

**Artigos Médicos: Veículos Passíveis de Transmissão de
Staphylococcus aureus às Gestantes no Atendimento Básico
de Saúde**

Angela Maria de Souza Breves Rodrigues

Curso de Especialização em Controle da Qualidade de
Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância
Sanitária Instituto Nacional de Controle de Qualidade em
Saúde Fundação Oswaldo Cruz

Orientadoras: Neide Hiromi Tokumaru Miyazaki
Maysa Beatriz Mandetta Clementino

Rio de Janeiro

FOLHA DE APROVAÇÃO

Artigos Médicos: Veículos Passíveis de Transmissão de *Staphylococcus aureus* às Gestantes no Atendimento Básico de Saúde

Angela Maria de Souza Breves Rodrigues

Monografia submetida à Comissão Examinadora composta pelos professores e tecnologistas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Especialização em Controle da Qualidade em Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária.

Aprovada:

_____ (Doutor em Ciências – Vigilância Sanitária)
Dr. Antonio Eugenio C.C. Almeida

_____ (Doutor em Ciências – Microbiologia)
Dr. Ivano Raffaele V. F. Capasso

_____ (Mestre em Ciências – Microbiologia)
Prof.^a Lúcia Maria Corrêa Werneck

Orientadoras: Dra. Neide H. T. Miyazaki

Dra. Maysa B. M. Clementino

Rio de Janeiro

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Rodrigues, Angela Maria de Souza Breves

Artigos Médicos: Veículos Passíveis de Transmissão de *Staphylococcus aureus* à Gestantes no Atendimento Básico de Saúde/ Angela Maria de Souza Breves Rodrigues. Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2009.

xv, 51f., il., Quadr., graf.

Trabalho de conclusão de Curso (Especialização em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2009.

Orientador: Neide Hiromi Tokumaru Miyazaki.
Maysa Beatriz Mandetta Clementino.

1. *Staphylococcus aureus*, 2. artigos médicos, 3. infecção hospitalar, 4. tDNA-PCR I. Título.

Aos meus pais, Epitácio e Marcellina
Ao meu marido Luiz Fernando
Aos meus filhos Hugo e Isis

A minha neta Lorena

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará
ao seu tamanho original”*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Deus por me abençoar e me acompanhar em todos os momentos da minha vida.

A Coordenação de Pós Graduação em Vigilância Sanitária do INCQS/ Fiocruz, e a equipe de profissionais de saúde do Centro Municipal de Saúde Jorge Saldanha Bandeira de Melo, por terem acreditado, e permitido a realização deste trabalho.

À minha orientadora, Dra. Neide, pela orientação dedicada, pelo repasse de seus conhecimentos, mas também por ter permitido que eu realizasse parte deste estudo em seu laboratório.

À minha orientadora Dra. Maysa, não só pela excelente orientação, mas também pela amizade, carinho, apoio, incentivo e ensinamentos valiosos durante o desenvolvimento deste trabalho.

A bolsista Ana Paula (Aninha), pequena no tamanho, porém grande profissional, que foi uma pedra preciosa imprescindível e muito importante para o desenvolvimento e a finalização do meu trabalho.

A todos os funcionários e bolsistas dos laboratórios de Saneantes e de Microrganismos de Referência do Departamento de Microbiologia do INCQS/Fiocruz, que de alguma maneira me ajudaram nos momentos difíceis, seja auxiliando-me nas minhas tarefas como também com palavras de apoio e estímulo.

A todos os membros da banca examinadora meu muito obrigado por aceitarem de participar dessa fase do trabalho.

As amigas, Mara (INCQS), Vera e Tânia (CMS) pela força, estímulo e dedicação para comigo.

A toda a minha família, Luiz Fernando meu marido, Isis e Hugo meus filhos, Eptácio e Marcellina meus pais, Sérgio e Lycia meu genro e minha nora, pelo incentivo e o amor concedidos. Em especial a minha netinha Lorena, que veio iluminar mais ainda a minha vida com sua chegada nesse período de muito trabalho e dedicação. Amo todos vocês.

RESUMO

Staphylococcus aureus é o patógeno humano de maior importância entre os *Staphylococcus* por causar infecções severas, de origem comunitária e hospitalar. São agentes etiológicos de infecções na pele causando doenças como impetigo, foliculite, furúnculo, carbúnculo e também infecções mais profundas como osteomielite, endocardite, pneumonia e outras. Entre os microrganismos associados à etiologia dessas infecções, o *S. aureus* permanece como importante patógeno, sendo responsável por mais de 30% dos casos de infecções hospitalares. Nas unidades de saúde, os reservatórios são representados por artigos médicos, pacientes colonizados, funcionários e pelo próprio ambiente. As infecções hospitalares representam um grave problema de saúde pública e o seu melhor conhecimento, prevenção e controle, constitui um desafio a ser enfrentado. Dentro desta perspectiva realizamos as análises de caracterização dos isolados, das superfícies de artigos médicos não críticos, através de algumas provas bioquímicas e da amplificação por PCR dos espaços entre os genes do tRNA - tDNA-PCR. Os 14 isolados que se apresentaram como coagulase e catalase positivas foram confirmados através da tDNA-PCR como *S. aureus*.

Os resultados obtidos comprovam a presença de *S. aureus* nos artigos não críticos analisados (estetoscópio, esfigmomanômetro e sonar Doppler), apontam e alertam para falhas no processo de limpeza e desinfecção dos mesmos. Podemos concluir que a utilização destes equipamentos contaminados, sem as devidas precauções, pode ser responsável pela disseminação de bactérias no ambiente hospitalar, dentre elas o *S. aureus*.

Palavras chave: *Staphylococcus aureus*, artigos médicos, infecção hospitalar, tDNA-PCR.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is the most important human pathogen among staphylococci causing severe infections from communitarian and hospital origin. They are etiological agents of several diseases including skin infections as folliculitis, furuncle and carbunculum-like infections as well as osteomyelitis, endocarditis, pneumonia, among others. *S. aureus* remains as the most important pathogen, being responsible for more than 30% of hospital infections cases. In the health units, the reservoirs are represented by medical articles, colonized patients, employees and the environment. The hospital diseases represent a serious problem of public health and its best knowledge, prevention and control constitute a challenge to be opposed. Within this perspective we performed the characterization of isolates from non-critical medical articles through some biochemical tests and the amplification of the spacers between tRNA genes - tDNA-PCR. According to the coagulase and catalase production, it was possible to characterized 14 isolates as *S. aureus* strains, those were confirmed through t-DNA PCR. The generated results prove the presence of *S. aureus* in non-critical articles (stethoscope, sphygmomanometer, doppler sonar), pointing to failures in their cleaning and disinfection processes. We can conclude that the utilization of contaminated equipments, without adequate precautions, can be responsible for the dissemination of bacteria in hospital environment, mainly by *S. aureus*.

Key-words: *Staphylococcus aureus*, medical articles, hospital infection, tDNA-PCR.

LISTA DE ABREVIATURAS/ SIGLAS

ABC DO SUS – Cartilha do SUS

AMS – Agar Manitol Salgado

Anvisa – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – *American Type Culture Collection*

BHI – *Brain Heart Infusion*

CBC – Colégio Brasileiro de Cirurgiões

CD - Coeficiente de Dice

CGLAB/MS - Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública do Ministério da Saúde

CMS – Centro Municipal de Saúde

CNCIH - Comissão Nacional de Controle de IH

CP - Capsular Polysaccharides

cDNA - DNA complementar

dATP - desoxiadenosina trifosfatada

dCTP - desoxicitidina trifosfatada

dGTP - desoxiguanosina trifosfatada

dNTPs – desoxirribonucleotídeos trifosfatados

dTTP - desoxitimidina trifosfatada

DF – Distrito Federal

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNase - Desoxirribunuclease

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

EG – Estetoscópio (gestante = diafragma)

EP – Estetoscópio (profissional= olivas auriculares)

ESG – Esfigmomanômetro (gestante = braçadeira do manguito)

ESP – Esfigmomanômetro (profissional = pêra de borracha)

Fc – Fragmentos cristalizáveis

°C – Graus Celsius

HCL – Ácido Clorídrico

HTN – Hospital Regional Tibério Nunes

Id. - Idem

IgG – Imunoglobulinas séricas

LISTA DE ABREVIATURAS/ SIGLAS

IH – Infecção Hospitalar

IHs – Infecções Nosocomiais

IN – Infecção Nosocomial

IHs - Infecções Hospitalares

KCl - Cloreto de potássio

M – concentração molar

mg - miligrama

MgCl₂ – cloreto de magnésio

mL – mililitro

mM – milimolar

MRSA – Methicilin Resistant *Staphylococcus Aureus*

N – Normalidade

(-) negativo

ng - nanograma

NR – Não realizado

OPAS - Organização Pan-Americana de Saúde Pb – pares de base

PCIH – Programa de Controle de Infecção Hospitalar

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia pela polimerase)

PG – Estetoscópio de Pinard (gestante = borda inferior)

pH – potencial de hidrogênio

pmol – picomol

(+) positivo

PP - Estetoscópio de Pinard (profissional = borda superior)

RDC – Resolução Colegiada

Rede RM - Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde

RNA – Ácido ribonucléico

Rpm – rotações por minuto

S.aureus - *Staphylococcus aureus*

SEs – Enterotoxinas estafilocócicas

SNAS – Secretaria Nacional da Assistência Social

rDNA – DNA ribossômico

LISTA DE ABREVIATURAS/ SIGLAS

SDM – Sonar Doppler de mesa

SDPO – sonar Doppler portátil

SUS – Sistema Único de Saúde

TAE - Tris acetato EDTA

Taq = Thermus aquaticus

TBS - *Trypticase soy broth*

TE - Tris EDTA

Tris - Hidroximetil amino metano

Tris-HCl - Tris Hidrocloro

TSST- Síndrome do choque tóxico

U – unidade

V – volume

Volts – voltagem

µg – micrograma

µL – microlitro

µM – micromolar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Microscopia eletrônica de *S.aureus*.

Figura 2: Impetigo: lesão cutânea localizada.

Figura 3: Furúnculo estafilocócico.

Figura 4: Fotos dos sítios da coleta das amostras nos artigos não críticos.

Figura 5: Placa com Agar manitol salgado com colônias positivas.

Figura 6: Característica morfotintorial pela técnica de coloração de Gram gênero *Staphylococcus*.

Figura 7: Prova da Coagulase.

Figura 8: Prova da Catalase.

Figura 9: Prova da DNase.

Figura 10: Perfis de bandas das cepas de referências do INCQS.

Figura 11: Dendrograma das cepas de referências do INCQS.

Figura 12: Perfis de bandas das cepas de *S. aureus* da 1ª coleta.

Figura 13: Perfis de bandas das cepas de *S. aureus* da 2ª coleta

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Frequência de microrganismos isolados e notificados à Rede RM de Jul/2006 a Mar/2007

Quadro 2: Resultados da prova do Agar manitol salgado das amostras.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Gráfico do resultado da coloração de Gram das amostras.

Gráfico 2: Gráfico do resultado da prova da coagulase das amostras.

Gráfico 3: Gráfico do resultado da provas bioquímicas das amostras.

Gráfico 4: Gráfico do percentual de artigos médicos contaminados.

Sumário

| | |
|--|----|
| 1. Introdução..... | 1 |
| 1.1. Staphylococcus aureus | 1 |
| 1.2. Epidemiologia | 2 |
| 1.3. Fatores de Virulência | 3 |
| 1.4. Isolamento e Identificação | 4 |
| 1.5. Resistência aos antimicrobianos terapêuticos | 4 |
| 1.6. Sistema Único de Saúde..... | 5 |
| 1.7. Unidades Ambulatoriais | 5 |
| 1.8. Infecção Hospitalar | 6 |
| 1.9. Artigos Médicos e a Infecção Microbiana..... | 8 |
| 2. Objetivos..... | 13 |
| 2.1. Objetivo Geral..... | 13 |
| 2.2. Objetivos Específicos..... | 13 |
| 3. Materiais e Métodos | 14 |
| 3.1. Amostragem..... | 14 |
| 3.2. Coleta das amostras | 14 |
| 3.3. Isolamento e caracterização fenotípica..... | 15 |
| 3.3.1. Isolamento..... | 15 |
| 3.3.2. Verificação da pureza da cultura - características morfo-tintoriais | 16 |
| 3.3.3. Estoque dos microrganismos isolados | 17 |
| 3.3.4. Produção de coagulase..... | 17 |
| 3.3.5. Produção de catalase..... | 17 |
| 3.3.6. Produção de DNase | 18 |
| 3.4. Identificação Molecular | 18 |
| 3.4.1. Cepas de referência utilizadas: | 19 |
| 3.4.2. Extração, purificação e dosagem DNA genômico: | 19 |
| 3.4.3. Reação em cadeia pela polimerase - tDNA-PCR: | 19 |
| 3.4.4. Eletroforese: | 19 |
| 3.4.5. Análise dos perfis de bandas: | 20 |
| 3.4.6. Reprodutibilidade:..... | 20 |
| 3.4.7. Preservação dos isolados: | 20 |
| 4. Resultados e Discussão..... | 21 |
| 5. Conclusões..... | 32 |
| 6. Referências Bibliográficas | 34 |
| 7. ANEXO I..... | 44 |
| 1. Meios de Cultura e Condições de Cultivo | 44 |
| 2. Provas Bioquímicas: | 44 |
| 3. Métodos de Preservação | 49 |
| 4. Preparo de géis e tampões..... | 50 |

1. Introdução

1.1. *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* (do grego “staphy” = cacho de uvas e “coccus” = semente) pertencente à família *Staphylococcaceae* e inclui mais de 30 espécies conforme o *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology* (2005). Este microrganismo apresenta-se em forma, cocos Gram positivos agrupados em massas irregulares ou em forma de cachos de uva são imóveis, aeróbios ou anaeróbios facultativos (SANTOS et al., 2007).

O *S. aureus* (Figura 1) é uma das espécies mais importantes pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, e está envolvido em infecções humanas, tanto de origem comunitária quanto hospitalar (CASEY, LAMBRET & ELLIOTT, 2007). É diferenciado das outras espécies por produzir a enzima coagulase (FRANCO & LANDRAF, 2003), crescer geralmente em meio com 10% de cloreto de sódio (NaCl) e possuir temperatura ótima de crescimento entre 30-37°C. São patógenos oportunistas e a maioria das cepas produz enzimas chamadas de hemolisinas, desoxirribonuclease (DNase), nuclease termoestável, catalase e são capazes de fermentar o manitol (KONEMAM, ALLEN & JANDA, 2001; TRABULSI et al., 2002). Pode produzir diversas toxinas, que são substâncias de origem protéica, liberadas na corrente sanguínea, contribuindo assim para sua patogenicidade (KONEMAM, ALLEN & JANDA, 2001). Estas podem causar intoxicação alimentar provocada pela ingestão do alimento contaminado com *S. aureus*, que se dá pela toxina pré-formada (A, B, C1, C2, C3, D, E) chamadas de enterotoxinas, que são termoestáveis, podendo permanecer no alimento mesmo após o cozimento (FREITAS et al., 2005).

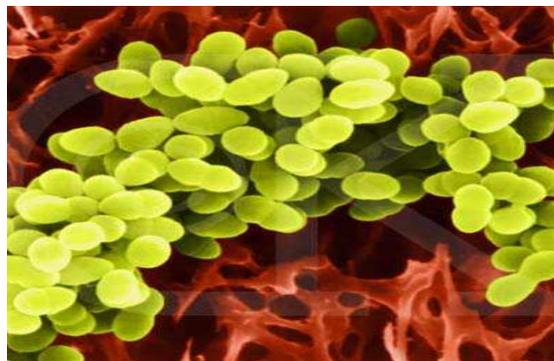


Figura 1: Microscopia eletrônica de *S.aureus*
Fonte: <http://swampie.wordpress.com/2008/02/17/>

1.2. Epidemiologia

O homem e os animais são os principais reservatórios de *S. aureus*. No corpo humano podem estar presente em várias partes como na garganta, no intestino, nas mãos, na pele e na cavidade nasal, que é apontada como a área mais importante como reservatório de *S. aureus*, tornando-se principal fonte de transmissão em alimentos, objetos e pacientes (SANTOS, 2000; CAVALCANTI, 2006). Esses microrganismos são agentes etiológicos de infecções na pele causando doenças como impetigo, foliculite, furúnculo e carbúnculo (Figuras 2 e 3), e também infecções mais profundas causando osteomielite, endocardite, pneumonia e, ocasionalmente, meningite, artrite bacteriana e bacteremia (KONEMAM, ALLEN & JANDA, 2001).



Figura 2: Impetigo: lesão cutânea localizada.

Fonte: http://www.clinical-virology.org/gallery/images/non_viral/impetigo-1.jpg



Figura 3: Furúnculo estafilocócico.

Fonte: <http://www.colegiosaofrancisco.com.br/alfa/furunculo/imagens/furunculo.jpg>

1.3. Fatores de Virulência

Estes fatores são: componentes da superfície celular, as toxinas e as enzimas extracelulares, que contribuem para a patogenicidade do microrganismo que é medida pela mortalidade que ele produz e/ ou por seu valor de invadir tecidos do hospedeiro, garantindo assim êxito em sua instalação e manutenção. (MORK, 2005).

A maioria das cepas de *S. aureus* possui uma cápsula polissacarídica, cuja função principal é proteger a bactéria contra a fagocitose. Com base na variabilidade antigênica os polissacarídeos capsulares (*Capsular Polysaccharides* – CP) permitem classificar as amostras em sorotipos, entre os quais, parecem prevalecer os sorotipos 5 (CP5) e 8 (CP8) (TRABULSI et al., 2004). A cápsula apresenta um papel importante na virulência de muitos patógenos bacterianos, geralmente atuando como um fator antifagocítico. Em *S. aureus* mais de 90% das cepas produzem cápsula e dentre, aproximadamente, 11 sorotipos identificados até o momento apenas alguns foram bem caracterizados. Quando cepas clínicas são analisadas quanto à produção de cápsula, verifica-se que aproximadamente 70% apresentam sorotipos CP5 ou CP8 (LUONG & LEE, 2002). Dentre os 11 sorotipos, CP5 e CP8 compreendem 80 a 85% de todos os isolados clínicos do sangue (NILSSON et al., 1997).

O *S. aureus* pode ainda apresentar a proteína A, que possui a capacidade de se ligar à porção Fc de muitas subclasses de IgG impedindo que os anticorpos interajam com as células fagocitárias (proteção contra a fagocitose juntamente com a cápsula) (HARTLEIB et al., 2000).

Os ácidos teicóicos, que são também considerados como um dos fatores de virulência, integram a parede celular e contribuem para a patogenicidade, ativando a via alternativa do complemento e estimulando a produção de citocinas (TRABULSI et al., 2004).

A capacidade de colonização e a patogenicidade do *S. aureus* são, portanto, uma consequência de seus fatores de virulência, os quais têm papel relevante na adesão celular, na captação de nutrientes e na sua evasão da resposta imunológica do hospedeiro. Esses fatores podem ser classificados, basicamente, nas três seguintes categorias: a) fatores relacionados com a aderência às células do hospedeiro ou à matriz extracelular, como a produção de moléculas de fibrinogênio, fibronectina, colágeno ou da enzima coagulase; b) fatores relacionados com a evasão da defesa do hospedeiro, como diversas enterotoxinas estafilocócicas (SEs A-E, G-J, K, L, M, O e P), a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST), a proteína A, lípases,

polissacarídeos capsulares; c) fatores relacionados com a invasão na célula do hospedeiro e a penetração nos tecidos ou adesão de superfícies de cateteres e próteses, os quais incluem as proteínas (toxinas) a, b, d, g e d– hemolisinas (VELAZ-MEZA, 2005).

1.4. Isolamento e Identificação

O isolamento é realizado em meios de culturas convencionais como, por exemplo, agar infusão de cérebro e coração, agar sangue e ou por meios seletivos, como o agar manitol salgado. (CASSETTARI, STRABELLI, MEDEIROS, 2005).

A identificação bioquímica é realizada através da produção da catalase, da coagulase, da DNase e da fermentação do manitol (ZAVADINACK et al., 2001) entre outros açúcares (MURRAY, 2004). Segundo Martinez (2001) o teste de coagulase em tubo com plasma comercial do coelho é o critério mais seguro para identificação das espécies de *S.aureus*. Muitos laboratórios de análises clínicas vêm utilizando métodos baseados na PCR para realizar o diagnóstico de *S. aureus*, que tem vantagens em relação aos métodos convencionais, pois oferece elevada eficácia e segurança, além de ser um método rápido e sensível (OLIVEIRA & LENCASTRE, 2002).

1.5. Resistência aos antimicrobianos terapêuticos

Embora o *S. aureus* ainda possa ser suscetível à ação de várias drogas ativas contra bactérias Gram-positivas (tais como penicilinas, cefalosporinas, eritromicina, aminoglicosídeos, tetraciclina e clorafenicol), é também conhecido pela sua elevada capacidade de desenvolver resistência a diversas delas (SILVA et al., 2007).

O uso indiscriminado das penicilinas levou ao surgimento das primeiras bactérias resistentes a este fármaco, resistência esta, mediada pela produção de enzimas β -lactamases. Numa tentativa de reverter este problema foram produzidas as penicilinas resistentes às β -lactamases, o que deu origem a um novo grupo de microrganismos resistentes a vários quimioterápicos incluindo, a oxacilina e a meticilina. Entretanto, logo após a introdução desses fármacos, surgiram as primeiras cepas de *S.aureus* resistentes a meticilina, denominadas em inglês, de *Methicilin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Estes microrganismos emergiram como

importantes patógenos associados à elevada morbidade e mortalidade, propagando-se entre pessoas através das mesmas infectadas ou através de contato indireto ao tocar objetos (toalhas, lençóis, roupas ou equipamentos médicos) (Id., 2007).

1.6. Sistema Único de Saúde

O Sistema Único de Saúde (SUS) foi criado pela Constituição Federal vigente (BRASIL, 1988) e regulamentado pelas Leis Federais 8.080/90 (BRASIL, 1990), 8.142/90 (BRASIL, 1990b) e por Normas Operacionais do Ministério da Saúde. Caracteriza-se pelo conjunto de ações e serviços de saúde prestados gratuitamente por instituições e órgãos públicos federal, estaduais e municipais, das administrações diretas e indiretas e fundações mantidas pelo poder público, podendo contar com a participação complementar do setor privado. Tem como diretrizes básicas a descentralização político administrativa da gestão dos sistemas de saúde, o atendimento integral e a participação da comunidade na formulação e no controle da execução das políticas de saúde (BRASIL, 2001).

O Ministério da Saúde, gestor federal do SUS, desenvolve ações para aprimorar a qualidade e ampliar a divulgação de dados e indicadores de Saúde. Esses dados são disponibilizados ao público através do Anuário Estatístico de Saúde do Brasil. O Anuário oferece informações sócio-econômicas sobre a organização do sistema de saúde, características e dinâmica da população, perfil de mortalidade, morbidade e fatores de risco, rede de serviços, recursos humanos, recursos financeiros, além da produção e cobertura de diversos serviços de saúde (Id., 2001).

1.7. Unidades Ambulatoriais

As Unidades Ambulatoriais do SUS são unidades que prestam serviços de saúde em regime de não internação. A natureza desses prestadores de serviço está agrupada em pública (federal, estadual, municipal), privada (privada com fins lucrativos, filantrópicos e sindicatos), universitária pública e universitária privada. Os tipos de unidades estão definidos em função da estrutura e capacidade de atendimento das unidades ambulatoriais: Posto de Saúde, Centro de Saúde, Policlínica, Ambulatório de Unidade Hospitalar Geral, Ambulatório de Unidade Hospitalar Especializado, Unidade Mista de Saúde, Pronto-Socorro Geral, Pronto-Socorro Especializado, Consultório, Unidade Móvel Fluvial, Clínica Especializada, Centro/Núcleo de Reabilitação, outros

Serviços Auxiliares de Diagnóstico e Terapia, Unidade Móvel Terrestre para Atendimento Médico/Odontológico, Unidade Móvel Terrestre do Programa de Enfrentamento a Emergências e Traumas, Farmácia para Dispensação de Medicamentos, Unidade de Saúde da Família, Centro de Alta Complexidade em Oncologia III, e Unidade de Vigilância Sanitária (Id., 2001).

A Secretaria de Assistência a Saúde (SNAS), através do ABC do SUS, nomenclatura, parâmetros e instrumentos de planejamento, publicada em 1990, definiu os centros de saúde como unidades destinadas a prestar assistência a uma população determinada, contando com uma equipe, interdisciplinar em caráter permanente, com médicos generalistas e/ou especialistas. Sua complexidade e dimensões físicas variam em função das características da população a ser atendida, do seu tamanho e sua capacidade resolutiva. Podem ser agrupados em três tipos (tipo 1, 2 e 3) de acordo com o número de habitantes: (1): entre 2.000-5.000, (2): entre 5.000-15.000 e (3): entre 15.000-30.000 respectivamente. Os centros de saúde tipo 3 serão a referência para outros centros de saúde de menor complexidade, na sua área. Dependendo das características locais, os centros de saúde poderão contar com atendimento de urgência, nas 24 horas, e leitos de observação (BRASIL, 1990a).

1.8. Infecção Hospitalar

O século XIX foi marcado por descobertas revolucionárias no campo da Microbiologia para a prevenção das infecções hospitalares, época em que os hospitais eram desprovidos de água corrente, e quando dispunha era contaminada, lixo e dejetos eram jogados em poços nos fundos dos terrenos, os cirurgiões limpavam suas mãos e instrumentos nos seus aventais e as roupas de cama não eram trocadas com frequência (FONTANA, 2006).

No início do século XX, com a disseminação do princípio de que tudo que entrasse em contato com o campo cirúrgico deveria ser estéril, foi adotado então o uso de luvas, capotes, gorros, máscaras e material cirúrgico estéril (COUTO, 2000). Com o objetivo de prevenir as infecções, a introdução de agentes antimicrobianos na década de 30, tornou possível o desenvolvimento de cirurgias cada vez mais elaboradas (COUTO; VERONESI; FOCACCIA, 2000).

O problema da infecção hospitalar (IH) no Brasil foi assumido pelo Estado em 1983, quando foi publicada a Portaria MS nº 196, tornando obrigatória a implantação de

comissões de controle de IH em todos os hospitais. Em 1987, foi criada a Comissão Nacional de Controle de IH (CNCIH), com representantes de vários estados. Em 1988, a Portaria nº 232 criou o Programa Nacional de Controle de Infecção Hospitalar (PCIH) (BRASIL, 1983, 1987, 1988b). Só a partir de 1985, com a repercussão da morte do ex-presidente Tancredo Neves, em consequência de IH, essa questão assumiu uma dimensão maior sensibilizando a população em geral (BRASIL, 2004). A partir da década de 1990, o serviço de prevenção de IH passou a ser considerado como programa prioritário de garantia da qualidade na área de assistência médica, caracterizando-se pela expansão cada vez maior do campo da epidemiologia hospitalar, sendo fundamental o uso de ferramentas epidemiológicas e da estatística no entendimento dos vários problemas hospitalares (OLIVEIRA, 1999).

As atividades do controle de IH, até então desenvolvidas no âmbito do Departamento de Gestão de Políticas da Secretaria de Políticas de Saúde, dispostas na Portaria GM 1.241, de 13 de outubro de 1999, passaram a ser executadas pela Anvisa, logo após sua criação em 26 de janeiro de 1999, pela Lei nº 9.782. Em junho de 2000, este órgão publicou o Roteiro de Inspeção na RDC nº 48 com o objetivo de estabelecer a sistemática para avaliação do cumprimento das ações do PCIH e definiu a IH como aquela adquirida após a admissão do paciente na Unidade Hospitalar e que pode manifestar-se durante a internação, ou após a alta, quando se relaciona com a internação ou procedimentos (BRASIL, 2000).

A Anvisa em parceria com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) e a Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública do Ministério da Saúde (CGLAB/MS) em 2004, criou a Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde (Rede RM) que tem como principal foco a assistência à saúde mais efetiva por meio do uso adequado de antimicrobianos e da detecção, prevenção e controle da emergência de resistência microbiana em serviços de saúde do país.

A Rede RM tem como objetivos a padronização dos métodos para o uso em laboratórios de Microbiologia da rede de Saúde Pública, capacitando-os para atuarem na rede de identificação e confirmação da resistência microbiana, bem como, as comissões de controle de infecção do Distrito Federal (DF), estados, municípios e hospitais que fornecem dados epidemiológicos das infecções encontradas (BRASIL, 2007a). Os primeiros resultados publicados pela Rede RM estão demonstrados no Quadro1, sobre os microrganismos isolados e notificados pelos hospitais, referentes ao

período de Jul/2006 a Mar/2007, onde destacamos o *S. aureus*, com uma frequência de 17.3%, ocupando o segundo lugar como agente causador de IH (BRASIL, 2007b).

Quadro 1: Frequência de microrganismos isolados e notificados à Rede RM de Jul/2006 a Mar/2007

| Espécie | Total | |
|---------------------------------|-------|------|
| | N. | % |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 186 | 17.3 |
| <i>Staphylococcus coag. neg</i> | 249 | 23.1 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 171 | 15.9 |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | 109 | 10.1 |
| <i>Acinetobacter spp</i> | 27 | 2.5 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 128 | 11.9 |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | 22 | 2.1 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 36 | 3.3 |
| <i>Enterobacter spp</i> | 7 | 0.7 |
| <i>Escherichia coli</i> | 57 | 5.3 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 38 | 3.5 |
| <i>Enterococcus faecium</i> | 4 | 0.4 |
| <i>Enterococcus spp</i> | 12 | 1.1 |
| <i>Candida albicans</i> | 17 | 1.6 |
| <i>Candida não albicans</i> | 13 | 1.2 |
| Total | 1076 | 100 |

Fonte: Rede RM-ANVISA/CGLAB/OPAS (BRASIL, 2007b).

Dados do Ministério da Saúde (MS) mostram que a taxa de pacientes com IH no Brasil é de 15% enquanto a média proposta pela Organização Mundial da Saúde é de 8%. Segundo o Colégio Brasileiro de Cirurgiões (CBC), 45 mil pessoas morrem por ano no Brasil, de um total de 12 milhões de internações, vítimas de IH. O problema gera um custo anual de R\$ 10 bilhões aos cofres públicos (MALUF et al., 2002; SILVA, 2003).

1.9. Artigos Médicos e a Infecção Microbiana

Nos centros de saúde são realizados alguns procedimentos que envolvem a utilização de artigos médicos destinados a fornecer suporte a procedimentos diagnósticos, terapêuticos, cirúrgicos e são classificados, segundo os riscos de transmissão de infecções para os pacientes, em três categorias: críticos, semicríticos e não críticos (BRASIL, 1988a). Os artigos críticos são objetos, equipamentos e instrumentos odontológicos, médicos e hospitalares, bem como seus acessórios, que entram em contato com tecidos subepiteliais, tecidos lesados, órgãos e sistema vascular. Incluem-se nesta categoria o material cirúrgico, os cateteres cardíacos e vesicais, os implantes, os fluídos intravenosos, e devem ser tratados com processo de esterilização (Id., 1988a).

Os artigos semicríticos são os objetos e equipamentos odontológicos, médicos e hospitalares que entram em contato com mucosas tais como equipamento anestésico, endoscópio, e estes devem sofrer a desinfecção de alto nível (quando os desinfetantes (físico ou químico) são eficazes contra todas as formas vegetativas, e destroem uma parte dos esporos quando utilizados entre 10 e 30 minutos (BRASIL, 1994)) (BRASIL, 1988a).

Os artigos não críticos são os objetos e equipamentos odontológicos, médicos e hospitalares que entram em contato apenas com a pele íntegra ou mesmo não entram em contato direto com os pacientes como termômetros, bacias, roupas de cama do paciente, manguitos de esfigmomanômetros, estetoscópios, entre outros. Estes equipamentos devem ser submetidos à desinfecção de baixo nível (quando os desinfetantes têm atividade contra bactérias vegetativas, mas não destroem, esporos (BRASIL, 1994)) utilizando o álcool etílico, o álcool isopropílico, o hipoclorito de sódio (KALIL & COSTA, 1994) ou outros princípios ativos (BRASIL, 1988a).

Pelo fato dos artigos não críticos serem os mais utilizados nas atividades médicas diárias como instrumentos de uso universal tanto no ambiente hospitalar como ambulatorial (ARAÚJO, OLIVEIRA & SANTOS, 2000), e por repetidas vezes entrarem em contato direto com muitos pacientes, tornam-se possíveis fontes de transmissão de infecções. Maluf et al. (2002) e Villamil et al. (2004) citaram que a utilização dos artigos médicos sem as devidas precauções poderia ser responsável pela disseminação de bactérias no ambiente hospitalar, dentre elas o *S. aureus*, e que pouca atenção tem sido dispensada, principalmente no que se relaciona à limpeza e a desinfecção. Por esse motivo Gialluly et al. (2006) ressaltaram a urgente necessidade de alertar e de

informar aos profissionais de saúde sobre o potencial risco de IH com o manuseio dos artigos médicos não críticos.

Segundo Schabrun, Chipchase & Helthcare (2006) artigos médicos vêm sendo identificados como fonte de infecções nosocomiais (INs) e pesquisas indicam que um terço dessas infecções pode ser prevenido através da prática rotineira de lavagem das mãos e da limpeza adequada dos equipamentos. Estudos envolvendo a detecção de contaminantes em artigos médicos demonstraram a presença de microrganismos resistentes à meticilina (MRSA) em 85% dos estetoscópios analisados (MADAR, NOVAKOVA & BASKA, 2005). Outro dado relevante foi encontrado em análises microbiológicas envolvendo 40 estetoscópios, onde foi verificada a presença de diferentes bactérias, sendo a maioria por *Staphylococcus* coagulase negativo (MARINELLA, PIERSON & CHENOWETH, 1997).

As INs representam um dos principais problemas da qualidade da assistência médica, um problema econômico devido à importante incidência e letalidade significativa, assim como os custos diretos e indiretos, como aqueles representados pela impossibilidade de retorno ao mercado de trabalho. Atualmente, as INs representam um grave problema em todos os ambientes de saúde, pois 4 a 10% dos pacientes hospitalizados adquirem algum tipo de infecção anualmente (SCHABRUN, CHIPCHASE & HEALTHCARE, 2006).

No Brasil, alguns estudos têm demonstrado que os artigos médicos não críticos contaminados são importante fonte de IH. Maluf et al. (2002) analisaram trezentos diafragmas de estetoscópios utilizados, em diversas seções das instalações hospitalares de um hospital em Sorocaba, São Paulo, por médicos (63 amostras), residentes (54 amostras), internos (106 amostras), estudantes de enfermagem (33 amostras) e setores específicos (36 amostras). Oitenta e sete por cento dos estetoscópios analisados estavam contaminados, sendo o *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativo os mais freqüentes em relação à presença de mais de um microrganismo no diafragma do estetoscópio. Outro exemplo foi a pesquisa realizada no Hospital Regional Tibério Nunes (HTN), no Piauí, entre o período de maio a setembro de 2007, onde foram analisadas as condições microbiológicas das instalações do hospital, antes e após a limpeza das unidades. Foi verificada pouca eficiência dos procedimentos da limpeza em relação aos parâmetros microbiológicos analisados. O resultado obtido sugeriu a implementação de procedimentos de

limpeza e desinfecção de superfícies, com o intuito de reduzir os riscos de uma IH (ABREU et al., 2008).

Os procedimentos adotados incluem a coleta, o cultivo e a caracterização bacteriana dos isolados. Essa caracterização é realizada de acordo com esquemas de identificação convencionais, incluindo características morfológicas, bioquímicas, sorológicas, entre outras. A partir dos anos 90, métodos genotípicos de taxonomia, direcionados para moléculas de DNA ou RNA, vêm sendo amplamente utilizados na identificação molecular bacteriana. Esses métodos são uma consequência do progresso tecnológico experimentado pela biologia molecular nas décadas recentes e atualmente dominam os estudos taxonômicos modernos (VANDAMME et al., 1996).

Uma das principais estratégias de identificação bacteriana consiste, na análise do gene codificador da subunidade 16S ribossomal. A reação em cadeia pela polimerase (PCR) desse gene oferece a possibilidade de identificação bacteriana através de um único par de iniciadores, específicos para regiões conservadas do rDNA (DRANCOURT et al., 2000). Este método pode implementar e concluir a identificação bacteriana fenotípica devido a sua distribuição universal entre as bactérias e pela presença de regiões variáveis espécie específicas (WEISBURG et al., 1991). Esta abordagem tem sido extensivamente adotada, e possui atualmente um dos maiores bancos de dados, o que possibilita a identificação de um grande número de organismos (VAN DE PEER et al., 1996). Embora seja bastante utilizado por muitos laboratórios, sua implementação requer um investimento inicial alto envolvendo a aquisição de equipamentos sofisticados e reagentes caros, o que limita sua ampla utilização (BOER; BEUMER, 1999).

A partir do exposto podemos considerar que os ambientes hospitalares, incluindo todas as instalações que cercam o paciente, guardam íntima relação com as infecções, podendo proporcionar focos de contato e de transmissão, como mostrou estudo de Bhalla et al. (2004). Embora a maioria das patologias seja causada por microrganismos através das infecções endógenas, não se pode desconsiderar a parcela importante das infecções exógenas que acomete àqueles expostos a microrganismos com potencial para provocar doenças (MURRAY et al., 2006).

Considerando a relevância dos estudos que evidenciam a presença de contaminação microbiana em equipamentos médicos nas unidades de saúde, bem como os riscos de transmissão de infecções para pacientes e profissionais de saúde,

direcionamos o foco deste trabalho na detecção e caracterização do *S. aureus* nos artigos não críticos em um centro de saúde do Rio de Janeiro.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi investigar a presença de *Staphylococcus aureus* em artigos médicos e identificá-los de acordo com metodologias fenotípica e molecular, em uma unidade de atendimento básico de saúde.

2.2. Objetivos Específicos

- Realizar a coleta das amostras em 5 artigos médicos não críticos, na clínica de pré-natal do Centro Municipal de Saúde Jorge Saldanha Bandeira de Melo, Rio de Janeiro;
- Realizar o cultivo e o isolamento de cepas de *S. aureus* em meio de cultura seletivo;
- Verificar a produção das enzimas coagulase, catalase e Dnase nos isolados suspeitos de *S. aureus*;
- Caracterizar os isolados de *S. aureus* por meio da técnica molecular da tDNA-PCR;
- Evidenciar a presença de *S. aureus* nos artigos analisados e contribuir para alertar o profissional de saúde da importância da limpeza e desinfecção dos artigos médicos não críticos.

3. Material e Métodos

3.1. Amostragem

Foram coletadas 16 amostras, das superfícies de cinco artigos médicos não críticos utilizados no atendimento às gestantes na clínica de pré natal de um centro municipal de saúde do Rio de Janeiro.

- Estetoscópio - olivas auriculares (EP) e membrana do diafragma (EG)
- Esfigmomanômetro - braçadeira do manguito (ESG) e pêra de borracha (ESP)
- Estetoscópio de Pinard - borda superior (PP) e borda inferior (PG)
- Sonar Doppler de mesa - parte inferior do transdutor (SDM)
- Sonar Doppler portátil - parte inferior do transdutor (SDPO)

3.2. Coleta das amostras

A amostra foi coletada com o auxílio de um *swab* seco estéril, através de fricção sobre a superfície do artigo selecionado (Figura 4). O *swab* foi imerso em tubo de ensaio contendo meio de cultura líquido *Brain Heart Infusion* (BHI) e transportado acondicionado em recipiente isotérmico para o laboratório de saneantes do INCQS/Fiocruz, sendo incubado a 37 °C por 24 - 48 h em estufa bacteriológica, onde foram utilizados os métodos convencionais para o isolamento e caracterização dos microorganismos presentes.

O total de 16 amostras foi coletado nos dias 07/07/2008 e 08/08/2008, dos mesmos artigos médicos: dois estetoscópios, dois esfigmomanômetros, dois estetoscópios de Pinard, um Sonar Doppler de mesa e um Sonar Doppler portátil.

Após o período de incubação foi realizada a técnica da coloração de Gram para verificar as características morfo tintoriais das células cultivadas. Foram encontrados as seguintes formas de microorganismos:

1ª Coleta: Estetoscópio: Cocos Gram Positivos, Bastonetes Longos Gram Positivos;
Esfigmomanômetro: Cocos Gram Positivos, Bastonetes Curtos Gram Positivos;
Sonar Doppler de Mesa: Cocos Gram Positivos; **Sonar Doppler Portátil:** Bastonetes Curtos Gram Positivos; **Estetoscópio de Pinard:** Cocos Gram Positivos, Bastonetes Curtos Gram Positivos, Bastonetes Longos Gram Positivos, Bastonetes Ligeiramente Curvos Gram Positivos.

2ª Coleta: Estetoscópio: Cocos Gram Positivos, Cocos Maiores Gram Positivos, Bastonetes Pequenos Gram Positivos, Bastonetes Grandes Gram Positivos; **Esfigmomanometro:** Cocos Gram Positivos, Bastonetes Pequenos Gram Positivos, Bastonetes Grandes Gram Positivos; **Sonar Doppler de Mesa:** Cocos Gram Positivos; **Sonar Doppler Portátil:** Não houve crescimento e Estetoscópio de Pinard: Cocos Gram Positivos, Bastonetes Grandes Gram Positivos, Bastonetes Menores Gram positivos

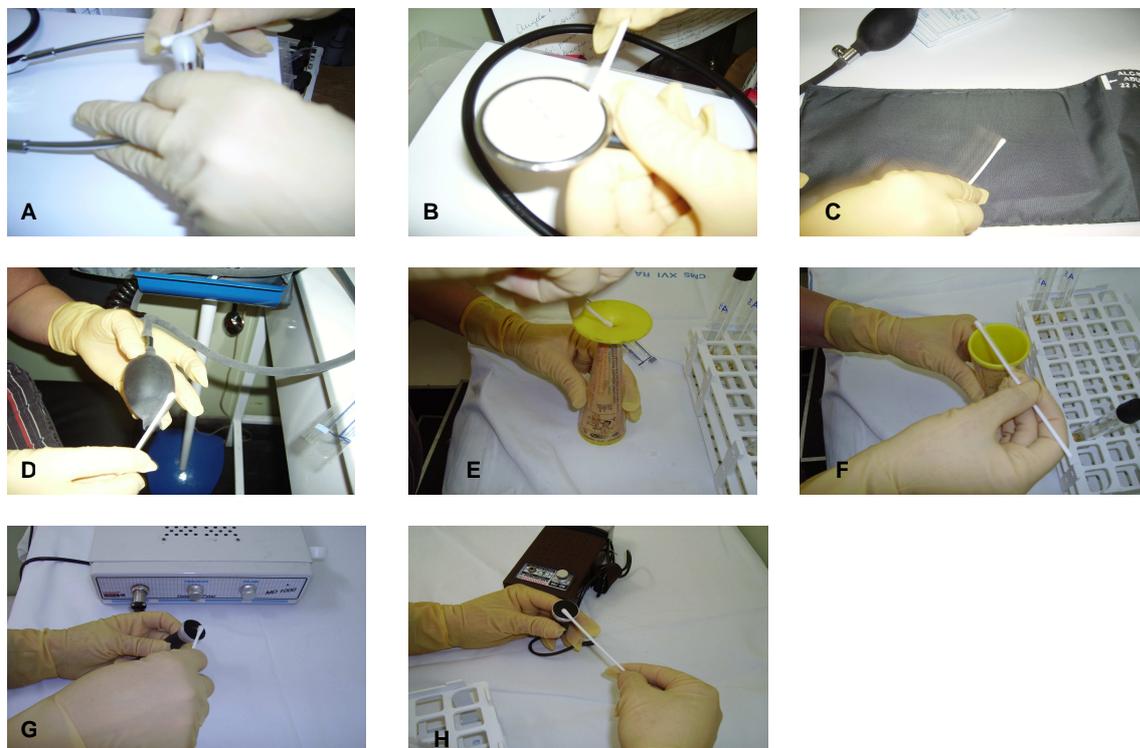


Figura 4: Fotos dos sítios da coleta das amostras nos artigos não críticos. A. Estetoscópio - Olivas auriculares; B. Estetoscópio – Diafragma; C. Esfigmomanômetro - (Braçadeira com manguito); D. Esfigmomanômetro - Pêra de borracha insufladora; E. Estetoscópio de Pinard - borda superior; F. Estetoscópio de Pinard - borda inferior; G. Sonar Doppler de mesa superfície inferior do transdutor; H. Sonar Doppler portátil - superfície inferior do transdutor.

3.3. Isolamento e caracterização fenotípica

3.3.1. Isolamento

As amostras que apresentaram turvação no caldo BHI foram semeadas, através da técnica de esgotamento em estrias, nas placas de Petri, contendo o meio de cultura sólido Agar manitol salgado (AMS) e incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24-48 h. (Figura 5) (TRABULSI et al. 2002).



Figura 5: Placa com meio de cultura AMS com colônias positivas fermentadoras do manitol.

3.3.2. Verificação da pureza da cultura - características morfo-tintoriais

A partir das placas contendo AMS uma unidade formadora de colônia (UFC), que fermentou o manitol de cada um dos isolados, foi semeada em tubo contendo caldo BHI e incubada a 37 °C por 24-48h. Após o período de incubação, as características morfo-tintoriais do isolado foi realizada através da coloração de Gram (Figura 6) (BIER,1976).

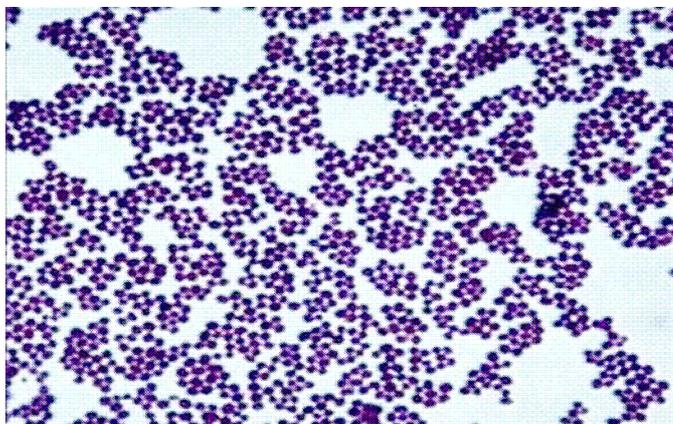


Figura 6: Coloração de Gram - *Staphylococcus* spp.
Fonte: Tortora, Funke & Case (2005).

3.3.3. Estoque dos microrganismos isolados

Após a verificação da pureza e das características morfo-tintoriais, alíquotas de 800 µL foram transferidas para tubos de crio-preservação, adicionadas de solução de glicerol a 50% para concentração final de 10%, homogeneizadas e estocadas em freezer a – 20 ° C (BIER, 1976) (Anexo1).

3.3.4. Produção de coagulase

A produção da coagulase livre foi verificada adicionando-se 0,5 mL de uma cultura de 18 - 24 h em meio BHI a um tubo contendo 0,5 mL de plasma de coelho com EDTA (Becton Dickinson), incubados a 37 °C em estufa bacteriológica. As leituras foram realizadas a cada hora, durante 4 - 5 horas para verificar a formação do coágulo (Figura 7). Quando não foi possível visualizar o coágulo ao final deste tempo o ensaio foi repetido, porém incubando a 35 °C em banho termostático, durante 24 horas. (SPERBER, TATINI, 1975; RIBEIRO, SOARES, 1993; NEDER, 1992).

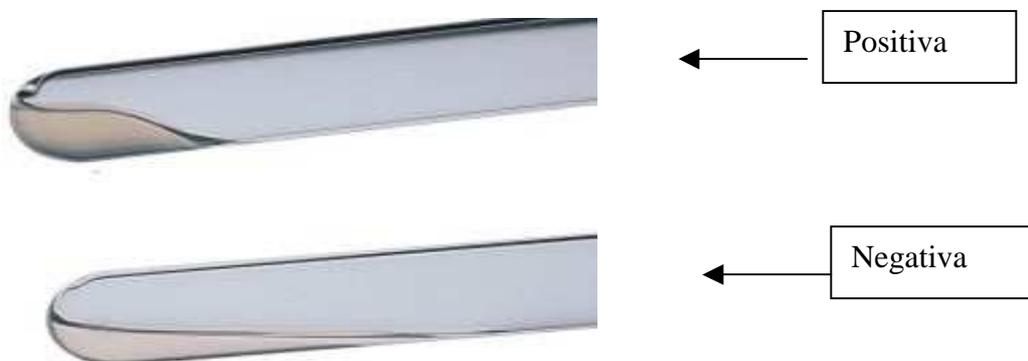


Figura 7: Prova Bioquímica da Coagulase em Tubo

Fonte: <http://www.laborclin.com.br/Tecnicas/manuais/microbiologia/stafi.htm>

3.3.5. Produção de catalase

A prova da catalase foi realizada a partir de uma cultura em agar BHI inclinado obtida após incubação de 18-24 h a 37 °C. Uma pequena alçada da cultura foi transferida para uma lâmina de vidro limpa e sobre esse crescimento bacteriano foi adicionada de uma gota de solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3%. (Id., 1975;

1993; 1992). O resultado foi considerado positivo, quando imediatamente apresentou efervescência devido à produção de gás, que aparecerá borbulhando. (Figura 8).

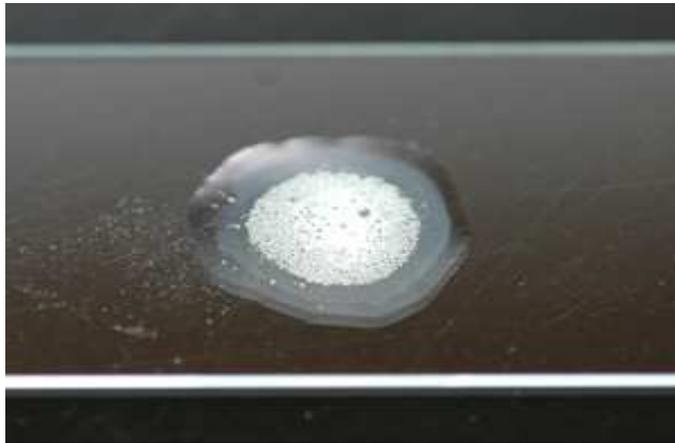


Figura 8: Prova Bioquímica da Catalase com borbulhamento.

Fonte:

https://www.hardydiagnostics.com/catalog2/hugo/refphoto/z62_catalasereagent_saureus_25923_hugo.jpg.

3.3.6. Produção de DNase

Uma alçada da cultura em caldo BHI obtida após incubação a 37 °C por 18-24 h foi semeada em placa de Petri contendo agar DNase, incubada a 37 °C por 18-24 h e adicionada de solução de ácido clorídrico (HCl 1N) para visualização de halo em torno do crescimento bacteriano (Figura 9) (JAWETZ, MELNICK & ADELBERG, 2000).

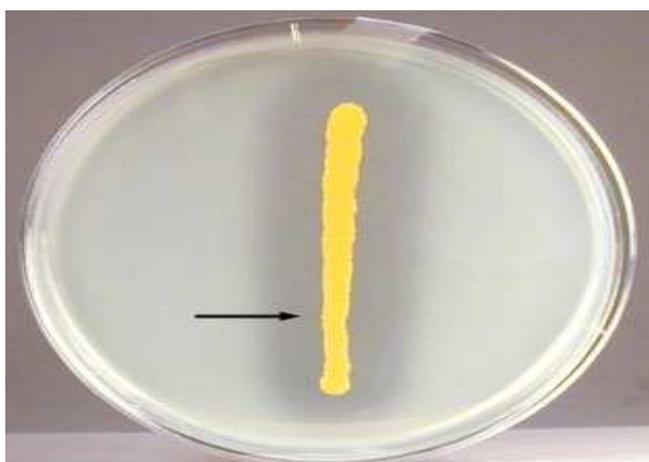


Figura 9. Prova Bioquímica da DNase positiva (halo transparente)

Fonte; <http://student.cbcemd.edu/courses/bio141/labmanua/lab15/dnasa.html>

3.4. Identificação Molecular

3.4.1. Cepas de referência utilizadas:

Staphylococcus aureus INCQS 00039 ATCC 6538; *Staphylococcus warneri* INCQS 00243 ATCC 10209; *Staphylococcus hominis* INCQS 00359 ATCC 27844; *Staphylococcus saprophyticus* INCQS 00233 ATCC 15305; *Staphylococcus simulans* INCQS 00254 ATCC 27851; *Staphylococcus epidermidis* INCQS 00016 ATCC 12228; *Staphylococcus xylosum* INCQS 00255 ATCC 29971.

3.4.2. Extração, purificação e dosagem DNA genômico:

As linhagens estocadas em glicerol a -20°C foram abertas e cultivadas em caldo e Agar BHI como descrito no item 3.2. Após o crescimento, foi retirada uma alça da cultura que foi transferida para um tubo eppendorf e submetida à extração do DNA genômico de acordo com o DNaseasy Tissue Kit (Qiagen), protocolo Appendix E: *Purification of Genomic DNA from Gram-positive Bacteria*. Após a extração os DNAs foram dosados em gel de agarose a 2% em tampão TAE 1X (40 mM Tris base, 20 mM sodium acetate, 1.0 mM EDTA, pH 8.0), utilizando o *low DNA Mass ladder* (Gibco BRL).

3.4.3. Reação em cadeia pela polimerase dos espaços entre os genes que codificam os RNAs transportadores - tDNA-PCR:

A mistura da PCR teve um volume total de 50 µL por reação, contendo os seguintes reagentes: iniciadores (25 pmol cada) - T5A (5'-AGTCCGGTGCTCTAACCAACTGAG -3') e T3B (5'-AGGTCGCGGGTTCTGAATCC-3') (WELSH & MC CLELLAND, 1991); 5µL de 10X PCR *Buffer* Tampão (500 mM KCl, 100 mM Tris HCl [pH 9.0]); 1µL (200 µM cada) dATP, dCTP, dGTP e dTTP; 1,0 U *Taq* polimerase, 3 mM MgCl₂ (Invitrogen) e 35,8 µL de água deionizada estéril. A esta mistura foi adicionado ~ 30 ng do DNA genômico. A amplificação foi realizada no aparelho termociclador (*Peltier Thermal Cycler*), modelo: PTC- 200, marca: MJ Reserarch, programado para um ciclo inicial de 94 °C por dois minutos seguidos de 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos; de 50 °C por 30 segundos e de 72 °C por dois minutos e um ciclo adicional de 72 °C por dez minutos.

3.4.4. Eletroforese:

Uma alíquota de 10 µL de cada mistura da PCR foi aplicada em gel de agarose 2% (p/v), onde os produtos da PCR foram separados por eletroforese a 50 Volts por 3 horas, utilizando tampão TAE 1X e peso molecular de 100 bp *DNA ladder* (Invitrogen co. Carlsbad, CA, USA). Os géis foram revelados com brometo de etídio (3 mg/mL) e as imagens foram digitalizadas pelo Sistema de Vídeo documentação e analisadas pelo sistema de documentação "*ImageMaster VDS*" (Amersham Pharmacia Biotech)

3.4.5. Análise dos perfis de bandas:

Os perfis de bandas ("*DNA fingerprinting*") dos isolados foram identificados através de análise comparativa visual com aqueles obtidos com as linhagens de referência. Os "*DNA fingerprinting*" foram considerados idênticos quando o mesmo número de bandas nas mesmas posições foi observado; não sendo consideradas as variações de intensidade.

A construção do dendograma, para avaliar os níveis de similaridade genética entre os perfis fornece valores em porcentagens, onde a proximidade genética é estimada pela distância entre as amostras, percorrendo suas linhas verticais sendo analisada pelo programa BioNumerics (Applied Maths Kortrijk. Bélgica, v.1.0.1), utilizando o coeficiente DICE (CD) (DICE,1945), pelo método das médias de agrupamento UPGMA.

O CD foi descrito por DICE (1945), e é obtido pela fórmula: $CD = \frac{2n^{a-b}}{n^a + n^b}$ sendo: n^{a-b} , o nº de fragmentos localizados na mesma posição em ambas as amostras. O valor encontrado do CD pode definir se as amostras são idênticas, similares ou diferentes (SCHMIDT et al.,2004 & SADER; HOLLIS; PFALLER,1995).

3.4.6. Reprodutibilidade:

A tDNA-PCR foi realizada pelo menos três vezes para cada linhagem analisada, inclusive as linhagens de referência. Foi utilizado mais de um "Kit" para a reação da PCR, termocicladores diferentes, bem como novas alíquotas de reagentes com o objetivo de confirmar a reprodutibilidade dos resultados obtidos.

3.4.7. Preservação dos isolados:

Inicialmente os isolados foram estocados em glicerol a 10% e armazenados a – 20 °C. Após a identificação bioquímica e molecular, os isolados foram preservados por liofilização e depositados na coleção de Microrganismo do INCQS/FIOCRUZ (Anexo 1).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

S. aureus é um microrganismo responsável por grande morbidade e mortalidade sendo o homem e os animais seus principais reservatórios. No corpo humano podem estar presente, entre as várias localizações, na garganta, no intestino, nas mãos, na pele e na cavidade nasal, que é apontada como a área mais importante de colonização de *S. aureus*, tornando-se importante fonte de transmissão em alimentos, artigos médicos e pacientes (SANTOS 2000; CAVALCANTI et al. 2006).

O conhecimento e a conscientização dos vários riscos de transmissão de infecções, das limitações dos processos de desinfecção e de esterilização e das dificuldades de processamento inerentes à natureza de cada artigo são imprescindíveis para que se possam tomar as devidas precauções (LACERDA, 2002). A contaminação microbiana deve ser uma preocupação não apenas em determinadas unidades, mas em todo ambiente hospitalar (DIAZ et al.1999).

A presença de microrganismos patogênicos em artigos médicos vem sendo assunto de grande destaque na literatura científica. Os artigos não críticos se caracterizam por serem os mais utilizados nas atividades médicas diárias, além de seu uso universal tanto no ambiente hospitalar como ambulatorial, tornando-se possíveis fontes de infecções bacterianas (ARAÚJO, OLIVEIRA & SANTOS, 2000).

Neste estudo foram realizadas análises microbiológicas para verificar a possível presença de *S. aureus* em artigos médicos não críticos em um centro de saúde. Das 16 amostras correspondentes aos cinco artigos analisados, um (II/SDPO) não apresentou crescimento no meio BHI, originando, portanto 15 amostras que foram semeadas sobre AMS. Sete apresentaram crescimento, das quais seis (EP, EG, ESG, II/EG, II/ESG e II/SDM) produziram ácido no AMS, e em uma amostra (SDM) não foi observada produção de ácido. As oito amostras restantes não foram capazes de crescer nesse meio de cultura (Quadro 2), sendo portanto desprezadas.

Quadro 2: Resultados da semeadura em placas de Petri contendo AMS, a partir da amostragem crescida em caldo BHI.

| Amostras | Agar Manitol Salgado |
|----------|---|
| DM | - |
| SDPO | sem crescimento |
| EP | + |
| EG | + |
| ESP | sem crescimento |
| ESG | + |
| PG | sem crescimento |
| PP | sem crescimento |
| II/EP | sem crescimento |
| II/EG | + |
| II/ESP | sem crescimento |
| II/ESG | + |
| II/SDM | + |
| II/SDPO | NR - não havia crescimento no caldo BHI |
| II/PP | sem crescimento |
| II/PG | sem crescimento |

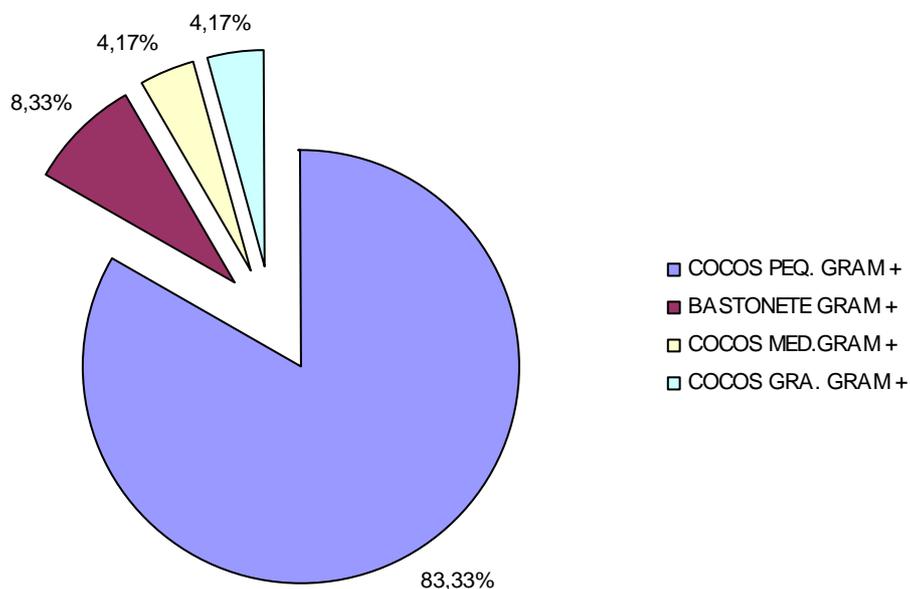
1ª coleta: SDM (sonar Doppler de mesa); SDPO (sonar Doppler portátil); EP (estetoscópio-oliva auriculares); EG (estetoscópio-diafragma); ESP (esfigmomanômetro-pêra de borracha); ESG (esfigmanômetro - braçadeira do manguito); PG (estetoscópio de Pinard - face inferior); PP (estetoscópio de Pinard - face superior). **2ª coleta:** II/SDM (sonar Doppler de mesa); II/SDPO (sonar Doppler portátil); II/EP (estetoscópio - olivas auriculares); II/EG (estetoscópio - diafragma); II/ESP (esfigmomanômetro - pêra de borracha); II/ESG (esfigmanômetro - braçadeira do manguito); II/PG (estetoscópio de Pinard - face inferior); II/PP (estetoscópio de

Pinard - face superior). Fermentação do manitol: positivo: (+); Fermentação do manitol: negativo: (-); NR: não realizada a prova.

A partir das seis amostras que produziram ácido em AMS foram selecionadas aleatoriamente quatro colônias de cada uma resultando um total de 24 colônias, as quais foram semeadas em agar BHI inclinado. Através da coloração de Gram verificou-se que: 20 colônias (83,33%) eram cocos Gram positivos pequenos, característicos do gênero *Staphylococcus*, uma colônia (4,17%) apresentou-se como cocos Gram positivos de tamanho médio, uma colônia (4,17%) correspondia a cocos Gram positivos grandes e duas colônias (8,33%) eram bastonetes Gram positivos (Gráfico 1).

Os quatro isolados que não se apresentaram como cocos Gram positivos pequenos foram retirados deste estudo e estocados a - 20 °C. Desta forma, obteve-se 20 amostras isoladas de material médico, que fizeram parte deste estudo.

Gráfico 1: Percentual das características morfo-tintoriais das 24 colônias selecionadas a partir das placas de Petri contendo agar manitol salgado.



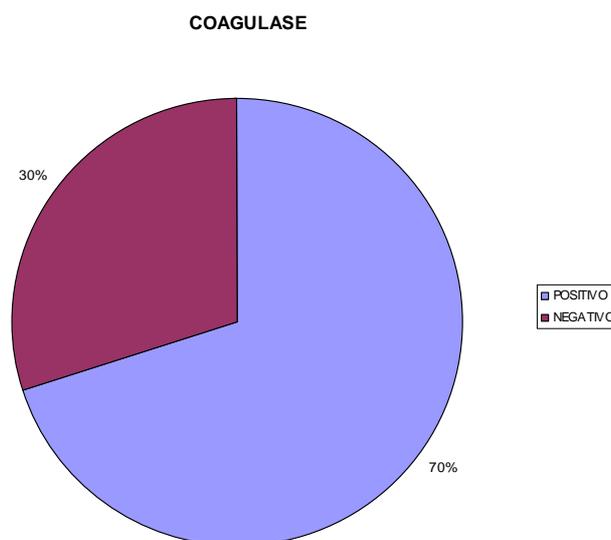
Correspondendo com os seguintes diâmetros: Cocos pequeno (de 0.3 μ a 0.5 μ); médio (intermediário de 0.5 μ a 1.0 μ); grande (maiores de 1.0 μ) de diâmetro. (BIER, 1986, p. 17)

Marinella, Pierson & Chenoweth (1997) num estudo realizado em um hospital de grande porte nos Estados Unidos com 40 estetoscópios demonstraram a presença de

diferentes bactérias, sendo a maioria de *Staphylococcus* coagulase negativo. No Brasil, Maluf et al. (2002) analisaram trezentos diafragmas de estetoscópios utilizados em diversas seções das instalações de um hospital em Sorocaba, São Paulo, e verificaram que 87% dos estetoscópios analisados estavam contaminados, inclusive com a presença de mais do que uma espécie de microrganismo em muitas amostras, sendo o *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativo os mais freqüentes.

Dentre as 20 amostras selecionadas neste estudo, pelo resultado da coloração de Gram, 14 produziram a enzima coagulase e foram denominadas como coagulase positivas. Em seis amostras não foi possível evidenciar a formação de coágulo no plasma de coelho (coagulase negativa), que conforme o *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2005) pode ter ocorrido devido à produção de coagulases que contêm diferenças antigênicas e/ ou que requerem substratos específicos (Gráfico 2).

Gráfico 2: Percentual da produção da enzima coagulase nas 20 amostras selecionadas a partir do resultado da coloração de Gram

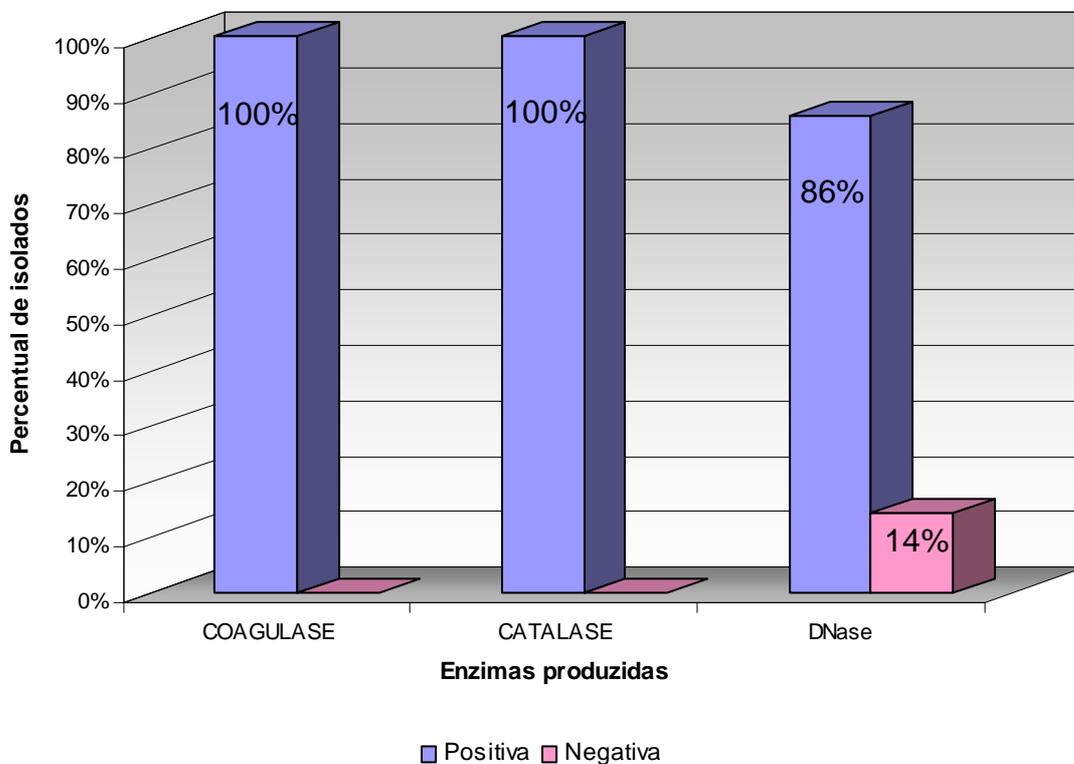


Total: 20 amostras = 14positivas (70%) e seis negativas (30%)

As 14 amostras coagulase positivas foram então submetidas às provas da catalase e da DNase. Todas as cepas (100%) foram capazes de hidrolizar o peróxido de hidrogênio em água (H₂O) e oxigênio (O₂) através da produção de catalase (catalase positiva) (Gráfico 3). Esta enzima é produzida por cepas de *S. aureus* que crescem aerobicamente e podem estar ausentes em mutantes com deficiência no mecanismo respiratório (JENSEN, 1963; SANZ et al.,2000)

. A presença da enzima DNase foi detectada em 12 (85,7%) dos 14 isolados analisados, teste este considerado 100% positivo para o *Staphylococcus aureus* segundo o *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2005) (Gráfico 3). Embora este manual seja considerado um dos mais relevantes na sistemática bacteriana, cepas de *S. aureus* DNase negativa vêm sendo relatadas ultimamente. Um exemplo é o estudo de Gundogan, Citak & Turan (2006) envolvendo 180 amostras de leite, sendo 110 linhagens de *S. aureus*, das quais 94,5% eram positivas para o teste da DNase.

Gráfico 3: Resultado das Provas da Coagulase, da Catalase e da DNase dos 14 isolados.



A taxonomia microbiana produziu um sistema estável, previsível e altamente informativo que vem colaborando para o avanço de vários ramos da ciência, incluindo não somente a microbiologia, mas também a genômica, ciências médicas, ecologia de microrganismos, biotecnologia, evolução e epidemiologia (GENOMICS, 2002).

Os métodos microbiológicos tradicionais baseados em características fenotípicas, como propriedades morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, governaram por décadas a taxonomia microbiana e forneceram informação descritiva para a

estruturação da classificação microbiana, nos mais variados grupos de bactérias (BOONE & CASTENHOLZ, 2001).

Busch & Nitschko (1999) relataram que as metodologias que envolvem ácidos nucleicos foram reconhecidas como ferramentas para identificação de microrganismos por oferecerem resultados rápidos, precisos e reprodutíveis quando comparados aos métodos baseados nas características fenotípicas (DRANCOURT et al., 2000).

Um dos métodos utilizados na identificação molecular bacteriana é a amplificação por PCR dos espaços entre os genes que codificam os RNA transportadores - tRNA (tDNA-PCR). Os genes que codificam os tRNA ocorrem em múltiplas cópias dispersas através do genoma em muitas espécies. As seqüências compartilhadas dos genes do tRNA indicam que os "primers" (iniciadores) utilizados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) contendo seqüências consenso dos genes do tRNA vão resultar em um número de produtos de PCR característicos para cada espécie. (WELSH & MCCLELLAND, 1991).

A habilidade da tDNA-PCR de identificar espécies do gênero *Staphylococcus* foi demonstrada por Maes et al. (1997) pela obtenção de 18 perfis de bandas específicas correspondentes a 18 espécies analisadas. As identidades obtidas pela tDNA-PCR apresentaram concordância com àquelas obtidas pelas provas bioquímicas em 99% dos analisados. Resultado semelhante foi verificado em um estudo comparativo entre a metodologia fenotípica e a tDNA-PCR na identificação de membros do grupo do *Staphylococcus sciuri* (*S. sciuri*, *S. lentus* e *S. vitulinus*), através do qual foi observado que foram equivalentes em 157 das 161 amostras analisadas (97,5%), demonstrando dessa forma a sensibilidade e acurácia da tDNA-PCR na identificação de espécies do gênero *Staphylococcus* (STEPANOVIC et al., 2005).

Miranda, Martins & Clementino (2008) descreveram que métodos moleculares que geram perfis de bandas (DNA *fingerprinting*) são muitas vezes tão sensíveis e reprodutíveis quantos aqueles que envolvem a amplificação por PCR seguida pelo sequenciamento. A análise de DNA *fingerprinting* é, em alguns casos, mais rápida e acessível do que o sequenciamento, uma vez que dispensa os equipamentos e insumos necessários a sua realização (Id, 2008).

No presente estudo, a amplificação resultou em sete perfis de bandas características para cada uma das sete espécies de referência do gênero *Staphylococcus* analisadas: *S. aureus* (Sa) (oito fragmentos entre 50 e 420bp), *S. epidermidis* (Se) (nove fragmentos entre 25 e 390bp), *S. saprophyticus* (Ss) (oito

fragmentos entre 25 e 390 bp), *S. simulans* (Si) (cinco fragmentos entre 80 e 600bp), *S. hominis* (Sh) (sete fragmentos entre 25 e 390bp), *S. xylosus* (Sx) (oito fragmentos entre 25 e 180 bp), *S. warneri* (Sw) (oito fragmentos entre 25 e 390bp) (Figura 10). Estes resultados podem ser melhor observados no dendrograma gerado após análise do gel (Figura 11).

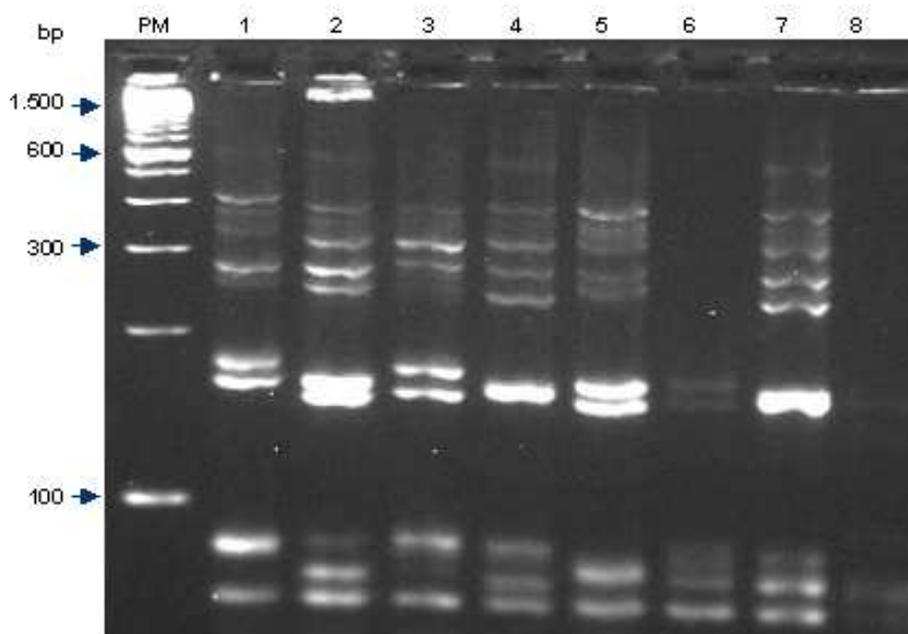


Figura 10: Perfis de bandas das cepas de referências do INCQS. PM - 100 bp; 1 - *S. aureus* INCQS 00039; 2 - *S. epidermidis* INCQS 00016; 3 - *S. hominis* INCQS 00359; 4 - *S. saprophyticus* INCQS 00233; 5 - *S. warneri* INCQS 00243; 6 - *S. simulans* INCQS 00254; 7 - *S. xylosus* INCQS 00255; 8 - H₂O.

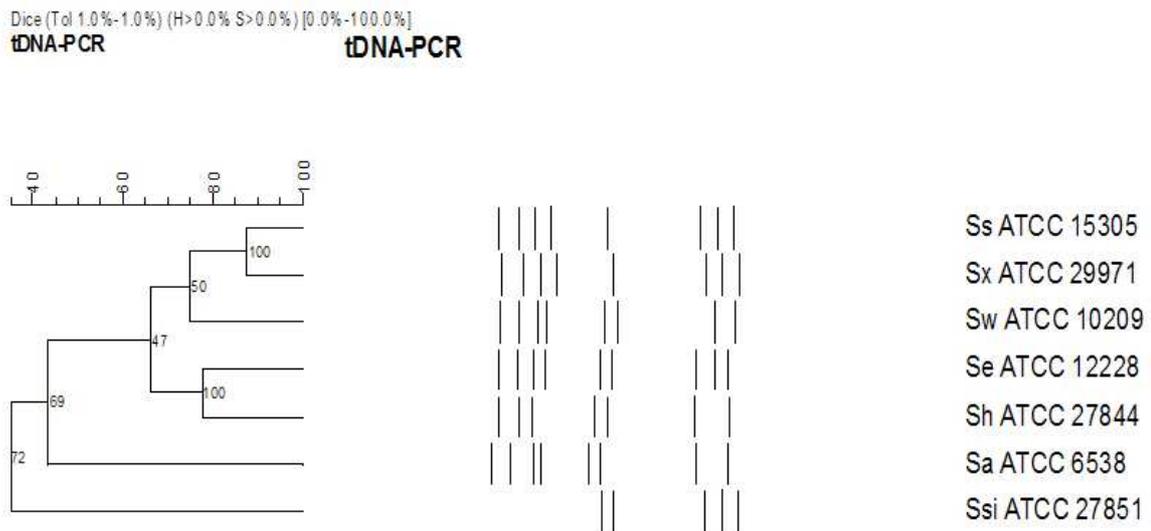


Figura 11: Dendrograma das cepas de referências do INCQS. Ss – *S. saprophyticus* ATCC 15305 (INCQS 00233), Sx – *S. xylosus* ATCC 29971 (INCQS 00255), Sw – *S. warneri* ATCC 10209 (INCQS 00243), Se – *S. epidermidis* ATCC 12228 (INCQS 00016), Sh – *S. hominis* ATCC 27844 (INCQS 00359), Sa – *S. aureus* ATCC 6538 (INCQS 00039), Ssi – *S. simulans* ATCC 27851 (INCQS 00254).

Os 14 isolados pré-identificados como *S. aureus*, através da produção das enzimas: coagulase, catalase e DNase, e um representante dos seis isolados coagulase negativa, foram submetidos à tDNA-PCR totalizando 15 isolados. Desses 15 isolados, 8 isolados apresentaram perfil idêntico àquele apresentado pelo *S. aureus* INCQS 00039 (ATCC 6538) (Figura 12). Dos sete restantes, referentes à segunda coleta, seis também apresentaram perfil idêntico àquele apresentado pelo *S. aureus* INCQS 00039, e o isolado coagulase negativa apresentou um perfil totalmente distinto daqueles apresentados pelas sete espécies de *Staphylococcus* confirmando a identificação fenotípica (Figura 13).

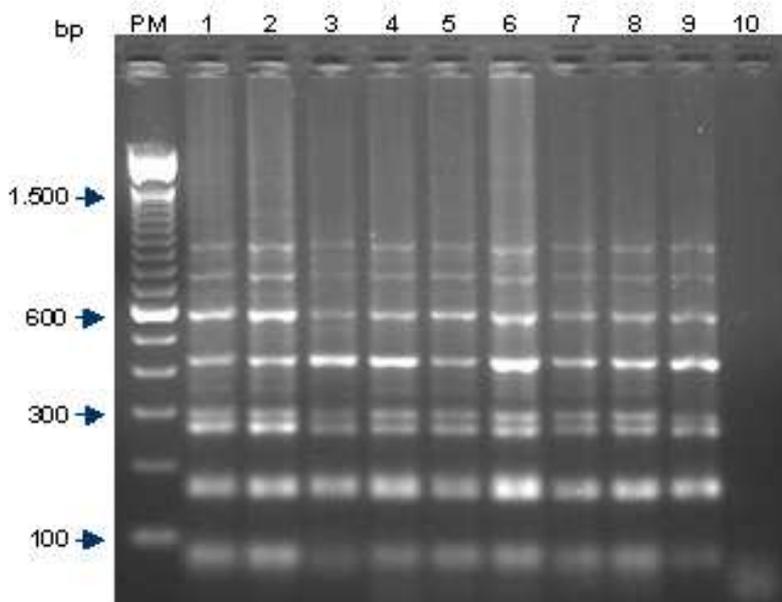


Figura 12: Perfis de bandas dos isolados 1. PM - 100 bp; 1 - *S. aureus* ATCC 6538; 2 - EG; 3 - ESG; 4 - EPA; 5 - EP; 6 - ESG; 7 - EP; 8 - EG; 9 - ESG; 10 - H₂O

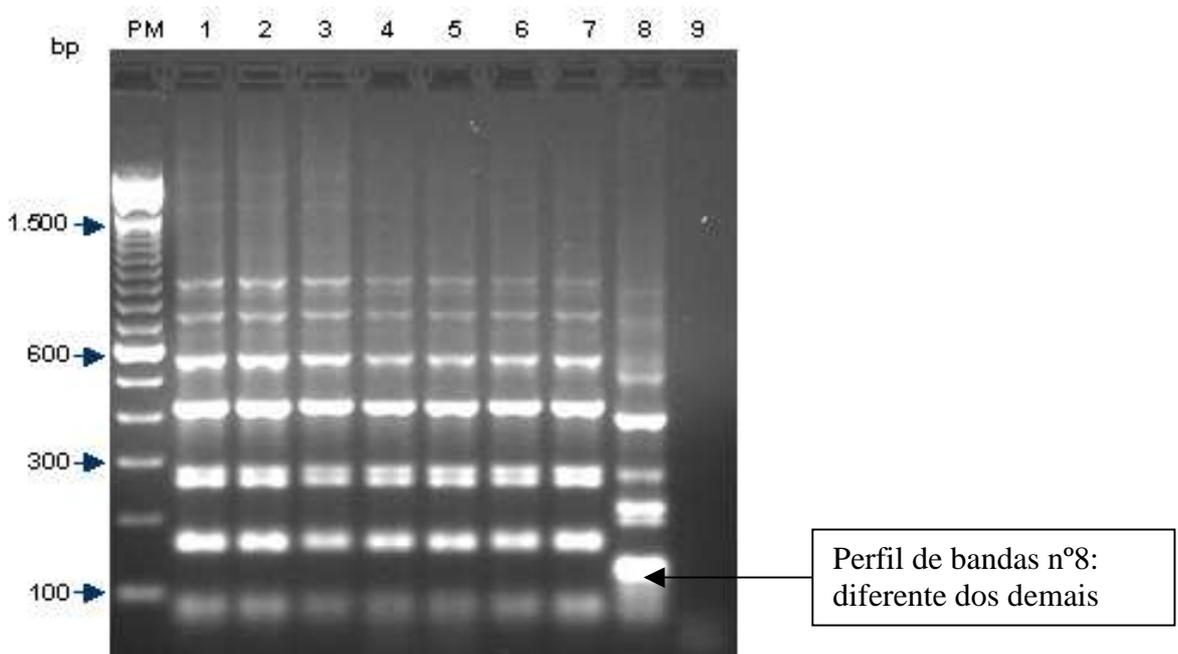


Figura 13: Perfis de bandas dos isolados 2. PM - 100 bp; 1 - *S. aureus* ATCC 6538; 2 - II/EG; 3 - II/SDM; 4 - II/ESG; 5 - II/SDM; 6 - II/SDM; 7 - II/ESG; 8 - II/ESG; 9 - H₂O

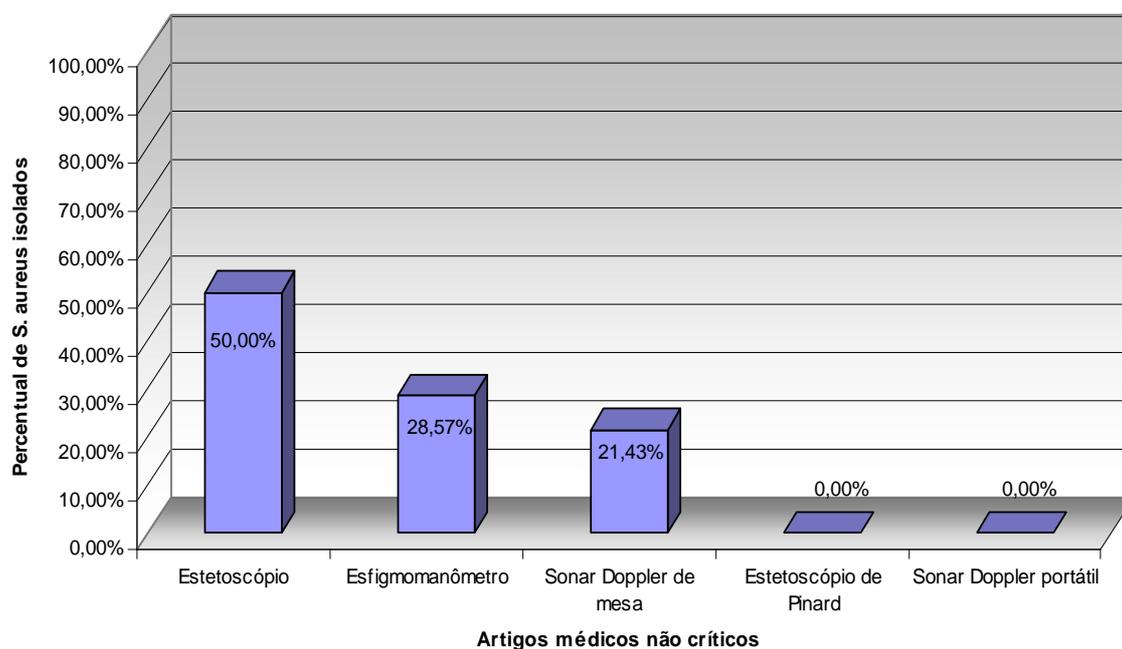
Pelo fato dos artigos não críticos serem os mais utilizados nas atividades médicas diárias, de serem considerados como instrumentos de uso universal tanto no ambiente hospitalar como ambulatorial e por repetidas vezes, entram em contato

direto com muitos pacientes, tornam-se possíveis fontes de infecções bacterianas. A utilização dos artigos médicos sem as devidas precauções pode ser responsável pela disseminação de bactérias no ambiente hospitalar, dentre elas o *S. aureus*. Por esse motivo Gialluly et al. (2006) ressaltaram a urgente necessidade de alertar e de informar aos profissionais de saúde sobre o potencial risco de IH com o manuseio dos artigos médicos não críticos.

Palma, Guerreiro & Palma (2006) avaliaram os índices de contaminação existentes nos diafragmas de estetoscópios utilizados pelos profissionais de saúde, bem como a eficácia da limpeza e desinfecção dos mesmos. Eles constataram a presença de vários microrganismos contaminantes, e a eficiência da desinfecção dos equipamentos, com álcool 70%. Resultados semelhantes foram observados por Torres et al. (2003), no estudo realizado em um hospital espanhol. O estudo teve como objetivo averiguar a presença de microrganismos em artigos médicos de vários setores do hospital. Neste estudo foram realizadas coletas de duas amostras, uma antes e outra após a desinfecção com álcool 70%, em cada estetoscópio. Os diafragmas dos estetoscópios foram pressionados diretamente sobre o meio de cultura contendo agar sangue e este incubado a 37°C por 48 horas. Oitenta e um por cento dos isolados foram caracterizados como do gênero *Staphylococcus*, sendo que 63% destes eram *S. aureus*. Foi observada uma redução significativa no número de microrganismos contaminantes, após o processo de limpeza e desinfecção, confirmando a necessidade da realização destes procedimentos na rotina hospitalar (Id., 2003).

Em nosso estudo, vale ressaltar que as 14 cepas de *S. aureus* isoladas correspondem a oito e sete isolados da primeira e da segunda coleta respectivamente. Eles estão distribuídos da seguinte forma: Estetoscópio (n=7) (50%) sendo três das olivas auriculares e quatro do diafragma; Esfigmomanômetro (n=4) (28,57%) todas da braçadeira do manguito e Sonar Doppler de mesa (n=3) (21,43%). O Estetoscópio de Pinard e o Sonar Doppler portátil não apresentaram crescimento bacteriano no AMS. Podemos visualizar melhor, este percentual de contaminação nos artigos médicos por *S.aureus* abaixo (Gráfico 4).

Gráfico 4: Percentual de *S. aureus* isolados neste estudo dos artigos médicos não críticos.



As IHS constituem um grave problema de saúde pública, tanto pela sua abrangência como pelos elevados custos sociais e econômicos. O conhecimento e a conscientização dos vários riscos de transmissão de infecções, das limitações dos processos de desinfecção e de esterilização e das dificuldades de processamento inerentes à natureza de cada artigo são imprescindíveis para que se possam tomar as devidas precauções (LACERDA, 2002).

Este estudo traduz a preocupação com a proteção e a promoção da saúde que se constitui no dever do Estado, que por intermédio de instrumentos específicos pode impedir atividades que possam significar riscos para a saúde da população. Um desses instrumentos é a Vigilância Sanitária que tem como atribuição não só a de fiscalizar baseado na legislação em vigor, mas principalmente a de conscientizar sobre a necessidade da importância da limpeza e desinfecção dos artigos não críticos amplamente utilizados nos estabelecimentos de saúde.

5. Conclusões

Os objetivos propostos neste estudo foram atingidos, mesmo com uma pequena amostragem, possibilitando as seguintes conclusões:

- O teste da coagulase demonstrou ser confiável na caracterização de *S. aureus* quando o resultado é coagulase positiva, já que os 14 isolados coagulase positiva apresentaram perfil idêntico ao da cepa de referência INCQS 00039.
- Não é possível afirmar que o representante dos seis isolados coagulase negativa, não seja uma espécie do gênero *Staphylococcus* através da tRNA-PCR, pois o mesmo não apresentou perfil de bandas compatível apenas com aqueles obtidos nas sete espécies de referência, disponíveis no Laboratório de Microrganismos de referência do INCQS. Existem aproximadamente 30 espécies e futuramente, quando esses DNA *fingerprinting* estiverem determinados, poderemos realizar a comparação com um número maior de espécies.
- A identificação de *S. aureus* nos artigos médicos não críticos do centro de saúde confirma os dados da literatura, que considera esses artigos como importantes vetores de disseminação de microrganismos patogênicos.
- A utilização dos artigos médicos sem limpeza e desinfecção pode ser responsável pela disseminação de bactérias no ambiente hospitalar, dentre elas o *S. aureus*.
- Os resultados apresentados, apesar do pequeno número de isolados estudados, apontam para a necessidade de adoção de procedimentos de limpeza e desinfecção, evitando o comprometimento dos equipamentos utilizados nas unidades de saúde como transmissores de infecções.

6. Perspectivas:

- Ampliar este estudo através da realização de novas coletas, incluindo os profissionais de saúde;
- Realizar coleta nos artigos e profissionais de outra unidade de saúde;
- Utilizar métodos de tipagem com o objetivo de realizar avaliação epidemiológica dos isolados;
- Realizar o ensaio de sensibilidade aos antimicrobianos;
- Divulgar os dados obtidos por meio de publicação de artigo científico em periódicos nacional e internacional.

6. Referências Bibliográficas

ABREU, A et al. Avaliação das condições microbiológicas em hospital antes e após os procedimentos de limpeza. **Controle da Contaminação**, n. 105. p. 23-28, jan.2008.

ARAÚJO, B. A. C; OLIVEIRA, A. L; SANTOS, F. L. Isolamento de amostras multirresistentes de *Staphylococcus aureus* em estetoscópios usados no ambiente hospitalar **Revista Brasileira de Análises Clínicas**; v.32, n.4: p. 285-288. 2000.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology , vol. 2, Part. A, Springer ed., 2005, p.

BIER O. – Bacteriologia e Imunologia em suas Aplicações a Medicina e à Higiene – 17 ed. Ver. Ampl. São Paulo, **Melhoramentos** - RJ, p.1055. 1976.

BLALLA et al. Acquisition of nosocomial pathogens on hand after contact with environmental surfaces near hospitalized patients. **Infect Control Hosp. Epidemiology**, v.25, n.2, p.164-167, 2004.

BOER, E.; BEUMER, R. R. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. **Internation Journal of Food Microbioly**, v. 50, n.1-2, p. 119-130, 15 Sept. 1999.

BOONE, D.R.; CASTENHHOLZ, R. W. The *Archaea* and the Deeply Branching and Phototrophic *Bacteria*. 2001. v. 1 : In G.M. Garrity, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition, Springer-Verlag, New York.

BRASIL, Lei n. ° 8.142, de 28 de dezembro de 1990b. Dispõe sobre a participação da comunidade na gestão do Sistema Único de Saúde - SUS e sobre as transferências intergovernamentais de recursos financeiros na área da saúde e dá outras providências. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l8142.htm. Acesso em: 10 dez. 2008.

_____. Presidência da República. Senado Federal – Lei - Constituição da República Federativa do Brasil, de 05 de outubro de 1988. Disponível em:

http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/constitui%C3%A7ao.htm. Acesso em 10 dez. 2008.

_____. _____. Lei n.º 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF. 19 de setembro de 1990. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L8080.htm. Acesso em: 10 dez. 2008.

_____. Ministério da Saúde. Portaria n.196 de 24 jun. 1983. Instruções para o controle e prevenção das infecções hospitalares. D. O. U. Diário Oficial da União; Poder Executivo, Brasília. 28 de junho de 1983. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=1085&word=Descontamina%c3%a7%c3%a3o>. Acesso em 16 dez. 2008.

_____. _____. Portaria n.140 de 08 abr. 1987. **Diário Oficial**. Brasília. 13 abr. 1987.

_____. _____. Portaria n.232 de 06 abr. 1988. **Diário Oficial**. Brasília. 11 abr.1988 (b).

_____. _____. Secretaria de Assistência à Saúde (SNAS), **Cartilha do Sistema Único de Saúde**, 1990 a. Disponível em: (<http://www.rebidia.org.br/noticias/saude/nomen.html>). Acesso em 08 de dez.2008.

_____. _____. Coordenação de Controle de Infecção Hospitalar. **Processamento de Artigos e Superfícies em Estabelecimentos de Saúde**. 2ª. ed. Brasília, 50p., 1994. Disponível em http://www.cro-rj.org.br/biosseguranca/processamento_artigos.pdf
∴ Acesso em 08 de dez.2008.

_____. _____. **Anuário Estatístico de saúde do Brasil, 2001**. Disponível em

<http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/anuario2001/index.cfm?saude=http>. Acesso em 10 dez. 2008.

_____. _____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA - Portaria n.º 15, de 07 de janeiro de 1988 a. Determina que o registro de produtos saneantes domissanitários com finalidade antimicrobiana seja procedido de acordo com as normas regulamentares. D.O.U. - **Diário Oficial da União; Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF. 05 de set de 1988. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18661&word>. Acesso em: 10 dez. 2008

_____. _____. _____. Informes Técnicos Institucionais: Anvisa intensifica controle de infecção em serviços de saúde. Revista de Saúde Pública v. 38, n. 3, São Paulo, jun 2004.

_____. _____. _____. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 48, de 2 de junho de 2000. Republicada por ter saído com incorreção, do original, no **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, nº 108-E, 6 jun 2000, Seção, 1 pág. 27. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2000/48_00rdc.htm. Acesso em: 20 abr. 2007.

_____. _____. _____. Controle de Infecção em Serviços de Saúde. Disponível em:

https://www.anvisa.gov.br/servicosasaude/controle/rede_rm/index.htm. Acesso em: nov 2007 a.

_____. _____. _____. Primeiros Resultados da Rede de Resistência Microbiana. Boletim Informativo da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde – Rede RM. Edição nº 1, de 26 de abril de 2007b. Disponível em:

https://www.anvisa.gov.br/servicosasaude/rede_rm/2007/01_260407_resultados_sensibilidade.htm. Acesso em: nov. 2007.

_____. _____. _____. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº. 56, de 6 de agosto de 2008. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Boas Práticas Sanitárias no Gerenciamento de Resíduos Sólidos nas áreas de Portos, Aeroportos, Passagens de Fronteiras e Recintos Alfandegados. D.O.U. - **Diário Oficial da União; Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF de 07 de agosto de 2008. Disponível em <http://www.who.int/idhl-rils/idhl/Braz%2056.pdf>: Acesso em: 11 dez. 2008.

BUSCH, U.; NITSCHKO, H. Methods for the differentiation of microorganisms **Journal of Chromatography B: Biomedical Science and Applications** , v.722, n.1-2, p. 263-278, 5 Febr., 1999.

CARVALHO, A. L. I. et al. Catalase - negative, methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* as a cause of septicemia. **Jornal Bras. de Patol. e Med. Labor.** Rio de Janeiro, v.39, n.1. , 2003.

CASEY, A.L, LAMBERT, P.A, ELLIOTT, T.S.J. Staphylococci. **Internation Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, , p. 23-32. 2007.

CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. *Staphylococcus aureus* Bacteremia: What is the Impact of Oxacilin Resistance on Mortality? **Braz J Infect Dis**, v. 9, n.1, p. 770-6, 2005.

CAVALCANTI, S. M. M. et al. Estudo comparativo de *Staphylococcus aureus* importado para as unidades de terapia intensiva de hospital universitário, Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 9, p. 436-446, 2006.

COUTO, R. C. **Infecção hospitalar em centro de terapia intensiva neonatal**: fatores de risco e sua relação com o óbito. Tese de Doutorado em Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, UFMG, 191f. 2000.

DELTHA, R. "Germ Warfare." **Ms. Magazine**, p. 43-45. Spring, 2007.

DÍAZ S. N.; et al. El **Estetoscópio Como Vector de la Infección Nosocomial Emergencias**; v.11, p. 281-285, 1999.

DICE, L.R. Measures of the amount of ecological association between species ecology; v.26, p.379-303, 1945.

DRANCOURT, M. et al. 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis of a Large Collection of Environmental and Clinical Unidentifiable Bacterial Isolates. **J Clin Microbiol.**; v. 38, n. 10, p. 3623–3630. Oct. 2000.

FONTANA, R. T. As infecções hospitalares e a evolução histórica das infecções. **Rev. Bras. Enferm.** Brasília, v. 59 n. 5, set - out, 2006.

FREITAS, M. F. L. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, p. 171-177, 2005.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. Ed. Atheneu, São Paulo, 2003.

GENOMICS and taxonomy for all. **Nature**, London, v.417, n. 6889, p. 573, 6 june 2002

GIALLULY, C. et al. *Blood Pressure Cuffs as a Potential Vector of Pathogenic Microorganism: a prospective study in a teaching hospital*. França: 2005. **Revista Infect Control Hops Epidemiol** (*Infection control and hospital epidemiology: the official journal of he Society of Hospital Epidemiologist of America*) v.27, 9 ed., p. 940-943, Sep. 2006.

GUNDOGAN, N.; CITAK, S.; TURAN, E. Slime production, DNase activity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk, pasteurised milk and ice cream samples. **Food Control**, v.17, n. 5, p.389-392, May 2006.

HARTLEIB, J. et al, Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. **Blood** . v. 96, p.2149-56. 2000;

JAWETZ, E; MELNICK, J.L.; ADELBERG, E.A. **Microbiologia Médica**, 21ª ed. Rio de Janeiro Guanabara - Koogan, p.612, 2000.

JENSEN, J. Apocatalase of catalase-negative staphylococci *Science*, v. 141,p. 45-46, 1963.

KALIL, E. M.; COSTA, A. J. F. Desinfecção e Esterilização. **ACTA ORTOP BRAS**. v. 2, n.4, out-dez, p.1-4, 1994.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W. M. **Diagnóstico microbiológico**. 5ªed., cap.11, parte 1, Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2001

LACERDA, R. A. Produção científica nacional sobre infecção hospitalar e a contribuição da enfermagem: ontem, hoje e perspectivas. **Rev Latino Am. Enfermagem**, v.10, n.1, p. 55-63, jan.-fev., 2002.

LUONG, T.T.; LEE, C.Y. Overproduction of type 8 capsular polysaccharide augments *Staphylococcus aureus* virulence. **Infect Immun.**, v.70, p. 3389-3395, 2002.

MADAR R, NOVAKOVA E, BASKA T. The role of non-critical health-care tools in the transmission of nosocomial infections. **Bratisl Lek Listy**, v.6, n.11, p.348-35, 2005.

MAES, R.K. et al. Canine distemper outbreak in Alaska: diagnosis and strain characterization using sequence analysis. **Journal Vet Diagn Invest**, v. 15, p.213-220, 2003.

MALUF et al., Stethoscope: a friend or an enemy? **São Paulo Med. J.**, v. 120, n. 1, p. 13-15, 2002.

MARINELLA MA, PIERSON C, CHENOWETH C. The stethoscope: a potential source of. Nosocomial Infection. **Arch Intern Med**. v. 157, p.:786-790. 1997.

MARTINEZ, T.C.N. Caracterização de *Staphylococcus sp.* isolados de processos infecciosos de caninos utilizando plasmas de diferentes espécies animais. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.** v.1, n. 2, p. 48-53, 2001.

MIRANDA, C. A. C.; MARTINS, O. B. ; CLEMENTINO, M. M. Species-level identification of *Bacillus* strains isolates from marine sediments by conventional biochemical, 16S rRNA gene sequencing and inter-tRNA gene sequence lengths analysis. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.93, p.297-304, 2008.

MORK, T. et al. Genetic diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections in Norway. **Vet Microbiol.**, v.106, p.65-73. 2005.

MURRAY, P. R. et al. **Microbiologia Médica**. 5ª ed. Rio de Janeiro, Ed. Elsevier, p.979. 2006.

MURRAY, P. R. et al. Staphylococcus e microrganismos correlatos. **Microbiologia médica**. 4ª ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, p. 188-201, 2004.

NEDER, R. N. **Microbiologia: manual de laboratório**. Ed. Nobel. São Paulo, 138p. , 1992.

NILSSON, I. M. et al., The role of staphylococcal polysaccharide microcapsule expression in septicemia and septic arthritis 1997 **Infect Immun.**; v. 65, n. 10, p.:4216-21, Oct. 1997.

OLIVEIRA, C. Z. F. et al., 1999 Susceptibilidade antimicrobiana in vitro de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de Queijo Minas. **Rev. Hig. Alim**, v.13, p.30, 1999.

OLIVEIRA, C. D.; LENCASTRE, H. Multiplex PCR Strategy for Rapid Identification of Structural Types and Variants of the *mec* Element in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Antimicrobial **Agents and Chemotherapy**, , v. 46, n.7 , p. 2155-2161, July 2002.

PALMA, F. M.; GUERREIRO, I. M.; PALMA, M. D. Estetoscópios como veículo de disseminação da Infecção Nosocomial. **Revista Investigação em Enfermagem**, nº. 14, ago. p. 48-56, 2006.

RIBEIRO, M. C.; SOARES, M. M. S. R. **Microbiologia Prática: roteiro e manual**. Ed. Atheneu. São Paulo, 107p., 1993.

RODRIGUES, A.C. R. et al. **Infecções hospitalares: prevenção e controle**. São Paulo, Ed. Sarvier, 1997.

SADER, H. S. ; HOLLIS, J. R.; PFALLER, M. The use of molecular techniques in the epidemiology and control of infectious diseases. **Contemporary issues in clinical microbiology**, [S.l.], v. 15, no. 2, p. 407-431, 1995.

SANZ, R. et al. Catalase deficiency in *Staphylococcus aureus* subsp. *Anaerobius* is associated with natural loss-of-function mutations within the structural gene. **Microbiology**, v. 146, p. 465-475, 2000.

SANTOS L. SAÚDE DO TRABALHADOR - Conflito de Competência; União, Estados e Municípios. Interface Ministério do Trabalho e Emprego, Ministério da Saúde e Ministério da Previdência e Assistência Social. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde - Representação no Brasil, p. 63, 2000.

SANTOS, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J Bras Patol Med Lab** v. 43, n. 6, p. 413-423, dez., 2007.

SCHABRUN S, CHIPCHASE, L. HEALTHCARE. *Equipment as a source of nosocomial infection: a systematic review*. **J Hosp Infect**. v. 63, n.3, p.239-45, Jul, 2006.

SCHMIDT, D. A. M. et al. Comparação entre Medidas Morfológicas e Molecular em Aveia (*Avena Sativa*) em Experimentos com e sem a Aplicação de Fungicida. Disponível em: www.ufpel.edu.br/cic/2004/arquivos/CA_01610.doc. Acesso em 06 de jan de 2009.

SILVA, E. C. B. F. et al. *Staphylococcus aureus*: aspectos biológicos e patogênicos. **Anais Fac. Med. Univ. Fed. Pernamb.**, Recife, v.52, n.2, p. 168-171, 2007.

SILVA R.F. Hospital infection in the context of the health policies established by the state of Santa Catarina. Rev. Latino-Am. **Enfermagem** vol.11, n.1, p. 108-14, Ribeirão Preto, jan.- fev., 2003.

SPERBER, W.H. ; TATINI, S. R. Interpretation of the Tube Coagulase Test for Identification of *Staphylococcus aureus* **Appl Environ Microbiol.**, v.29, n.4, p. 502-505, April.,1975.

STEPANOVIC, D. I. A comparative evaluation of phenotypic and molecular methods in the identification of members of the *Staphylococcus sciuri* group. Syst Appl Microbiol. V.28, n. 4, p. 353-7, 2005.

TORRES et al., 2003, The stethoscope: a potential vector of infection - **Rev. Ciencia Pediátrica**, vol.23, nº.8, p. 27-32, 2003.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Bactérias. In: **Microbiologia**. 8. ed., Porto Alegre: Artmed, 2005.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**, 5ª ed.; Editora Atheneu, São Paulo, **cap. 20**, p. 175-82. 2005.

TRABULSI, L. R.; et al. *Staphylococcus aureus* In: TRABULSI, L. R. & ALTERTHUM F. **Microbiologia**. 4ª ed., São Paulo: Atheneu, p. 175-182, 2004.

TRABULSI, LR, et al. **Microbiologia**. 3º ed., Atheneu, São Paulo, p. 143 -156, jan 2002.

TU, K. K.; PALUTKE, W. A. Isolation and characterization of a catalase-negative strain of *Staphylococcus aureus* **J Clin Microbiol**. v.3, n.1, p. 77-78, Jan. 1976.

VANDAMME, P. P. B et al. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiol Rev**. v.60, p.. 407–438,1996.

VAN DE PEER, Y. et al.. Database on the structure of small subunit RNA. **Nucleic Acids Res.** v. 24, n.86–91,1996.

VELÁZQUEZ-MEZA, M. E. *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination. **Salud Pública de México**, v. 47, p. 381-7, 2005.

VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 2ed, São Paulo, Atheneu Ed., cap59, CDD-6169 NLM-WC 1004, p.768-792, 2004.

VILLAMIL, A. S. et al. *Los manguitos del esfigmomanómetro son reservorio de bacterias potencialmente patógenas* **Revista Argentina de Cardiología** vol.72 nº 1, p.9-13, jan.-fev., 2004.

ZARADINACK, M. N. et al., *Staphylococcus aureus*: incidência e resistência antimicrobiana em abscessos cutâneos de origem comunitária **Acta Scientiarum** Maringá, v. 23, n. 3, p. 709-712, 2001.

WEISBURG, W. G et al., 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **J Bacteriol.** , v.173, p.697–703, 1991.

WELSH, J.; Mc CLELLAND. Genomic Fingerprintings Produced by PCR with Consensus tRNA Gene Primers. **Nucleic Acids Res.**v.19, p.861-866,1991.

7. ANEXO I

1. Meios de Cultura e Condições de Cultivo

1.1. Caldo BHI – Brain Heart Infusion

Brain Heart Broth (MERCK) - cat. nº 1.10493.0500

Pesar e hidratar segundo instruções do fabricante.

1.2. Agar BHI- Brain Heart Infusion

Brain Heart agar (MERCK) - cat. nº 1.13825.0500

Pesar e hidratar segundo instruções do fabricante.

1.3. Agar Sal Manitol

Mannitol Salt Phenol-Red Agar (MERCK) - cat. nº 1.05404.0500

Pesar e hidratar segundo instruções do fabricante.

1.4. Agar Dnase

DNase Test Agar (MERCK) - cat. nº 1.10449.0500

Pesar e hidratar segundo instruções do fabricante.

1.5. Agar Nutriente

| | |
|-------------------------|---------|
| Extrato de carne----- | 3 g |
| Peptona de carne----- | 5 g |
| Agar ----- | 15 g |
| Água destilada qsp----- | 1000 mL |

Suspender os componentes em água destilada.

Dissolver por aquecimento à ebulição.

Distribuir alíquotas de 20 mL em Placas de Petri.

Deixar solidificar.

pH final = 7,0 +/- 0,2.

2. Provas Bioquímicas:

2.1. Método de Gram:

Reagentes (corantes):

Cristal Violeta: (Seg. Hucker)

Solução A:

Cristal Violeta ----- 2 g
Álcool etílico ----- 20 ml

Solução B:

Oxalato de amônio ----- 0,8 g
Água destilada ----- 80 mL

Misturar soluções A e B;
Deixar em repouso por 24 horas;
Filtrar em papel wathmamn nº 1;
Armazenar em frasco escuro.

Solução de Lugol:

Iodo ----- 1 g
Iodeto de potássio ----- 2 g
Água destilada ----- 300 mL

Macerar o iodo e o iodeto de potássio em um gral;
Adicionar água aos poucos e misturar bem;
Completar o volume com água destilada;
Armazenar em frasco escuro.

Descorante:

Agente lento: álcool etílico 95%
Agente rápido: acetona
Agente intermediário: álcool – acetona (álcool etílico 95%, 100 mL; acetona, 100 mL)

Fucsina Fenicada: (Seg. Ziehl)

Fucsina básica ----- 1 g
Álcool etílico 95% ----- 10 mL
Fenol fundido ----- 5 g
Água destilada ----- 100 mL

Dissolver em um gral a fucsina no álcool;
Juntar aos poucos o fenol;
Homogeneizar até completa dissolução;
Juntar a água aos poucos, lavando o gral;
Filtrar após 24 h de repouso.

Preparo e Fixação de Esfregaços:

Usar lâminas limpas e desengorduradas;
Colocar no centro da lâmina uma alça do material. Se o material for pouco fluido, colocar uma gota de água destilada sobre a lâmina e acrescentar uma alça do material;
Homogeneizar com pequenos movimentos circulares;
Deixar secar e fixar pelo calor, passando a lâmina com esfregaço rapidamente tres ou quatro vezes pela chama do bico de Bunsen. É fundamental que a lâmina esfrie antes de começar as colorações.

Procedimento:

Esfregaço bem homogêneo fixado ao calor;
Corar durante 1 minuto com solução de cristal violeta;
Escorrer o corante e cobrir durante 1 minuto com solução de lugol;
Lavar em água corrente;
Diferenciar com um dos descorantes descritos acima;
Lavar em água corrente;
Contrastar durante trinta segundos com fucsina de Ziehl;
Lavar em água corrente;
Secar a preparação (entre duas tiras de papel de filtro).

Interpretação:

Microrganismos Gram positivos: cor roxa

Microrganismos Gram negativos: cor vermelha

2.2. Prova da Coagulase em tubo:

Reagentes:

Plasma de coelho;

Coagulase Plasma Rabbit with EDTA (BECTON DICKINSON) - cat.nº 240827

Reidratação da Ampola:

Reidratado de acordo com as instruções do fabricante.

Esterilidade:

Inocular 0,5 mL de plasma reidratado em caldo BHI e incubar a 37 °C por cinco dias, para verificar se há crescimento de possíveis contaminantes.

Potência

Colocar 0,5 mL de plasma puro em tubo 13x100 mm e uma alça cheia de crescimento de uma cultura jovem de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 como controle positivo, e de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 como controle negativo. O controle positivo deverá estar totalmente coagulado, entre uma a tres horas após o início do teste, enquanto o negativo continuará líquido.

Procedimento:

Colocar em um tubo de ensaio (13x100 mm),0,5 mL de plasma de coelho pré-testado e concentrado;

Colocar uma alça grande de uma colônia pura em placa;

Girar o tubo vagarosamente para suspender os organismos (não agitar);

Incubar a 37 °C em estufa bacteriológica ;

Observar a cada uma hora durante quatro horas, a formação do coágulo. Se o coágulo não for visível ao final de quatro

horas, reincubar em banho-maria a 35 °C por 24 horas;

Interpretação:

Teste positivo: formação de coagulo de uma às quatro horas

Teste negativo: ausência da formação de coagulo

2.3. PROVA DA DESOXIRRIBONUCLEASE (DNase):

Para determinar a habilidade de um microrganismo em hidrolisar o ácido nucléico contido no meio.

Meio de Cultura:

DNase agar

Reagente Empregado:

Uma solução de ácido clorídrico a 1N.

Inoculação e Incubação:

Inocular com crescimento de uma cultura pura de 18-24h de incubação em meio apropriado.

Usar inóculo pesado em pontos definidos cobrindo cerca de 1 cm² da área da placa.

Várias culturas podem ser testadas na mesma placa.

Incubar por 18-24h a 35-37 °C.

Interpretação:

Revelar com uma solução a 1N de ácido clorídrico. Uma zona transparente em torno do crescimento, após opacificação do ácido nucléico residual pelo ácido clorídrico, indica teste positivo.

2.4. Prova da Catalase

Reagente

Peróxido de hidrogênio (H₂O₂). a 3% (10 vol.)

Procedimento:**Método da Lâmina:**

Com uma agulha, retirar o centro de uma única colônia (crescimento de 24 h de incubação), colocar em uma lâmina de vidro limpa;

Colocar uma gota de H₂O₂ (3%), usando pipeta Pasteur;

Não inverter a ordem do procedimento, e não homogeneizar com alça ou agulha a mistura de H₂O₂ e cultura, porque resultados falsos positivos podem ocorrer;

Interpretação:

Observar o imediato borbulhamento (liberação de gás), o que indica a positividade do teste;

Descartar a lâmina em desinfetante.

2.5. Fermentação do Manitol (CHAPMAN)**Meio de cultura**

Agar Manitol acrescido de 7,5% de cloreto de sódio (NaCl).

Procedimento:

Semear a cultura sob a forma de esgotamento em estrias no meio de cultura distribuído em placas de Petri. Incubar a 37 °C por 24-48h.

Interpretação:

O indicador de pH é o vermelho de fenol, que indica uma reação positiva quando o meio ao redor das colônias se torna amarelo, e negativa quando permanece avermelhado.

3. Métodos de Preservação**3.1. Glicerol 20% (SIGMA)**

Preparar uma solução a 20% de glicerol com meio líquido de cultura (BHI). Utilizar 500 µL da solução para uma alça de cultura, e armazenar em freezer a -70 °C.

3.2. Liofilização (Freeze-drying)

As culturas foram semeadas em meios de cultivo apropriados e após a incubação o crescimento foi coberto com "Skim Milk" (DIFCO 0001) a 10%, retirado com o auxílio de uma alça de "Drigalsky" e transferido para ampolas estranguladas, em volumes de 0.3 a 0.5 mL por ampola. Após a distribuição da suspensão em ampolas, estas foram colocadas em um banho de gelo seco e etanol absoluto, para congelamento rápido, aonde a temperatura do banho chega a -70 °C. Em 30 - 60 segundos de imersão no banho gelado, a suspensão estava congelada e foi transferida para um freezer a -70 °C, onde permaneceu por 24-48 horas, antes de ser liofilizada. Este congelamento rápido é importante para evitar a formação de cristais de gelo entre as membranas dos microrganismos, o que poderia inviabilizar as células, levando a ruptura de estruturas vitais das células.

Após 72h a -70 °C as ampolas foram colocadas no liofilizador com o objetivo de retirar toda água da amostra por meio do congelamento a vácuo. O processo acontece por conta da pressão que o vácuo ocasiona no material fazendo com que haja a passagem da água em estado sólido para o estado gasoso. Após 18h, as ampolas foram transferidas para uma "árvore", que permite a finalização do processo e o fechamento das ampolas com auxílio de um maçarico de chama dupla. Foram liofilizadas dez ampolas de cada microrganismo.

4. Preparo de géis e tampões

4.1. Tampões

Tampão Tris-Borato – EDTA 10X (TBE 10X)

| | |
|---------------------------------------|---------|
| TRIS base _____ | 121.1 g |
| Acido Bórico _____ | 61.8 g |
| NA2 EDTA _____ | 3.7 g |
| Água MilliQ esterilizada q.s.p. _____ | 1000 mL |

Tampão Tris-Borato – EDTA TBE (0.5X)

Tampão TBE 10X _____ 125 µL
Água MilliQ esterilizada q.s.p. _____ 2500 mL

Gel de agarose (Sambrook, 1989)

4.2. Géis

Agarose (Sigma A-0169)----- 10 g
TBE (0,5 x)----- 1000 mL
Brometo de etídio (5mg/ml)----- 60 µL