

Ocorrência e Caracterização de Espécies Patogênicas do Gênero *Staphylococcus* em Artigos Médicos e Profissionais de Saúde em duas Unidades Básicas de Saúde no Município do Rio de Janeiro, no período de 2009 a 2011, Brasil.

ANGELA MARIA DE SOUZA BREVES RODRIGUES

Mestrado Profissional  
Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadores: Dra Maysa Beatriz Mandetta Clementino  
Dr. Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso

Rio de Janeiro  
2011

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Ocorrência e Caracterização de Espécies Patogênicas do Gênero *Staphylococcus* em Artigos Médicos e Profissionais de Saúde em duas Unidades Básicas de Saúde no Município do Rio de Janeiro, no período de 2009 a 2011, Brasil.**

Angela Maria de Souza Breves Rodrigues

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária 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 Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovado em 30 / 05 / 2011

\_\_\_\_\_ (INCQS/FIOCRUZ)  
Dr. Antonio Eugenio C. Cardoso de Almeida

\_\_\_\_\_ (IPEC/FIOCRUZ)  
Dr. Armando de Oliveira Schubach

\_\_\_\_\_ (UFRJ)  
Dr. Sergio Eduardo Longo Fracalanza

\_\_\_\_\_ (INCQS/FIOCRUZ)  
Orientador - Dr<sup>a</sup>. Maysa B. M. Clementino

\_\_\_\_\_ (INCQS/FIOCRUZ)  
Orientador - Dr. Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso

Rio de Janeiro

2011

Rodrigues, Angela Maria de Souza Breves

Ocorrência e Caracterização de Espécies Patogênicas do Gênero *Staphylococcus* em Artigos Médicos e Profissionais de Saúde em duas Unidades Básicas de Saúde no Município do Rio de Janeiro, no período de 2009 a 2011, Brasil.

Angela Maria de Souza Breves Rodrigues. Rio de Janeiro: INCQS/Fiocruz, 2011.

xvi, 103 p, il., tab, quadr., graf.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2011.

Orientador: Dr<sup>a</sup>. Maysa Beatriz Mandetta Clementino  
Dr. Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso

Occurrence and Characterization of Pathogenic Species of the genus of *Staphylococcus* on Medical Articles and Health professionals in Healthcare two units in Rio de Janeiro City in the period 2009-2011, Brazil.

*Se queremos progredir, não devemos repetir a história,  
mas fazer uma história nova.*

*“Mahatma Gandhi”*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, muito obrigada pela saúde, força, amparo e proteção em todos os momentos de minha vida e, principalmente, durante a execução deste trabalho, onde precisei de muito amparo nos momentos de desânimo.

A Profa. Dra. Maysa, obrigada por ser minha orientadora, pela amizade, confiança e dedicação.

Ao Prof. Dr. Ivano, obrigada por ser meu orientador, pela compreensão, paciência e participação para realização deste trabalho.

Ao meu esposo Luiz Fernando por estar sempre ao meu lado, e também, por muitas vezes, compreender a minha ausência.

A toda a minha família por ser meu norte, para onde eu posso voltar sempre.

Aos meus pais "In Memoriam" que me deram a vida e ensinaram-me a caminhar sozinha.

Aos funcionários do Laboratório de Micro-organismos de Referência do INCCS, por me receberem com carinho, me acolherem e pelos conhecimentos compartilhados.

Ao bibliotecário Alexandre, pela força técnica e boa vontade dispensada quando dúvidas surgiam.

*Ao Marcelo Luiz pela ajuda na elaboração da apresentação da minha dissertação.*

*Dedico este trabalho ao meu esforço, a minha dedicação e perseverança em desenvolver este estudo, que acredito ser tão importante para as ações de prevenção da Vigilância Sanitária.*

*De modo especial, à minha cadela Lisbela pelo companheirismo, pois a todo instante em que eu elaborava essa dissertação, ela fielmente permanecia sempre ao meu lado.*

## RESUMO

Este estudo avaliou a colonização por *Staphylococcus* spp em superfícies de artigos médicos (estetoscópio, esfigmomanômetro e Sonar Doppler) e das fossas nasais e mãos dos profissionais do serviço de atendimento ao pré-natal de duas Unidades Básicas de Saúde no Município do Rio de Janeiro, no período de 2009-2010. Foram coletadas 79 amostras que resultaram em 49 isolados, submetidos à caracterização fenotípica (bioquímica e suscetibilidade aos antimicrobianos) e molecular (PCR dos genes *coa*, *femA* e *mecA*). Trinta e cinco (71,4%) foram coagulase positivas e 41 (83,6%) apresentaram a enzima DNase. A susceptibilidade aos antimicrobianos resultou em 19 perfis de resistência, 34,6% apresentaram susceptibilidade aos nove antimicrobianos analisados, 53,6% foram resistentes à eritromicina, 34,6% à cefoxitina, 30,6% a oxacilina, 16,3 % a clindamicina e 2% a vancomicina. A PCR dos genes *coa*, *femA* e *mecA* resultou na amplificação de um único fragmento variável de 650 a 900 pb, 900 pb e 500 bp respectivamente em 75,5%, 71,4% e 30,6% dos isolados, respectivamente. Dos 49 isolados, 20,4% foram coagulase positiva e resistente à oxacilina e, portanto considerados “Meticillin Resistant *Staphylococcus aureus*” (MRSA) e 10,20% “Meticillin Resistant coagulase negativa *Staphylococci*” (MR-CoNS) após a confirmação pela amplificação do gene *mecA*. A resistência concomitante à eritromicina e a clindamicina foi observada em 10 cepas (20,4%) que apresentaram o fenótipo “Macrolide-Lincosamide-Streptogramin type B” (MLSB) constitutivo. Oito isolados (16,3%), apresentaram perfis multirresistentes (cinco ou mais antimicrobianos) e foram identificados como MRSA. Dentre essas oito cepas multirresistentes, uma cepa isolada da mão de um profissional, apresentou também resistência à vancomicina. A evidência de *Staphylococcus* patogênicos em equipamentos e profissionais de saúde traduz a preocupação com a proteção da saúde de pacientes, profissionais e da comunidade. Uma das atribuições da Vigilância Sanitária é a conscientização da importância dos procedimentos de limpeza e desinfecção das mãos e dos artigos médicos utilizados nos ambientes de saúde.

## ABSTRACT

This study evaluated the colonization of *Staphylococcus* spp in three medical items (stethoscope, sphygmomanometer and Doppler Sonar) and the nostrils and hands of professionals of two basic prenatal health units in the municipality of Rio de Janeiro, from 2009 to 2010. Forty nine strains of *Staphylococcus* spp. were isolated from 79 samples collected and were characterized through phenotypic (biochemistry and antimicrobial susceptibility) and molecular (PCR of *coa*, *femA* and *mecA* genes) assays. Susceptibility tests showed 19 different resistance patterns with 30,6% susceptible to all nine antibiotics tested, 53,6% were resistant to erythromycin, 34,6% to cefoxitin, 26,53% to oxacillin, 16,3% to clindamycin and 2,0% to vancomycin. The isolates were identified and characterized by PCR of *coa*, *femA* and *mecA* genes yielding single fragments of 650-900bp, 900bp and 500bp from 75.51%, 71.42% and 30.61% of the isolates respectively. From the 49 isolates, 20.41% produced coagulase and were resistant to oxacillin, therefore considered "Meticillin Resistant *Staphylococcus aureus*" (MRSA). Other 10, 20% resistant to oxacillin were coagulase negative and considered "Meticillin Resistant coagulase negative *Staphylococci*" (MR-CoNS) after confirmation by amplification of *mecA* gene. Additional resistance to erythromycin and clindamycin was detected on 10 strains (20, 4%) showing the constitutive phenotype Macrolide-Lincosamide-Streptogramin type B (MLSB). Eight isolates (16, 3%) presenting multiresistant pattern (more than 5 antibiotics), were characterized as MRSA. One of these strains also showed resistance to vancomycin. The detection of such strain in the hands of a health professional is of concern since this antibiotic is used against resistant staphylococcal strains. The high incidence of pathogenic *Staphylococci* colonizing the medical and health professionals from both primary health care suggests the need to a better control of the hygiene practices in this environment.



## LISTA DE SIGLAS

aa - Aminoácidos  
AMS - Agar Manitol Salgado  
AMH - Agar Miller Hinton  
Anvisa - Agencia Nacional de Vigilância Sanitária  
ATCC - *American Type Culture Collection*  
BEC - Brazilian Epidemic Clone  
CFO - Cefoxitina  
BHI - *Brain Heart Infusion* (agar infusão de cérebro e coração)  
CA-MRSA *Staphylococcus aureus* comunitário resistente à meticilina/oxacilina  
CIM - Concentração inibitória mínima  
CIP - Ciproflaxina  
CLI - Clindamicina  
CLO - Clorafenicol  
CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute  
Ccr - Complexo gênico  
CMS - Centro Municipal de Saúde  
cna - Proteína de ligação ao colágeno  
coa - Gene coagulase  
CP - Capsular Polysaccharides  
cDNA - DNA complementar  
CoNS - *Staphylococcus coagulase negativa*  
dATP - Desoxiadenosina trifosfatada  
dCTP - Desoxicitidina trifosfatada  
DF - Distrito Federal  
dGTP - Desoxiguanosina trifosfatada  
DNA - Ácido desoxirribonucleico  
DNase - Desoxirribunuclease  
dNTPs - Desoxirribonucleotídeos trifosfatados  
dTTP - Desoxitimidina trifosfatada  
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra- Bromide  
ED - Estetoscópio (diafragma)  
EO - Estetoscópio (olivas auriculares)

E-test - *Epsilometer test* (para determinação de CIM de antibióticos)  
ER I- Eritromicina  
ESM - Esfigmomanômetro (braçadeira do manguito)  
ESP - Esfigmomanômetro (pêra de borracha)  
Fc - Fragmentos cristalizáveis  
*Fem* - *Factor essential for methicillin resistance*  
FRC - Fator de reação da coagulase  
°C - Graus Celsius  
HA-MRSA – *Staphylococcus aureus* - hospitalar resistente à oxacilina  
HBV - Vírus da Hepatite B  
HCL - Ácido Clorídrico  
IgG - Imunoglobulinas séricas  
IH - Infecção Hospitalar  
IHs - Infecções Hospitalares  
IN - Infecção Nosocomial  
INs - Infecções Nosocomiais  
IRAs -Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde  
GEN - Gentamicina  
*Is431mec* - elemento de inserção 431 *mec*  
Kb - Kilobase  
KCl - Cloreto de Potássio  
kDa - Quilodáltons ( unidade de massa atômica)  
M - Concentração molar  
mg - miligrama  
MgCl<sub>2</sub> - Cloreto de magnésio  
mL - mililitro  
mM - milimolar  
MR-CoNS - “Methicilin Resistant *Staphylococcus* coagulase negative”  
MRSA - “Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus*”  
MSSA - “Methicilin sensitive *Staphylococcus aureus*”  
N - Normalidade  
(-) - Negativo  
ng - Nanograma  
OPAS - Organização Pan-Americana de Saúde

OXA - Oxacilina  
pb - Pares de bases  
PBP - Proteína ligadora de penicilina  
PBPs - Penicillin Binding Proteins  
PBP2a - Proteína ligadora de penicilina 2 alterada  
PCR - *Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia pela polimerase)  
PFGE - Eletroforese em Gel de Campo Pulsado  
PG - Estetoscópio de Pinard (gestante = borda inferior)  
pH - Potencial de hidrogênio  
pmol - Picomol  
(+) - Positivo  
RAPD - *Random Amplicification Polymorphism DNA*  
rDNA - DNA ribossômico  
RDC - Resolução Colegiada  
RIF - Rifampicina  
RFLP - *Restriction fragment length polymorphism*  
RNA - Ácido ribonucléico  
rpm - rotações por minuto  
*S.aureus* - *Staphylococcus aureus*  
SEs - Enterotoxinas estafilocócicas  
SCCmec - Cassete *mec* do cromossomo de *Staphylococcus*  
SDM - Sonar Doppler de mesa  
SRRs - Sequências curtas repetidas  
SUS - Sistema Único de Saúde  
TAE - Tris acetato EDTA  
*Taq* - *Thermus aquaticus*  
TBS - *Trypticase soy broth*  
TE - Solução de Tris-HCL  
Tris - Hidroximetil amino metano  
Tris-HCl - Tris Hidrocloroeto  
TSST- 1- Síndrome do choque tóxico  
U - Unidade  
VAN - Vancomicina  
v - Volume

Volts-Voltagem

$\mu\text{g}$  - Micrograma

$\mu\text{L}$  - microlitro

$\mu\text{M}$  - Micromolar

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura esquemática do gene <i>coa</i> de <i>S aureus</i> .....	10
Figura 2: Distribuição das Áreas Programáticas do Rio de Janeiro.....	30
Figura 3: Sítios utilizados na coleta das amostras .....	30
Figura 4: Prova do Agar Manitol Salgado - AMS.....	32
Figura 5: Método de Coloração de GRAM .....	32
Figura 6: Prova da Catalase.....	33
Figura 7: Prova da Coagulase livre .....	34
Figura 8: Prova da DNase.....	35
Figura 9: Susceptibilidade aos Antimicrobianos .....	37
Figura 10: Representação gráfica de resistência aos antimicrobianos nos isolados de <i>Staphylococcus</i> .....	44
Figura 11 PCR do gene <i>femA</i> das cepas de referência .....	46
Figura 12: PCR do gene <i>femA</i> dos isolados de <i>Staphylococcus</i> .....	46
Figura 13: PCR do gene <i>coa</i> das cepas de referência de <i>Staphylococcus</i> .....	47
Figura 14: PCR do gene <i>coa</i> dos isolados de <i>Staphylococcus</i> .....	48
Figura 15: PCR do gene <i>mecA</i> das cepas de referência de <i>Staphylococcus</i> ..	49
Figura 16: PCR do gene <i>mecA</i> dos isolados de <i>Staphylococcus</i> .....	49
Figura 17: Número de isolados de <i>Staphylococcus</i> spp.....	50
Figura 18: Esquema dos Resultados Finais.....	51

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Iniciadores utilizados neste estudo.....	39
--	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número de amostras de acordo com o local e os sítios de coleta .....	31
Tabela 2: Distribuição dos sítios de coleta e isolados de <i>Staphylococcus</i> .....	41
Tabela 3: Resultados das Provas Fenotípicas das Cepas Isoladas de Artigos Médicos e Profissionais de Saúde .....	42
Tabela 4: Perfil de Resistência aos Antimicrobianos dos Isolados de <i>Staphylococcus</i> .....	43
Tabela 5: Fenótipos de Resistência <i>Staphylococcus spp</i> identificados.....	45

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Unidades Básicas de Saúde .....	1
1.2. Artigos Médicos de Serviços de Saúde .....	2
1.3. Métodos de Desinfecção de Artigos Médicos .....	5
1.4. O gênero <i>Staphylococcus</i> .....	5
1.5. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	6
1.6. <i>Staphylococcus aureus</i> em Unidade Basica de Saúde .....	25
2. OBJETIVOS .....	26
2.1. Objetivo geral.....	27
2.2. Objetivos específicos.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1. Aspectos Éticos .....	28
3.2. Obtenção das amostras .....	28
3.3. Isolamento e identificação fenotípica dos isolados .....	31
3.4. Preservação dos isolados.....	35
3.5. Susceptibilidade aos antimicrobianos .....	36
3.6. Caracterização Molecular .....	37
4. RESULTADOS .....	41
4.1. Distribuição dos isolados .....	41
4.2. Identificação Fenotípica .....	41
4.3. Caracterização molecular de <i>S. aureus</i> .....	45
4.4. Caracterização de <i>Staphylococcus spp</i> .....	50
5. DISCUSSÃO .....	52
6. CONCLUSÕES .....	52
7.PERSPECTIVAS.....	52
8. REFERÊNCIAS.....	60
APÊNDICE I: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....	79
APÊNDICE II: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....	80
ANEXO I: PARECER COMITÊ DE ÉTICA .....	81
ANEXO II: PARECER COMITÊ DE ÉTICA .....	82
ANEXO III: MEIOS DE CULTURA .....	833



# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1. Unidades Básicas de Saúde**

O Sistema Único de Saúde (SUS) foi criado pela Constituição Federal de 1988 (BRASIL, 1988) e regulamentado pelas Leis Orgânicas da Saúde n.º 8080/90 (BRASIL, 1990a), e n.º 8.142/90 (BRASIL, 1990b). Deste Sistema Único de Saúde fazem parte às unidades básicas de saúde, os hospitais (incluindo os universitários), laboratórios, hemocentros, bancos de sangue, além de fundações e institutos de pesquisa, como a Fundação Oswaldo Cruz e o Instituto Vital Brasil.

As Unidades Básicas de Saúde do SUS são aquelas 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 privada. Os tipos de unidades estão definidos em função da estrutura e capacidade de atendimento ambulatorial: 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 Diagnose 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 (BRASIL, 2006).

Segundo o Cadastro Nacional de Estabelecimentos de Saúde (BRASIL, 2006) o Centro de Saúde é a unidade para realização de atendimento de atenção básica e integral a uma população de forma programada ou não nas especialidades básicas, podendo oferecer assistência odontológica e de outros profissionais de nível superior. A assistência deve ser permanente e prestada por médico generalista ou especialista nestas áreas. Pode ou não oferecer Serviço de Apoio à Diagnose e Terapia (SADT) e de pronto atendimento 24 horas, e o Posto de Saúde como a unidade destinada à prestação de

assistência a uma determinada população de forma programada ou não, por profissional de nível médio, com a presença intermitente ou não do profissional médico. No município do Rio de Janeiro essas unidades de saúde estão distribuídas nos bairros que ficam agrupados em áreas programáticas (APs) cuja responsabilidade está a cargo da Secretaria Municipal de Saúde e Defesa (SMSDC), que é responsável pela regionalização da saúde, considerando cada um dos 160 bairros existentes (PREFEITURA, 2010).

## **1.2. Artigos Médicos e Profissionais de Saúde nos Serviços de Saúde**

Existem alguns procedimentos médicos em Unidades Básicas de Saúde, que envolvem a utilização de artigos médicos destinados a diagnósticos e terapias. Em 1968, Spaulding propôs uma abordagem racional à desinfecção e à esterilização, dividindo o material usado nos cuidados aos pacientes em três categorias distintas, baseando-se no grau de risco de infecção envolvido, a saber: artigos críticos, artigos semicríticos e artigos não críticos, sendo adaptada e oficialmente adotada pelo Ministério de Saúde em 2001 (BRASIL, 2001b).

Os artigos críticos são destinados aos procedimentos invasivos em pele e mucosas adjacentes, nos tecidos subepiteliais e no sistema vascular, bem como todos os que estejam diretamente conectados com este sistema, e requerem esterilização, por exemplo, agulhas, cateteres intravenosos, materiais de implante, e outros; os artigos semicríticos são aqueles que entram em contato com a pele não íntegra, porém, restrito às camadas da pele ou com mucosas íntegras, requerem desinfecção de intermediário, ou alto nível ou esterilização, por exemplo, cânula endotraqueal, equipamento respiratório, espéculo vaginal, sonda nasogástrica, e por fim os artigos não críticos que são aqueles destinados ao contato com a pele íntegra e também os que não entram em contato direto com o paciente, estes requerem limpeza ou desinfecção de baixo ou médio nível, dependendo do uso a que se destinam ou do último uso realizado, por exemplo, termômetro, materiais usados em banho de leito como bacia, cuba rim, estetoscópio, esfigmomanômetro, roupa de cama do paciente, etc (KALIL; COSTA, 1994; BRASIL, 2001b).

A presença de micro-organismos patogênicos em artigos médicos tem sido 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 no ambulatorial, tornando-se possíveis fontes de infecções bacterianas (ARAÚJO; OLIVEIRA; SANTOS, 2000).

O uso contínuo em muitos pacientes, além da deficiência no processo de desinfecção dos artigos médicos, os torna alvos de contaminação microbiana, e de possíveis fontes de transmissão de infecções (ARAÚJO; OLIVEIRA; SANTOS, 2000). 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 de saúde, dentre elas *S. aureus*, e que pouca atenção tem sido dispensada, principalmente no que se relaciona à limpeza e a desinfecção.

A presença de micro-organismos patogênicos na superfície de equipamentos médicos já foi demonstrada em estetoscópio e no Sonar Doppler (ultrassom) que revelaram principalmente a presença de *Staphylococcus spp* coagulase negativo e *Stenotrophomonas maltophilia*, *S.aureus* e *Acinetobacter baumannii* e, dentre outras espécies bacterianas (MARINELLA; PIERSON; CHENOWETH, 1997; SCHABRUN; CHIPCHASE, 2006). Os autores concluíram que os equipamentos de ultrassom são um potencial vetor para a infecção nosocomial em unidades de saúde, e que a higienização correta dos equipamentos com etanol 70% entre cada paciente é uma medida eficaz na redução do risco de infecção. A presença de contaminação microbiana em equipamentos médicos não invasivos, provavelmente se dá aos baixos níveis de descontaminação dispensados a esses equipamentos (BEARD; ROBERTSON; GETZY, 1989; SYKES et al., 2006).

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 micro-organismo em muitas amostras, sendo o *S. aureus* e CoNS os mais freqüentes. Esses dados reforçam a idéia de que esses equipamentos podem ser considerados um importante veículo de disseminação bacteriana (XAVIER;

UENO, 2009). A possível contaminação cruzada por *S. aureus* entre pacientes, profissionais e artigos médicos, em unidades de saúde é uma preocupação constante, o que leva vários pesquisadores a estudar a prevalência deste patógeno em fossas nasais de portadores assintomáticos no ambiente hospitalar (BALDWIN et al., 1957 ; UTHIDA-TANAKA, 1973).

A investigação sobre a colonização em profissionais em uma unidade de tratamento intensivo de um hospital universitário na Turquia revelou que 14,3% dos profissionais estavam colonizados por *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina - MRSA (ZER et al., 2009). Outro estudo envolvendo a pesquisa de *S. aureus* nas mãos de profissionais de saúde, em um hospital particular em Goiás, demonstrou a presença de 70,0% de MRSA e 44,5% *Staphylococcus* coagulase negativa - CoNS de 48 amostras de enfermeiros, auxiliares e médicos (CUSTÓDIO et al., 2009). Diversas são as fontes de contaminações detectadas no ambiente hospitalar, sendo as mais relevantes as mãos dos profissionais de assistência, os equipamentos e a microbiota dos próprios pacientes. Estudos como o desenvolvido por Custodio et al. (2009) demonstraram que a correta assepsia realizada pelos profissionais da saúde implica diretamente no nível de redução das taxas de infecções hospitalares. Oliveira et al. (2010) também encontraram a presença de CoNS nas mãos de profissionais na unidade de terapia intensiva do Hospital das Clínicas em São Paulo. Outro estudo revelou a presença de *S. aureus* na cavidade bucal dos serventes da limpeza hospitalar de 43 indivíduos colonizados com 13 MRSA e 30 de *Staphylococcus aureus* sensível a oxacilina - MSSA concluindo que esta cavidade é um importante reservatório de MRSA (CRUZ et al., 2011).

Pelo exposto acima, foram escolhidos no presente estudo, três artigos médicos não críticos: o estetoscópio, o esfigmomanômetro e sonar Doppler, por serem todos estes utilizados no atendimento as gestantes nas clínicas de pré-natal tanto no centro de saúde quanto em posto de saúde, no atendimento de rotina, sendo muito manipulados pelos profissionais de saúde. Apesar da relevância de *S. aureus* no ambiente hospitalar e nas infecções nosocomiais, tendo os profissionais de saúde e os artigos médicos como potenciais veiculadores no âmbito de saúde, ainda são poucos os estudos quanto à presença deste patógeno em artigos e em profissionais de saúde nas unidades básicas de saúde.

### 1.3. Métodos de Desinfecção de Artigos Médicos

A Portaria nº 930 (BRASIL, 1992) substituída pela Portaria 2616, de 12-05-98 (BRASIL, 1998) que atualiza conceitos e normas do controle de infecção hospitalar, relaciona, no seu anexo V, métodos e produtos químicos para limpeza, desinfecção e esterilização de artigos e áreas em estabelecimentos de saúde do país. Quando se fala em processo de desinfecção hospitalar subentende-se o uso de agentes químicos, cujos produtos encontram-se regulamentados pelas Resoluções RDC nº 14 de fevereiro de 2007 e nº 35 de 16 de agosto de 2010. De acordo com a legislação, para que um desinfetante hospitalar possa ser registrado e comercializado no Brasil, o mesmo deve apresentar eficácia comprovada frente a vários micro-organismos, dentre eles *S. aureus* (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2007; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010).

Os agentes químicos mais utilizados são: os aldeídos, fenólicos, quaternário de amônia, compostos orgânicos liberados de cloro ativo, iodo e derivados, álcoois, glicóis, e outros, desde que atendam à legislação específica. A desinfecção é descrita como o método capaz de eliminar micro-organismos patogênicos, com exceção dos esporos. Este método pode ser realizado por processo físico ou químico, em objetos inanimados e superfícies podendo ser de alto, médio e baixo nível (RUTALA; WEBER, 2008; BRASIL, 2001b). A desinfecção de baixo nível destrói as bactérias na forma vegetativa, alguns vírus e alguns fungos. *Mycobacterium tuberculosis*, os esporos bacterianos e o vírus da Hepatite B (HBV) sobrevivem; na desinfecção de nível intermediário além dos micro-organismos destruídos na desinfecção de baixo nível são atingidos *Mycobacterium tuberculosis*, a maioria dos vírus (inclusive o HBV) e dos fungos, mas ainda sobrevivem *Mycobacterium intracellulare*, os esporos bacterianos e os vírus lentos. E na desinfecção de alto nível resistem apenas alguns tipos de esporos bacterianos mais resistentes e os vírus lentos (BRASIL, 1994; BRASIL, 2001b).

### 1.4. O gênero *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus* do grego “*staphyle*” (cachos de uvas) e “*coccus*” (semente ou grão) pertence à família *Staphylococcaceae*, e inclui mais de 30 espécies de bactérias. Suas células apresentam-se em forma de cocos Gram-positivos, com 0,5 a 1,5 µm de diâmetro. São imóveis, não esporulados e suas colônias são relativamente grandes, com 1 a 2 mm de diâmetro (BANNERMAN; PEACOCK, 2007). As colônias são opacas, convexas, cremosas e suas cores variam do branco a vários tons de amarelo, dependendo da espécie (KONEMAN et al., 2001).

As bactérias pertencentes a esse gênero produzem as enzimas catalase e termonuclease e podem produzir ou não a coagulase, dependendo da espécie (KLOSS; LAMBE, 1991). São bactérias mesófilas, apresentando temperatura de crescimento na faixa de 4°C a 46°C, sendo a temperatura ótima de 35°C a 37°C, e são tolerantes a concentrações de 10% a 20% de cloreto de sódio (FRAZIER; WESHOFF, 2000). Apresentam ainda capacidade de crescer em pH de 4,0 a 9,8, sendo o pH ótimo para crescimento compreendido entre 6,0 e 7,0 (FRANCO ; LANDGRAFF, 2000). As espécies de *Staphylococcus* diferem daquelas do gênero *Micrococcus* por serem oxidase-negativa, fermentadoras da glicose e possuírem ácido teicóico como constituinte de sua parede celular (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 1997).

### **1.5. *Staphylococcus aureus***

Do gênero *Staphylococcus*, a espécie mais importante é *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*), por estar envolvida em infecções em animais e em humanos, tanto de origem comunitária quanto hospitalar (CASEY; LAMBERT; ELLIO, 2007). Esta espécie foi descrita pela primeira vez em 1880, por Alexandre Ogston, cirurgião que a encontrou em secreção de um abscesso cirúrgico (SANTOS et al., 2007). Este patógeno é importante, devido à sua virulência, resistência aos antimicrobianos e associação a várias doenças, incluindo enfermidades sistêmicas potencialmente fatais, infecções cutâneas, infecções oportunistas e intoxicação alimentar (LOWRY, 1998). Ainda é capaz de sobreviver em alimentos refrigerados (FREITAS et al., 2004) e de permanecer colonizando preferencialmente as fossas nasais de pessoas

sadias por períodos e tempos variáveis (VERONESI ; FOCACCIA, 1996). A taxa de colonização varia de 10% a 40%, dos indivíduos tanto na comunidade quanto em serviços de saúde. Nos ambientes de saúde podem contaminar mobiliários, roupas e equipamentos ao redor do paciente colonizado ou infectado, os quais funcionam como fontes ou reservatórios desse micro-organismo (GOMES; OLIVEIRA, 2006).

Para Moore (2001), a infecção pode disseminar-se a partir das cavidades nasais. Nessa perspectiva, é importante destacar que a prevenção da infecção hospitalar (IH) por *S. aureus* depende do controle deste micro-organismo presente no meio ambiente e nos portadores saudáveis (TANAKA et al., 2001). A transmissão de *S. aureus* possui significado especial no ambiente de saúde, onde as fontes de infecções são constituídas pelo próprio ambiente, pelos portadores assintomáticos e pelos pacientes. Os meios de transmissão podem ser diretos (contato direto com a fonte de infecção ou mesmo autoinfecção) ou indiretos, em que *Staphylococcus* são veiculados principalmente pelas mãos do profissional de saúde ou pelos equipamentos contaminados (BALDY, 2005). Os artigos médicos utilizados no atendimento diário dos pacientes, tais como termômetros, esfigmomanômetros, fonoendoscópios e otoscópios foram descritos atuando como vetores de transmissão de agentes patogênicos, tais como MRSA e outras bactérias multirresistentes entre os pacientes, tanto através do contato direto do paciente com um instrumento, como indiretamente através do contato com as mãos dos profissionais de saúde (BROOKS et al., 1998; SING et al., 2002).

### **1.5.1. Fatores de Virulência**

Os fatores de virulência são aqueles que permitem a invasão do hospedeiro e ou a evasão do patógeno ao sistema imune. Os principais fatores de virulência do *S. aureus* são os componentes da superfície celular, como a cápsula, a proteína A, as adesinas, as enzimas extracelulares, as leucocidinas, as hemolisinas e os ácidos teicóicos, entre outros (TRABULSI; CAMPOS, 2002). As cepas patogênicas podem apresentar muitos destes fatores, o que contribui para a patogenicidade desses micro-organismos, garantindo assim

êxito em sua instalação e manutenção nos tecidos do hospedeiro (MORK et al., 2005).

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 de virulência 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 ligadoras ao 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, lipases e polissacarídeos capsulares; e **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) alfa, beta, gama - hemolisinas (VELÁZQUEZ-MEZA, 2005).

*Staphylococcus aureus* contém ainda, na estrutura de sua parede celular, polissacarídeos e proteínas antigênicas, bem como outras moléculas capazes de induzir uma resposta imunológica no hospedeiro. Entre essas outras moléculas podemos citar o ácido teicóico, o glicanopeptídeo, a proteína A, além da presença de cápsula e de adesinas (LUTZ et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2001). A cápsula apresenta um papel importante na virulência, pois geralmente atuam como um fator antifagocítico. A maioria das cepas de *S. aureus* possui cápsula polissacarídica (TRABULSI; TEIXEIRA; BUERIS, 2004). Mais de 90% das cepas de *S. aureus* produzem cápsula entre os 11 sorotipos identificados até o momento. Entre cepas clínicas, verificou-se que aproximadamente 70% apresentam os sorotipos CP5 ou CP8 (LUONG; LEE, 2002).

A proteína A 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, também são considerados fatores de virulência relevantes que integram a parede celular contribuindo para a patogenicidade pela ativação da via alternativa do



complemento e estimulando a produção de citocinas (TRABULSI; TEIXEIRA; BUERIS, 2004).

Diversos genes codificam esses fatores de virulência, tais como enterotoxinas, toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1), toxinas esfoliativas, leucocidinas, as alfa, beta e gama toxinas e proteínas associadas à superfície como, por exemplo, a proteína de ligação ao colágeno (cna), o gene *icaAD*, um dos responsáveis pela produção do biofilme (PROJAN ; NOVICK, 1997; SCHECHTER ; MARANGONI, 1998; CAFISO et al., 2004).

O alto potencial infeccioso do *S. aureus* não está restrito apenas à sua facilidade de multiplicação e disseminação nos tecidos, mas também à produção de moléculas com grande poder patogênico, que incluem enzimas e toxinas entre elas as beta-lactamases, coagulases, hialuronidases e catalases, DNases, lipases, proteases e esterases (BRAUNWALD et al., 2002; NOVICK, 2000).

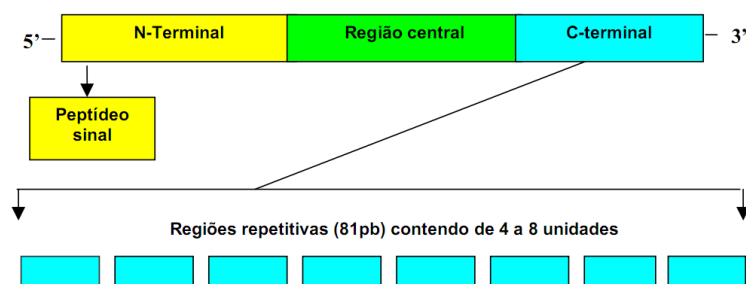
A coagulase é uma proteína extracelular produzida pela maioria das amostras de *S. aureus* que é usada como marcador fenotípico para a diferenciação de espécies do gênero. Esta proteína que possui ação enzimática reage com a protrombina, formando um complexo denominado estafilotrombina que reage com o fibrinogênio que é convertido em fibrina e coagula o plasma (KONEMAN et al., 2001). Esta proteína tem peso molecular de 63-77 kDa , contendo entre 630 e 730 resíduos de aminoácidos, sendo codificada por um gene cromossômico que possui em torno de 3.000 pares de bases (pb). A molécula da coagulase possui três regiões distintas: a região N-terminal que é o sítio de ligação à protrombina, composta de 150 a 270 aminoácidos; uma região central, bastante conservada e a região C-terminal, bastante variável (Figura 1), onde são encontradas de 4-8 sequências repetitivas de 27 aminoácidos (KANEMITSU et al., 2001; WATANABE et al., 2005). Esta última região que é variável possui seqüências curtas repetidas (SRRs), e é utilizada em diversos estudos epidemiológicos para subtipar isolados de *S. aureus* baseado no número de sequências repetidas e pela localização de sítios de restrição para endonucleases específicas, permitindo aumentar o poder discriminatório da técnica (GOH et al., 1992).

A coagulase pode ser encontrada de duas formas: uma pequena parte encontra-se ligada à parede celular e a outra livre. A coagulase livre reage com

uma substância no plasma chamada “fator de reação da coagulase” (FRC), formando um complexo que reage com o fibrinogênio com subsequente formação de fibrina (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 1997). Ambas, coagulase livre e ligada atuam formando uma película envolvente ao redor da célula bacteriana, fornecendo proteção contra opsonização, fagocitose, dificultando a atuação de agentes antimicrobianos e o reconhecimento do patógeno pelas células do sistema imune do hospedeiro. (MURRAY et al. , 2004). Por outro lado, a formação desta película pode limitar a infecção a um determinado local. Fibrinolisinias produzidas por *S. aureus* podem, no entanto, lisar esta fibrina e permitir que a infecção se espalhe para os tecidos adjacentes (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 1997).

Raras cepas de *S. aureus* e de *S. intermedius* podem ser consideradas coagulase negativa e algumas cepas de *S. hyicus*, *S. delphini* e de *S. schleiferi subsp coagulans* podem produzir coagulase quando avaliadas pelo método da coagulase ligada (KONEMAN et al., 2001). Existe uma relação entre linhagens enterotoxigênicas de *S. aureus* e linhagens que possuem a enzima coagulase, sendo indicativo de uma correlação entre produção de coagulase e de potencial para geração de enterotoxina, mesmo que a bactéria seja de outra espécie que não *S. aureus*. (JAY, 2005).

**Figura 1:** Estrutura esquemática do gene *coa* de *S aureus*



Fonte: Costa, 2008

Os fatores de virulência produzidos por algumas cepas *S.aureus* “Panton-Valentine Leukocidin” incluem a produção de citocinas (toxinas) que causam necrose tecidual e destruição de leucócitos, são também associados a infecções de pele e pneumonia necrotizantes. Além disso, estes isolados

frequentemente carregam muitos genes mediadores de exotoxinas, gerando respostas inflamatórias exacerbadas (KARCHMER, 2006).

### 1.5.2. Patogenicidade

*Staphylococcus aureus* é um dos agentes patogênicos mais comuns, responsáveis por surtos de intoxicação alimentar e infecções hospitalares. As peculiaridades do “habitat” de *S. aureus* tornam sua presença amplamente distribuída na natureza, sendo transmissível aos alimentos por manipuladores, na maioria, portadores assintomáticos, e pelos animais, principalmente o gado leiteiro com mastite (BALABAN; RASOOLY, 2000).

Classicamente, estudos sobre os mecanismos de invasão do *S. aureus* revelam que, no primeiro momento, esse organismo adere à pele ou à mucosa para, em seguida, romper as barreiras do epitélio, comprometendo estruturas de ligações intercelulares, como desmossomos e junções de aderência (WATSUKI et al., 2006). Após a invasão do epitélio, o *S. aureus* utiliza diversas estratégias para permitir a sua sobrevivência e proliferação no organismo hospedeiro. Essas estratégias estão relacionadas com inativação da fixação do complemento, a neutralização da fagocitose e a inibição da resposta imune humoral e celular (SANTOS et al., 2007).

As doenças causadas por *S. aureus* podem ser divididas em infecções e doenças causadas por toxinas (NOVAK, 1999). As infecções podem ser localizadas, como pústulas, furúnculos, impetigos, processos mais extensos e graves, como infecção pós-cirúrgica, osteomielite, pneumonia, endocardite, meningite, etc, ou disseminadas, como bacteremia e septicemia. As doenças causadas por toxinas também apresentam amplo espectro de manifestações clínicas, como celulite, síndrome da pele escaldada, síndrome do choque tóxico e intoxicação alimentar (ARBUTHNOTT; COLLEMAN; AZAVEDO, 1990; CORBELLA et al., 1997). *Staphylococcus aureus* é responsável ainda por uma imensa quantidade de problemas médicos, incluindo infecções de pele e tecidos moles, infecções de sítios cirúrgicos, endocardites e bacteremias adquiridas em hospitais (CASEY; LAMBERT; ELLIOT, 2007). Pode ocasionar doenças com manifestações clínicas ou ser assintomáticas, não causando lesões aparentes (CAVALCANTI et al., 2006).

A transmissão pode acontecer por contato direto ou indireto, com contaminação por meio dos profissionais de saúde que dão assistência a portadores hospitalizados, ou no manuseio de objetos contaminados (TAMMELIN et al., 2003). O portador da bactéria tem papel essencial na epidemiologia e patogênese da infecção, aparecendo como fator de risco nas infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), já que a maioria dessas infecções é proveniente de fontes exógenas (PERL et al., 2002).

### **1.5.3. Mecanismos de Resistência aos Antimicrobianos**

A resistência antimicrobiana é um reflexo dos hábitos de uso dos antimicrobianos e desta forma é importante determinar o padrão de resistência dos micro-organismos (OTTER 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  $\beta$ -lactamases. Numa tentativa de reverter este problema foram produzidas as penicilinas resistentes às  $\beta$ -lactamases, o que deu origem a um novo grupo de micro-organismos resistentes a vários quimioterápicos incluindo, à oxacilina e à meticilina. As primeiras cepas de *S.aureus* resistentes a meticilina foram denominadas em inglês, de Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (SILVA et al., 2007a).

O monitoramento da evolução da resistência de *S. aureus* é importante, pois se trata de um micro-organismo que apresenta alta versatilidade em desenvolver resistência aos antimicrobianos e com diferentes matizes de expressão fenotípica a um mesmo antimicrobiano (JORGENSEN, 1993). Embora *S. aureus* possa ser susceptível a vários antimicrobianos tais como: penicilinas, cefalosporinas, eritromicina, aminoglicosídeos, tetraciclinas e cloranfenicol, são também reconhecidos pela sua elevada capacidade de desenvolver resistência a diversos deles (SILVA et al., 2007a).

Estudos demonstram a existência de três mecanismos distintos responsáveis pela resistência a meticilina: a) hiperprodução de beta-lactamases; b) presença de proteína ligadora de penicilina (*protein binding penicilin*- PBP) alterada denominada PBP2a; c) modificações na capacidade de ligação das PBP's (SOUZA; REIS; PIMENTA, 2008). De Lencastre (1991)

sugeriu que os três mecanismos poderiam estar presentes numa mesma linhagem, inclusive interagindo entre si.

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno genético, relacionado à existência de genes contidos no micro-organismo que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas. A outra origem da resistência é a importação dos genes causadores do fenômeno, consistindo na resistência transferível. Esta resistência faz-se através dos mecanismos de transdução, transformação e conjugação e, freqüentemente, envolve genes situados em plasmídios e transposons (SUASSUNA, 1983; SAUNDERS, 1984; CUNHA, 1998).

A resistência à meticilina em *S. aureus* e *Staphylococcus coagulase negativa* (CoNS) é mediada primeiramente pela superprodução de PBP2a, uma proteína de ligação à penicilina (PBP's – *Penicillin Binding Proteins*), alterada, adicional às normais PBP1 a PBP4, porém com afinidade extremamente baixa aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (HACKBARTH ; CHAMBERS,1989).

O gene *mecA*, determinante estrutural que codifica a PBP2a, é muito conservado entre *S. aureus* e *S. epidermidis* resistentes a meticilina (RYFFEL et al.,1990). Este gene está contido em um elemento genético móvel chamado de cassete *mec* do cromossomo de *Staphylococcus* (*SCCmec*), que possui também o elemento de sequência de inserção *IS431mec* e um cassete único de genes da recombinase (*ccr*), que são responsáveis pela integração e excisão do *SCCmec* (CHAMBERS, 1997). A tipificação do *SCCmec* é essencial para compreender a epidemiologia molecular do MRSA. Este *SCCmec* é um grupo móvel de elementos de DNA de 21 a 67 kb, integrado ao cromossomo do MRSA em um único sítio (*attBsc*) locado próximo a origem de replicação do *S. aureus* (KLUYTMANS-VANDEN-BERGEH ; KLUYTMANS, 2006).

Os menores *SCCmec* (I, IV, V e VI) codificam apenas recombinases e genes regulatórios e estruturais para resistência a meticilina. Estes não carregam elementos transponíveis e genes de resistência a outros antimicrobianos (não-  $\beta$ -lactâmicos). Estudos realizados nos últimos anos têm indicado que isolados bem definidos de MRSA comunitários (CA-MRSA) carregam *SCCmec* tipos IV, V e VI, enquanto os MRSA hospitalares (HAMRSA) carregam *SCCmec* tipos I, II e III e, raramente carregam o gene para PVL. Em contrapartida, *SCCmec* IV, V e VI são relativamente pequenos

em tamanho o que confere mobilidade e habilidade de transferência entre as estirpes e, ao menos o tipo IV frequentemente carrega o gene para PVL (APPELBAUM, 2007). Além disso, a multirresistência que é usualmente vista em isolados de HA-MRSA, nos CA-MRSA a resistência é frequentemente limitada aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Isso ocorre em decorrência da ausência de genes de resistência diferentes do *mecA* em SCC*mec* IV, V e VI, quando comparado ao acúmulo de múltiplos genes de resistência nos SCC*mec* II e III (ITO et al., 2004).

É notável que alguns tipos SCC*mec* carreguem vários elementos genéticos adicionais (Tn554, o qual codifica resistência aos macrolídeos, clindamicina e streptograminas; e pT181, o qual codifica resistência às tetraciclina), que conferem resistência a outras classes de antimicrobianos. Estes elementos genéticos são especialmente comuns em HA-MRSA. Além disso, isolados resistentes a eritromicina podem rapidamente induzir resistência à clindamicina (APPELBAUM, 2007).

Mesmo sendo um pré-requisito para a resistência a meticilina, o gene *mecA* não é o único responsável pelo nível ao qual a resistência é expressa; sabe-se também que o nível de PBP2a não está relacionado diretamente ao nível fenotípico de resistência (SUZUKI et al., 1993). Existem alguns genes que auxiliam o gene *mecA* a expressar um alto nível de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, denominados genes auxiliares, fatores essenciais ou genes *fem* (factor essential for methicillin resistance). Seis genes *fem* foram identificados: *femA*, *femB*, *femC*, *femD*, *femE* e *femF*. O gene *femA* e o gene *mecA* estão relacionados à resistência do *S. aureus* à oxacilina/meticilina, sendo de grande importância a sua detecção. Ambos os genes podem ser detectados através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction-PCR*) (VANNUFFEL et al., 1995).

A resistência à oxacilina é variável e depende da expressão do gene *mecA*, produção de  $\beta$ -lactamases e PBP's modificadas (JORGENSEN, 1993) e se caracteriza pelo fato de que uma população bacteriana resistente pode ou não carrear o gene *mecA*, o que significa que nem todas expressam sua resistência da mesma forma (MOHANASOUNDARAM ; LALITHA, 2008).

Cepas de *S. aureus* que apresentam resistência à oxacilina são frequentemente, resistentes a outros grupos de agentes antimicrobianos mais

comuns como os aminoglicosídeos, macrolídeos, cloranfenicol, tetraciclina e fluoroquinolonas, tornando-se um grande risco para o homem e animais em casos de infecções (NEVES et al., 2007). A identificação de cepas MRSA procedentes da comunidade intra-hospitalar ou de pacientes internados tem ocorrido com frequência cada vez maior. Atualmente essas cepas também têm sido isoladas de indivíduos saudáveis na comunidade. A vigilância epidemiológica neste caso é importante em função da ocorrência de infecção cruzada e da disseminação destas estirpes (Id., 2007).

A multirresistência entre *S. aureus* vem se tornando freqüente e o monitoramento das taxas de infecção por *S. aureus*, bem como da resistência aos antimicrobianos, é de suma importância no ambiente hospitalar. Outros estudos também apresentaram altas taxas de resistência à eritromicina, à clindamicina e oxacilina. Kobayashi et al. (2009) isolaram 1239 cepas de *Staphylococcus aureus*, a partir de 1960 amostras clínicas de um hospital público em Goiás, que apresentaram resistência de 70,4%, 68,5% e 68% à eritromicina, oxacilina e clindamicina respectivamente. Das 272 cepas de *S. aureus* isolados em dois hospitais de oncologia no Peru, 156 (57,4%) foram resistentes a oxacilina e 13 cepas a clindamicina. A clindamicina é um antimicrobiano pertencente à classe das lincosamidas que é frequentemente usada para o tratamento das infecções causadas por *S. aureus*. Entretanto, alguns estudos demonstram a emergência de amostras comunitárias resistentes a este antimicrobiano (PATEL et al., 2006).

Em *Staphylococcus aureus*, a resistência aos grupos de Macrolídeo, lincosamida e estreptogramina B (MLSB), que são drogas quimicamente distintas, apresentam mecanismo de ação similar na inibição da síntese protéica, pela ligação ao receptor 23s do rRNA, que faz parte da subunidade 50s do ribossomo bacteriano tem dois fenótipos. O primeiro é devido à modificação ribossomal do 23S rRNA, mediados primariamente pelos genes *ermA*, *ermB* ou *ermC* (encontrados em plasmídios ou cromossomos), impedindo a ligação do antimicrobiano ao seu sítio alvo ribossomal. O segundo tipo é mediado pelo *msrA* e envolve o efluxo ativo do antimicrobiano por uma bomba ATP-dependente, mantendo concentrações intracelulares abaixo do nível requerido para a ligação aos ribossomos (NICOLA et al., 1998). Macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B. apresentam espectro de

atividade dirigida contra cocos GRAM positivos, cocos GRAM negativos e bactérias intracelulares como clamídias e riquetsias. A resistência do *S. aureus* ao grupo MLSB é conhecida desde 1956, logo após a introdução da eritromicina na prática terapêutica (LECLERCQ, 2002; ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

No Brasil, tanto *S. aureus* quanto *S. epidermidis* mostram-se resistentes à penicilina G, ampicilina e amoxicilina em mais de 70% das cepas isoladas, seja em ambiente hospitalar ou na comunidade, não sendo mais indicado o uso destes antimicrobianos para o tratamento de infecções estafilocócicas, mesmo que benignas, e mesmo que procedam do ambiente extra-hospitalar (RANGEL et al., 1995; SANTOS FILHO; FREITAS; SIQUEIRA, 1994). Relatos de hospitais em diferentes regiões brasileiras encontraram de 30% a 100% do *S. aureus* resistentes à oxacilina (SOUZA, OLIVEIRA, RIBEIRO, 1998; SILVA NETO et al., 1999).

Algumas cepas de MRSA também podem ser resistentes a outros antibióticos, além das penicilinas e das cefalosporinas e, ocasionalmente, são sensíveis apenas à vancomicina e a teicoplanina. As infecções por estas cepas são semelhantes às causadas por cepas sensíveis, ocorrendo assim, a disseminação epidêmica de cepas altamente transmissíveis de hospital para hospital de uma região ou de um país (CASTRO, 2003; RICARDO, 2004). A resistência a glicopeptídeos em *S. aureus* pode se expressar através de dois fenótipos distintos: VISA (*S. aureus* com sensibilidade reduzida à vancomicina) e VRSA (*S. aureus* resistente à vancomicina).

Os isolados de VISA apresentam sensibilidade intermediária à vancomicina, com CIM variando de 8 a 16 µg/ml. Um estágio inicial de resistência denominado heteroVISA (hVISA), foi descrito para cepas de *S. aureus* sensíveis à vancomicina, mas que contêm subpopulações resistentes para este antimicrobiano (COSGROVE; CARROL; PERL, 2004). O segundo fenótipo de resistência VRSA, foi descrito nos últimos anos, e está relacionado a um alto grau de resistência à vancomicina, com CIM > 32µg/mL (TENOVER et al., 2004). O mecanismo aparente deste fenótipo de resistência está relacionado pela conjugação de *S. aureus*, e de um plasmídeo carreador do gene *vanA* proveniente do *Enterococcus faecalis* (FONSECA, 2005; LOWY, 2003).



A susceptibilidade reduzida dos *S. aureus* a vancomicina (VISA com CIM > 8-16 mcg/ml) surgiu em 1996 no Japão, e em 2002, nos EUA, a primeira cepa resistente à vancomicina (VRSA) (MIMICA; MENDES, 2007; SAIID-SALIM; MATHEMA; KREISWIRTH, 2003; SANTOS et al., 2007). No Brasil registrou-se o isolamento de *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina no Rio de Janeiro, em São Paulo e Porto Alegre, e de *Staphylococcus coagulase* negativos resistentes à vancomicina e à teicoplanina em São Paulo (SANTOS, 1997; MAMIZUKA; OLIVEIRA, 2000; SANTOS et al., 2007). Em 2000, foi encontrada a primeira cepa resistente à vancomicina, em um hospital de Queimados no Rio de Janeiro (SANTOS et al., 2007). Ainda pouco se sabe sobre a resistência adquirida pelo *S. aureus* à vancomicina (FRIDKIN et al., 2001). Acredita-se que esta possa estar relacionada ao envolvimento do gene *van*, que determina resistência de *Enterococcus* a esta droga, com a transmissão por meio de plasmídeos ou pelo espessamento da parede celular, com a produção de maiores quantidades de peptidoglicanos (CUI et al., 2006; SANTOS et al., 2007).

A vancomicina pertence ao grupo de glicopeptídicos (vancomicina e teicoplanina) isolado em 1956, que foi obtido por *Streptomyces orientalis*, e foi introduzido no mercado em 1958, produzido pelo Laboratório Lilly nos Estados Unidos da América (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1982; VILA et al., 2007). Este antimicrobiano tem peso molecular aproximadamente de 1.500 Da, e inibe a síntese e acoplamento dos polímeros de peptidoglicano da parede celular das bactérias, pois forma um complexo com o precursor D-alanil-D-alanina. Esse precursor se encaixa na molécula da vancomicina, evitando deste modo, sua ligação ao terminal do peptidoglicano, que é o alvo das enzimas transglicolase e transpeptidase, ou seja, ela inibe a incorporação de aminoácidos aos glicopeptídeos integrantes da parede celular das bactérias Gram-positivas. Além disso, a vancomicina pode alterar não só a síntese de RNA como também a permeabilidade da membrana citoplasmática da bactéria. Esses múltiplos mecanismos de ação da vancomicina provavelmente contribuem para baixa frequência de desenvolvimento de resistência (SILVA, 2006).

No Brasil, o uso da vancomicina representa uma das últimas linhas de tratamento da infecção estafilocócica, sendo ainda escassos os estudos que

demonstraram o isolamento de estirpes resistentes. Esta resistência, entretanto, já se encontra disseminada em diversos países, conforme relatado em alguns estudos (SANTOS et al., 2007; CUI et al., 2006).

Segundo o último Boletim da Rede de Monitoramento de Resistência Antimicrobiana (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2009) o percentual de sensibilidade das cepas de *S. aureus* e de *Staphylococcus coagulase negativa* (CoNS) encontrado nos hospitais participantes, no período de julho de 2006 a junho de 2008, aos antimicrobianos oxacilina e vancomicina foi o seguinte: *S.aureus* 39% (973/364) sensível a oxacilina e 100% sensível (897/897) a vancomicina, e CoNS: 20% sensível (1483/299) a oxacilina, não sendo testado para vancomicina.

A partir da década de 1990, intensificaram-se os relatos de infecções associadas à resistência à oxacilina e à vancomicina. O Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recomenda que a detecção destas resistências seja realizada pelo teste de Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2006). O CIM é um método considerado padrão para a avaliação quantitativa da resistência bacteriana aos antimicrobianos (MIMICA; MENDES, 2007).

#### **1.5.4. Diagnóstico laboratorial**

Para o diagnóstico microbiológico de rotina são adotados procedimentos que incluem a coleta, o cultivo e a caracterização dos isolados. Essa caracterização é realizada de acordo com esquemas de identificação convencionais, incluindo características morfológicas, bioquímicas e sorológicas, entre outras (BOONE; CASTENHOLZ, 2001). Além da identificação fenotípica, técnicas moleculares têm sido empregadas no diagnóstico laboratorial, através da detecção e caracterização de genes ou proteínas específicas por métodos baseados na reação em cadeia pela polimerase (PCR), que por meio de quantidades muito pequenas de sequências específicas de DNA ou RNA. Essas quantidades podem ser amplificadas enzimaticamente a uma extensão de material suficiente para detecção (KONEMAN et al., 2001). A PCR foi desenvolvida inicialmente por Kary B. Mullis, em 1985, permitindo obter milhões de cópias de um segmento

específico de DNA através da ação da enzima *Taq* DNA polimerase e de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) sobre um DNA molde. É realizada em um equipamento denominado termociclador, o qual possibilita a alternância de temperaturas por determinados períodos de tempo, de modo a permitir a ocorrência de ciclos repetitivos de desnaturação e síntese do DNA (KONEMAN et al., 2001). Na última década, o PCR tornou-se o mais utilizado e popular método genético para diagnóstico microbiológico (BOER; BEUMER, 1999; MALORNY et al., 2003). A introdução de PCR em diagnóstico microbiano estabeleceu uma alternativa viável aos métodos tradicionais de cultura e aos testes imunológicos (MALORNY et al., 2003). Essa técnica apresenta diversas vantagens em relação às técnicas convencionais, como maior poder de tipificação e discriminação, maior rapidez, bom limite de detecção, maior seletividade, especificidade, potencial para automação e a possibilidade de trabalhar com bactérias que não são cultiváveis em meios de cultura normalmente utilizados (BUSH; NITSCHKO, 1999).

As populações de *S.aureus* podem apresentar uma considerável heterogeneidade genética, a qual pode ser explorada para investigar a disseminação de cepas de *S. aureus* de origens humana e animal (TENOVER et al., 1994; KAPUR et al., 1995). A avaliação desses traços heterogêneos inclui as variações das características bioquímicas e de sensibilidade a antimicrobianos, a fagotipagem, o perfil da presença de plasmídeos, o estudo das regiões variáveis dos genes da coagulase, da região X da proteína A e do espaçador intergênico entre as regiões 16S e 23S do RNA ribossomal, a amplificação aleatória de segmentos genômicos (RAPD-PCR), e a macrorrestrição do DNA celular total detectada pela eletroforese de campo pulsado (PFGE) (LANGE et al., 1999).

Rotineiramente são utilizados métodos microbiológicos clássicos para o diagnóstico laboratorial, os quais são dotados de alto nível de sensibilidade, mas requerem dias ou semanas para serem concluídos (GILLIGAN et al., 2000). Técnicas imunológicas são bastante usadas para a detecção de *S. aureus* e de enterotoxinas estafilocócicas, contudo, sua sensibilidade e especificidade podem variar dependendo da pureza dos reagentes e níveis de expressão da toxina (GILLIGAN et al., 2000). Técnicas como ELISA - (*Enzyme-Linked Immunosorbent assays*), imunodifusão e radioimuno-ensaios, assim

como kits comerciais de diagnósticos baseados em reações imunoenzimáticas, são alguns dos sistemas usualmente empregados. Essas técnicas, no entanto, além do alto custo, não possuem sensibilidade suficiente para detectar e quantificar concentrações de enterotoxinas abaixo de  $0,5 \text{ ng. mL}^{-1}$  ou  $0,5 \text{ ng.g}^{-1}$  (SOEJIMA et al., 2004). Além disso, com o uso dessas metodologias, existe a possibilidade da obtenção de resultados falsos negativos ou falsos positivos na identificação de *S. aureus* enterotoxigênicos, haja vista que são baseados na avaliação da produção de enterotoxinas (RASOOLY; RASOOLY, 1998; SHARMA; REES; DODD, 2000).

Na rotina microbiológica, o diagnóstico para MRSA é baseado nas características fenotípicas. A técnica de difusão em Agar com discos de oxacilina é a mais usada. O Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI recomenda a utilização do ágar Mueller-Hinton suplementado com 4% de NaCl e  $6 \mu\text{g/mL}$  de oxacilina, o Screen agar, para confirmação de resistência à meticilina (LEE, et al., 2004; BRAOIOS, 2005; METAN; ZARAKOLU; UNAL, 2005). Problemas na detecção de MRSA podem estar relacionados a baixos níveis de expressão da resistência à oxacilina em alguns isolados, diminuindo a sensibilidade do teste por disco-difusão com oxacilina. Nestes casos a cefoxitina apresenta melhores resultados em termos de sensibilidade por estimular a expressão da resistência à meticilina mais fortemente que a oxacilina (ROSA, 2009).

Para a determinação da resistência à oxacilina e à vancomicina, o Clinical and Laboratory Standards Institute (2009c), documento M07-A8, preconiza a realização do teste de Concentração Inibitória mínima (CIM). O documento técnico não apresenta parâmetro para a aferição do tamanho do halo de inibição para vancomicina. Uma amostra só poderá ser confirmada como resistente à vancomicina após a realização do teste da concentração inibitória mínima (BROWN et al., 2005). O CIM é um método considerado padrão para a avaliação quantitativa da resistência bacteriana aos antimicrobianos (MIMICA; MENDES, 2007).

Em relação aos estudos epidemiológicos varias abordagens têm sido utilizadas. Por exemplo, a aplicação dos métodos de biologia molecular em programas de vigilância tem capacitado o rastreamento da disseminação intra

e inter-hospitalar de patógenos, que podem atravessar regiões, e até mesmo continentes. Entre estes micro-organismos estão incluídos *Staphylococcus* spp, principalmente os MRSA (TEIXEIRA et al., 1995).

Para verificação do perfil de susceptibilidade dos micro-organismos aos antimicrobianos vários testes laboratoriais *in vitro* podem ser realizados, tais como: o teste de disco difusão, de ágar diluição em meio sólido, ou líquido, para detecção da concentração inibitória mínima (CIM) (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2009a; ETM, 2008). Com o teste de disco difusão pode ser conhecido se um organismo é sensível ou resistente a um determinado antibiótico, contudo este método não fornece qual é o grau de resistência do micro-organismo. O teste realizado com base apenas na presença ou ausência de um halo de inibição, sem considerar o tamanho do halo, não é aceitável. Só podem ser obtidos resultados confiáveis com testes de disco difusão que usam o princípio de metodologia padronizada e medidas do diâmetro do halo de inibição correlacionadas às concentrações inibitórias mínimas (CIMs), com cepas reconhecidamente sensíveis e resistentes a diversos agentes antimicrobianos (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2010). Vários são os antimicrobianos preconizados para a realização do Teste de Disco difusão para o *S. aureus* (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2010). O teste de Agar diluição obtida usando a CIM pode mostrar qual a concentração do agente antimicrobiano necessária no sítio da infecção para inibir o crescimento do organismo infectante (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2009b). O E-test também pode ser usado para identificação da sensibilidade de amostras. Nesse método, uma fita estreita de material plástico, que contém gradiente com concentrações crescentes de antibiótico, e deve ser colocada em placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton, semeada com o patógeno, de maneira semelhante ao teste de difusão em disco (FERREIRA ; ÁVILA, 1996).

#### **1.5.4.1. Isolamento e Identificação Bioquímica**

O isolamento pode ser realizado em alguns meios de culturas como: no meio diferencial agar sangue, no meio seletivo agar manitol salgado (AMS) ou

meio enriquecido de BHI com 7,5% de cloreto de sódio (CASSETTARI; STRABELLI; MEDEIROS, 2005).

A identificação das características morfo-tintoriais são analisadas pela técnica de coloração de GRAM e a identificação bioquímica é realizada através da produção das enzimas catalase, coagulase, DNase e da fermentação do manitol e de outros açúcares (ZAVADINACK NETTO et al., 2001; MURRAY et al., 2004). Segundo Martinez (2001) o teste de coagulase em tubo (pesquisa da coagulase livre) com plasma comercial do coelho é o critério mais seguro para identificação das espécies de *Staphylococcus*.

A pesquisa da enzima termonuclease (TNase) também é frequentemente utilizada como um teste simples, rápido e prático para a identificação de rotina de *S. aureus*. Todavia, os testes de coagulase e de termonuclease podem resultar em falso-negativos na designação das espécies, visto que as espécies, *S. intermedius* e *S. hyicus*, apresentam testes da coagulase e termonuclease positivas, sinalizando a necessidade de confirmação através de outros testes (LANCETTE; TATINI, 1992).

#### **1.5.4.2. Identificação Molecular**

A partir dos anos 90, métodos genotípicos de taxonomia, direcionados para moléculas de DNA ou de RNA, vêm sendo amplamente utilizados na identificação bacteriana, por oferecerem resultados mais rápidos, mais precisos e reprodutíveis, quando comparados aos métodos baseados nas características fenotípicas (BUSCH; NITSCHKO, 1999; VANDAMME et al., 1996; RODRIGUES, 2009).

Diversos trabalhos sugerem a utilização da amplificação, por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), de sequências específicas do genoma microbiano para serem utilizadas como marcadores genéticos, como uma alternativa viável aos métodos morfológicos e bioquímicos. O desenvolvimento de métodos baseados em PCR para diagnóstico microbiano estabeleceu uma alternativa viável aos métodos tradicionais de cultivo (MALORNY et al., 2003) e tem se revelado uma das alternativas rápidas, sensíveis e específicas na identificação de patógenos e seus genes de enterotoxinas (ROSEC; GUIRAUD, 2002).

O aprimoramento de técnicas baseadas em sequências de DNA ao longo dos últimos anos forneceu a base necessária para a utilização de métodos moleculares e análise filogenética de sequências de DNA e proteínas como instrumento de rotina no estudo da diversidade de micro-organismos (MOREL, 1997). Assim, sequências do operon ribossomal DNAr 16S, 23S, 5S e regiões espaçadoras 16S-23S figuram entre as mais utilizadas em estudos de filogenia de bactérias. Milhares de sequências encontram-se disponíveis em bases de dados como o RDP e o Genbank. A análise filogenética da sequência de genes do operon ribossomal, particularmente do DNAr 16S, é uma metodologia relativamente simples e com alto poder de resolução, empregada na identificação de micro-organismos em nível de gênero e, em alguns casos, também espécie (GÜRTLER; STANISICH, 1986; WOESE, 1987). A região espaçadora 16S-23S, que é conservada, tem sido frequentemente utilizada em estudos de identificação, permitindo a classificação de muitas bactérias (GÜRTLER; STANISICH, 1996; MENDOZA et al., 1998).

Para a identificação de *S. aureus* já foram utilizados, entre outros genes, o gene *spa* (que codifica proteína A), gene *coa*, (que codifica a coagulase), o gene *nuc* (que codifica a enzima termonuclease -TNase) que é uma proteína extracelular termoestável com massa molecular de 17000 KDa (TUCKER; HAZEN; COTTON, 1978). Esta enzima apresenta estabilidade térmica, sendo produzida por 99% dos *S. aureus*, tornando-se outro importante critério para a identificação dessa espécie (PARK et al., 1980). A enzima termonuclease é uma endonuclease, que degrada tanto o DNA como o RNA, e sua atividade enzimática pode resistir a 100°C, por pelo menos, 1 hora (LACHICA; HOEPRICE; RIEMANN, 1972).

Vários estudos têm relacionado à amplificação do gene *femA* com a identidade fenotípica de *S. aureus*, o que permite diferenciá-lo de outras espécies (BORGES, 2006). O gene *femA* é um marcador que tem sido estudado para a expressão de uma proteína essencial precursora da biossíntese do peptideoglicano nessa espécie (VERAS et al., 2008). Esse gene faz parte dos genes *fem* (*femX*, *femB*, *femC*, e outros) os quais codificam proteínas designadas de fatores essenciais para a resistência a meticilina (BENSON et al., 2002). Apesar de o gene *femA* ser considerado um marcador essencial e específico para a identidade de *S. aureus*, devido a sua resistência

á meticilina, esse gene não é uma região conservada somente nessa espécie. Estudos relatam a presença desse gene em algumas espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa resistentes a meticilina – CoNS (FERNANDEZ et al., 2004).

Em relação aos estudos epidemiológicos varias abordagens têm sido utilizadas. Por exemplo, a aplicação dos métodos de biologia molecular em programas de vigilância tem capacitado o rastreamento da disseminação intra e inter-hospitalar de patógenos, que podem atravessar regiões, e até mesmo continentes. Entre estes micro-organismos estão incluídos *Staphylococcus* spp, principalmente os MRSA (TEIXEIRA et al., 1995).

Os métodos de caracterização molecular mais comumente utilizados são baseados na análise do polimorfismo dos tamanhos dos fragmentos de DNA, clivados com enzima de restrição (RFLP - *Restriction Fragment-Length Polymorphism*) ou na amplificação de seqüência do DNA genômico, através da Reação em cadeia da polimerase (MITANI et al., 2005).

O polimorfismo, tanto de seqüências específicas quanto randômicas envolvendo ácidos nucléicos, tem sido bastante estudado, como por exemplo, o método denominado "Random Amplified Polymorphic DNA" (RAPD-PCR). O princípio básico desses métodos é a aplicação de biomarcadores, moléculas que possuem regiões altamente conservadas entre os diferentes micro-organismos e regiões variáveis específicas de cada um para detecção e identificação dos mesmos (PACE; OLSEN; WOESE, 1986). Já o polimorfismo dos fragmentos gerados com digestão por enzimas de restrição, analisados por eletroforese de campo pulsado (PFGE) tem sido utilizado para investigar surtos de *S. aureus* em ambiente hospitalar (BANNERMAN et al., 1995; AUCKEN et al., 2002). Segundo Tenover et al. (1995), essa técnica é uma das ferramentas de tipagem de maior poder discriminatório para *S. aureus*, por detectar variações genéticas menores entre estirpes epidêmicas, e é considerado um bom método para estabelecimento de relações clonais em estudos epidemiológico-moleculares. O PFGE tem sido bastante utilizado entre as cepas resistentes á oxacilina isoladas da comunidade e de centros de saúde (KOSTMAN et al., 1995; MCDOUGAL et al., 2003) .

A caracterização de *S. aureus* através da análise do polimorfismo do gene coagulase (*coa*) como um marcador epidemiológico, é também utilizada



(LAWRENCE et al., 1996). Este método é realizado com iniciadores, homólogos à região conservada do gene *coa*, no intuito de amplificar as sequências que codificam a região C-terminal desta molécula (GOH et al., 1992; NADA et al., 1996).

Dentre os métodos moleculares, muitos autores consideram a tipagem do gene *coa* uma ferramenta epidemiológica simples e suficientemente reprodutível, específica e discriminatória, quando empregada na subtipagem de *S.aureus* isolados de fontes humanas e animais (SANTOS et al., 2003). A região variável do gene *coa* é constituída de sequências curtas repetidas (SRRs) em *tandem* de 81 pb e vem sendo utilizada em diversos estudos epidemiológicos para subtipar isolados de *S. aureus* (SANTOS et al., 2003).

A pesquisa do gene *mecA* e o estudo do perfil de resistência aos antimicrobianos em estirpes de *S. aureus* vêm sendo amplamente utilizados como ferramentas em estudos epidemiológicos de casos de infecção hospitalar em humanos (van BELKUM et al., 1997; MORVAN et al., 1997). A resistência à oxacilina pode ser detectada utilizando a técnica PCR, considerada padrão ouro para a detecção do gene *mecA* (ROSA, 2008; TERASAWA, 2006).

Murakami et al. (1991) utilizaram esta metodologia para detecção da resistência a oxacilina em *S. aureus* e nos CoNS, por considerar a técnica eficaz na detecção de isolados oxacilina resistentes, incluindo aqueles com resistência heterogênea. A caracterização molecular por sequenciamento multilocus (*Multilocus Sequence Typing- MLST*) foi desenvolvida anos atrás como um método de referência para macro-estudos epidemiológicos como, por exemplo, estudos sobre clonalidade de bactérias abrangendo populações bacterianas separadas por ampla distância geográfica, relacionada com o tempo ou com a epidemiologia (STRUELENS, 2002).

## **1.6. *Staphylococcus aureus* em Unidades Básicas de Saúde**

O grupo de patógenos, que se destaca é o das bactérias que constituem a flora humana e que normalmente não trazem risco a indivíduos saudáveis, devido sua baixa virulência, mas que podem causar infecção em indivíduos com estado clínico comprometido, denominada assim de bactéria oportunista (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004). A transmissão de

*Staphylococcus* spp tem significado especial no ambiente de saúde, onde as fontes de infecções são constituídas pelo próprio ambiente, pelos portadores assintomáticos e pelos pacientes. Os meios de transmissão podem ser diretos (contato direto com a fonte de infecção ou mesmo autoinfecção) ou indiretos, em que os *S.aureus* são veiculados principalmente pelas mãos do profissional de saúde ou pelos equipamentos contaminados (BALDY, 2005).

Silva et al. (2007a) comenta que MRSA emergiu como importante patógeno associado à elevada morbidade e mortalidade, propagando-se entre pessoas através de contato direto ou indireto ao tocar objetos (toalhas, lençóis, roupas ou equipamentos médicos). No âmbito internacional, determinado por um estudo mostrou que a prevalência das infecções hospitalares foi mais alta na América Latina e Ásia (11,4%) do que na Europa (9,3%), nos Estados Unidos (8,7%) e Canadá (8,6%) (FONTANA, 2006). A magnitude do papel que *S. aureus* exerce nas infecções hospitalares e comunitárias, aliada à morbimortalidade causada por este agente faz com que estudos epidemiológicos sejam cada vez mais necessários, a fim de auxiliar no conhecimento da dinâmica da presença de *S. aureus* em instituições de saúde no Brasil.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Verificar a Ocorrência e Caracterização de Espécies Patogênicas do Gênero *Staphylococcus* em Artigos Médicos e Profissionais de Saúde de duas Unidades Básicas de Saúde, no Município do Rio de Janeiro, no período de 2009 a 2011, Brasil.

### **2.2. Objetivos específicos**

- ✓ Identificar através de métodos fenotípicos e moleculares os diferentes grupos patogênicos obtidos de artigos médicos e de profissionais de saúde;
- ✓ Caracterizar o perfil de sensibilidade de *Staphylococcus* aos antimicrobianos utilizados;
- ✓ Verificar a presença de genes responsáveis pela produção de resistência e de virulência provenientes de artigos médicos e dos profissionais de saúde;
- ✓ Relacionar os tipos encontrados com os potenciais riscos de patogenicidade e transmissibilidade entre os profissionais e pacientes.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Aspectos Éticos**

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde e Defesa Civil - RJ, sob parecer favorável nº de protocolo 141/09 (CAAE N ° 01600314000-09) - 05/10/2009 (ANEXO 1- CMS e ANEXO 2- PS).

#### **3.2. Obtenção das amostras**

##### **3.2.1. Localização das unidades do estudo**

O estudo foi realizado em dois ambulatórios de Pré-Natal: um do Centro Municipal de Saúde (CMS) e outro do Posto Municipal de Saúde (PS), estando ambos localizados na região de Jacarepaguá. Esta região fica na área programática quatro (AP4), do município de Rio de Janeiro (Figura 2).

Segundo o censo demográfico do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE a AP4 tem uma população total de 909.955 habitantes, e que está distribuída em três regiões administrativas: **a.** XVI – Jacarepaguá (572.617), **b.** XXIV Barra da Tijuca (300.823), **c.** XXXIV Cidade de Deus (36.515) (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2010).

##### **3.2.2. Coleta de amostras**

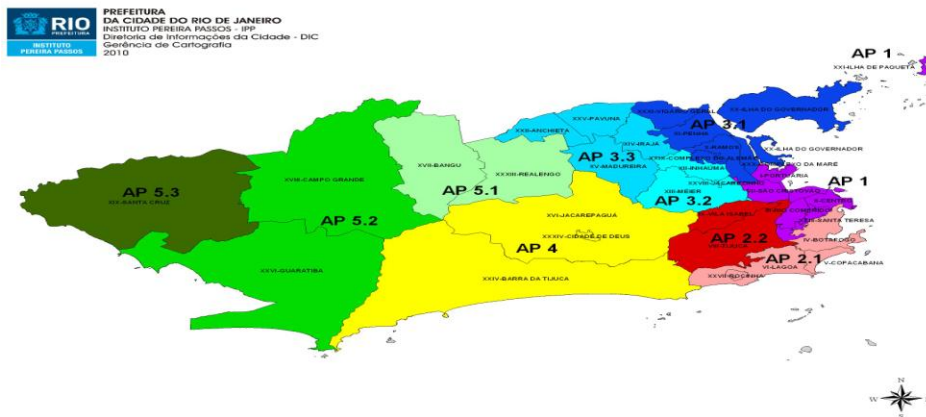
Foram realizadas quatro coletas no CMS e três no PS, no período entre maio de 2009 e janeiro de 2010, perfazendo um total de sete coletas com um total de 79 amostras coletadas. As coletas foram realizadas através de “swab” seco e estéril, friccionado e rolado em toda a extensão da superfície dos equipamentos (estetoscópio, esfigmomanômetro e Sonar Doppler) e nas mãos e narinas dos profissionais de saúde. Antes da coleta nasal e das mãos dos profissionais de saúde incluídos no estudo, estes foram esclarecidos do objetivo do trabalho proposto, e a coleta se realizou mediante sua concordância, através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e

Esclarecido (APÊNDICE I e APÊNDICE II). No momento da coleta os profissionais responderam a algumas questões quanto à idade, sexo, função e tempo de serviço na unidade. Após o consentimento foi realizada a coleta nas mãos direita e esquerda friccionando-se um “swab” nas palmas das mãos, dorso, ponta dos dedos, região interdigital, debaixo de anéis, debaixo das unhas, e outro “swab” na mucosa nasal nas narinas direita e esquerda. A coleta das mãos foi feita pelo pesquisador estando suas mãos com luvas descartáveis, porém a das narinas foi o próprio profissional orientado pelo pesquisador que a realizou.

Todas as superfícies dos artigos médicos (estetoscópio: olivas e diafragma; esfigmomanômetro: pêra de borracha e manguito superfície interna e do transdutor do sonar Doppler), utilizados no atendimento das gestantes das clínicas de pré-natal, foram friccionadas com “swab” seco e estéril em todos os sentidos até esgotar a superfície (Figura 3). Logo após a fricção todos os “swabs” foram colocados imediatamente em tubo de ensaio contendo meio de cultura líquido *Brain Heart Infusion* (BHI), e transportados para o Laboratório de Micro-organismos de Referências do Departamento de Microbiologia, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) em recipiente fechado isotérmico a temperatura ambiente no prazo máximo de uma hora e trinta minutos.

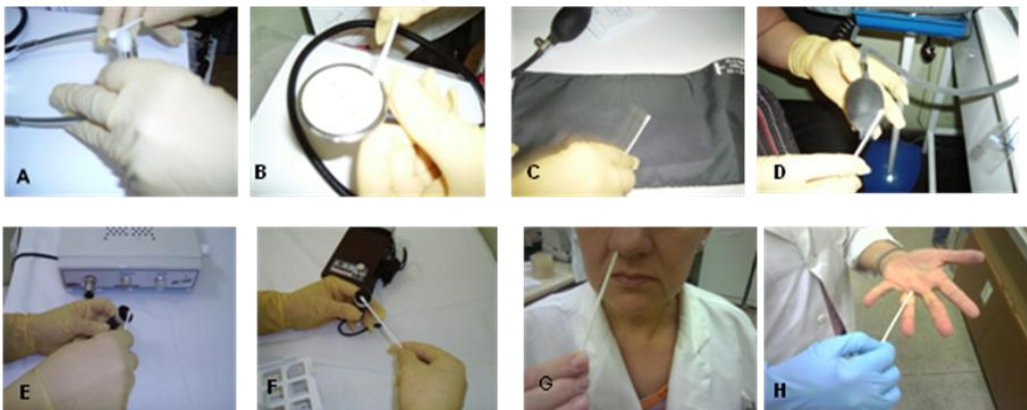
As quatro coletas no CMS resultaram em 36 amostras sendo 22 de equipamentos médicos e 14 dos profissionais de saúde. As três coletas no PS resultaram em 43 amostras sendo 19 de equipamentos médicos e 24 dos profissionais de saúde (Tabela 1). Todos os artigos médicos estudados são de uso exclusivo da clínica de pré-natal de cada unidade básica, e todos os profissionais de saúde estavam aparentemente saudáveis (médico (a), enfermeira, técnico (a) de enfermagem e auxiliar de enfermagem). Dos 21 profissionais existentes apenas dois recusaram-se a participar da pesquisa.

**Figura 2:** Distribuição das Áreas Programáticas do Rio de Janeiro



Fonte: [http://www.armazemdedados.rio.rj.gov.br/arquivos/2905\\_aps\\_indice.JPG](http://www.armazemdedados.rio.rj.gov.br/arquivos/2905_aps_indice.JPG)

**Figura 3:** Sítios utilizados na coleta das amostras



**A.** Estetoscópio - Olivas auriculares; **B.** Estetoscópio – Diafragma; **C.** Esfigmomanômetro - Braçadeira com manguito; **D.** Esfigmomanômetro - Pêra de borracha insufladora; **E.** Transdutor do Sonar de mesa; **F.** Transdutor do Sonar portátil; **G.** Fossas Nasais; **H.** Mãos.

**Tabela 1:** Número de amostras de acordo com o local e os sítios de coletas

Nº Data	Coletas/ Local Coleta	Artigos médicos	Profissionais	Total Amostras	de
1ª / 20-05-2009	CMS <sup>a</sup>	5	2	7	
2ª / 17-06-2009	CMS	5	-	5	
3ª / 02-07-2009	CMS	6	6	12	
4ª / 18-08-2009	CMS	6	6	12	
5ª / 05-11-2009	PS <sup>b</sup>	5	6	11	
6ª / 10-11-2009	PS	7	8	15	
7ª / 06-01-2010	PS	7	10	17	
Total Geral	—	41	38	79	

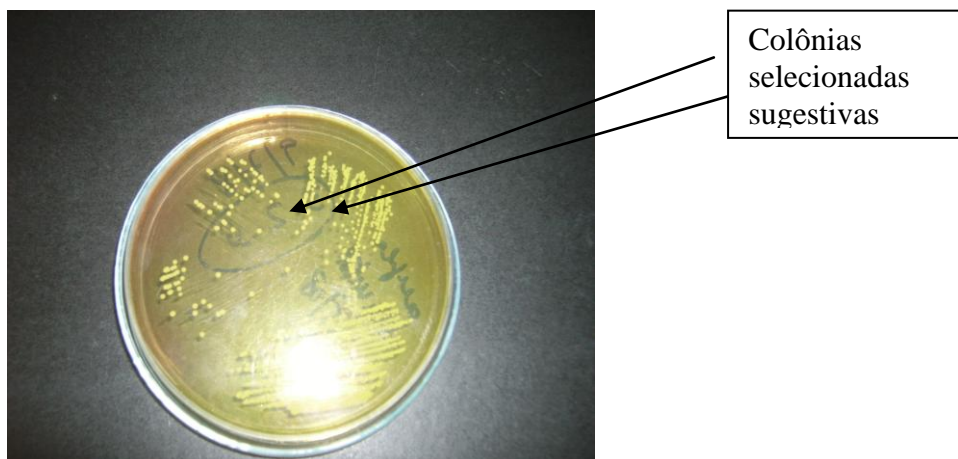
<sup>a</sup>CMS - Centro Municipal de Saúde; <sup>b</sup>PS - Posto de Saúde

O número de coletas de quatro para o CMS e de três para o PS, foi determinado em função do horário do plantão dos profissionais que atuavam em cada unidade estudada, podendo assim entrevistar todos (21) profissionais. Destes, porém apenas 19 profissionais, assinaram o formulário de consentimento para a coleta de amostra. Apenas dois profissionais foram coletados duas vezes (uma auxiliar de enfermagem do CMS e outro técnico de enfermagem do PS), os demais apenas uma única vez (17 profissionais + 2 (repetiram) = 19 coletados + 2 não participaram = 21 profissionais). Do total geral de 79 amostras, 41 amostras foram dos artigos médicos e 38 dos profissionais.

### 3.3. Isolamento e identificação fenotípica dos isolados

Os caldos BHI contendo os “swabs” foram incubados por 24 h a 37°C. Após esse período as culturas foram semeadas por esgotamento em estrias em placa contendo o meio de cultura agar manitol salgado (AMS) (DIFCO – Detroit USA) e incubado por 24 h a 37°C. Após o período foram coletadas duas colônias de cada placa de AMS fermentadoras do manitol (Figura 4) sugestivas e repicadas em novos meios líquidos de BHI (37°C/24h), e após este período foram submetidas à coloração de GRAM (ANEXO III) (TRABULSI et al., 2002). As placas com culturas que apresentaram crescimento, mas não fermentaram o manitol foram descartadas.

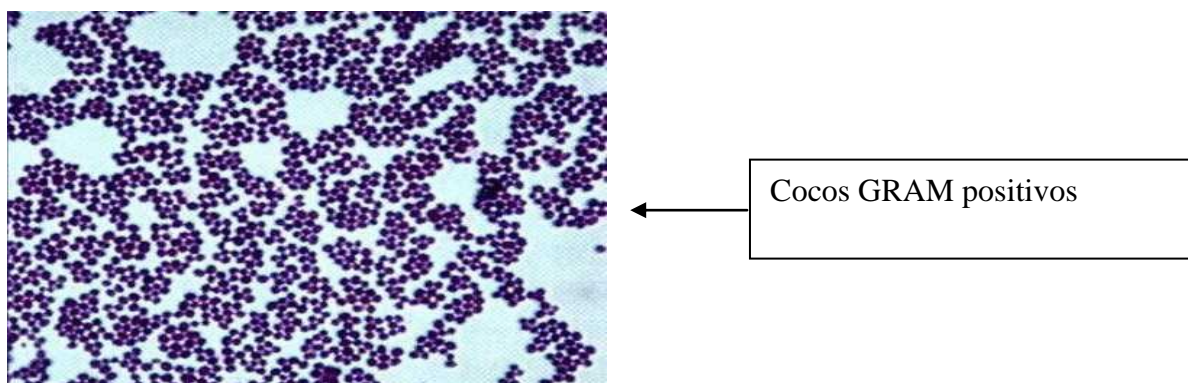
**Figura 4:** Crescimento Bacteriano em Agar Manitol Salgado



Fonte: Autor

A avaliação das características morfotintoriais foi determinada pela Coloração de Gram e observada ao microscópio ótico (NIKON Eclipse E400). As bactérias do gênero *Staphylococcus* apareceram como cocos Gram positivos arranjados em forma de cachos de uva ou aos pares (Figura 5) (BIER, 1976; YORK, 2004).

**Figura 5:** Método de Coloração de Gram



Fonte: TORTORA; FUNKE; CASE 2005.

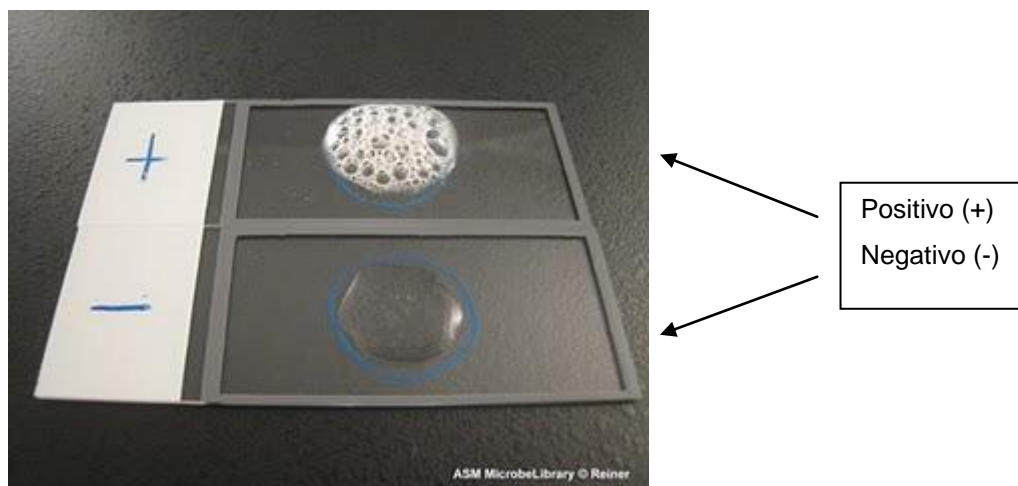
### 3.3.2. Produção de Catalase

A prova da catalase foi realizada depois de retirada uma alíquota com o auxílio de uma alça bacteriológica da cultura em BHI, que foi transferida para a superfície de uma lâmina de microscópio. Foi adicionada ao crescimento uma gota de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) a 3%. A positividade foi caracterizada



pela presença de bolhas de gás em até 30 segundos (Figura 6) Controles: Positivo – *S. aureus* ATCC 12600 (INCQS 00358) e Negativo *Streptococcus pneumoniae* ATCC 33400 (INCQS 00360) (RIBEIRO; SOARES, 1993).

**Figura 6:** Resultados da Prova da Catalase

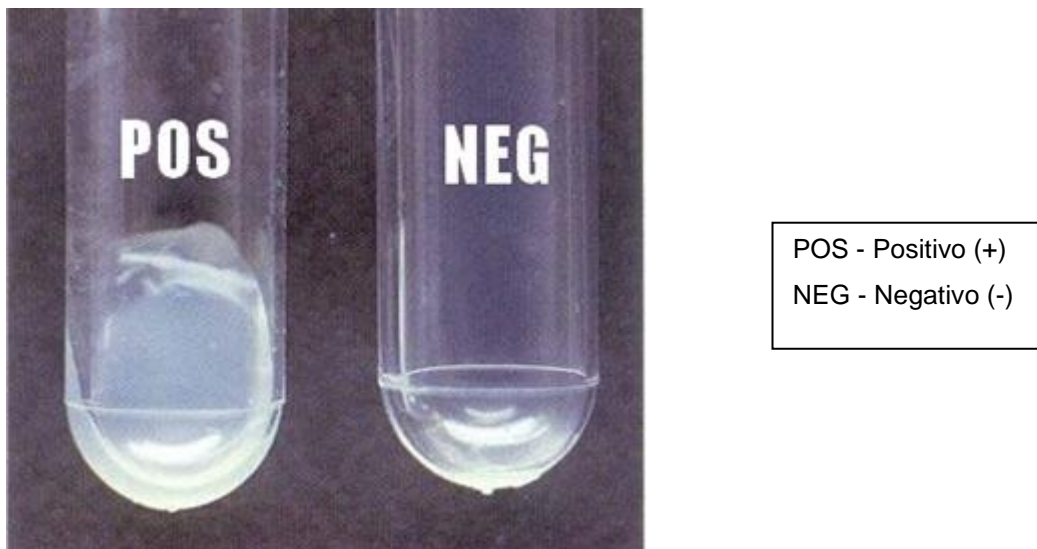


Fonte: <http://umconviteabiomedicina.blogspot.com/2011/04/identificacao-de-bacterias-catalase-e.html>

### 3.3.3. Coagulase livre em tubo

A produção da coagulase livre foi verificada pela adição de 0,5 mL de uma cultura de 24h em meio líquido BHI a um tubo contendo 0,5 mL de plasma de coelho com EDTA (Becton Dickinson), incubado a 37° C em banho termostático durante 24 horas. As leituras foram realizadas a cada hora, durante 4-5 horas iniciais, para verificar a formação do coágulo. Quando não foi possível a visualização do coágulo neste período de tempo, as amostras foram deixadas em banho-maria até completar às 24 horas (SPERBER; TATINI, 1975; RIBEIRO; SOARES, 1993; NEDER, 1992; KONEMAN et al., 2008). Controle: *S aureus* ATCC 6538 (INCQS 00039 - controle positivo) e *S epidermidis* ATCC12228 (INCQS 00016 - controle negativo).

**Figura 7:** Resultados da Prova da coagulase livre

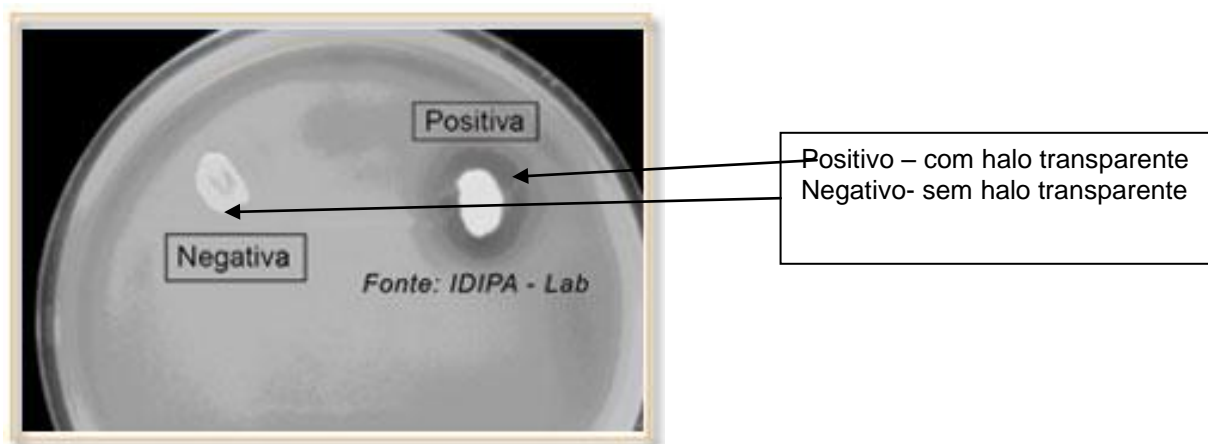


Fonte: <http://umconviteabiomedicina.blogspot.com/2011/04/identificacao-de-bacterias-catalase-e.html>.

#### **3.3.4. Produção de DNase**

Para a realização da prova da DNase foi retirada uma alíquota do meio líquido de BHI, e reinsoladas em tubo de ensaio contendo agar inclinado BHI e incubada a 37° C por 24h .Após este período foi retirada uma alíquota da cultura e semeada (*spot*) em agar DNase, e incubada a 37° C por 24h. Após a incubação, foi adicionado ácido clorídrico – HCl 1N para verificar a formação de halo transparente ao redor do *spot* por 3 minutos indicando a degradação do DNA pela enzima DNase produzida pelo *S. aureus* (JAWETZ; MELNICK; ALDELBERG, 2000). (Figura 8) Controle: *S. aureus* ATCC 6538 (INCQS 00039 - controle positivo) e *S. epidermidis* ATCC 12228 (INCQS 00016 - controle Negativo).

**Figura 8:** Prova da DNase



Fonte:

[http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede\\_rm/cursos/boas\\_praticas/modulo4/id\\_sta4.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/id_sta4.htm)

### **3.4. Preservação dos isolados**

#### **3.4.1. Criopreservação em Glicerol a 20%**

Após as provas de identificação fenotípica as culturas de *Staphylococcus* spp e *S. aureus* foram preservadas por congelamento em glicerol a 20% (concentração final) (REIMER; CAROL, 2003). A seguir foram armazenadas a – 20°C.

#### **3.4.2. Liofilização**

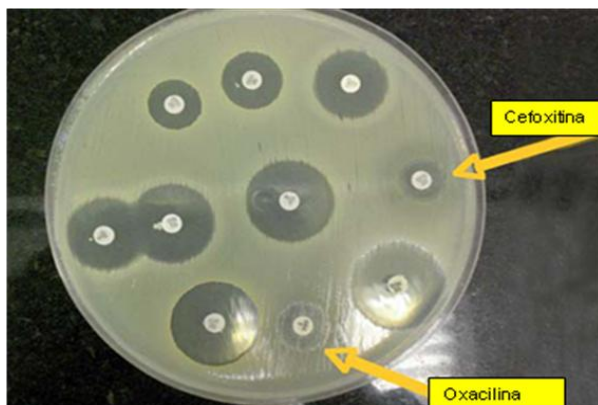
Após o crescimento, em meios de cultivo recomendados, a placa foi coberta com “Skim Milk” (DIFCO 0001) a 10%, homogeneizado com o auxílio de uma alça de “Drigalsky” e transferido para ampolas estranguladas em volumes de 03 a 05 mL por ampola. Após a distribuição as culturas foram imersas em banho de gelo seco e etanol absoluto para congelamento rápido (-70 °C) por 30 – 60 segundos. A seguir foram mantidas em freezer a –70°C, por 48-72 horas e colocadas no liofilizador (EDWARS) com o objetivo de retirar toda água da amostra por sublimação da água contida no material. Após 18h, as ampolas foram transferidas para um “manifold” (ou árvore), que permite a

finalização do processo e o fechamento das ampolas com auxílio de um maçarico de chama dupla (REIMER; CARROL, 2003). Foram liofilizadas cinco ampolas de cada micro-organismo e depositadas na coleção de Micro-organismos de Referência do INCQS/Fiocruz com a identificação numérica: P3413 a P3439; P3460 a P3463, e P3527 a P3544 e, armazenadas a – 70°C.

### **3.5. Susceptibilidade aos antimicrobianos**

A susceptibilidade aos agentes antimicrobianos foi determinada através do método de difusão de discos (KIRBY- BAUER modificado) segundo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLS (2010). As suspensões bacterianas foram obtidas em solução de cloreto de sódio estéril (0,9%) e ajustadas a uma turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland. As culturas foram semeadas em ágar Mueller Hinton (AMH) (Difco-Detroit USA) para obtenção de um crescimento confluyente. Posteriormente, os discos dos agentes antimicrobianos foram depositados, com o auxílio de uma pinça e incubados à 37°C por 24 horas em aerobiose. Os agentes antimicrobianos utilizados foram: eritromicina (15 µg), clindamicina (2 µg), oxacilina (1µg), vancomicina (30 µg), rifampicina (5 µg), clorafenicol (30 µg), gentamicina (10 µg), ciprofloxacina (5 µg) e cefoxitina (30µg) (Cefar- São Paulo, SP, Brasil). Após a incubação de 24 horas foi realizada a leitura dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento (Figura 9). Foram utilizadas as cepas de referência *S. aureus* ATCC 25923 (INCQS 00015) e *E.coli* ATCC 35218 (INCQS 00325) para controle de resistência e sensibilidade.

**Figura 09:** Susceptibilidade aos antimicrobianos



Fonte: <http://www.scielo.br/pdf/abd/v84n5/v84n05a09.pdf> - modificado

### **3.6. Caracterização Molecular**

#### **3.6.1. Extração e purificação DNA genômico**

A extração do DNA genômico dos isolados foi realizada utilizando o Kit QIAGEN. Foi utilizado o protocolo recomendado para bactérias Gram positivas “protocolo Appendix E: Purification of Genomic DNA from Gram-positive Bactéria” do kit comercial DNeasy Blood & Tissue Handbook 07/2006 (QIAGEN) (QIAGEN Companies-Uniscience do Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. Quinhentos  $\mu\text{l}$  de cultura foi centrifugada por 10 min a  $5000 \times g$  (7500 rpm) (Centrifuge 5415 C Eppendorf). O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspenso em 180  $\mu\text{l}$  do tampão de lise e incubado a  $37^\circ\text{C}$  por 30 min. Foram adicionados 25  $\mu\text{l}$  de proteinase K e 200  $\mu\text{l}$  do tampão AL, homogeneizados em agitador de tubos (Vortex genie 2-Scientific Industries) e incubado a  $56^\circ\text{C}$  por 30 min em banho seco (VWR Scientific Products). Após a incubação foram adicionados 200  $\mu\text{l}$  de etanol (96-100%) e homogeneizados. A mistura (incluindo o precipitado) foi cuidadosamente dispensada na coluna Dneasy Mini acoplada ao tubo coletor de 2 mL. Foi centrifugado a  $\geq 6000 \times g$  (8000 rpm) por 1 minuto. A coluna foi transferida para um novo tubo coletor onde foram adicionados 500  $\mu\text{l}$  de tampão AW1 e centrifugados  $\geq 6000 \times g$  (8000 rpm). A coluna foi colocada em novo tubo coletor onde foram adicionados 500  $\mu\text{l}$  do tampão AW2 e centrifugados a  $20.000 \times g$  (14000 rpm) por 3 minutos. A coluna foi transferida para um tubo Eppendorf de 1,5 mL onde foram adicionados 100  $\mu\text{l}$  do tampão

AE e incubado a temperatura ambiente por 1 minuto. Após esse período foi centrifugado a  $\geq 6000 \times g$  (8000 RPM) por 1 minuto; o tubo Eppendorf foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

A integridade dos DNAs genômicos extraídos pelo kit QIAGEN foram avaliados através de eletroforese em gel de agarose (SIGMA A-0169) 1% em solução-tampão TBE 0,5x (Tris-Borato EDTA- 0,0445 M de Tris, 0,0445 M de ácido bórico e 0,001 M de EDTA, pH 8,4) acrescido de 1,5  $\mu\text{L}$  da solução de brometo de etídio (3mg/ml). Os DNAs foram submetidos à eletroforese a 50 V por 1 hora. As imagens foram digitalizadas e analisadas pelo sistema de vídeo documentação Transillumination GE Image Quant 300.

### **3.6.2. Reação em cadeia da polimerase para pesquisa dos genes *coa*, *femA* e *mecA***

**Foram utilizadas como cepas controle das reações de PCR:** *S. aureus* ATCC 33591 (INCQS 00306 - cont. positivo) e *S. epidermidis* ATCC 12228 (INCQS 00016 - cont. negativo).

**Para a pesquisa do gene *coa*** - A mistura da PCR teve o volume final de 50  $\mu\text{L}$  contendo os seguintes reagentes da Invitrogen: 5  $\mu\text{L}$  de 10X PCR Buffer Tampão (500 mM KCl, 100 mM Tris HCl [pH 90]); 200  $\mu\text{M}$  cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP; 2,5 U *Taq* polimerase, 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 25 pmol de cada oligonucleotídeo (Quadro 1) e água deionizada estéril. A esta mistura foi adicionado ~50ng do DNA genômico. As amplificações foram realizadas nos termocicladores *Peltier Thermal Cycler*, modelo: PTC-200 marca: MJ Research e Eppendorf EP Master Cycler. Todos os iniciadores utilizados foram sintetizados pela Invitrogen, Carlsbad, CA.

**Para a pesquisa do gene *femA*** - A mistura da PCR teve o volume final de 25  $\mu\text{L}$  do kit Hot Star (Qiagen) acrescido de 20 pmol de cada oligonucleotídeo (Quadro 1), seguindo as instruções do fabricante.

**Para a pesquisa do gene *mecA*** - A mistura da PCR teve o volume final de 25  $\mu$ L do kit Master Mix (Promega) acrescido de 20 pmol de cada oligonucleotídeo (Quadro 1), seguindo as instruções do fabricante.

### 3.6.3. Iniciadores e ciclos utilizados

Todos os iniciadores e os programas de amplificação utilizados nas reações da PCR estão apresentados no quadro 1.

**Quadro 1. Iniciadores e programas de amplificação utilizados neste estudo**

Gene Alvo	Iniciadores	Sequência	Programa	Tamanho pb	Referência
<i>coa</i>	CoaG2  CoaG3	5' CGAGACCAAGATTCAACAAG 3'  5' AAAGAAAACCACTCACATCA 3'	94°C- 2' 94°C- 30 <sup>seg</sup> 65°C- 2' 35x 72°C- 4' 72°C- 7'	650 - 812	Guler et al., 2005
<i>femA</i>	<i>femAF</i>  <i>femAR</i>	5' TCACGCAAAGTGTGGCCACT 3'  5' CCATTGCACTGCATAACTTCCGC	95°C- 5' 94°C- 2' 57°C- 2' 35x 72°C- 1' 72°C- 7'	974	Este estudo
<i>mecA</i>	<i>Sa_mecAF</i>  <i>Sa_mecAR</i>	5' GATCTGTACTGGGTTAATCA 3'  5' CATATGACGTCTATCCATTT 3'	94°C- 5' 94°C- 2' 60°C- 2' 35x 72°C- 1' 72°C- 7'	500	Este estudo

### 3.6.4. Visualização dos produtos da PCR

Para a visualização dos produtos da PCR, 10  $\mu$ L dos produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1,0M Tris, 0,01M ácido bórico, 0,01M EDTA pH 8,2 (Invitrogen) acrescido de brometo de etídio (3mg/mL). Utilizou-se o marcador de peso molecular 100 pb da Invitrogen. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal Eletrophoresis Cell (Bio - América) contendo TBE 0,5X, por 60 minutos a 60 V em fonte Power

Pac 300 (Bio-Rad). As imagens foram digitalizadas pelo sistema de vídeo documentação IMAGEQUANT 300® - GE. Todas as reações da PCR foram realizadas pelo menos três vezes para verificação da reprodutibilidade.

### **3.6.5. Cepas de referência utilizadas:**

As cepas utilizadas nesse estudo foram as seguintes: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (INCQS 00039); *Staphylococcus warneri* ATCC 10209 (INCQS 00243); *Staphylococcus hominis* ATCC 27844 (INCQS 00359); *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305 (INCQS 00233); *Staphylococcus simulans* ATCC 27851 (INCQS 00254); *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (INCQS 00016); *Staphylococcus xylosus* ATCC 29971 (INCQS 00255); *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 (INCQS 00358- MRSA); *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 (INCQS 00306); *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (INCQS 00015).



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Distribuição dos isolados

No período de maio de 2009 a janeiro de 2010 foram coletadas 79 amostras provenientes de artigos médicos e de profissionais de saúde, em duas unidades básicas de saúde estudadas (Tabela 2). Após o processamento, estas 79 amostras resultaram no isolamento de 49 bactérias do gênero *Staphylococcus*. Dos 49 isolados de duas unidades de saúde, 33 (67,3%) foram procedentes de artigos médicos e 16 (32,6%) de profissionais de saúde (Tabela 2). Desses 49 isolados, 37 foram *Staphylococcus aureus* e 12 *Staphylococcus* coagulase negativa (Figura 18).

**Tabela 2:** Distribuição dos sítios de coleta e isolados de *Staphylococcus* spp

Artigos Médicos	Nº de Amostras	Nº Isolados	% Isolados
EO	08	12	24,5
ED	08	04	8,2
ESP	08	04	8,2
ESM	08	04	8,2
SON	09	09	18,3
<b>TOTAL</b>	<b>41</b>	<b>33</b>	<b>67,</b>
<b>Profissionais</b>			
NAR	19	07	14,3
MAO	19	09	18,3
TOTAL	38	16	32,6
<b>TOTAL GERAL</b>	<b>79</b>	<b>49</b>	<b>100</b>

(EO) Estetoscópio-olivas; (ED) Estetoscópio-diafragma; (ESP) Esfigmomanômetro-pêra; (ESM) Esfigmomanômetro-manguito; (SON) Sonar Doppler; (NAR) Narinas; (MAO) Mãos.

### 4.2. Identificação Fenotípica

#### 4.2.1. Características morfotintoriais e bioquímicas

As 49 cepas com características de *Staphylococcus* foram cocos Gram positivos, produziram catalase, e fermentaram o manitol. Quarenta e um isolados (83,67%) produziram a enzima desoxirribonuclease (DNase), 35

(71,42) produziram a enzima coagulase e as 14 (28,57%) restantes foram manitol positivas e coagulase negativas (CoNS) (Tabela 3).

**Tabela 3:** Resultados das Provas Fenotípicas das Cepas Isoladas de Artigos Médicos e Profissionais de Saúde

Testes	Nº de isolados	% de isolados
Fermentação do manitol (+)	49	100
Coloração de Gram (CG+)	49	100
Catalase (+)	49	100
Coagulase (+)	35	71,4
Coagulase(-)	14	28,6
DNase (+)	41	83,7
DNase (-)	08	16,3

(+): Resultado positivo; (-): Resultado negativo

#### 4.2.2. Susceptibilidade aos antimicrobianos

Foram realizados ensaios de susceptibilidade aos antimicrobianos frente a nove antimicrobianos e de acordo com os resultados obtidos, foram estabelecidos 19 perfis de resistência (Tabela 4). O perfil I formado por 15 isolados (dois isolados (SON); cinco isolados (ESM); quatro isolados (NAR); três isolados (ED) e um isolado das mãos), apresentou susceptibilidade aos nove antimicrobianos analisados.

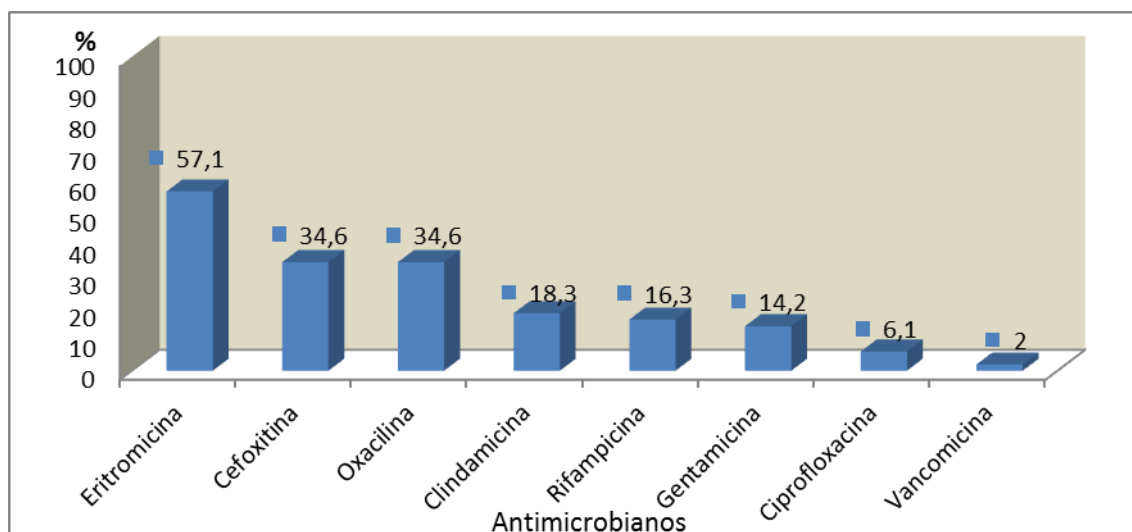
**Tabela 4:** Perfil de Resistência aos Antimicrobianos dos Isolados de *Staphylococcus*

Perfis	Fenótipo de resistência	Nº de isolados
I	SENSÍVEL A TODOS	15
II	ERI	06
III	RIF	01
IV	CLO	03
V	CLI	01
VI	ERI, OXA	03 <sup>b</sup>
VII	ERI, GEN	01
VIII	ERI, RIF	01
IX	OXA, CFO	04 <sup>c</sup>
X	ERI, OXA, CFO	01 <sup>c</sup>
XI	ERI, CLO, CLI	01
XII	ERI, GEN, CFO	03
XIII	ERI, OXA, GEN, CFO	01 <sup>a</sup>
XIV	ERI, CLO, CLI, RIF	01
XV	ERI, CLI, OXA, RIF, CFO	03 <sup>a</sup>
XVI	ERI, CLI, OXA, CIP, CFO	01 <sup>a</sup>
XVII	ERI, CLO, CLI, OXA, RIF, CFO	01 <sup>a</sup>
XVIII	ERI, CLI, OXA, VAN, RIF, CFO	01 <sup>a</sup>
XIX	ERI, CLI, OXA, GEN, CIP, RIF, CFO	02 <sup>a</sup>
TOTAL		49

(OXA) oxacilina; (CFO) cefoxitina; (ERI) eritromicina; (CLO) clorafenicol; (CLI) clindamicina; (GEN) gentamicina; (VAN) vancomicina; (CIP) ciproflaxina; (RIF) rifampicina; <sup>(a)</sup> Todas cepas MRSA; <sup>(b)</sup> 2 cepas MRSA e 1 cepa MR-CoNS; <sup>(c)</sup> Todas cepas MR-CoNS.

Os 49 isolados apresentaram grande variação em relação à susceptibilidade aos antimicrobianos analisados sendo 53,0% (n=26) resistentes à eritromicina, 30,6% (n=17) à cefoxitina; 30,6% (n=17) à oxacilina; 20,4 % (n=09) à clindamicina; 14,2% (n=08) à rifampicina; 12,2% (n=06) à cloranfenicol; 14,2% (n=07) à gentamicina; 6,1% (n=03) à ciprofloxacina e 2,0% (n=01) à vancomicina (Figura 10).

**Figura 10:** Representação gráfica do percentual de resistência (%) aos antimicrobianos dos *Staphylococcus* isolados



Os 49 isolados de *Staphylococcus* spp, foram submetidos a provas bioquímicas e a susceptibilidade aos antimicrobianos, e de acordo com os fenótipos apresentados foram identificados como: *S.aureus* 35 (71,4%), CoNS 14 (28,5%). Destes 14 isolados seis (12,2%) foram *Staphylococcus* coagulase negativa resistentes à metilina – (MR-CoNS). Dos 35 *S. aureus*, 11 (22,4%) foram resistentes à oxacilina (MRSA), sendo um (\*) destes 11 também resistentes à vancomicina (VRSA) e 24 (51,0%) foram sensíveis a metilina (MSSA). As 17 cepas resistentes a metilina (\*\*) foram isoladas dos seguintes sítios: ESM = 03 MRSA; EO= 01 MRSA; ED= 01 MRSA; SON= 02 MRSA; MÃO = 04 MRSA; SON= 03 MRCoNS; MÃO= 02 MRCoNS e NAR= 01 MRCoNS (Tabela 5).

**Tabela 5:** Fenótipos de Resistência *Staphylococcus spp* identificados

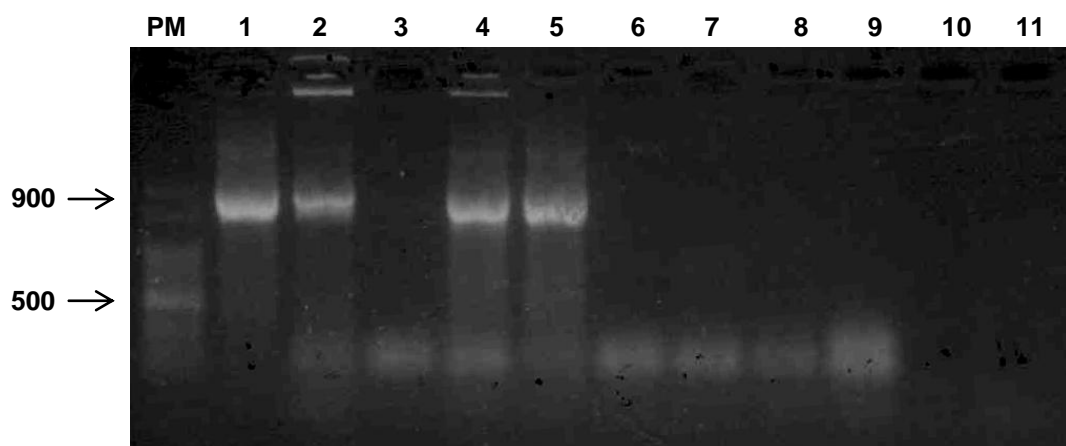
Fenótipos	No de isolados	% Isolados
MSSA	24	48,9
MRSA	11**	22,4*
TOTAL	35	71,4
CoNS	08	16,4
MR-CoNS	06**	12,3
TOTAL	14	28,6
TOTAL GERAL	49	100

**(MRSA)** *S.aureus* resistentes a meticilina; **(MSSA)** *S. aureus* sensível a meticilina ; **(CoNS)** ; *Staphylococcus* coagulase negativa; **(MR-CoNS)** *Staphylococcus* coagulase negativa resistente a meticilina.

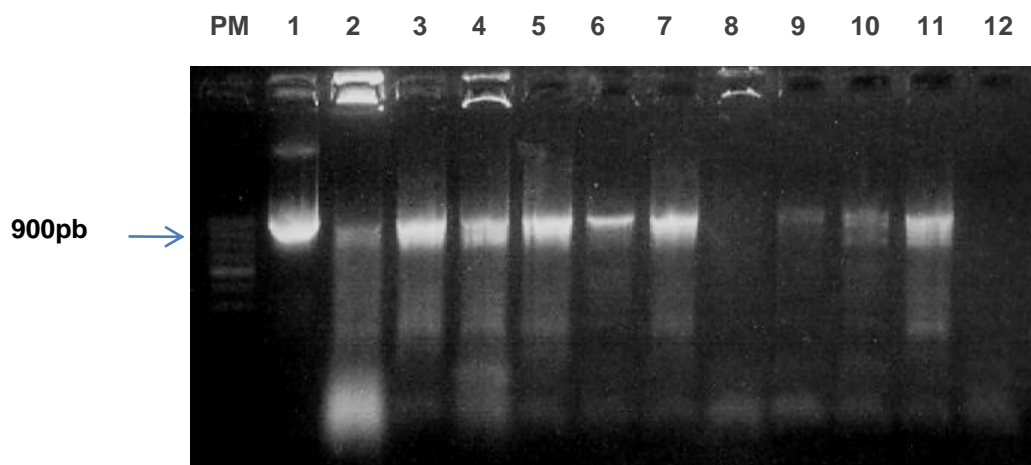
### 4.3. Caracterização molecular de *S. aureus*

#### 4.3.1. Pesquisa do gene *femA* pela PCR

A especificidade dos iniciadores utilizados na amplificação do gene *femA* foi determinada através da PCR utilizando DNA genômico de 10 espécies de referência do gênero *Staphylococcus*. Foi verificado um único fragmento de 900 pb em 4 linhagens de *S. aureus* analisadas (Figura 11). A PCR do gene *femA* dos 49 isolados resultou na amplificação de um único fragmento de 900 bp em 35 (71,42%) cepas analisadas (Figura 12). As 35 (100%) linhagens fermentaram o manitol e produziram catalase e 34 (97,14%) produziram a enzima coagulase e 31 (88,57%) produziram DNase. Destas 35 linhagens, 11 (31,42%) apresentaram resistência a cefoxitina e 10 (28,57%) apresentaram resistência a oxacilina e foram identificadas como *S.aureus* (MRSA).



**Figura 11:** PCR do gene *femA* das cepas de referência de *Staphylococcus* PM - 100pb; **1.** MRSA INCQS 00306; **2.** *S. aureus* INCQS 00015; **3.** *S. epidermidis* INCQS 00016; **4.** *S. aureus* INCQS 00358; **5.** *S. aureus* INCQS 00039; **6.** *S. warneri* INCQS 00243; **7.** *S. simulans* INCQS 00254; **8.** *S. hominis* INCQS 00359; **9.** *S. saprophyticus* INCQS 00233; **10.** *S. xylosus* INCQS 00255; **11** H<sub>2</sub>O

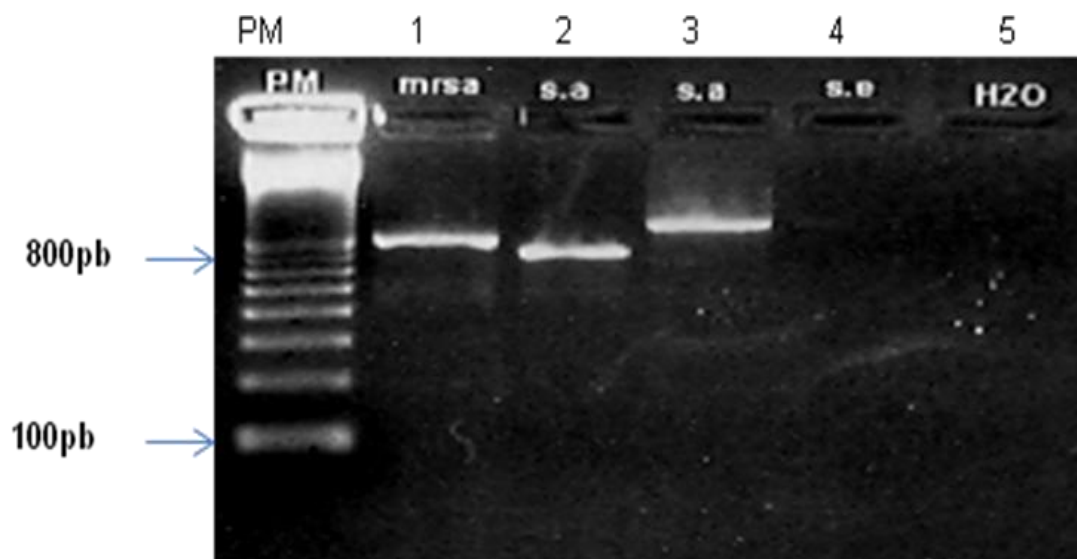


**Figura 12:** PCR do gene *femA* dos isolados de *Staphylococcus* PM - 100 pb; **1.** MRSA INCQS 0306 ;**2.** P3413; **3.** P3414; **4.** P3415; **5.** P3416; **6.** P3417; **7.** P3418; **8.** P3533; **9.** P3420; **10.** P3421; **11.** P3422; **12.** H<sub>2</sub>O.

#### 4.3.2. Pesquisa do gene *coa* pela PCR

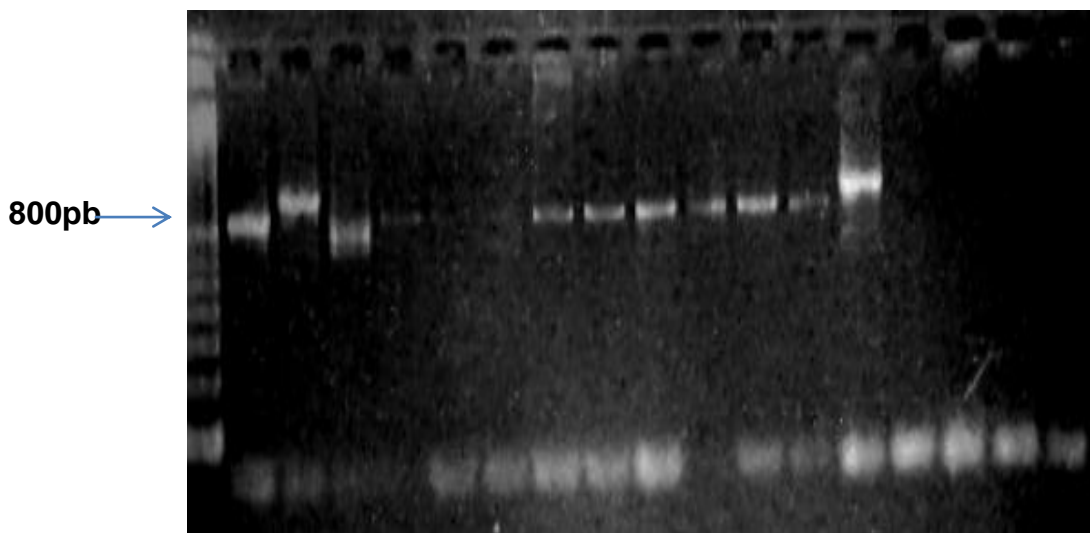
A especificidade dos iniciadores utilizados na amplificação do gene *coa* foi determinada pela PCR frente ao DNA genômico de três linhagens de *S. aureus*, sendo uma MRSA e uma espécie de *S. epidermidis*. Foi verificado um único fragmento de ~800 bp na linhagem MRSA; de ~850 pb para *S. aureus* ATCC / INCQS 0358; ~ 900 bp para *S. aureus* ATCC / INCQS 0039 (Figura 13). A PCR do gene *coa* dos 49 isolados resultou na amplificação de um único

fragmento de ~ 650 – 900 pb em 37 (75,51%) cepas analisadas (Figura 14). As 37 (100%) linhagens fermentaram o manitol e produziram catalase e 35 (94,59%) produziram a enzima coagulase e amplificaram o gene *femA*. Trinta e duas (86,48%) produziram DNase. Destas 37 linhagens 11 (29,7%) apresentaram resistência a cefoxitina e 11 (29,7%) apresentaram resistência a oxacilina, e foram identificadas como *S. aureus*. As 12 cepas (24,4%) restantes fermentaram o manitol, produziram catalase e nove (75%) dessas 12 cepas também produziram a enzima DNase. Essas 12 cepas não apresentaram a enzima coagulase, não amplificaram o gene *mecA* e o gene *coa*, e foram identificadas como *Staphylococcus* spp (CoNS). Para a identificação final de *S.aureus*, foi considerado o padrão molecular que foi de 37 cepas e não 35 conforme o diagnóstico fenotípico.



**Figura 13:** PCR do gene *coa* das cepas de referência de *Staphylococcus* PM – 100 pb (DNA Ludwig); 1. MRSA INCQS 00306; 2. *S.aureus* INCQS 00358; 3. *S.aureus* INCQS 00039; 4. *S. epidermidis* INCQS 00016; 5. H<sub>2</sub>O.

PM 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17



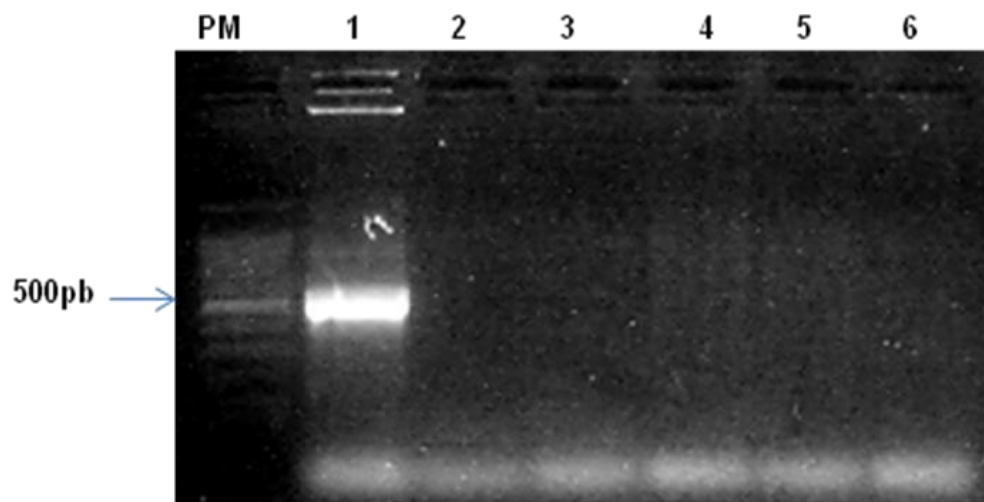
**Figura 14:** PCR do gene *coa* dos isolados de *Staphylococcus* PM - 100 pb; 1. MRSA INCQS 0306; 2. P3463; 3. P3464; 4. P3465; 5. P3527; 6. P3528; 7. P3529; 8. P3530; 9. P3531; 10. P3528; 11. P3532; 12. P3533; 13. P3534; 14. P3535; 15. P3536; 16. P3537; 17. H<sub>2</sub>O.

#### 4.3.3. Pesquisa do gene *mecA* pela PCR

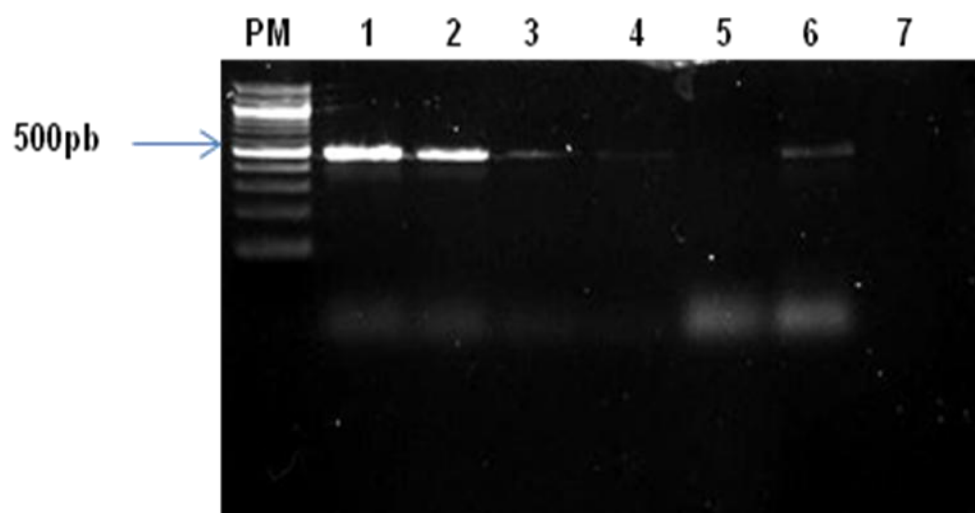
A especificidade dos iniciadores utilizados na amplificação do gene *mecA* foi determinada através da PCR frente ao DNA genômico de quatro linhagens de *S. aureus*, sendo uma MRSA e uma espécie de *S. epidermidis*. Foi verificado um único fragmento de 500 pb na linhagem MRSA (Figura 15). A PCR do gene *mecA* dos 49 isolados resultou na amplificação de um único fragmento de 500 bp em 15 (30,6%) dos isolados analisados (Figura 16). Desses 15 isolados, 10 (100%) fermentaram o manitol, produziram catalase, coagulase e DNase. Todas as cepas amplificaram os genes *femA* e o gene *coa* e foram identificadas como MRSA. Das 12 cepas (24,4%) que não produziram a enzima coagulase e não amplificaram o gene *coa*, cinco (41,6%) cepas apresentaram resistência a oxacilina, a cefoxitina e amplificaram o gene *mecA*, foram identificadas como MR-CoNS. As outras seis cepas foram *mecA* negativo e foram identificadas como CoNS, e uma cepa resistência a oxacilina



e a cefoxitina que não amplificou o gene *mecA*, foi identificada como MRCons atípica.



**Figura 15:** PCR do gene *mecA* das cepas de referência de *Staphylococcus* PM - 100pb (DNA Ladder); 1. MRSA INCQS 00306; 2. *S.aureus* INCQS 00358; 3. *S.aureus* INCQS 00015 4. *S.aureus* INCQS 00039; 5. *S. epidermidis* INCQS 00016; 6. H<sub>2</sub>O.

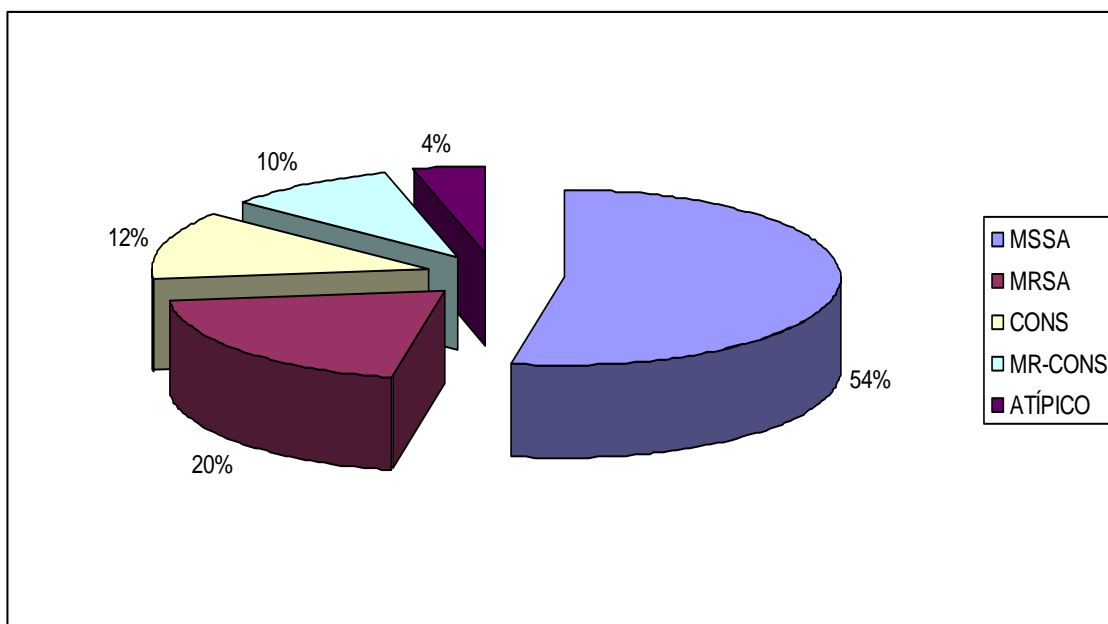


**Figura 16:** PCR do gene *mecA* dos isolados de *Staphylococcus* PM - 100 pb; 1. MRSA INCQS 0306; 2. P3435; 3. P3436; 4. P3437; 5. P3439; 6. P3462; 7. H<sub>2</sub>O.

#### 4.4. Caracterização dos *Staphylococcus* spp

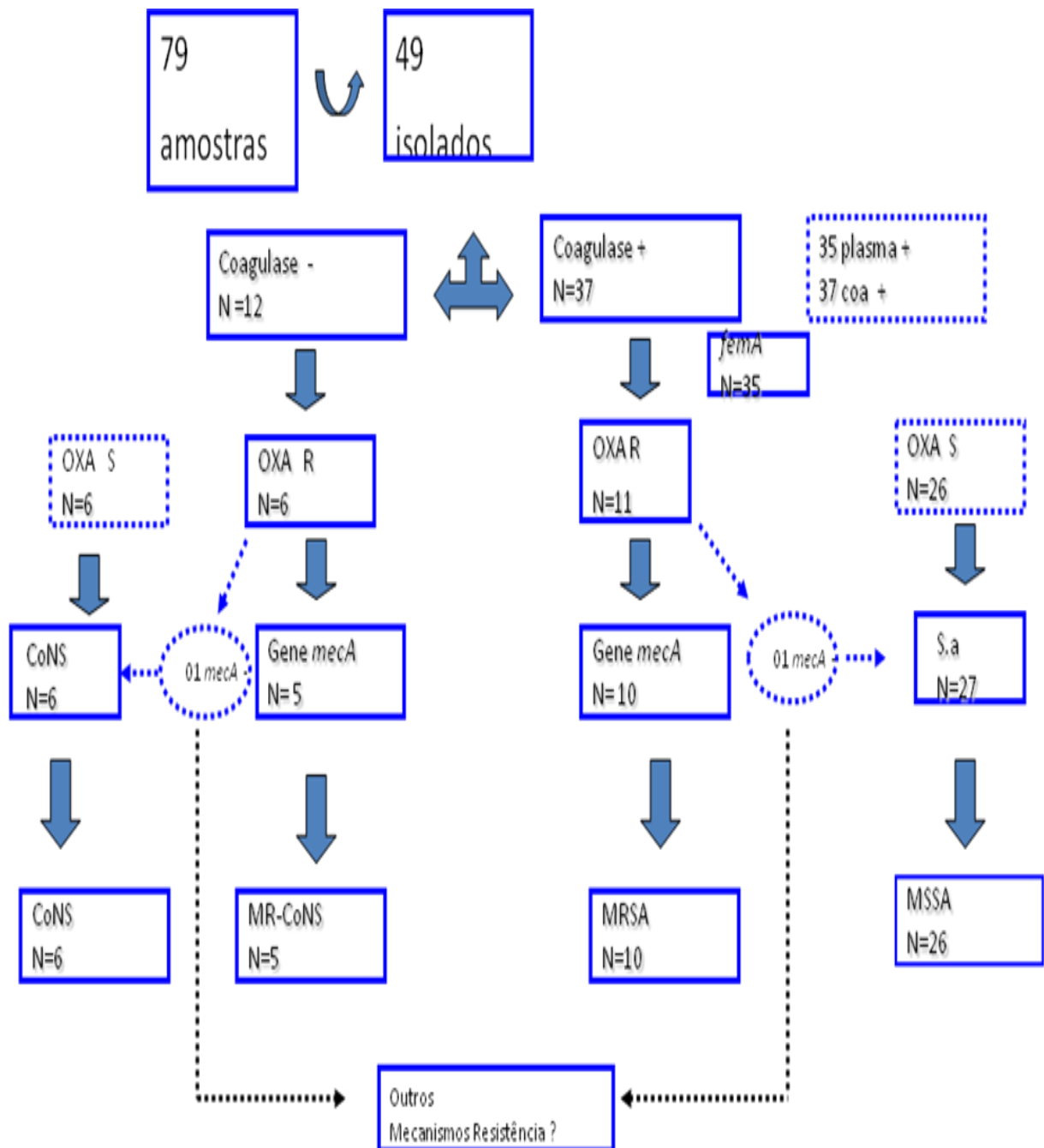
Após a identificação fenotípica e molecular os 49 isolados foram identificados como: MSSA (n=27), MRSA (n=10) sendo um (01) desses 10 isolados também identificado como VRSA, CoNS (n=7) e MR-CoNS (n=5) (Figura 17). Desses isolados, 35 produziram coagulase (*S. aureus*) e 14 não produziram (CoNS), pelo método convencional da “coagulase livre”. No entanto, o gene *coa* foi amplificado em 37 isolados que foram então identificados como *S. aureus* e 15 amplificaram o gene *mecA* identificados como MRSA (10 cepas) e MRCoNS(5 cepas)

Figura 17: Percentual de isolados de *Staphylococcus* spp



***Staphylococcus aureus* sensível a meticilina (MSSA); *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA); *Staphylococcus* sensível a meticilina (CONS); *Staphylococcus* resistente a meticilina.**

Figura 18. Esquema dos resultados encontrados neste estudo



Fonte: autor

## 5. DISCUSSÃO

Neste estudo, verificamos a presença de *Staphylococcus* spp tanto em equipamentos médicos quanto nos profissionais de saúde nas duas unidades básicas de saúde estudadas. Foi demonstrado a presença de vários fenótipos de *Staphylococcus*, dentre eles MRSA (um desses MRSA também foi VRSA), MSSA, CoNS, MR-CoNS. Um estudo envolvendo a detecção de *S. aureus* em funcionários, pacientes e acompanhantes em 12 unidades de saúde, em Carazinho (Rio Grande do Sul), Brasil, demonstrou a presença de apenas 4,7% de cepas de *S. aureus* (BORTOLI, 2006). Outro estudo realizado em Barretos (São Paulo) detectou a presença de *S. aureus* nas mãos e cavidade bucal de 73% dos dentistas, 52% de outros profissionais de saúde e 54% dos pacientes de consultórios odontológicos das unidades básicas de saúde da cidade (LENCELLOTTI, 2006).

Os resultados apresentados nesse estudo mostram um percentual superior na detecção de *S. aureus* e a presença de linhagens resistentes à meticilina. Acreditamos que o baixo percentual encontrado por Bortoli (2006) pode ser devido a falhas nas etapas de enriquecimento e cultivo dos micro-organismos presentes nas secreções nasais.

*Staphylococcus aureus* constitui parte da microbiota da pele de até um terço da população em geral, sendo os vestíbulos nasais o principal reservatório (35%) seguido pela região perianal (30%), bem como as regiões umbilicais, axilares e interdigitais (5-10%) de onde a disseminação pode ocorrer, levando às infecções (CAVALCANTI et al., 2005).

A produção da coagulase por *S. aureus* constitui um determinante fenotípico e está associada à virulência desse micro-organismo. Por isso, é considerada de necessidade a detecção desta enzima na diferenciação dos isolados de *Staphylococcus*. A presença da coagulase em 71,42% e a detecção do gene *coa* em 75,51% dos isolados foram reportados neste estudo. Estes dados nos levam a pensar que embora o teste da coagulase em tubo seja considerado o teste padrão, alguns isolados, podem não ser identificados pela técnica de produção da enzima o que pode levar a resultados falsos negativos (VANNUFFEL et al, 1995).

Em vista disso a amplificação do gene *coa* tem sido empregada como teste considerado sensível e acurado na diferenciação das espécies (VIEIRA-DA-MOTTA; FOLY; SAYIMA; 2001). Além de ser um fator de virulência, a enzima coagulase, está presente em várias formas alélicas o que faz com que os isolados possam ser classificados em diferentes variantes. Assim como o gene *spa* (proteína A), o gene *coa* possui uma região polimórfica usada na diferenciação dos isolados de *S. aureus* por meio da análise do polimorfismo do comprimento dos fragmentos por restrição, método que vem sendo utilizado em estudos epidemiológicos (GOH et al, 1992; HOOKEY; RICHARD; COOKSON, 1998). Neste estudo foi ainda confirmada a presença do gene *femA* nos 35 isolados de *S. aureus*. A presença do gene *femA* em *S. aureus* tem sido considerada uma característica única da espécie e aplicada na detecção seletiva deste micro-organismo (BROWNE; BROWN, 1991; LECLERCQ et al., 1988; MULLIGAN et al., 1993). No entanto, homólogos deste gene foram caracterizados em outras espécies de CoNS como: *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. hominis* e *S. saprophyticus* (ALBORN et al., 1996). Acreditamos que a falha na amplificação do *femA* nos dois isolados que não produziram coagulase, mas apresentaram o gene *coa* pode ser devido à presença de diversidade nas regiões de anelamento dos iniciadores utilizados para a amplificação do *femA* (VANNUFFEL et al., 1999).

As infecções em ambientes de saúde causadas por *S. aureus* multirresistentes tornaram-se bastante relevantes nas últimas décadas, sendo responsáveis por altos índices de morbidade e letalidade. Atualmente *S. aureus* resistentes a oxacilina ou metilicina é reconhecido como um dos mais importantes patógenos causadores de infecções em todo o mundo levando ao surgimento e à disseminação de cepas cada vez mais virulentas e multirresistentes (VELASQUEZ-MEZA, 2005). O gene *mecA* está localizado em uma região do DNA cromossômico bacteriano denominado *Staphylococcal Cassete Chromosome mec* (*SCCmec*), ausentes em MSSA (LIVERMORE, 2000). Atualmente são conhecidos oito tipos de *SCCmec*, que ainda podem apresentar alguns subtipos. Os *SCCmec* tem fundamental importância na transmissão da resistência microbiana e na epidemiologia, além de conter genes de resistência a outros antibióticos e outros pseudogenes que codificam

enzimas com diversas funções (ITO et al., 2003; KONDO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2006).

No presente estudo, dos 17 isolados resistentes a oxacilina, 11 (64,7%) expressaram a enzima coagulase e 10 (58,8%) amplificaram o gene *mecA*, sendo esses últimos identificados como MRSA e um não apresentou o gene *mecA* sendo considerado *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina atípico. A resistência a oxacilina apresentada pelo isolado no qual não foi amplificado o gene *mecA*, se deve provavelmente, ao desenvolvimento da resistência através de um outro mecanismo, como por exemplo hiperprodução de  $\beta$ -lactamase ou PBP's modificadas, o que significa que nem todos expressam sua resistência da mesma forma (GEHA et al.,1994; JORGENSEN,1993; MOHANASOUNDARAM ; LALITHA, 2008). Em relação aos 12 isolados CoNS, 50% (6/12) apresentaram resistência à oxacilina, cinco apresentaram o gene *mecA* e foram identificados como MR-CoNS e um não apresentou o gene *mecA* sendo considerado *Staphylococcus* resistente a oxacilina atípico. Este resultado pode também estar relacionado com a presença de expressão heterogênea dos genes que conferem resistência a oxacilina (KAISER et al., 2010) ou a outros mecanismos de resistência dos CoNS associados à oxacilina, incluindo a produção de  $\beta$ -lactamase, biofilme, transposons e plasmídeos, (ALVES ; LEMOS, 2007).

Por fazerem parte da microbiota, CoNS foram durante muito tempo considerados de pouca importância clínica, entretanto, durante as últimas duas décadas a incidência desses micro-organismos vem aumentando e eles passaram a ser reconhecidos como agentes oportunistas causadores de infecções nosocomiais e comunitárias (BARRETO ; PICOLI, 2008; CUNHA; SINZATO ; SIVEIRA, 2004). Dos 44,5% de CoNS isolados nas mãos dos profissionais de saúde em um hospital em Goiás, 75% apresentaram resistência a oxacilina (CUSTÓDIO et al.,2009). No presente estudo dos 49 isolados seis cepas das mãos dos profissionais foram resistentes a oxacilina (12.2%) (04 MRSA e 02 MRCoNS), sendo uma MRSA resistente também a vancomicina (VRSA).

No Brasil, a preocupação com a disseminação de MRSA tem sido objeto de estudos que visam verificar a frequência dessa resistência e suas implicações no sistema hospitalar (BRITES; SILVA; SAMPAIO-SÁ, 2006;

CAVALCANTI, 2005; OLIVEIRA et al., 2006; SPIANDORELLO et al., 2000). Dois estudos realizados sendo um no Rio Grande do Sul e outro na região sul não identificada, demonstraram a presença de 32,7% de MRSA em pacientes internados em um hospital de Caxias do Sul (SPINDORELLO et al., 2000) e de 20,6% de MRSA em saliva de 13 profissionais do serviço de limpeza em um hospital universitário no sul (CRUZ et al., 2011). Em Recife, a taxa de prevalência foi de 13% em amostras de pacientes internados em UTI (CAVALCANTI et al., 2006), enquanto em Salvador, essa taxa foi de 28% (BRITES; SILVA; SAMPAIO-SÁ, 2006). Uma investigação a partir de “swabs” nasais de recém-nascidos em hospital-maternidade verificou uma frequência ainda maior de 47% deste patógeno no Rio de Janeiro, (LOUREIRO et al., 2000).

A percepção tem mudado a partir do registro dos primeiros relatos de infecções comunitárias graves, *community acquired methicillin-resistant S. aureus* (CA-MRSA), especificamente em indivíduos não hospitalizados e que não mantiveram contato com profissionais de saúde e ou pacientes (HUNT et al., 1999; ROSSI; ANDREASSI, 2005). Neste contexto, uma pesquisa identificou a taxa de prevalência de 15,5% de MRSA em pacientes atendidos em unidade ambulatorial de saúde pública com 44% de resistência a oxacilina, o que levou à reflexão sobre influência desses organismos nas infecções diagnosticadas na unidade (FERRERIA et al., 2009).

Estudos em outras regiões do Brasil também revelam diferentes proporções da frequência desse patógeno tanto de origem hospitalar quanto comunitária. Na cidade de Manaus, Egido; Barros (2003) identificaram 10% e 62,5% de MRSA, isolados de amostras comunitárias e de pacientes com abscesso piogênicos, respectivamente, enquanto Meneggoto; Picoli (2007) detectaram 7,5% de CA-MRSA em uma população de profissionais de saúde.

O aparecimento de micro-organismos cada vez mais virulentos nas unidades de saúde preocupa os profissionais que se expõem diariamente a esse ambiente. A preocupação com a transmissão do MRSA não é exclusiva dos portadores nasais, mas abrangem também os artigos médicos como veículos desta transmissão. Desta forma, a colonização por *S. aureus*, principalmente MRSA, é um problema de saúde pública, e que desperta

interesse em investigar se os profissionais de saúde são também portadores nasais de MRSA (NEVES et al., 2007).

Em relação à susceptibilidade aos antimicrobianos foram identificados 19 perfis de resistência neste estudo. Embora quinze isolados (30,61%) tivessem apresentado sensibilidade a todos os antibióticos testados, os demais apresentaram resistência a diversas classes de antimicrobianos, destacando-se os  $\beta$ -lactâmicos (63,26%) e macrolídeos (59,18%). A presença de MRSA dos oito isolados multiresistentes, seis (85,71%) apresentando perfis multidrogas resistentes sugere a presença de outros genes de resistência no SCC*mec*.

Existem na literatura outros estudos que também mostraram altas taxas de resistência à eritromicina, à clindamicina e oxacilina. Kobayashi et al. (2009) isolaram 1239 cepas de *S. aureus*, a partir de 1960 amostras clínicas de um hospital público em Goiás, que apresentaram resistência de 70,4%, 68,5% e 68% à eritromicina, oxacilina e clindamicina, respectivamente. Das 272 cepas de *S. aureus* isolados em dois hospitais de oncologia no Peru, 156 (57,4%) foram resistentes à oxacilina e 13 cepas a clindamicina. A clindamicina é um antimicrobiano pertencente à classe das lincosamidas que é frequentemente usada para o tratamento das infecções causadas por *S. aureus*. Entretanto, alguns estudos demonstram a emergência de amostras comunitárias resistentes a este antimicrobiano (PATEL et al., 2006).

De acordo com Baldy (2005), a transmissão dos *Staphylococcus* spp tem significado especial no ambiente de saúde, onde as fontes de infecções são constituídas pelo próprio ambiente, pelos portadores assintomáticos e pelos pacientes. Os meios de transmissão podem ser diretos (contato direto com a fonte de infecção ou mesmo autoinfecção) ou indiretos, em que os *Staphylococcus* são veiculados principalmente pelas mãos do profissional de saúde (GOMES; OLIVEIRA, 2006). Toda a população dos serviços de saúde, temporária (pacientes) ou permanente (médicos, enfermeiros, atendente etc) é potencialmente suscetível. Sendo assim, algumas medidas profiláticas são recomendadas para a prevenção de infecções causadas por espécies bacterianas como a implementação do programa de controle de Infecção Hospitalar (IH) disponibilizar protocolos de lavagem das mãos para todas as pessoas que exercem atividade no ambiente de saúde; realizar limpeza, desinfecção e/ou esterilização de todo artigo médico (roupas, instrumental,



utensílios e equipamentos) utilizado no ambiente de saúde; investigar surtos epidêmicos na origem da fonte de infecção; no caso da constatação dessa fonte em algum profissional de saúde, este deverá ser afastado temporariamente e submeter-se ao tratamento adequado (BALDY, 2005).

Muitos estudos demonstram a possível participação dos portadores nasais de MRSA no desenvolvimento de infecções em unidades de saúde tanto nos pacientes como nos profissionais, e propõem a introdução de medidas de intervenção de identificação precoce do paciente colonizado e ou infectado por MRSA como o tratamento dos portadores nasais (pacientes e profissionais) com mupirocina tópico durante cinco dias (MOREIRA, 2000; GARCIA et al., 2003; GOMES ; OLIVEIRA, 2006). Mupirocina, antimicrobiano de uso tópico, é recomendado para descolonização da mucosa nasal e lesões cutâneas de pacientes ou profissionais da saúde (COIA et al., 2006; WERTHEIM ; VOS, 2005). Esta descolonização visa a limitar a disseminação desse agente nos serviços de saúde e, assim, reduzir o grande impacto clínico produzido por ele nas infecções hospitalares, notadamente, aquelas relacionadas a procedimentos cirúrgicos e cateteres vasculares (WERTHEIM; VOS, 2005). Estudos avaliaram a vigilância ativa por meio da cultura em *swab* nasal e/ou de orofaringe e demonstraram que esta medida contribui para redução das taxas de infecção (NETTO DOS SANTOS et al.,1996; ROBICSEK et al.,2008).

Neste estudo os resultados demonstram a presença de vários fenótipos de *Staphylococcus* nos artigos médicos e nos profissionais de saúde analisados. A presença desses patógenos em indivíduos que tem contato com os pacientes e com os profissionais de saúde pode representar risco não só para os pacientes, mas também para os próprios profissionais que carregam e transmitem cepas com grande potencial patogênico dentro de sua comunidade. Assim, podemos supor que a promoção de medidas de prevenção como a vigilância epidemiológica e programas efetivos de educação devem ser adotados de forma contínua, visando a profilaxia e o controle das doenças infecciosas em serviços de saúde.

## 6. CONCLUSÕES

- ✓ Ocorrência de *Staphylococcus* spp potencialmente patogênicos em todos os artigos médicos e de alguns profissionais de saúde analisados.
- ✓ A presença de cepas multirresistentes, inclusive à vancomicina em profissionais de saúde demonstra a importância da aplicação dos procedimentos de desinfecção previstos na legislação.
- ✓ A adoção contínua de medidas de prevenção como a vigilância epidemiológica e programas efetivos de educação devem ser adotados de forma contínua, visando à profilaxia, e a transmissão de doenças infecciosas em serviços atendimento básico de saúde.

## **7. Perspectivas:**

- ✓ Ampliar este estudo através da realização de novas coletas em outras unidades de básicas de saúde;
- ✓ Utilizar métodos de tipagem com o objetivo de realizar avaliação epidemiológica dos isolados;
- ✓ Divulgar os dados obtidos por meio de publicação de artigo científico em periódico nacional.

## 8. Referências bibliográficas

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde, 2004.** Disponível em:

[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_microbiologia\\_completo.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_microbiologia_completo.pdf)  
Acesso em: 27 de agosto de 2010.

\_\_\_\_\_. **Resolução - RDC nº 14, de 28 de fevereiro de 2007.** “Aprova o Regulamento Técnico para Produtos Saneantes com Ação Antimicrobiana harmonizado no âmbito do MERCOSUL através da Resolução GMC nº 50/06”. Disponível em [www.saude.mg.gov.br/.../produtos.../RDC-NVISA%20no%2014,%20de%2028-02-2007.doc](http://www.saude.mg.gov.br/.../produtos.../RDC-NVISA%20no%2014,%20de%2028-02-2007.doc). Acesso em 15 abr. 2009

\_\_\_\_\_. **Boletim Informativo da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde (2009).** Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/divulga/newsletter/rede\\_rm/2009/100709\\_dados\\_nacionais.pdf](http://www.anvisa.gov.br/divulga/newsletter/rede_rm/2009/100709_dados_nacionais.pdf). Acesso em 03 de setembro de 2010.

\_\_\_\_\_. Resolução de Diretoria Colegiada – RDC nº 35 de 16 de agosto de 2010 “Dispõe sobre o Regulamento Técnico para produtos com ação antimicrobiana utilizados em artigos críticos e semicríticos” Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis/index.htm> Acesso em 13 de abril de 2011.

ALBORN, W. E. et al. Cloning and Characterization of *femA* and *femB* from *S.epidermidis*, Intern J Genes and Genomes, Amsterdam, v. 180, n. 1-2, p.177-181, Nov-1996.

ALVES, E. C. C.; LEMOS, M. M. V. F. Detecção de genes da resistência antimicrobiana em cromossomos e plasmídeos da *Staphylococcus* spp **Arq do Inst de Biol**, v .74, n .3, p. 2007-2013, São Paulo, 2007.

ARAÚJO, B. A. C.; OLIVEIRA, A. L.; SANTOS, F. L. Isolamento de amostras multirresistentes de *Staphylococcus aureus* em estetoscópios usados no ambiente hospitalar **Rev. Bras. Anál. Clín.**, v.32, n.4, p. 285-288, 2000.

APPELBAUM, P. C., Microbiology of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*, **Clin Infect Dis**, v. 45 (suppl. 3), p.165 – 170, 2007.

ARBUTHNOTT, J. P; COLLEMAN, D. C.; AZAVEDO, J. S. Staphylococcal toxins in human disease **J of Appl Bacteriol Symp**, Supplement, p.101S-107S ,1990.

AUCKEN, H. M. et al A new UK strain of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (EMRSA-17) resistant to multiple antibiotics **J Antimicrob Chemot**, v.50, p.171–175, 2002.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins **Intern J of Food Microbiol**, v.61, p.1-10 2000.

BALDWIN, J. et al Staphylococcal infections in newborn infants III Colonization of newborn by *Staphylococcus pyogenes* AWAm J **Dis Child**, v.94, p. 107-12, 1957.

BALDY, J.L.S. Estafilococcias. p.1254-1297 In: COURA,J.R (Ed.) **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**, v.II, Rio de Janeiro Guanabara Koogan, 2005.

BANNERMAN, T. L. et al. Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, p.551-555,1995.

BANNERMAN, T. L.; PEACOCK, S. 2007. IN: **Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase-positive cocci that grow aerobically**. In Manual of clinical microbiology, 9th ed. Edited by P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry and M. A. Pfaller. Washington DC: American Society for Microbiology. 390-411.

BARRETO, M. F.; PICOLI, S.U. Staphylococcus em um Hospital de Porto Alegre (RS) **Rev Bras de Anál Clín**, v.40 Porto Alegre, 2008.

BEARD, W.L., ROBERTSON, J.T., GETZY, D.M. Enterotomy technique in the descending colon of the horse - Effect of location and suture pattern **Vet Surg**, v.18, n.2, p.135-140, 1989.

BENSON, T. E. et al Structure of *Staphylococcus aureus femA* **Struct**, v. 10, p.1107-1115, 2002.

BENSON, T.E et al. Structure of *Staphylococcus aureus femA*. **Structure**, v. 10, n. 8, p. 1107-1115, 2002.

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

BOER, E.; BEUMER, R. R. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, v.50, p.119-130. 1999.

BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R.W. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** 2 ed Washington: Springer-Verlag, 2001 v. 1.

BORGES, M. F. **Diagnóstico da contaminação por bactérias piogênicas em uma indústria processadora de queijo coalho e detecção de genes associados a fatores de virulência** 2005 222 f Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2006.

BORTOLI, C.C. **Pesquisa de portadores de *Staphylococcus aureus* em indivíduos de postos de saúde, no município de Carazinho/RS** Disponível

em:<<http://www.ulbracarazinho.edu.br/novo/grades/tcc%202009%201%20biomedicina/Camila%20De%20Bortolipdf>> Acesso em: 12 jan 2010.

BRAIOS, A. **Estudo de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) por técnicas genotípicas e fenotípicas. 2005.** 102f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

BRASIL. 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 da República Federativa do Brasil**; Poder Executivo, Brasília. 28 de junho de 1983.

\_\_\_\_\_. 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](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/constitui%C3%A7ao.htm). Acesso em 10 dez. 2009.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Lei n. ° 8.080, de 19 de setembro de 1990 a. 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](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L8080.htm). Acesso em: 10 dez de 2009.

\_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. 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](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l8142.htm). Acesso em: 10 dez. 2008.

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

\_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. Portaria n. 930, de 27 de agosto de 1992. Expede instruções para o controle de infecção hospitalar. **Diário Oficial da União**, Brasília, p.12279-12281, 4 set. 1992. Seção 1.

\_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. Coordenação de Controle de Infecção Hospitalar. **Processamento de Artigos e Superfícies em Estabelecimentos de Saúde**. 2ª. ed. Brasília, 50p., 1994. Disponível em: < [www.anvisa.gov.br/servicos/saude/controle/processamento\\_artigos.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicos/saude/controle/processamento_artigos.pdf)>. Acesso em: 10 dez. 2009.

\_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. Portaria nº 2616, de 12 de maio de 1998. “Dispõe sobre a obrigatoriedade da manutenção pelos hospitais do país, de programa de controle de infecções hospitalar. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília, 13 de mai 1998 Disponível em: <[http://www.anvisagovbr/legis/portarias/2616\\_98htm](http://www.anvisagovbr/legis/portarias/2616_98htm)> Acesso em: 15 dez 2009.

\_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. **Anuário Estatístico de Saúde do Brasil** Brasília, 2001  
a. Disponível em: <http://portalsaude.gov.br/saude/aplicacoes/anuario2001/indexcfm>> Acesso em: 10 dez 2009.

\_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. Secretaria de Assistência à Saúde. Coordenação-Geral das Unidades Hospitalares Próprias do Rio de Janeiro- **Orientações Gerais para Central de Esterilização Série A Normas e Manuais Técnicos Brasília:** Ed MS, Brasília, 2001b. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/orientacoes\\_gerais\\_central\\_esterilizacao\\_p2.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/orientacoes_gerais_central_esterilizacao_p2.pdf). Acesso em 27 mai 2009.

\_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. **Manual Técnico do Cadastro Nacional de Estabelecimentos de Saúde – CNES - versão 2**, Brasília, 05 mai 2006. Disponível em < [http://cnes.datasus.gov.br/Mod\\_Download\\_Fces2.asp](http://cnes.datasus.gov.br/Mod_Download_Fces2.asp) >. Acesso em: 16 mai. 2009.

\_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. **Manual Técnico do Cadastro Nacional de Estabelecimentos de Saúde:** versão 2 Brasília, 2006. Disponível em <[http://cnesdatasus.gov.br/Mod\\_Download\\_Fces2.asp](http://cnesdatasus.gov.br/Mod_Download_Fces2.asp)> Acesso em: 16 mai 2010.

BRAOIOS, A. **Estudo de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) por técnicas genotípicas e fenotípicas.** 2005. 102f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

BRAUNWALD, E. et al. **Harrison Medicina Interna** 15 ed Rio de Janeiro: Mcgraw-Hill Interamericana do Brasil, 2002.

BRITES, C.; SILVA, N.; SAMPAIO-SÁ, M. Temporal evolution of the prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a tertiary hospital in Bahia, Brazil: a nine-year evaluation study **Braz J Infect Dis**, v.10, .p 235-238, 2006.

BROOKS, S. et al. Reduction in vancomycin-resistant *Enterococcus* and *Clostridium difficile* infections following change to tympanic thermometers. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v.19, n. 5, p.333-6,1998.

BROWNE D. F. J.; BROWN, L. Evaluation of E-test, a novel method for quantifying antimicrobial activity. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 27, p.185–190, 1991.

BROWN, D. F. J. et al. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **J Antim Chemoth**, v.56, p. 1000-1018, 2005.

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

CAFISO, V. et al. Presence of the *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. **Clin Microbial Infect**, v. 10, p.1081-1088, 2004

CASEY, A.L. ; LAMBERT, P.A. ; ELLIOTT, T.S.J. Staphylococci **Intern J of Antimic 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.

CASTRO, M. Bactérias multirresistentes In: COUTO, Renato C; PEDROSO, Tânia MG; NOGUEIRA, José Mauro **Infecção hospitalar e outras complicações não infecciosas de doença**: epidemiologia, controle e tratamento 3 ed Rio de Janeiro: MEDSI, p. 579-593, 2003.

CAVALCANTI, M. S. et al Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a university hospital, Pernambuco, Brazil **The Braz J of Infect Dis**, v.9, p.56-63, 2005.

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

CHAMBERS, H.F. et al. Low-Level Methicillin Resistance in Strains of *Staphylococcus aureus*, **Antim Agen Chemoth** v. 33, n. 4, p. 424-428, Apr. 1989.

CHAMBERS, H.F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications **Clin Micro Reviews**, v .10, n. 4, p. 781-791, Oct 1997.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2006. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard , M2-A9, 9th ed. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, Pa.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2009a. Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard. M07-A8, 10 th ed. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Pa.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2009 b. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. 8th ed. **Clinical and Laboratory Standards Institute** Wayne, Pa.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2009c. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing: nineteenth informational supplement. M100-S20 **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, Pa.



CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2010. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing; approved standard- 30 ed, Document M100-S20, **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, Pa.

COIA, J. E. et al. Guidelines for the control and prevention of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in healthcare facilities. **J Hosp Infect.** 2006. 63 Suppl 1:S1-44.Review. Erratum in: **J Hosp Infect.**, v.64, n.1, p.97-98, 2006.

COSGROVE, S.E.; CARROLL, K.C.; PERL, T.M. *Staphylococcus aureus* with Reduced Susceptibility to Vancomycin. **Clin Infect Dis**, v.39, p. 539-45, 2004.

CORBELLA, X. et al. *Staphylococcus aureus* nasal carriage as a marker for subsequent staphylococcal infections in intensive care unit patients **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.16, p. 351-357, 1997.

COSTA, G, M, **Da Mamite bovina em rebanhos leiteiros da região sul do estado de Minas Gerais, MG** 2008 123 f Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 2008.

CRUZ, E. D. A. et al. Detecção de *Staphylococcus aureus* na boca de trabalhadores da limpeza hospitalar **Rev Latino- Am Enferm**, v19, n 1, p 1- 7, jan-fev 2011.

CUI, L. et al. Novel mechanism of antibiotic resistance originating in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, D.C., v. 50, no. 2, p. 428-438, 2006.

CUNHA, B. A. **Antibiotic resistance Drugs of Today**, v3.4, p .691-698, 1998.

CUNHA, M.L;R. S.; SINZATO, Y.K.; SILVEIRA, L. V. A. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative *Staphylococci*. **Mem Inst O Cruz**, v. 99, n. 8. Rio de Janeiro, 2004.

CUSTODIO, J. et al. Avaliação microbiológica das mãos de profissionais da saúde de um hospital particular em Itumbiara, Goiás. **Rev de Ciên Méd**, v.8, n.1, p.7-11 Campinas, 2009 Disponível em: <<http://www.primary-pluscom//2009/12/biofilmjpg>> Acesso em: 25 nov 2010.

DE LENCASTRE, H. S. A., Multiple mechanisms of methicillin-resistance and improved methods for detection in clinical isolates of *S aureus*. **Antimic Agen Chemother**, v. 35, p .632-639, 1991.

EGIDO, M.; BARROS, M. L. Preliminary study of community-acquired *Staphylococcus aureus* infection in Manaus Hospital, Amazonas Region, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.36, p .707-709, 2003.

ETM. **Etest® Technical Manual**. 2008. Disponível em: <[www.abbiiodisk.com/pdf/etm\\_index.htm](http://www.abbiiodisk.com/pdf/etm_index.htm)>. Acesso em: 10 dez. 2009.

FERNANDEZ, G. M. et al. *Staphylococcus* methicillin resistance: fine focus on folds and functions **FEMS Microbio Letters** Amsterdam, v.235, n.1, p. 1-8, Jun 2004.

FERREIRA, W. A.; ÁVILA, M. L. S. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

FERREIRA, W. A. et al. Prevalência de *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA) em pacientes atendidos em Ambulatório de Dermatologia Geral em Manaus-Amazonas, Brasil. **Rev. patol. trop**;38(2):83-92, abr.-jun. 2009.

FONTANA, R. T. As infecções hospitalares e a evolução histórica das infecções. **Rev. Bras. Enf.**, v.59, n. 5, p. 703-6, set-out 2006.

FONSECA, D. A.C. (2005). Dissertação de mestrado. ***Staphylococcus aureus* resistente à Oxacilina em Montes Claros-MG: Caracterização Microbiológica e Epidemiológica**. Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAFF, M. **Microbiol dos Alim** São Paulo: Atheneu, 2000.

FRAZIER, W. C.; WESHOFF, D. C. **Microbiol de los Alim** 4 ed Zaragoza: Editorial Acribia, 2000.

FREITAS, M. F. L. et al. Exotoxinas Estafilocócicas, **Ciênt Vet Tróp**, Recife, v.7, p. 63-74, 2004.

FRIDKIN, S. K. et al. The effect of vancomycin and third generation cephalosporins on prevalence of vancomycin resistant enterococci in 126 US adult ICU. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v.135, n.3, p.175-183, 2001.

GARCIA, A. M. et al Uso nasal de la mupirocina para *Staphylococcus aureus*: efecto en portadores y en infecciones nosocomiales **Rev Biom**, Bogotá, v.23, n2, p .173-179, Jun 2003.

GEHA, D. J. et al. Multiplex PCR for Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococci* in the Clinical Laboratory **J Clin Microbiol**, Washington, DC, v. 32, n. 7, p. 1768-1772, 1994.

GILLIGAN, K.; SHIPLEY, M.; STILES, B.; HADFIELD, T.L.; IBRAHIM, M.S. Identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A and B genes by PCR-ELISA. **Molecular and Cellular Probes**, v.14, p. 71-78, 2000.

GOH, S. H. et al. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase polymorphism **J Clin Microbiol**, v .30, p. 1642-1645, 1992.

GOMES, M. Z. ; OLIVEIRA, L. A. Infecção Estafilocócica In: LOPES, A C (Ed) **Tratado de Clínica Médica**, v.3, São Paulo: Roca Ltda, p .3974-3995, 2006.

GÜLER, L. et al. Antimicrobial susceptibility and coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis cases in Turkey **J Dairy Scie**, v.88, n.9, p.3149-3154, 2005.

GÜRTLER, V.; STANISICH, V.A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S spacer region. **Microbiol, Reading**, v.142, p.3-16, 1996.

HACKBARTH, C. J.; CHAMBERS, H F Methicillin-resistant staphylococci: genetics and mechanisms of resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 33, p. 991-994, 1989.

HARTLEIB, J. et al. Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus* **Blood**, v .96, p.2149–2156, 2000.

HOOKEY, J. V.; RICHARDSON, J. F.; COOKSON, B. D. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequences analysis of the coagulase gene **J Clin Microbiol**, v .36, p .1083-1089, 1998.

HUNT, C. et al. Four pediatric deaths from community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Minnesota and North Dakota, 1997-1999 **MMWR**, v.48, p.707-710, 1999.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE) – **Sinopse do XII Censo Demográfico** – 2010. Rio de Janeiro. Disponível em: [http://www.censo2010.ibge.gov.br/resultados\\_do\\_censo2010.php](http://www.censo2010.ibge.gov.br/resultados_do_censo2010.php). Acesso em 30 de abril de 2011.

ITO, T.; UDAKA, N.; OKUDELA, K. Mechanisms of neuroendocrine differentiation in pulmonary neuroendocrine cells and small cell carcinoma. **Endocrine Pathol**, v.14, n.2, p.133-139. 2003;

ITO, T. et al. Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, ccrC **Antimicrob Agents Chemother**, v .48, p.2637-2651, 2004.

JAY, J. M.. **Microbiologia dos Alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

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

JORSENSEN, J. H. Selection criteria for na antimicrobial susceptibility testing system **J Clin Microbiol**,v. 31, n.11, p. 2841-4, 1993.

KAISER, T. D. L. et al. Avaliação de métodos comumente usados em laboratórios para a determinação da susceptibilidade à oxacilina entre amostras de *Staphylococcus* sp, isoladas de um hospital de Vitória, estado do Espírito Santo **Rev Soc Brás Méd Tropical**, v.43, n.3, p. 298-303, mai-jun, 2010.

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

KANEMITSU, K. et al. Relatedness between the coagulase gene 3'-end region and coagulase serotypes among *Staphylococcus aureus* strains. **Microbiol and Immun**, v. 45, n. 1, p. 23-27, 2001.

KAPUR, V. et al. Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows **J Clin Microbiol, Washington**, v.33, p.376-380, 1995.

KARCHMER, A. W. From Theory to Practice: Resistance in *Staphylococcus aureus* and New Treatments, **Clin Microbiol Infect**, v.12, supp 18, p. 15-21, Dec-2006.

KLOSS, W. E.; LAMBE, J. R. *Staphylococcus* In: BALOWS, A **Manual of Clin Microbiol**, 5 ed Washington: American Society for Microbiology, 1991.

KLUYTMANS-VANDEN BERGH, M. F. Q.; KLUYTMANS, J. A. J. W., Communityacquired Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Current Perspectives. **Clin Microbiol Infect** , v.12, p.9 – 15 ( Suppl. 1), 2006.

KOBAYASHI, H. et al. Improving clinical significance of PCR: use of propidium monoazide to distinguish viable from dead *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* **J Orthop Res**, v.27, p.1243-1247, 2009.

KONDO, Y. et al. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: rapid identification system for mec, ccr, and major differences in junkyard regions. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, p.264–27, 2007.

KONEMAN, E. W. et al. Cocos Gram-Positivos: Parte I: estafilococos e microrganismos relacionados. In: \_\_\_\_\_. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, p. 551- 588, 2001.

KONEMAN, E. W.; et al. **Diagnóstico microbiológico** 6ed Rio de Janeiro Ed Guanabara Koogan, 2008.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química Farmacêutica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1982. p.575-617.

KOSTMAN, J. R. et al. A universal approach to bacterial molecular epidemiology by polymerase chain reaction ribotyping **The J Infec Dis**, Chicago, v. 171, p.. 204-298, 1995.

LACHICA, R. V. F; HOEPRICE, P D; RIEMANN, H P Tolerance of staphylococcal thermonuclease to stress **App Microbiol**, Washington, v. 23, p.994–997, 1972.

LANCETTE, G. A.; TATINI, S.R. *Staphylococcus aureus* In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods** 3 ed Washington, DC, Cap33, p.533-550, 1992.

LANGE, C. et al. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil, **Vet Microbiol** , Amsterdam, v.67, p.127-141, 1999.

LAWRENCE, C. et al. Use of the coagulase gene typing method for detection of carriers methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* **J Antimic Chemoth**, London, v. 37, p .687-696, 1996.

LECLERCQ, R. et al. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teichoplanin in *Enterococcus faecalis*. **N Engl J Med**, v.319, p.157–159, 1988.

LECLERCQ, R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: Nature of the resistance elements and their clinical implications. **Clin. Infect. Dis.**, v. 34, p.482-492, 2002.

LEE, J. H. et al. Evaluation of the Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) – Screen Latex Agglutination Test for Detection of MRSA of animal Origin. **J Clin Microbiol**, South Korea, v.42, n.6, p. 2780-2782, 2004.

LENCELOTTI, M. **Estudo Epidemiológico de *Staphylococcus* spp em Ambientes, Água e Portadores sadios e determinação da sensibilidade a Antimicrobianos, 2006.** Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – UNESP, Campus de Jaboticabal, JABOTICABAL – SP, 2006.

LIVERMORE, D. M. Antibiotic resistant in staphylococci **Int J Antimic Agents**, v. 16, p. S3-S10, 2000.

LOUREIRO, M. M. et al. Molecular Epidemiology of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Newborns in a Hospital in Rio de Janeiro, Brazil **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 95, p.777-782, 2000.

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

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. Division of Infectious Diseases, Departments of Medicine and Pathology, Columbia University, College of Physicians and Surgeons, New York, USA. **J Clin Invest**, v.111, p.1265–1273, 2003.

LUTZ, L. et al. Clinical failure of vancomycin treatment of *Staphylococcus aureus* infection in a tertiary care hospital in southern Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 7, n .3, p .224-8, 2003.

LUONG, T. T.; LEE, C. Y. Overproduction of Type 8 Capsular Polysaccharide Augments *Staphylococcus aureus* Virulence. **Infec and Immunity**, v. 70, n. 7, p. 3389–3395, July 2002.

McDOUGAL, L. K. et al. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the United States: Establishing a National Database. **J C M**, v.41, n.11, p. 5113-5120, nov, 2003.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J., **J Biol Micro** 8 ed New Jersey: Prentice-Hall, 1997.

MALORNY, B. et al. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, p. 39-48. 2003.

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

MAMIZUKA, E. M.; OLIVEIRA, G. A. Isolamento de cepas de *Staphylococcus aureus* com sensibilidade reduzida a vancomicina em hospital brasileiro. **Rev. Pharm. Bras.**, Brasília, DF, ano. 3, p. 7-8, 2000.

MARINELLA, M. A., PIERSON, C.M., CHENOWETH, C. The stethoscope: a potential source of nosocomial infection. **Arch Intern Medic**, 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.

MENDOZA, M. et al. Identification of *Staphylococcus* species by 16S-23S rDNA intergenic spacer PCR analysis. **Intern J System Bacteriol** Washington, v.48, p. 1049-1055, 1998.

MENEGOTTO, F. R.; PICOLI, S. V. *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (MRSA): incidência de cepas adquiridas na comunidade (CA-MRSA) e importância da pesquisa e descolonização em hospital. **Rev Brás Anal Clin**, Rio de Janeiro, v. 39, n.2, p.147-150, 2007.

METAN, G.; ZARAKOLU, P.; UNAL, S. Rapid detection of antibacterial resistance in emerging Gram-positive cocci. **J. Hosp.Infect.**, v. 61, p. 93-99, 2005.

MIMICA, M. J; MENDES, C. M. F. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. **J. Bras. Patol. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, p. 399-406, 2007.

MITANI, N. et al. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by PCR-RFLP and its usefulness in an epidemiological study of an outbreak, **J Infect Dis**, v.58, n.4, p.250-2, Aug 2005.

MOHANASOUNDARAM, K. M.; LALITHA, M. K. Comparaison of phenotypic versus genotypic methods in the detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Ind J Med Res**, v.27, n.1, p.78-84, 2008.

MOORE, D O Nariz In: \_\_\_\_\_ **Anatomia orientada para a clínica** 4 ed, Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2001 p. 684-692.

MOREL, V. Microbiology's scanned revolutionary. **Science**, Washington, v. 51, p. 221-271, 1987.

MORK, T. et al. Comparison of *Staphylococcus aureus* genotypes recovered from cases of bovine, ovine and caprine mastitis **J Clin Microbiol**, v. 43, p. 3979–3984, 2005.

MOREIRA, M. **Avaliação da aplicação de medida de prevenção e controle para infecções por *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina em Unidade de Terapia Intensiva** 2000. Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2000.

MORVAN, A. et al. Contribution of a typing method based on IS256 probing of *Sma*I digested cellular DNA to discrimination of European phage type 77 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains **J Clin Microbiol**, Washington, v. 35, n. 6, p. 1415-1423, 1997.

MULLIGAN, M.E. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a consensus review of the microbiology, pathogenesis, and epidemiology with implications for prevention and management **Am J Med**, v.94, n.3, p.313–328, Mar 1993.

MURAKAMI, K. et al. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, n. 10, p.2240 – 2244, 1991.

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

NADA, T. Comparison of DNA fingerprinting by PFGE and PCR-RFLP of the coagulase gene to distinguish MRSA isolates **J Hosp Infect**, v. 32, p. 305-307, 1996.

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

NETTO DOS SANTOS, K. R. et al. Emergence of high-level mupirocin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Brazilian university hospitals. **Infect Control Hosp Epidemiol**. v.17, n.12, p.813-6, 1996.

NEVES, M. C. et al. Detecção de genes de resistência antimicrobiana em cromossomos e plasmídeos de *Staphylococcus* spp **Arquiv Instit Biol**, São Paulo, v.74, n. 3, p. 207-213, 2007.

NICOLA, F. G. et al, Characterization of Erytromycin-Resistant Isolate of *Staphylococcus aureus* Recovered in the United States from 1958 to 1969. **Antim Agents Chemot**, v.42, p. 3024 – 3027, 1998.

NOVAK, F. R. **Ocorrência de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina em leite humano ordenhado**, 1999 Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Microbiologia Prof Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 1999.

NOVICK, R.P. **Pathogenicity factors and their regulation** In: GRAM Positive Pathogens Washington: ASM Press, p. 392-407, 2000.

OLIVEIRA, G. A. et al. Avaliação da tolerância à vancomicina em 365 cepas hospitalares de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina **J Bras Patol**, v. 37, n .4, p. 239-46, 2001.

OLIVEIRA, A. C. et al. Nosocomial infections and resistance microbian in Intensive Care Unit of a University Hospital An epidemiological study **Online Braz J Nurs**, v.5, n.2, 2006. Disponível <http://www.ufrbr/objnursing/index.php/nursing/article/viewArticle/837/208>.

OLIVEIRA, A. D. D. et al. Laboratory detection for methicillin resistance in coagulase negative *Staphylococcus* isolated from ophthalmic infections **Arq Bras Oftal**, v L70, pL 667-675, 2007.

OLIVEIRA, D. G. M. et al. Avaliação da higiene das mãos na perspectiva Microbiológica. **Rev Panam Infectol**, v.12, n.3, p. 28-32, 2010.

OTTER J. A. et al. Identification and control of an outbreak of ciprofloxacin-susceptible MRSA -15 on a neonatal unit. **J Hosp Infect**. v. 67, n.3, p.232-9, 2007.

PACE, N. R.; OLSEN, G.J.; WOESE, C. R. Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent, **Cell**, v45, p325- 326, 1986.

PATEL, M et al. Prevalence of inducible clindamycin resistance among community- and hospital-associated *Staphylococcus aureus* isolates **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 7, p. 2481-2484, 2006.

PERL, T. M. et al. Intranasal mupirocin to prevent postoperative *Staphylococcus aureus* infections **New Eng J Medicine**, Boston, v .346, n. 24, p. 1871-1877, 2002.

PREFEITURA DO RIO DE JANEIRO. Portal da **Subprefeitura da Barra e Jacarepaguá, 2010. Disponível em** <http://www.rio.rj.gov.br/web/sbj/>. Acesso em 18 de novembro de 2010.



PROJAN, S; NOVICK, R. The molecular basis of pathogenicity In: CROSSLEY, K B; ARCHER, G L (Ed). **The Staphylococci in Human Disease** New York: Churchill Livingstone, 1997 p. 55-81.

RANGEL, E. Avaliação das culturas de secreções do laboratório do Hospital Universitário de Brasília (HUB)-DF e do perfil de resistência aos antimicrobianos, de outubro/93 a março/94. **Rev Socied Bras de Med Trop**, v.28, supl 1, p.263, 1995.

RASOOLY, A.; RASOOLY, R. Detection and analysis of Staphylococcal enterotoxin A in food by Western immunoblotting. **Inter J F Microbiol.**, v.41, p.205-212, 1998.

REIMER, L. G.; CARROL, K.C. Procedures for the storage of microorganisms In: P R Murray (Ed). **Manual of Clinical Microbiology, Eighth Edition** Washington, DC: ASM Press, v.1, p.67-73, 2003.

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

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

RODRIGUES, A. M. S. B. **Artigos Médicos: Veículos Passíveis de Transmissão de *Staphylococcus aureus* às Gestantes no Atendimento Básico de Saúde**, 2009. Monografia (Especialização em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Fundação Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, 2009.

ROSA, J. O. **Deteção de gene *mecA* em estafilococos coagulase negativa resistentes a oxacilina isolados da saliva de profissionais da saúde de um Hospital Universitário** 2008 Dissertação -(Mestrado) Universidade Federal de GoiásGoiânia 2008.

ROSA, A.W. **Caracterização Fenotípica e Tipagem Molecular de MRSA Isolados na Unidade de Terapia Intensiva do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná** 2009. Dissertação (Mestrado) em Microbiologia Parasitologia e Patologia. Universidade Federal do Paraná. Curitiba.

ROSEC, J. P.; GIGAUD, O Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France, **Intern J Food Microbiol**, Amsterdam, v. 77, n.12, p.61-70, Jan-Fev, 2002.

ROSSI, F.; ANDREASSI, D. B. Resistência bacteriana **Interpretando o Antibiograma** São Paulo, Atheneu, 2005.

RUTALA, W. A.; WEBER, D. J. **Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities**. Chapel Hill/North Carolina: The Healthcare Infection

Control Practices Advisory Committee (HICPAC)/ University of North Carolina School of Medicine, 2008.

RYFFEL, C. et al. Sequence comparison of *mecA* genes isolated from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* **GENE**, v.94, p.137-138, 1990.

SAID-SALIM, B.; MATHEMA, B.; KREISWIRTH, B.N. **Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging pathogen.** Infect. Control Hosp. Epidemiol., v.24, p. 451-455, 2003.

SANTOS, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: visistnado uma cepa de importância hospitalar In: MURRAY, P, R et al **JBras Patol Med Lab**, v.43, n. 6, p. 413-423, dez-2007.

SANTOS, B. M O. Monitoramento da colonização pelo *Staphylococcus aureus* em alunos de um curso de auxiliar de enfermagem durante formação profissional. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, Ribeirão Preto, v. 8, n. 1, p. 67-73, 2000.

SANTOS, B. M. O; DARINI, A. L. C. Colonização por *Staphylococcus aureus* em portadores são relacionados de uma creche de Hospital Universitário. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 35, p.160-172, 2002.

SANTOS - FILHO, L.; FREITAS, F. I. S.; SIQUEIRA, J.R. J. P. Evolution of drug-resistance in *Staphylococcus aureus* from a brazilian university hospital **Folha Médica**, Rio de Janeiro, v.108, p.101- 103 1994.

SANTOS, F. G. B. et al. Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados do leite de vacas com mastite subclínica e equipamentos de ordenha procedentes do estado de Pernambuco. **Rev Nap**, São Paulo, v. 6, p. 19-23, 2003.

SANTOS, N. Q. **Infecção hospitalar uma reflexão histórico-crítica.** Florianópolis: UFSC, 1997.

SAUNDERS, J. R. Genetics and evolution of antibiotic resistance **Brit Medic Bull**, v.40, p. 54-60, 1984.

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.

SCHECHTER, M.; MARANGONI, D V **Doenças infecciosas: conduta, diagnóstico e terapêutica** 2 ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

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, 2007a.

SILVA NETO, R. S. et al. Estudo de microrganismos multirresistentes, segundo antibióticos-índice, no Hospital Getúlio Vargas, de agosto de 1996 a abril de 1998 – Teresina, Pi, **Braz J Infec Dis**, v. 3, supl 2, p. S80, 1999.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3 ed., São Paulo, Varela, cap. 6, 2007b.

SINGH et al. Bacterial contamination of hospital pagers. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v.23, n.5, p.274-6, 2002.

SHARMA, N. K.; REES, C. E. D; DODD, C. E. R. Development of a single-reaction multiplex PCR toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* strains. **Appl and Envir Microbiol**, v.66, p.1347-1353, 2000.

SOEJIMA, T. et al. Comparison between ultrafiltration and trichloroacetic acid precipitation method for concentration of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in dairy samples. **Inter J of F Microbiol**. v.93, p.185-194, 2004.

SOUZA, K. M. C.; OLIVEIRA, L. A.; RIBEIRO, E. L. Susceptibilidade antimicrobiana em um Hospital Universitário. **Rev Soc Bras Med Tropical**, v.31, supl 1, p .205, 1998.

SOUZA, M. V.; REIS, C.; PIMENTA, F. C. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos **Rev Patol Trop Goiania**, v.34, n. 1, p. 27-36, 2008.

SPAULDING, E. H. Chemical disinfection of medical and surgical materials In: BLOCK, S. S. **Disinfection, sterilization and preservation** Philadelphia: Lea Fabiger, 1968, p. 517-553.

SPERBER, W. H.; TATINI, S. R. Interpretation of the Tube Coagulase Test for Identification of *Staphylococcus aureus*, **Appl Environ Microbiol**, v29, n4, p 502-505, Apr 1975.

SPIANDORELLO, W, P, Resistência do *Staphylococcus aureus* a oxacilina em Hospital de Caxias do Sul **AMRIGS**, v.44, p. 120-125, 2000.

SUASSUNA, I. Noções gerais e incidência da resistência bacteriana In: GOMES, A.J. (Ed) SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE RESISTÊNCIA BACTERIANA E INFECÇÕES MISTAS, São Paulo, 1982 **Anais São Paulo**, Unipress, 1983.

SUZUKI, E. et al. Distribution of *mec* regulator genes in methicillin - resistant *Staphylococcus* clinical strains. **Antimic Agen Chemother**, Washington, v.37, n.6, p.1219-1226, Jun. 1993.

STRUELENS, M. Molecular typing tool: a key for the surveillance and control of nosocomial infection. **Curr Opin Infect Dis**, v.15, p. 383-385, 2002.

SYKES, A. et al. An investigation of the microbiological contamination of ultrasound equipment. **British J Infec Control**, v. 7, n.4, August 2006

TAMMELIN, A. et al. Nasal and hand carriage of *Staphylococcus aureus* in staff at a department for thoracic and cardiocascular surgery: endogenous or exogenous source? **Infect Control Hosp Epidemiol**, Chicago, v.24, n .686-689, Sept 2003.

TANAKA, M. et al. Organization of the mouse ghrelin gene and promoter: occurrence of a short noncoding first exon. **Endocrinol**, v. 142, p .3697-3700, 2001.

TEIXEIRA, L. A. et al. Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil **J Clin Microbiol** v.33, n.9, p.400-404, Sept 1995.

TENOVER, F. C. et al. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. **J Microbiol**, Washington, v.32, p.407, 1994.

TENOVER, F. C. et al. vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* Isolate from a Paciente Pennsylvania. **Antimic agents and Chemoter**, v.48., n.1, p.275-80, 2004.

TERASAWA, L. B. **Caracterização da resistência à oxacilina em estafilococos coagulase negativa isolados no Hospital de Clínicas de Curitiba – Paraná** Dissertação de mestrado, Curitiba, 2006.

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

TRABULSI, L.R. et al. **Microbiologia** – 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

TRABULSI, L. R.; TEIXEIRA, L. M.; BUERIS, V. *Staphylococcus aureus*. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4 ed. São Paulo: Editora Atheneu, p. 175-182, 2004.

TUCKER, P. W.; HAZEN, E. E. JR.; COTTON, F; A. Staphylococcal nuclease reviewed: Aprototypic study in contemporary enzymology I Isolation, physical and enzymatic properties **Mol Cell Biochem**, v.22, p. 67–77, 1978.

UTHIDA -TANAKA, A. M. Carriage of *Staphylococcus aureus* in the nose on the skin of patients without pyogenic dermatosis **Dermatológica**, v.146, p. 65-8, 1973.

Van BELKUM, A. et al. Genetic homogeneity among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from Saudi Arabia **Microb Drug Resist**, v .3, p 365-369, 1997.

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

VANNUFFEL, P. et al. Especific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR **J Clin Microbiol**, v. 33, p. 2864-2867, 1995.

VANUFFEL, P.; HEUSTERSPREUTE, M.; BOYER, M. et al Molecular characterization of *femA* from *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus saprophyticus*, and *femA*- based discrimination of *Staphylococcal* species. **Resear Microbiol**, Paris, v.150, n. 2, p.129-141, 1999.

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

VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia** 2 ed, São Paulo: Atheneu, 1996.

VIEIRA- DA- MOTTA, O., FOLLY, M. M.; SAKYIAMA, C. C. H. Detection of different *Staphylococcus aureus* strains bovine milk from subclinical mastitis using PCR and routine techniques **Braz J Microbiol**, São Paulo, v. 32, p .27-31, 2001.

VILA, M.M.D.C. et al. Analytical methods for vancomycin determination in biological fluids and in pharmaceuticals. **Química Nova**, v.30, n.2, p.395-399, 2007.

VILLAMIL, A. S. et al. Los manguitos del esfigmomanómetro son recervorio de bacterias potencialmente patógenas **Rev Argen Cardiol** v.72, n. 1, p.9-13, jan-fev, 2004.

XAVIER, M. S.; UENO, M. Contaminação bacteriana de estetoscopios das unidades de pediatria em um hospital universitario **Rev Soc Bras Med Tropical**, v. 42, n.2, p.217-218, mar-abr, 2009.

YORK, M.K. Aerobic Bacteriology In: H D Isenberg (Ed) *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, Second Ed Washington, DC: **ASM Press**, v.1, p.311 – 31821, 2004.

ZAVADINACK NETTO, M. et al. *Staphylococcus aureus*: incidência e resistência antimicrobiana em abscessos cutâneos de origem comunitária **Acta Sci**, v.23, n.3, p. 709-712, jun 2001.

ZER, Y. et al. Investigation of nasal colonization of health care workers by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with using new generation real-time PCR assay: Discussing of risks. **African J Biotechnol**, v. 8, n .2, p. 5531-5535, 19 October 2009.

WATANABE, S. et al. Structural comparison of ten serotypes of staphylocoagulases in *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol**, v. 187, n.11, p. 3698-3707, 2005

WATSUKI, K. et al. Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression. **J Dermatol Sci**, v.42, p. 203-14, 2006.

WERTHEIM, H. F.; VOS, M. C. Can mupirocin prevent methicillinresistant *Staphylococcus aureus* infections? **Crit Care**, v. 9, n.3,p.257-8, 2005.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiol - Reviews**, Washington, v.51, p. 221-271, 1987.

## APÊNDICE I: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Instituição:** Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – Fiocruz

**Projeto de Pesquisa:** Detecção, caracterização molecular e avaliação epidemiológica de isolados de *Staphylococcus aureus* em artigos médicos e profissionais de saúde no Atendimento Básico de Saúde

Eu, \_\_\_\_\_, declaro que participei voluntariamente do presente projeto que tem por objetivo analisar material coletado da superfície das mãos e da mucosa da cavidade nasal dos profissionais de saúde que trabalham na clínica de pré-natal, bem como das superfícies dos artigos médicos não críticos utilizados no atendimento de gestantes do **Centro Municipal de Saúde**, Rio de Janeiro, RJ Para isso, fui informado (a) que as amostras coletadas serão enviadas à Fundação Oswaldo Cruz – INCQS, para o desenvolvimento desse trabalho. Os desconfortos decorrentes da coleta nasal e das mãos fazem parte da rotina necessária para o diagnóstico laboratorial de portadores assintomáticos da bactéria *S. aureus*. Estou ciente de que o procedimento empregado para esse estudo, não acarreta riscos à minha saúde. O pesquisador responsável colocou-se à disposição para responder quaisquer perguntas a respeito desse estudo. Minha participação nesse estudo é inteiramente voluntária e sou livre para recusar a participar da referida pesquisa, ou me retirar em qualquer fase da mesma, sem dano para o meu diagnóstico e tratamento caso necessário. Será garantida a confidencialidade das informações analisadas.

Recebi uma cópia deste Termo de Consentimento e pela presente consinto minha participação, permitindo os procedimentos acima descritos.

Assinatura do voluntário

\_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_

Pesquisador responsável:

\_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_

Telefones para contato:

21- 3865-5236 (LabMicrRef INCQS)

SMS/RJ – Comitê de Ética em Pesquisa - Rua Afonso Cavalcanti 455 sala 701

Tel: 2503-2024

Local e data:

\_\_\_\_\_

## APÊNDICE II: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Instituição:** Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – Fiocruz

**Projeto de Pesquisa:** Detecção, caracterização molecular e avaliação epidemiológica de isolados de *Staphylococcus aureus* em artigos médicos e profissionais de saúde no Atendimento Básico de Saúde

Eu, \_\_\_\_\_, declaro que participei voluntariamente do presente projeto que tem por objetivo analisar material coletado da superfície das mãos e da mucosa da cavidade nasal dos profissionais de saúde que trabalham na clínica de pré-natal, bem como das superfícies dos artigos médicos não críticos utilizados no atendimento de gestantes do **Posto Municipal de Saúde**, Rio de Janeiro, RJ. Para isso, fui informado (a) que as amostras coletadas serão enviadas à Fundação Oswaldo Cruz – INCQS, para o desenvolvimento desse trabalho. Os desconfortos decorrentes da coleta nasal e das mãos fazem parte da rotina necessária para o diagnóstico laboratorial de portadores assintomáticos da bactéria *S. aureus*. Estou ciente de que o procedimento empregado para esse estudo, não acarreta riscos à minha saúde. O pesquisador responsável colocou-se à disposição para responder quaisquer perguntas a respeito desse estudo. Minha participação nesse estudo é inteiramente voluntária e sou livre para recusar a participar da referida pesquisa, ou me retirar em qualquer fase da mesma, sem danos para o meu diagnóstico e tratamento caso necessários. Será garantida a confidencialidade das informações analisadas. Recebi uma cópia deste Termo de Consentimento e pela presente consinto minha participação, permitindo os procedimentos acima descritos.

Assinatura do voluntário

\_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_

Pesquisador responsável:

\_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_

Telefones para contato:

21- 3865-5236 (LabMicrRef INCQS)

SMS/RJ – Comitê de Ética em Pesquisa - Rua Afonso Cavalcanti 455 sala 701

Tel: 2503-2024


Local e data:

\_\_\_\_\_



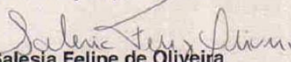
## ANEXO I: PARECER COMITÊ DE ÉTICA

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde e Defesa Civil - RJ, referente ao Centro Municipal de Saúde Jorge Saldanha de Melo (CMS) e pelo Posto de Saúde Luiz Gonzaga (PS)

 <b>Comitê de Ética em Pesquisa</b>	
Parecer nº 244A/2009	Rio de Janeiro, 05 de outubro de 2009.
Sr(a) Pesquisador(a),	
Informamos a V.Sa. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde e Defesa Civil - CEP SMSDC-RJ, constituído nos Termos da Resolução CNS nº 196/96 e, devidamente registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, recebeu, analisou e emitiu parecer sobre a documentação referente ao Protocolo de Pesquisa, conforme abaixo discriminado:	
<b>Coordenadora:</b> Salesia Felipe de Oliveira	<b>PROTOCOLO DE PESQUISA Nº 141/09</b> <b>CAAE: 0160.0.314.000-09</b>
<b>Vice-Coordenadora:</b> Suzana Alves da Silva	
<b>Membros:</b> Andréa Estevam de Amorim Alice de C. A. Vinhaes Bráulio dos Santos Júnior Carlos Alberto Pereira de Oliveira Elisete Casotti José M. Salame Jucema Fabrício Vieira Márcia Constância P. A. Gomes Mária Alice Gunzburger Mônica Amorim de Oliveira Nara da Rocha Saraiva Pedro Paulo Magalhães Crispim Rafael Aron Abitbol Sandra Regina Victor	<b>TÍTULO:</b> Caracterização molecular de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de artigos médicos e profissionais do atendimento básico de saúde no município do Rio de Janeiro, Brasil.
<b>Secretárias Executivas:</b> Carla Costa Vianna Renata Guedes Ferreira	<b>PESQUISADOR RESPONSÁVEL:</b> Angela Maria de Souza Breves Rodrigues.
	<b>UNIDADE (S) ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA:</b> CMS Jorge Saldanha Bandeira de Melo.
	<b>DATA DA APRECIÇÃO:</b> 05/10/2009.
	<b>PARECER:</b> APROVADO.

Ressaltamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (*item VII. 13.d., da Resolução CNS/MS Nº 196/96*).

Esclarecemos, ainda, com relação aos Protocolos, que o CEP/SMSDC deverá ser informado de fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo, devendo o pesquisador apresentar justificativa, caso o projeto venha a ser interrompido e/ou os resultados não sejam publicados.


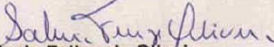
  
**Salesia Felipe de Oliveira**  
Coordenadora  
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde e Defesa Civil  
Rua Afonso Cavalcanti, 455 sala 715 – Cidade Nova – Rio de Janeiro  
CEP: 20211-901 Tel.: 3971-1590  
E-mail: [cepsms@rio.rj.gov.br](mailto:cepsms@rio.rj.gov.br) - Site: [www.saude.rio.rj.gov.br/cep](http://www.saude.rio.rj.gov.br/cep)

FWA nº: 00010761  
IRB nº: 00005577

## ANEXO II: PARECER COMITÊ DE ÉTICA

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde e Defesa Civil - RJ, referente aa solicitação do Posto de Saúde Luiz Gonzaga (PS)

 <b>Comitê de Ética em Pesquisa</b>	
Parecer nº 238A/2009	Rio de Janeiro, 05 de outubro de 2009.
Sr(a) Pesquisador(a),	
Informamos a V.Sa. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde e Defesa Civil - CEP SMSDC-RJ, constituído nos Termos da Resolução CNS nº 196/96 e, devidamente registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, recebeu, analisou e emitiu parecer sobre a documentação referente ao Protocolo de Pesquisa, conforme abaixo discriminado:	
<b>Coordenadora:</b> Salesia Felipe de Oliveira	<b>PROTOCOLO DE PESQUISA Nº 141/09</b> <b>CAAE: 0160.0.314.000-09</b>
<b>Vice-Coodenadora:</b> Suzana Alves da Silva	
<b>Membros:</b> Andréa Estevam de Amorim Alice de C. A. Vinhaes Bráulio dos Santos Júnior Carlos Alberto Pereira de Oliveira Elisete Casotti José M. Salame Jucema Fabrício Vieira Márcia Constância P. A. Gomes Maria Alice Gunzburger Mônica Amorim de Oliveira Nara da Rocha Saraiva Pedro Paulo Magalhães Chripim Rafael Aron Abitbol Sandra Regina Victor	<b>TÍTULO:</b> Caracterização molecular de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de artigos médicos e profissionais do atendimento básico de saúde no município do Rio de Janeiro, Brasil.
<b>Secretárias Executivas:</b> Carla Costa Vianna Renata Guedes Ferreira	<b>PESQUISADOR RESPONSÁVEL:</b> Angela Maria de Souza Breves Rodrigues.
	<b>UNIDADE (S) ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA:</b> PS Luiz Gonzaga.
	<b>DATA DA APRECIÇÃO:</b> 05/10/2009.
Ressaltamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação ( <i>item VII. 13.d., da Resolução CNS/MS Nº 196/96</i> ).	
Esclarecemos, ainda, com relação aos Protocolos, que o CEP/SMSDC deverá ser informado de fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo, devendo o pesquisador apresentar justificativa, caso o projeto venha a ser interrompido e/ou os resultados não sejam publicados.	
 <b>Salesia Felipe de Oliveira</b> Coordenadora Comitê de Ética em Pesquisa	
Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde e Defesa Civil Rua Afonso Cavalcanti, 455 sala 715 – Cidade Nova – Rio de Janeiro CEP: 20211-901 Tel.: 3971-1590 E-mail: <a href="mailto:cepams@rio.rj.gov.br">cepams@rio.rj.gov.br</a> - Site: <a href="http://www.saude.rio.rj.gov.br/cep">www.saude.rio.rj.gov.br/cep</a>	
FWA nº: 00010761 IRB nº: 0000577	

## **ANEXO III: MEIOS DE CULTURA**

### **1. Meios de Cultura e Condições de Cultivo (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004a)**

#### **1.1. Caldo BHI – Brain Heart Infusion**

Brain Heart Broth (MERCK) - cat nº 1104930500

Pesar e hidratar segundo instruções do fabricante

#### **1.2. Agar BHI- Brain Heart Infusion**

Brain Heartagar (MERCK) - cat nº 1138250500

Pesar e hidratar segundo instruções do fabricante

#### **1.3. Agar Sal Manitol**

Mannitol Salt Phenol-Red Agar (MERCK) - cat nº 1054040500

Pesar e hidratar segundo instruções do fabricante

#### **1.4. Agar DNase**

DNase Test Agar (MERCK) - cat nº 1104490500

Pesar e hidratar segundo instruções do fabricante

#### **1.5. Agar Nutriente (MERCK)**

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

### **1.6. Ágar Muller Hinton**

Agar Muller Hinton (MERCK) – cat nº1054370500 segundo CLSI

Pesar e hidratar segundo instruções do fabricante

### **1.7. “Skim Milk”**

“Skim Milk” (DIFCO) – cat nº 232100

Pesar e hidratar segundo instruções do fabricante

## **2. Provas Bioquímicas (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004a)**

### **2.1. Método de Coloração 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 wathmann nº1;

Armazenar em frasco escuro

Solução de Lugol: solução diluída de iodo-iodeto de potássio

(MERCK) - cat nº109261

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)

#### **Solução de Fucsina**

Fucsina Fenicada básica para Gram-- 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 três 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

### **3. Preparo de Géis, Tampões e Reagentes**

#### **3.1. Tampões** (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004a)

##### **3.1.1. Tampão Tris-Borato – EDTA 10X (TBE 10X)**

TRIS base 1211 g

Acido Bórico 618 g

NA<sub>2</sub> EDTA 37 g

Água MilliQ esterilizada qsp 1000 mL

##### **3.1.2. Tampão Tris - Borato – EDTA TBE (05X)**

Tampão TBE 10X 125 µL

Água MilliQ esterilizada qsp 2500 mL

#### **Gel de Agarose** (Sambrook, 1989)

#### **3.2. Géis** (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004a)

**3.2.1.** Agarose (Sigma A-0169)10 g

**3.2.2.** TBE (0,5 x) 1000 mL

#### **3.3. Reagente** (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004a)

**3.3.1.** Brometo de etídio (5mg/ml)60 µL