

GLEICE CRISTINA LEITE

**Epidemiologia molecular de *Staphylococcus aureus* resistentes
a metilina por meio de análise do perfil do DNA cromossômico
e de tipagem do Cassete Cromossômico Estafilocócico (SCC*mec*)
em hospital terciário de Campinas.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre
Área de concentração: Clínica Médica

Orientadora: Profa. Dra. Maria Clara Padoveze

Campinas
Unicamp
2010

GLEICE CRISTINA LEITE

**Epidemiologia molecular de *Staphylococcus aureus* resistentes
a meticilina por meio de análise do perfil do DNA cromossômico
e de tipagem do Cassete Cromossômico Estafilocócico (SCC*mec*)
em hospital terciário de Campinas.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre
Área de concentração: Clínica Médica

Orientadora: Profa. Dra. Maria Clara Padoveze

Campinas
Unicamp
2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA

BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

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

L536e Leite, Gleice Cristina
Epidemiologia molecular de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina por meio de análise do perfil do DNA cromossômico e de tipagem do Cassete Cromossômico Estafilocócico (SCCmec) em hospital terciário de Campinas / Gleice Cristina Leite. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientador : Maria Clara Padoveze
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Staphylococcus aureus. 2. Eletroforese em gel de campo pulsado. 3. Epidemiologia molecular. 4. Beta-lactamase. 5. Diversidade. I. Padoveze, Maria Clara. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* through analysis of chromosome DNA profile and typing of Sthaphylococcal Cassete Chromosome mec (SCCmec) in tertiary hospital of Campinas

Keywords: • Staphylococcus aureus
• Eletrophoresis, gel pulsed-field
• Molecular epidemiology
• Beta-lactams
• Divesrity

Titulação: Mestre em Clínica Médica

Área de concentração: Ciências Básicas

*Banca examinadora: Profa. Dra. Maria Clara Padoveze
Prof. Dr. Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza
Prof. Dr. Carlos Emilio Levy*

Data da defesa: 18-02-2010

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Gleice Cristina Leite

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Maria Clara Padovese

Membros:

1. Prof^ª. Dr^ª. Maria Clara Padovese

2. Prof. Dr. Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza

3. Prof. Dr. Carlos Emilio Levy

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

Data: 18/02/2010

*Dedico aos meus pais
Sonia e Paulo Roberto.*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida.

À Profa. Dra. Maria Clara Padoveze pela orientação, compreensão, amizade e pela grandiosa dedicação e exemplo de profissional competente.

À Profa. Dra. Maria Luiza Moretti pela oportunidade e confiança.

À Erivan Olinda Ribeiro e Márcia Maria Pedroso pela colaboração dentro do laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Transmissíveis.

À Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa e toda sua equipe do laboratório de citomegalovírus pela colaboração e ajuda.

Ao Prof. Dr. Rogério Kuboyama pela amizade, apoio e ensinamento.

Ao Prof. Dr. Orlando Bratfich pela disposição em ajudar quando foi necessário.

Aos funcionários do laboratório de Microbiologia da Divisão de Patologia Clínica do HC-UNICAMP, pela disposição e colaboração.

À Profa. Dra. Ângela Assis pela contribuição de dados para execução de técnicas.

À Dra Silvia Figueiredo Costa e seus colaboradores do laboratório do Instituto de Medicina Tropical da USP pelo apoio na etapa de padronização de técnicas para identificação do *SCCmec*.

Aos meus pais pelo amor, dedicação, exemplo de honestidade e por acompanharem incansavelmente meu trabalho.

À minha irmã Glauce, pela amizade e exemplo de determinação.

Aos meus afilhados, Sophia e Ricardo Vinícius, por existirem.

Ao Carlos pela confiança, compreensão e pelos incentivos.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

Staphylococcus aureus é reconhecido como um dos principais patógenos humanos capazes de causar uma grande variedade de infecções. As infecções causadas pelo *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) tiveram grande aumento na última década. MRSA é capaz de produzir uma proteína ligadora de penicilina (PBP) específica, chamada PBP2a ou PBP2' que possui baixa afinidade de ligação aos antibióticos β -lactâmicos. Esta proteína é codificada pelo gene *mecA*, o qual é carregado por um elemento genético móvel, denominado cassete cromossômico estafilocócico (SCC*mec*) e está integrado ao cromossomo dos MRSA. Foram descritos cinco tipos de SCC*mec*, sendo eles tipo I, II, III, IV e V e seus variantes, onde o tipo IIIA é característico do clone endêmico brasileiro. Os objetivos do presente estudo foram identificar o perfil de SCC*mec* de um conjunto de amostras de MRSA obtidas de pacientes atendidos no Hospital das clínicas da Unicamp (HC-Unicamp), descrever sua distribuição nas diversas unidades do HC e comparar o perfil de SCC*mec* utilizando-se as técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR-multiplex) com o perfil genômico definido por meio de eletroforese em campo pulsado - Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). Foram estudadas 99 amostras obtidas, por razões clínicas, no período de 1999 a 2004. Todas as amostras foram submetidas ao teste de difusão em disco para confirmação da resistência a oxacilina. Como resultados, foram identificados 26 diferentes perfis de PFGE e seus respectivos perfis relacionados. Os perfis genômicos apresentaram uma distribuição temporal, podendo ser agrupados em conjuntos clonais que foram substituídos ao longo do período, com exceção de uma única cepa, que apresentou ocorrências esporádicas durante o período do estudo. Dentre os 99 isolados, 92%

apresentaram *SCCmec* tipo IIIA, característico do clone endêmico brasileiro e 7% apresentaram *SCCmec* tipo IV. A revisão de prontuários não indica fatores que possam sugerir aquisição extra-hospitalar das cepas estudadas.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus has been recognized as an important human pathogen capable of causing a wide variety of infections. Infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) had greatly increased over the past decade. MRSA is capable of produce a specific penicillin-binding protein (PBP) called PBP2a or PBP2' that hold reduced affinities for binding to β -lactam antibiotics. This protein is encoded by the *mecA* gene, which is carried by a mobile genetic element, called staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) and is integrated to the chromosome of MRSA. It has been described five types of SCC*mec*, which are type I, II, III, IV and V and its variants, where the type IIIA is characteristic of Brazilian endemic clone. The goals of the study were to identify the SCC*mec* type from a set of MRSA samples obtained from patients seeking assistance at Hospital das Clínicas da Unicamp (HC-Unicamp), to describe its distribution in various units of HC and to compare the SCC*mec* profile with the genomic profile defined using the polymerase chain reaction (PCR-multiplex) techniques and pulsed-field electrophoresis (PFGE), respectively. It was studied 99 samples collected for clinical reasons during a period that extended from 1999 to 2004. All the samples have been submitted to the disk diffusion test for oxacilina resistance confirmation. It was carried through PFGE for genomic evaluation and PCR-multiplex for SCC*mec* type detection. It have been found 26 different PFGE profiles and their respective related profiles which have presented a temporal distribution, showing clonal groups of strains that have been substituted throughout the period, except of only one strain that was present sporadically

during all the period of the study. Among 99 isolated, 92% have shown *SCCmec* type IIIA, characteristic of Brazilian endemic clone and 7% have shown *SCCmec* type IV, in a way that all strains seem to have been acquired in the hospital environment.

Lista de abreviaturas

BEC – Clone Endêmico Brasileiro

BHI – “Brain Heart Infusion”

CARDI – Cardiologia

CA-MRSA – *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina adquiridos na comunidade

CHEF – “Clamped Homogeneous Electric Field”

CS – Coeficiente de similaridade

GASCI- Gastrocirurgia

HA-MRSA – *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina adquiridos no hospital

HC – Hospital das clínicas

HEMAT- Hematologia

LEMDT- Laboratório de epidemiologia molecular e doenças transmissíveis

LPC – Laboratório de patologia clínica

MOLIF- Moléstias infecciosas

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina

NCCLS- “National committee for clinical laboratory standards”

NEFRO- Nefrologia

NEUCI – Neurocirurgia

ONCHC – Oncologia geral

ORTOP – Ortopedia

PBP – Proteína de ligação da penicilina

PCR - Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da polimerase)

PEDIA - Pediatria

PFGE – “Pulsed-field gel electrophoresis”

PNEUM – Pneumologia

PVL – Leucocidina de Panton Valentine

REUMA- Reumatologia

SCC*mec* – “Staphylococcal cassette chromosome *mec*”

TMOSS - Transplante de medula óssea

TRAUM – Traumatologia ortopédica

UTIAD – Unidade de terapia intensiva de adultos

UTIPE – Unidade de terapia intensiva pediátrica

Lista de quadros

Quadro 1. Discriminação do lócus, <i>primers</i> utilizados, peso molecular do fragmento e tipo de SCCmec correspondente, segundo Oliveira & Lencastre, 2002. (34).....	18
Quadro 2. Distribuição de freqüência das principais características de pacientes infectados com <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a oxacilina (MRSA) (n= 85). HC-Unicamp, janeiro de 1999 a fevereiro de 2004.....	22
Quadro 3. Coeficiente de Similaridade (CS) entre amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a oxacilina (MRSA), obtido pelo programa computacional Bio-Profil (Biogene Vilber Lourmat Biotechnology), segundo o perfil principal de PFGE e respectivos perfis relacionados. HC-Unicamp, janeiro de 1999 a fevereiro de 2004.....	30
Quadro 4. Distribuição de freqüência do número de amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a oxacilina (MRSA) segundo o perfil genômico por PFGE nas respectivas unidades/especialidade de internação, de acordo com a localização geográfica (andar). HC-Unicamp, janeiro de 1999 a fevereiro de 2004.....	35
Quadro 5. Características dos pacientes cujas amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a oxacilina (MRSA) apresentaram SCCmec tipo IV. HC-Unicamp, janeiro de 1999 a fevereiro de 2004.....	39
Quadro 6. Características resumidas de estudos publicados sobre epidemiologia molecular de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a oxacilina (MRSA) de amostras obtidas no HC-Unicamp.....	41

Lista de tabelas

Tabela 1. Distribuição de frequência de pacientes infectados com <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a oxacilina (MRSA) segundo a unidade/especialidade de internação. HC-Unicamp, janeiro de 1999 a fevereiro de 2004.....	23
Tabela 2. Distribuição de frequência da ocorrência de procedimentos invasivos em pacientes com <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a oxacilina (MRSA). HC-Unicamp, janeiro de 1999 a fevereiro de 2004.....	24
Tabela 3. Distribuição de frequência do número de amostras e porcentagem (%) segundo o perfil genômico obtido por PFGE de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a oxacilina (MRSA) e respectivos períodos de prevalência. HC-UNICAMP, janeiro de 1999 a fevereiro de 2004.....	26
Tabela 4. Número de amostras relacionadas ao período do estudo, janeiro de 1999 a fevereiro de 2004. HC-Unicamp, Campinas.....	29

Lista de ilustrações

Figura 1. Representação esquemática do cassete cromossômico estafilocócico (Staphylococcal Cassette Chromosome <i>mec</i> - SCC <i>mec</i>).....	4
Figura 2. Distribuição do número de amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a oxacilina (MRSA) segundo os perfis genômicos obtidos por PFGE e seus respectivos perfis relacionados. HC-Unicamp, janeiro de 1999 a fevereiro de 2004.....	27
Figura 3. Representação do perfil de bandas obtidos a partir do PFGE com a utilização da enzima de restrição <i>smaI</i> em cepas de MRSA. (A).....	31
Figura 4. Representação do perfil de bandas obtidos a partir do PFGE com a utilização da enzima de restrição <i>smaI</i> em cepas de MRSA. (B).....	32
Figura 5. Representação do perfil de bandas obtidos a partir do PFGE com a utilização da enzima de restrição <i>smaI</i> em cepas de MRSA. (C).....	33
Figura 6. Distribuição temporal dos conjuntos clonais determinados pela análise do perfil de PFGE de amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a oxacilina (MRSA). HC-Unicamp, janeiro de 1999 a fevereiro de 2004.....	34
Figura 7. Distribuição de freqüência dos conjuntos clonais de amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a oxacilina (MRSA) determinados pela análise do perfil genômico por PFGE de acordo com a localização geográfica (andar). HC-Unicamp, janeiro de 1999 a fevereiro de 2004.....	37
Figura 8. Reação em cadeia da polimerase (PCR-multiplex) para determinação do tipo de SCC <i>mec</i> em amostras de MRSA, HC-UNICAMP, Campinas.....	38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Características dos <i>Staphylococcus aureus</i>.....	1
1.2. Epidemiologia dos <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a oxacilina (MRSA).....	4
1.3. Tipagem genômica de cepas de MRSA e do SCCmec	6
1.3.1. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE).....	7
1.3.2. Tipagem do SCCmec.....	8
1.4. Justificativa do Trabalho.....	8
2. OBJETIVO.....	9
2.1. Objetivo geral.....	9
2.2. Objetivos específicos.....	9
3. METODOLOGIA.....	10
3.1. Local do estudo.....	10
3.2. Caracterização dos pacientes.....	11
3.3. Conjunto de amostras.....	13
3.3.1. Obtenção das amostras.....	13
3.3.2. Unidade de coleta dos espécimes clínicos.....	13
3.4. Análise laboratorial confirmatória.....	14
3.4.1. Confirmação da identificação da espécie.....	14
3.4.2. Confirmação do teste de resistência a oxacilina.....	14

3.5. Tipagem do DNA genômico por PFGE.....	15
3.6. Determinação do tipo de SCC <i>mec</i>	16
3.7. Análise dos dados.....	19
3.7.1. Análise da relação de identidade entre isolados de MRSA.....	20
4. RESULTADOS.....	21
4.1. Caracterização dos pacientes.....	21
4.2. Análise do perfil genômico por PFGE.....	24
4.3. Determinação do tipo de SCC <i>mec</i>	37
5. DISCUSSÃO.....	40
6. CONCLUSÃO.....	46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
8. ANEXOS.....	56
8.1. Anexo 1.....	56
9. APÊNDICES.....	59
9.1. Apêndice 1.....	59
9.2. Apêndice 2.....	60
9.3. Apêndice 3.....	63

1. INTRODUÇÃO

1.1. Características dos *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Micrococcaceae*, é composto de 27 espécies amplamente distribuídas na natureza, dos quais a espécie *Staphylococcus aureus* é a mais importante (1).

S. aureus geralmente pertence a microbiota da pele e nariz de indivíduos saudáveis. Este agente pode causar diversas doenças incluindo endocardites, osteomielites, intoxicações alimentares e infecções de pele e partes moles. Independente da localização da infecção estafilocócica, todas são piogênicas devido seus fatores de virulência, e causam destruição local do tecido infectado. Caso o indivíduo infectado esteja debilitado por alguma doença, a infecção pode evoluir para infecções graves como septicemia, pneumonias e meningites (2,3). A maioria das cepas de *S. aureus* comporta-se como patógeno oportunista, podendo colonizar um indivíduo sem a presença de sintomas, por períodos longos ou curtos, causando doença quando há algum comprometimento do sistema imunológico (4).

S. aureus dispõe de um conjunto de mecanismos de virulência e grande versatilidade de estratégias patogênicas, distinguindo-se pela capacidade de integrar-se a microbiota normal do hospedeiro e estabelecer um estado de portador crônico. Sua transmissão decorre, na maioria das vezes, do contato direto com o indivíduo portador ou infectado. As taxas de colonização variam de 20% a 40%, sendo que algumas populações específicas, como profissionais da saúde, usuários de drogas injetáveis, diabéticos insulino-

dependentes, pacientes com cateteres de longa permanência e indivíduos portadores do HIV apresentam taxas maiores do que a população em geral (5-7). Estafilococos podem produzir doenças por meio de sua capacidade de multiplicar e disseminar-se amplamente nos tecidos e pela produção de muitas substâncias extracelulares, sendo estas, enzimas e toxinas. Entre os fatores de virulência do *S. aureus*, classificam-se as adesinas, exoenzimas, exotoxinas e outros. As toxinas, pertencentes à família dos superantígenos, estão envolvidas na patogênese das intoxicações alimentares, síndrome da pele escaldada e síndrome do choque tóxico (8).

A identificação laboratorial de *S. aureus* é feita utilizando-se testes que incluem a bacterioscopia para caracterização morfológica, teste de catalase para diferenciação de estreptococos e análise das colônias e da hemólise em meio de agar-sangue. É essencial o teste da coagulase para diferenciação entre *S. aureus* e outras espécies de *Staphylococcus*, coagulase negativo (9).

S. aureus por muito tempo têm sido o causador de doenças infecciosas, e um dos principais agentes etiológicos de infecções hospitalares. Pouco tempo após a introdução do uso clínico da penicilina, cepas de *S. aureus* desenvolveram a β -lactamase, enzima inativadora da penicilina. Pesquisas subseqüentes resultaram na obtenção de uma penicilina semi-sintética, a meticilina, quimicamente modificada, que degrada a ação da penicilinase. Contudo, esse agente infeccioso desenvolveu outro mecanismo de defesa relacionado com a produção das proteínas de ligação da penicilina, as PBPs (10). *S. aureus* produz quatro tipos de PBPs, de PBP1 a PBP4, sendo que determinadas cepas de *S. aureus* expressam uma nova PBP, a PBP2a ou PBP' (PBP adicional), adquirida de outras espécies de estafilococos, e codificada pelo gene *mecA* (10). O gene cromossômico *mecA* codifica uma

PBP adicional situada na superfície externa da membrana citoplasmática, e que possui baixa afinidade aos antibióticos β -lactâmicos, assim a PBP2a constitui um pré requisito para resistência a meticilina, desempenhando as funções na síntese da parede celular das outras PBPs, inibidas na presença de alta concentração de antibióticos β -lactâmicos (11).

O mecanismo de resistência a meticilina do *S. aureus* resulta da integração, em um sítio específico, de um elemento genético móvel. Este elemento genético é denominado **SCC*mec*** (Staphylococcal Cassete Chromosome), que se difere por conter o gene *mecA* e seus reguladores (12). Assim, também estão contidos no SCC*mec* o complexo genético *ccr*, que codifica recombinases responsáveis pela mobilidade do elemento genético e a região J (junkyard), onde estão contidos outros genes (13).

A região promotora do *mecA* e seus genes reguladores possuem seqüências relacionadas para as regiões análogas no gene da β -lactamase estafilocócica (14). Os genes *mecI* e *mecRI* são elementos regulatórios, transcritos divergentemente, estando localizados imediatamente superior (*upstream*) ao promotor do gene *mecA*. O gene *mecI* codifica uma proteína MecI, que se liga ao DNA e reprime a transcrição do gene *mecA*. O gene *mecRI* codifica uma proteína transdutora de sinal que na presença de β -lactâmicos leva a transcrição do gene *mecA* (Figura 1) (15).

Diferentes tipos de SCC*mec* são definidos por meio da combinação de classes do complexo genético *mec* e de alotipos *ccr*, o restante da estrutura é conhecida como região J e está inserida entre os dois complexos, com isso, variações da região J na mesma combinação de *mec-ccr* definem os subtipos de SCC*mec* (16).

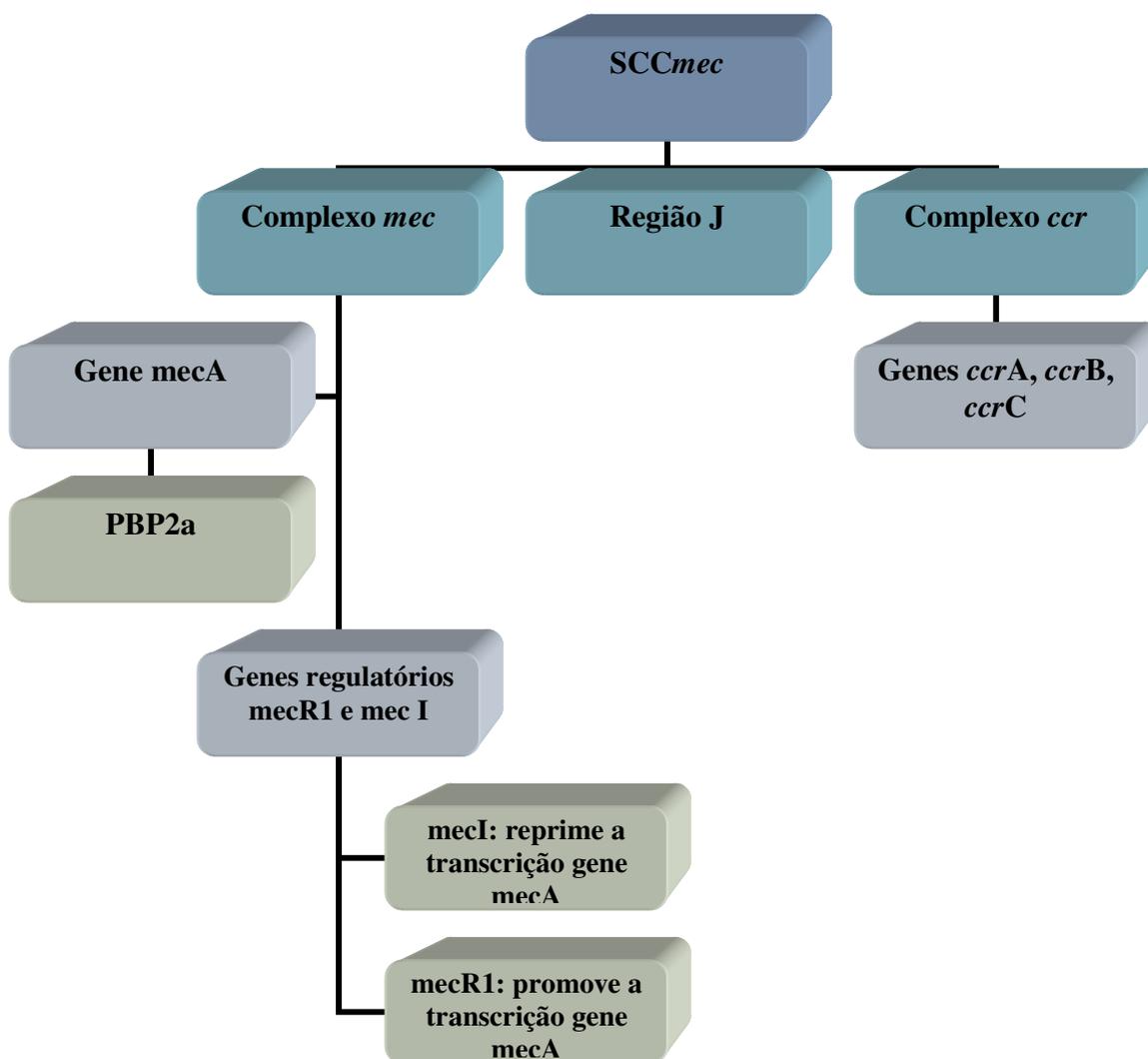


Figura 1. Representação esquemática do cassete cromossômico estafilocócico (Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* - SCC*mec*).

1.2. Epidemiologia dos *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA)

No início, os *S. aureus* resistentes a metilina (MRSA) estavam restritos a centros médicos de referência e hospitais terciários, mas logo se alastraram para serviços e centros

de saúde menores. Estudos de vigilância recentes feitos em várias partes do mundo mostraram prevalência variável de MRSA dependendo do país e, principalmente, do hospital ou setor do hospital estudado. Em alguns locais, já foram relatadas taxas acima de 80% (17). Um clone endêmico de MRSA, conhecido como clone endêmico brasileiro (BEC), apresentou disseminação por diversos hospitais brasileiros; tendo sido encontrado também em outros lugares da América do Sul, assim como na Europa (18,19). Este clone foi relatado como sendo o mais freqüente entre os isolados de MRSA em vários hospitais e em várias cidades do Brasil (18).

No entanto, o MRSA não pode mais ser considerado um patógeno relacionado exclusivamente as infecções relacionadas aos serviços de saúde. A partir dos anos 1990 surgiram relatos de infecções por MRSA adquiridas na comunidade (CA-MRSA) em pacientes sem fatores de risco identificáveis para aquisição de MRSA, ou seja, não tinham contato freqüente, direto ou indireto, com serviço de saúde que pudesse explicar a infecção por MRSA associada aos cuidados de saúde (16). Os primeiros casos documentados de infecção por CA-MRSA ocorreram entre aborígenes australianos e nativos americanos no Canadá, no início da década de 90. Posteriormente estas infecções se propagaram pelo mundo, incluindo diversos surtos, tanto nos Estados Unidos como em outros países (10). Outros casos de infecções por CA-MRSA já foram descritos no Brasil desde o primeiro relato por Ribeiro et al (20,21). Complementarmente, estudo avaliando cepas hospitalares obtidas no período de 1995 a 1999, identificou que cepas de MRSA contendo o *SCCmec* tipo IV poderiam estar presentes no país, porém ainda não identificadas (22).

Além de infectarem indivíduos sem fatores de risco aparentes, essas cepas têm perfil de resistência e virulência peculiares. Quanto à resistência, são menos resistentes a outras

classes de antimicrobianos não β -lactâmicos do que os MRSA adquiridos no hospital (HA-MRSA). Em relação à virulência, nas cepas CA-MRSA existe alta prevalência dos genes que codificam a produção da Leucocidina de Pantón-Valentine (PVL), uma exotoxina associada a infecções graves de pele e partes moles, bem como a pneumonia necrotizante, embora seu exato papel na patogenia dessas infecções não tenha sido totalmente esclarecido (23). A toxina de *Panton-Valentine leucocidina* (PVL), é uma toxina codificada por dois genes e capaz de destruir leucócitos humanos causando graves danos teciduais (24).

A grande questão sobre a emergência das cepas CA-MRSA, é se elas são derivadas de cepas HA-MRSA que foram transmitidas para comunidade, ou se desenvolveram independentemente. É proposto que todas as cepas MRSA são descendentes de um único e comum ancestral que se disseminou mundialmente, enquanto outra hipótese é a de que o *SCCmec* teria sido adquirido horizontalmente em diversas ocasiões de espécies estafilocócicas não pertencentes ao ambiente hospitalar (25).

No Brasil, a cepa BEC apresenta o cassete estafilocócico de resistência a meticilina (*SCCmec*) tipo IIIA (26). Entretanto, já foram relatados casos de infecção hospitalar por cepas de MRSA tipificadas como *SCCmec* IV no Brasil e no mundo (27-30).

1.3. Tipagem genômica de cepas de MRSA e do *SCCmec*

Durante as últimas décadas, as investigações de surtos de agentes patogênicos expandiram-se, havendo a necessidade de um refinamento das metodologias empregadas no esclarecimento da epidemiologia dos mesmos. Conseqüentemente, técnicas laboratoriais complementares como tipagem fenotípicas e genotípicas têm sido empregadas em associação com estudos epidemiológicos. Estes métodos incluem: fagotipagem, análises de

DNA plasmidial, “Pulsed-Field Gel Electrophoresis” (PFGE), Polymerase Chain Reaction (PCR) e ribotipagem, entre outro (31).

Dentre as técnicas empregadas, as análises baseadas em PCR e PFGE podem ser aplicadas com sucesso, uma vez que estas técnicas atingiram um nível satisfatório de reprodutibilidade. Acrescenta-se a isto o fato de que permitem excelente grau de discriminação entre cepas não relacionadas, enquanto as ligadas epidemiologicamente são identificadas como sendo idênticas (32).

1.3.1. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

A eletroforese convencional de moléculas de DNA é realizada aplicando-se amostras de preparados de DNA em uma matriz sólida de agarose e induzindo estas moléculas a migrar através do gel sob campo elétrico estático. A separação das moléculas através do gel depende predominantemente do peso molecular dos mesmos, de modo que pequenos fragmentos podem mover-se mais rapidamente que os maiores. O PFGE é um processo que utiliza campos elétricos que são ativados alternadamente, permitindo um realinhamento das moléculas de DNA, onde a separação de fragmentos das mesmas irá depender do seu peso molecular, sendo os de maior peso mais lentos em relação aos de menor peso. A duração do tempo programado para cada campo elétrico atuar sobre a molécula de DNA é denominada de tempo de pulso. O gradiente de voltagem, determinado em volts/centímetro, é o potencial elétrico aplicado ao gel (33).

1.3.2. Tipagem do SCCmec

O método mais utilizado para determinação dos tipos de SCCmec é o PCR-Multiplex que utiliza múltiplos pares de iniciadores dirigidos a vários genes e que amplificam fragmentos de tamanhos diferentes (34).

1.4. Justificativa do estudo

A ocorrência de MRSA na instituição na qual se realizou o presente estudo é endêmica e tem se mostrado de difícil controle (35-38). Em estudos anteriores desenvolvidos por outros pesquisadores, houve avanços na compreensão da epidemiologia molecular de MRSA na instituição, entretanto, os estudos prévios não aplicaram metodologias de tipagem de SCCmec para complementar a análise da epidemiológica (33,39).

A evolução dos conhecimentos sobre as características de CA-MRSA e HA-MRSA tem sido amplamente estudada no cenário internacional. Portanto, considera-se relevante a caracterização detalhada do cenário epidemiológico de MRSA na instituição, complementando assim, o conhecimento desta matéria no âmbito nacional.

O estudo aprofundado da epidemiologia de MRSA pode oferecer subsídios para a compreensão do fenômeno e potencialmente contribuir para o controle da sua disseminação.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Identificar e descrever o perfil genômico e o tipo de *SCCmec* de um conjunto de amostras de MRSA obtidas de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas no período de janeiro de 1999 a fevereiro de 2004.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar o tipo de *SCCmec* do conjunto de amostras obtidas;
- Identificar o perfil genômico por PFGE do conjunto de amostras obtidas;
- Descrever a distribuição dos perfis genômicos definidos por PFGE e dos tipos de *SCCmec* nas diversas unidades do HC;
- Comparar o perfil de *SCCmec* com o perfil genômico definido por PFGE no conjunto de amostras;

3. METODOLOGIA

Trata-se de estudo descritivo e exploratório com avaliação retrospectiva de dados e análise molecular de cepas de MRSA.

Durante o período de Janeiro de 1999 a Fevereiro de 2004 foram coletadas e estocadas cepas de *S. aureus* isolados de pacientes atendidos no HC-Unicamp. Neste período foram estocadas 172 amostras provenientes de sangue e cateter, das quais foram selecionadas cepas de 89 pacientes que apresentaram infecções por MRSA, correspondendo a um total de 99 amostras viáveis. A exclusão das 73 amostras foi devida apresentarem sensibilidade a oxacilina ou não estarem viáveis.

3.1. Local do estudo

A Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) está sediada em Campinas, município que conta com aproximadamente um milhão de habitantes. O Hospital das Clínicas da Unicamp (HC-Unicamp) é referência terciária na assistência a pacientes provenientes de cidades na região de Campinas, bem como de outras regiões adjacentes e mesmo de outros estados.

O HC-Unicamp contava no período de coleta das amostras com 403 leitos ativos, 375 consultórios, 44 especialidades médicas, 22 unidades de procedimentos especializados, 15 salas cirúrgicas, 8 salas cirúrgicas ambulatoriais, 8 serviços de laboratórios e 5 serviços de radiodiagnóstico, distribuído em um prédio de 6 andares, com uma área construída de aproximadamente 65.000 m², distribuídos em seis andares. O HC-Unicamp possui também

um atendimento de emergência (Unidade de Emergência Referenciada) com setores de retaguarda para internação de pacientes atendidos nesta unidade.

3.2. Caracterização dos pacientes

As informações sobre a caracterização dos pacientes foram obtidas por meio da análise de prontuários, utilizando ficha de coleta de dados padronizada (**Apêndice 1**).

Os pacientes foram caracterizados quanto aos dados referentes à internação em que foi obtida a amostra positiva para MRSA, a saber:

- ✓ Idade em anos
- ✓ Sexo
- ✓ Unidade de internação
- ✓ Data da internação
- ✓ Cirurgias (sim/não)
- ✓ Data da cirurgia
- ✓ Tipo de cirurgia
- ✓ Coleta de exames por punção (sim/não)
- ✓ Status de sorologia para HIV (positivo, negativo, desconhecido)
- ✓ Evolução (alta, óbito ou transferência).

As seguintes informações prévias a internação em que foi obtida a amostra positiva para MRSA foram avaliadas:

- ✓ Uso de insulina injetável e outros injetáveis; (sim/não)
- ✓ Episódio de vacinação ocorrida no HC-Unicamp; (sim/não)

✓ Internação recente (até um ano antes da data da internação em que foi obtida a amostra positiva para MRSA): (sim/não)

✓ Data de saída da internação recente

✓ Internação remota (mais de um ano antes da data da internação em que foi obtida a amostra positiva para MRSA): (sim/não)

✓ Data de saída da internação remota

✓ Acompanhamento ambulatorial (sim/não)

✓ Cirurgia ambulatorial: (sim/não)

✓ Data da cirurgia ambulatorial

Os intervalos de tempo até a coleta da primeira amostra positiva para MRSA foram identificados:

✓ Tempo entre internação a coleta

✓ Tempo entre a cirurgia e a coleta

✓ Tempo entre a saída da internação recente e a coleta (quando pertinente)

✓ Tempo entre a saída da internação remota e a coleta (quando pertinente)

✓ Tempo entre a cirurgia ambulatorial e a coleta (quando pertinente)

3.3. Conjunto de amostras

3.3.1. Obtenção das amostras

As amostras obtidas foram provenientes de sangue (n=66) e ponta de cateter (n=33) nos pacientes atendidos no HC-Unicamp no período de janeiro de 1999 a fevereiro de 2004.

Estas amostras foram coletadas com fins de investigação clínica de rotina, nas diversas unidades de atendimento e internação e foram processadas e identificadas pela Seção de Microbiologia do Laboratório de Patologia Clínica (LPC). Posteriormente, as amostras positivas para *S. aureus* foram estocadas em alíquotas de 1,5 ml de leite desnatado a 10% estéril e congeladas a -20°C. Este procedimento de estocagem fez parte de procedimento de rotina para composição de um banco de bactérias do HC-Unicamp, coordenado em parceria pelo Laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Transmissíveis (LEMDT) e o LPC.

3.3.2. Unidades de coleta dos espécimes clínicos

As amostras isoladas se originaram de espécimes coletadas em diferentes unidades/especialidades do HC-Unicamp. Foram consideradas como unidades/especialidades todas as unidades de internação, a Unidade de Leito-Dia para atendimento de pacientes HIV e a Unidade de Emergência Referenciada. A especialidade de Medicina Interna inclui pacientes atendidos tanto na Enfermaria Geral de Adultos, localizada no sexto andar, quanto Enfermaria de Emergência Clínica, localizada no quarto andar.

Embora esta não seja a configuração atual da distribuição das unidades hospitalares no HC-Unicamp, para fins deste estudo, mantivemos a descrição das unidades hospitalares, de acordo com o vigente na época de coleta das amostras.

3.4. Análise laboratorial confirmatória

3.4.1. Confirmação da identificação da espécie

As amostras de *Staphylococcus aureus* congeladas foram re-suspensas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubadas *overnight*. A seguir, estas amostras foram semeadas em meio de ágar sangue a 5%. Após crescimento bacteriano as amostras foram analisadas macroscopicamente de acordo com morfologia das colônias e presença de hemólise no meio de cultura. Após esta etapa, estas foram repicadas em meio de Agar *Müller Hinton* e a identificação foi confirmada pela presença do fator A utilizando-se kit comercial *Staphy Test*® (PROBAC DO BRASIL Produtos bacteriológicos Ltda).

3.4.2. Confirmação do teste de resistência a oxacilina

Para confirmar a resistência a oxacilina nas amostras em estudo, foi realizado teste de susceptibilidade pelo método de difusão em disco, sendo testados oxacilina e cefoxitina de acordo com as normas do NCCLS (40). Para tanto, 4 a 5 colônias foram transferidas para aproximadamente 4 mL de caldo de BHI e incubadas por 2 a 8 horas até se obter a turbidez padrão de 0,5 da escala de McFarland, então a suspensão foi semeada em meio de cultura ágar “Müller Hinton” com swab estéril e colocado os respectivos discos.

A resistência ou sensibilidade é avaliada pela medida do halo de inibição de crescimento em milímetros ao redor do disco de acordo com as normas de NCCLS (40), considerando sensível halo ≥ 13 mm, intermediário = 11-12 mm e resistente ≤ 10 mm.

3.5. Tipagem do DNA genômico por PFGE

A tipagem do DNA genômico por PFGE foi realizada no LEMDT no HC-Unicamp. O modelo de PFGE utilizado neste estudo foi o “Clamped Homogeneous Electric Field” (CHEF), cujo princípio é o da geração de campos elétricos homogêneos alternados usando múltiplos eletrodos distribuídos numa geometria hexagonal.

O equipamento (CHEF DRII; BioRad Manufacture) consta de: 1) cuba onde estão dispostos os eletrodos, na qual são colocados a solução tampão e o gel; 2) fonte geradora dos campos elétricos; 3) módulo de resfriamento do tampão; 4) bomba propulsora do tampão entre a cuba e o módulo de resfriamento.

A preparação do DNA genômico foi descrita anteriormente por Goering e Duensing (32) e adaptada por Branchini et al (41). Isolados bacterianos foram cultivados em BHI sob agitação e incubados a 35°C por 24 horas. Após centrifugação, o concentrado de bactérias foi lavado duas vezes com solução salina a 0,85%. A relação peso/volume desse concentrado foi então equilibrada com solução de lise (tampão EC: 6mM TRIS pH 7,5; 1M NaCl; 10 mM EDTA; 0,5% BRIJ 58; 0,2% desoxicolato de sódio; 0,5% N-lauroyl-sarcosine). Foram homogeneizados cinquenta e cinco microlitros da suspensão bacteriana adicionando 450 μ l de “low melt agarose” a 2% e 3,5 μ l de solução estoque de lisostafina e dispensados em moldes. Os blocos de gel contendo o concentrado bacteriano foram

incubados por 24 horas a 35°C com 3 mL da mesma solução de tampão EC. No dia seguinte, os blocos de agarose foram lavados e reincubados a 50°C por 24 horas em solução ES (0,4M EDTA pH 9,3; sarcosyl 1%), para remover todos os componentes celulares indesejáveis, porém mantendo o DNA intacto. No dia seguinte os blocos foram novamente lavados com solução TE de alta molaridade (100 mM TRIS pH 7,5; 100 mM EDTA pH 7,5). Para a digestão do DNA genômico por enzima de restrição, cada bloco foi lavado com solução Dummy no Salt (1M TRIS pH 8,0; 1M MgCl₂) e incubado em 200 µl de solução de digestão por *Sma I* (Invitrogen Corporation) à temperatura de 30°C por 24 horas. Após este período foram lavados com solução de TE de baixa molaridade.

Os blocos contendo o DNA digerido foram inseridos em gel a 1% de agarose grau cromossômico em solução tampão TBE 0,5X. A eletroforese foi realizada com pulsos de tempo de 5 a 35 segundos, gradiente de voltagem de 6 volts/cm, temperatura de 13,5°C por 20 horas. O gel foi corado com brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. Na primeira coluna de cada gel foi colocado DNA *lambda concatemer* (BioRad) para comparação do peso molecular.

3.6. Determinação do tipo de SCCmec

A determinação do tipo de SCCmec foi realizada utilizando-se o método de PCR multiplex, conforme protocolo de Oliveira & Lencastre (34), descrito a seguir. Foram utilizados 8 loci (A-H), selecionados com base nas seqüências do elemento *mec* descritas previamente (4,12,34). O locus A está localizado *downstream* ao gene *pls* e é específico para o SCCmec tipo I; o locus B é um fragmento interno do operon *kdp*, que é específico para o

SCC*mec* tipo II; o locus C é um fragmento interno do gene *mecl* presente nos SCC*mec* tipos II e III; o locus D é um fragmento interno da região *dcs*, presente nos SCC*mec* tipos I, II e IV; o locus E está localizado na região entre o plasmídeo pI258 e o transposon Tn554, sendo específico para o SCC*mec* tipo III; o locus F, também específico para o SCC*mec* tipo III, está localizado entre o Tn554 e a junção cromossômica direita (*orfX*). Os loci G e H foram incluídos para distinguir as variantes estruturais IA e IIIA, respectivamente. O locus G corresponde a junção esquerda entre a seqüência de inserção IS431 e o plasmídeo pUB110, permite diferenciar a variante estrutural IA devido a presença de um fragmento de 318 bp (que corresponde a inserção de pUB110), presente nessa variante e ausente no SCC*mec* tipo I. O locus H corresponde a junção esquerda entre a seqüência de inserção IS431 e o plasmídeo pT181, permite diferenciar o SCC*mec* tipo III do IIIA devido a ausência do fragmento de 303 bp no SCC*mec* tipo IIIA. Outra variante estrutural, SCC*mec* tipo IIIB, também pode ser discriminada devido a ausência de amplificação de fragmentos de DNA com *primers* correspondentes aos locis E, F e H. (**Quadro 1**).

Quadro 1. Discriminação do locus, *primers* utilizados, peso molecular do fragmento e tipo de SCCmec correspondente, segundo Oliveira & Lencastre, 2002. (34)

Locus	Primers	Tamanho (bp)	Tipo SCCmec
A	CIF2 F2 CIF2 R2	495	I
B	KDP F1 KDP R1	284	II
C	MECI P2 MECI P3	209	II, III
D	DCS F2 DCS R1	342	I, II, IV
E	RIF4 F3 RIF4 R9	243	III
F	RIF5 F10 RIF5 R13	414	III
G	IS431 P4 pUB110 R1	381	
H	IS431 P4 pT181 R1	303	
mecA	MECA P4 MECA P7	162	Controle Interno

O DNA genômico foi extraído utilizando-se o kit comercial “TriPhases” (BioAgency), segundo as instruções do fabricante. Para a reação de amplificação foi utilizado o kit comercial GeneAmp PCR (Applied Biosystems), contendo a seguinte mistura: tampão de reação II 1x, 200mM de cada dNTP, 400nM dos *primers* CIF2 F2, CIF2 R2, MECI P2, MECI P3, RIF5 F10, RIF5 F13, pUB110 R1 e pT181, 800nM dos *primers* DCS R2, MECA P4, MECA P7 e IS431 P4, 200nM dos *primers* KDP R1, RIF4 F3 e RIF4 R9, 1,25U de AmpliTaq e aproximadamente 5ng do DNA molde. A reação de amplificação foi

realizada no termociclador GeneAmp PCR System 2400, utilizando o seguinte programa: 4 minutos a 94°C, seguido por 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 53°C e 1 minuto a 72°C. O programa foi concluído com uma extensão adicional de 4 minutos a 72°C. Após, os tubos foram mantidos a 4°C até o momento da eletroforese.

Após a reação de amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X por 1 hora a 110 volts. Como padrão de peso molecular foi utilizado um marcador de peso molecular de 100bp (Invitrogen Corporation). O DNA foi corado em solução aquosa de brometo de etídio 0,5µg/mL e posteriormente visualizado e fotografado sob transiluminação ultravioleta.

3.7. Análise de dados

Os dados foram analisados quanto às características dos pacientes e quanto à distribuição geográfica e temporal dos tipos de SCC*mec* e perfis de PFGE. Os resultados de incidência de tipos de PFGE foram apresentados como porcentagem de perfis dentre o número total de amostras. A distribuição geográfica foi avaliada conforme a distribuição das unidades de atendimento na área física do HC. A análise temporal foi feita conforme a distribuição dos perfis de PFGE ao longo dos meses. A análise comparatória entre o perfil de PFGE e SCC*mec* foi realizada pelo método descritivo.

3.7.1. Análise da relação de identidade entre isolados de MRSA

A análise visual foi utilizada para discriminação preliminar entre os isolados. A relação entre dois isolados foi estimada pelo Coeficiente de Similaridade (CS), utilizando Coeficiente de Nei e Li, também chamado de Coeficiente de Dice (42), (para $CS = 2 n_{xy} / (n_x + n_y)$, onde n_x e n_y são os números de bandas nas linhas “x” e “y” respectivamente e n_{xy} é o número de bandas compartilhadas entre duas linhas). Para realização do CS foi utilizado o programa computacional para Windows (Bio-Profil, Bio-Gene Windows Application v. 99.04).

Foram definidas como perfil idêntico as cepas que apresentaram o mesmo padrão de bandas em número e peso molecular ($CS = 1$); perfil relacionado, aquelas cepas cujo padrão de bandas foi diferente do padrão principal encontrado devido a um evento genético por mutação, inserção, deleção ou inversão de DNA ($0,90 \leq CS < 1$). As cepas foram consideradas como perfil diferente quando o padrão diferiu do padrão principal encontrado ($CS < 0,9$).

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização dos pacientes

Foram avaliados 85 prontuários de 89 pacientes inseridos na pesquisa, devido à impossibilidade de localizar o número de registro do paciente, prejudicando a revisão de dados de quatro pacientes. As características dos pacientes estão apresentadas no **Quadro 2**.

O intervalo médio de tempo entre a data de internação e a data de coleta do material positivo para MRSA foi de 25 dias (mediana = 19, desvio padrão = 22).

Para os pacientes submetidos à cirurgia, o intervalo médio de tempo entre a data da cirurgia e a data de coleta do material positivo para *S. aureus* resistente a oxacilina foi de 21 dias (mediana = 18, desvio padrão = 17).

No caso de pacientes que apresentaram história de internação prévia recente, ou seja, com internação no período de um ano antes da internação em que foi isolada a amostra em estudo, o intervalo médio de tempo entre a data desta internação e a data da coleta do material positivo para MRSA foi de 97 dias (mediana = 37, desvio padrão = 130). Para pacientes que apresentaram história de internação remota, ou seja, onde o paciente esteve internado no período que antecede um ano da internação em que foi isolada a amostra em estudo, o intervalo médio de tempo entre a data da internação remota e a data da coleta do material positivo para internação em que foi isolada a amostra em estudo foi de 1.715 dias (aproximadamente 4,5 anos). Para os pacientes com história de seguimento ambulatorial, o intervalo médio de tempo entre a última consulta ambulatorial e a coleta do exame positivo para MRSA foi de 141 dias.

Quadro 2. Distribuição de frequência das principais características de pacientes infectados com *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina (MRSA) (n= 85). HC-Unicamp, janeiro de 1999 a fevereiro de 2004.

Características	Número de pacientes	%
Sexo*		
Feminino	28	31,4
Masculino	61	68,5
Faixa etária		
<10 anos	3	3,5
10-20 anos	4	4,7
20-40 anos	33	38,8
40-60 anos	33	38,8
> 60 anos	12	14,1
Internação prévia		
Não	36	42,3
Sim	49	57,6
Recente (< 1 ano)	38	44,7
Remota (> 1 ano)	11	12,9
Acompanhamento ambulatorial		
Sim	15	17,6
Não	70	82,3
Cirurgia na internação		
Sim	48	56,4
Não	37	43,5
Óbito durante a internação		
Sim	54	63,5
Não	31	36,4

* somente para a informação quanto ao sexo, n= 89.

Quanto ao status da sorologia para HIV, 72 (84,7%) apresentaram sorologia negativa, 13 (15,2%) pacientes apresentam sorologia positiva e 4 (4,7%) não tinham registro no prontuário quanto a esta informação.

As cepas estudadas foram obtidas de pacientes atendidos nas diferentes unidades de internação. O maior número de pacientes foi procedente da Medicina Interna distribuídos

entre a unidade de Enfermaria Geral de Adultos e Emergência Clínica; a Unidade de Terapia Intensiva de Adultos foi responsável pela internação de 15,2% dos casos (**Tabela 1**).

Tabela 1. Distribuição de frequência de pacientes infectados com *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina (MRSA) segundo a unidade/especialidade de internação. HC-Unicamp, janeiro de 1999 a fevereiro de 2004.

Unidade de Internação	Números de pacientes (%)
Medicina interna (a)	22 (25,8%)
Unidade de terapia intensiva de adultos	13 (15,2%)
Hematologia	09 (10,5%)
Moléstias infecciosas	06 (7,0%)
Unidade Leito-Dia	06 (7,0%)
Gastrocirurgia	05 (5,8%)
Neurocirurgia	05 (5,8%)
Nefrologia	03 (3,5%)
Traumatologia ortopédica	03 (3,5%)
Pediatria	02 (2,3%)
Unidade de Emergência Referenciada	02 (2,3%)
Transplante de medula óssea	02 (2,3%)
Unidade de terapia intensiva pediátrica	02 (2,3%)
Cardiologia	01 (1,2%)
Oncologia geral	01 (1,2%)
Ortopedia	01 (1,2%)
Pneumologia	01 (1,2%)
Reumatologia	01 (1,2%)
Total de Pacientes	85 (100%)

(a) A especialidade de Medicina Interna inclui a Enfermaria Geral de Adultos e a Emergência Clínica.

Com relação a procedimentos invasivos ocorridos prévios a internação destes pacientes, a distribuição das ocorrências é apresentada na **Tabela 2**. Destaque-se que o procedimento de diálise foi ocorrência freqüente, sendo em muitos casos em falência renal aguda.

Tabela 2. Distribuição de freqüência da ocorrência de procedimentos invasivos em pacientes com *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina (MRSA). HC-Unicamp, janeiro de 1999 a fevereiro de 2004.

Procedimento	Números de pacientes (%)
Coleta de exames por punção	85 (100%)
Diálise	20 (23,5%)
Uso de Insulina Injetável	05 (5,8%)
Uso de Outros Injetáveis	04 (4,7%)
Vacinação	04 (4,7%)
Cirurgia ambulatorial	01 (1,2%)
Total de Pacientes	85 (100%)

4.2. Análise do perfil genômico por PFGE

A análise do DNA cromossômico pelo método de PFGE foi realizada nas 99 amostras, sendo obtidos 26 perfis diferentes por meio da utilização do programa computacional Bio-Profil. A discriminação do período de prevalência dos perfis de PFGE está apresentada na **Tabela 3**. O perfil 1, com 13 amostras, apresentou a maior incidência no período (14,6%). Apresentaram cepas relacionadas os perfis de número 1 a 4, 6, 8 a 12, 18, 21 e 23. Os demais perfis não apresentaram cepas relacionadas, somente cepas idênticas.

Dentre os 89 pacientes incluídos no estudo, alguns deles apresentaram mais de uma amostra, ou seja, uma amostra de sangue e outra de ponta de cateter, ou duas amostras do mesmo material que foram coletadas em datas distintas. Um dos pacientes apresentou três amostras, sendo uma amostra de sangue e duas amostras de ponta de cateter. Em alguns casos as amostras de um mesmo paciente apresentam perfis de PFGE diferentes.

A **Figura 2** representa graficamente a distribuição dos perfis de PFGE com suas respectivas cepas relacionadas. O coeficiente de DICE entre amostras relacionadas em relação ao perfil principal é apresentado no **Quadro 3**.

Tabela 3. Distribuição de frequência do número de amostras e porcentagem (%) segundo o perfil genômico obtido por PFGE de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina (MRSA) e respectivos períodos de prevalência. HC-UNICAMP, janeiro de 1999 a fevereiro de 2004.

Perfil genômico pelo PFGE	Número de amostras	%	Período de prevalência
1 e relacionadas	13	14,6	Jan/99 – Jul/01
2 e relacionadas	9	10,1	Jan/99 a Abr/02
3 e relacionadas	7	7,9	Jan/99 a Mar/01
4 e relacionadas	8	9,0	Mar/99 – Set/03
5	1	1,1	Mar/00
6 e relacionadas	3	3,4	Abr/00 a Nov/00
7	1	1,1	Out/00
8 e relacionadas	5	5,6	Jan/01 a Out/03
9 e relacionadas	3	3,4	Set/01 a Jul/03
10 e relacionadas	4	4,5	Out/01 a Abr/02
11 e relacionadas	2	2,2	Out/01 a Fev/02
12 e relacionadas	7	7,9	Dez/01 a Mar/02
13	1	1,1	Fev/02
14	1	1,1	Abr/02
15	1	1,1	Abr/02
16	1	1,1	Abr/02
17	2	2,2	Mai/02 a Fev/03
18 e relacionadas	5	5,6	Mai/02 a Ago/03
19	1	1,1	Jun/02
20	1	1,1	Fev/03
21 e relacionadas	7	7,9	Mar/03 a Fev/04
22	1	1,1	Jul/03
23 e relacionadas	2	2,2	Jul/03
24	1	1,1	Out/03
25	1	1,1	Jul/03
26	1	1,1	Dez/03
Total de pacientes	89	100%	

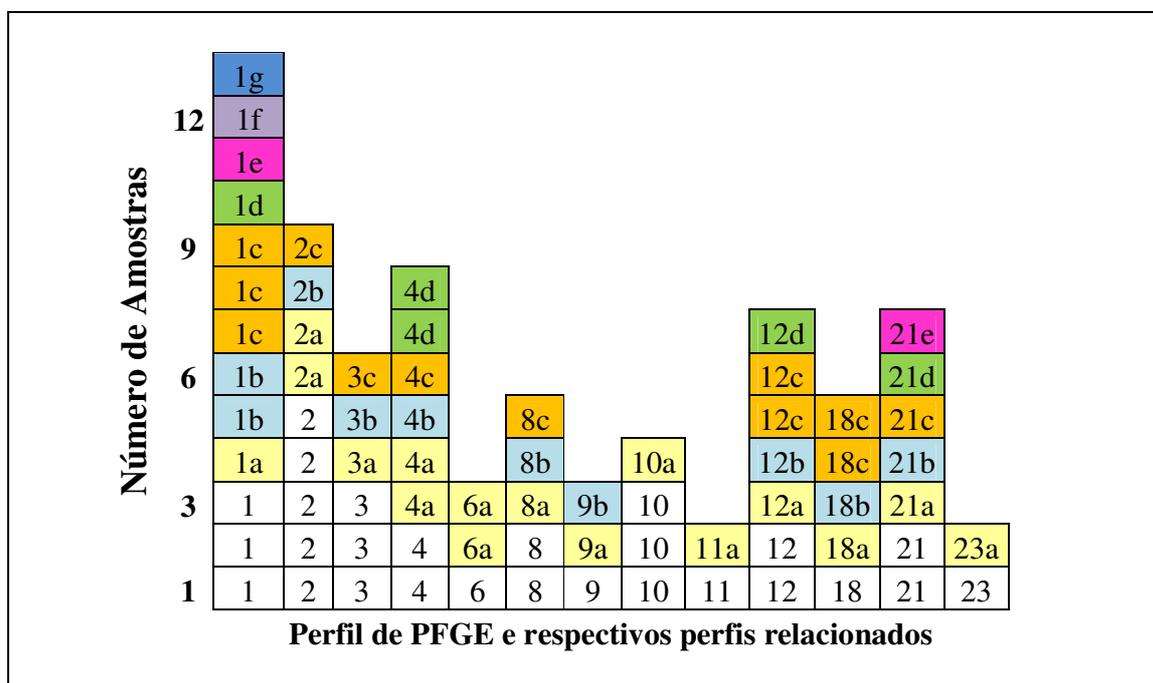


Figura 2. Distribuição do número de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina (MRSA) segundo os perfis genômicos obtidos por PFGE e seus respectivos perfis relacionados. HC-Unicamp, janeiro de 1999 a fevereiro de 2004.

Nas **Figuras 3, 4 e 5** estão representados alguns dos perfis obtidos de isolados de MRSA definidos por meio de PFGE, utilizando-se a enzima de restrição *Sma I*. O dendograma referente aos perfis de PFGE identificados encontra-se no Apêndice 3.

Ao longo do tempo, verificou-se a distribuição dos perfis formando conjuntos clonais, cada um dos quais perduraram por algum tempo, sendo posteriormente substituídos. No presente estudo, pudemos identificar três conjuntos clonais, utilizando como referência a primeira e a última data de amostra de MRSA com o perfil de PFGE mais prevalente em cada período. Assim, o conjunto clonal I teve como referência as cepas tipo 1 e tipo 2 e incluíram as cepas tipos 3, 5, 6 e 7, sendo o seu período de prevalência entre janeiro de

1999 a abril de 2002. O conjunto clonal II teve como referência a cepa tipo 8 e incluiu as cepas tipos 9 a 20 e suas relacionadas, sendo o seu período de prevalência entre junho de 2001 e outubro de 2003. O conjunto clonal III teve como referência a cepa tipo 21 e incluiu as cepas tipos 22 a 26 e suas relacionadas, sendo o seu período de prevalência entre março de 2003 e fevereiro de 2004. Observou-se que o período de prevalência destes conjuntos clonais apresentou alguns meses de superposição. Uma única cepa, com o perfil de PFGE tipo 4 e seus perfis relacionados, não foi incluída em nenhum destes grupos clonais identificados, pois apresentou ocorrência esporádica ao longo do período do estudo. A distribuição temporal dos conjuntos clonais está representada na **Figura 6**.

A **tabela 4** apresenta o número de amostras, sangue e ponta de cateter, relacionada ao período do presente estudo, 1999 a 2004.

Tabela 4. Número de amostras relacionadas ao período do estudo, janeiro de 1999 a fevereiro de 2004. HC-Unicamp, Campinas.

Período do estudo	Número de amostras
1999	10
Sangue	6
Cateter	
2000	
Sangue	7
Cateter	7
2001	
Sangue	11
Cateter	5
2002	
Sangue	18
Cateter	8
2003	
Sangue	15
Cateter	7
2004	
Sangue	1
Cateter	
*	
Sangue	4
Total	95

*4 pacientes sem análise de prontuários, período indeterminado

Quadro 3. Coeficiente de Similaridade (CS) entre amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina (MRSA), obtido pelo programa computacional Bio-Profil (Biogene Vilber Lourmat Biotechnology), segundo o perfil principal de PFGE e respectivos perfis relacionados. HC-Unicamp, janeiro de 1999 a fevereiro de 2004.

Perfis de PFGE		CS em relação ao tipo principal
Principal	Relacionado	
1	1a	0,92
	1b	0,92
	1c	0,92
	1d	0,92
	1e	0,92
	1f	0,92
	1g	0,92
2	2a	0,92
	2b	0,92
	2c	0,92
3	3a	0,96
	3b	0,96
	3c	0,96
	3d	0,96
4	4a	0,96
	4b	0,96
	4c	0,96
	4d	0,96
6	6a	0,95
8	8a	0,91
	8b	0,91
	8c	0,91
9	9a	0,90
	9b	0,90
	9c	0,90
10	10a	0,97
11	11a	0,97
12	12a	0,90
	12b	0,90
	12c	0,90
	12d	0,90
18	18a	0,92
	18b	0,92
	18c	0,92
21	21a	0,90
	21b	0,90
	21c	0,90
	21d	0,90
	21e	0,90
23	23a	0,94

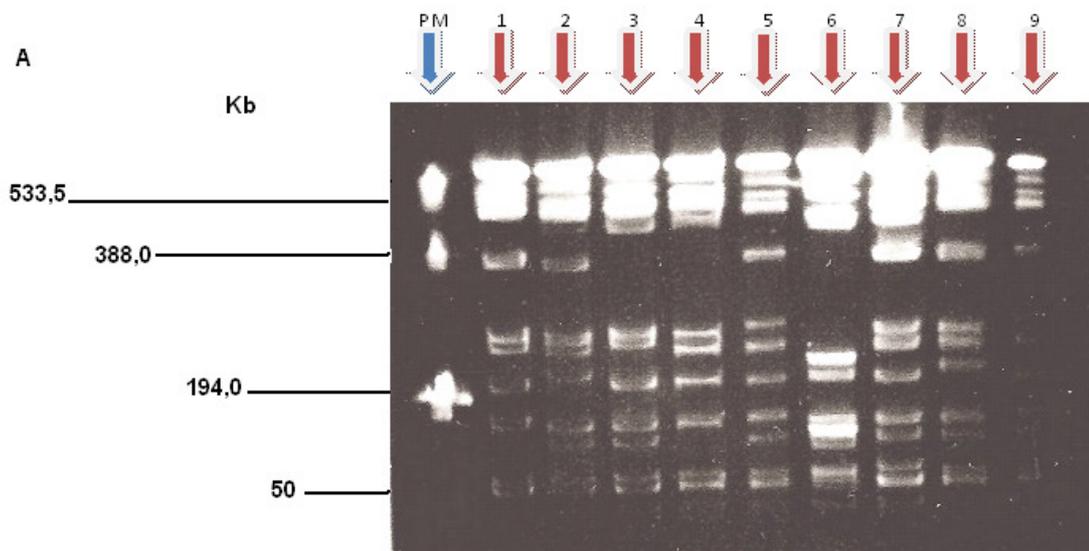


Figura 3. Representação do perfil de bandas obtidos a partir do PFGE com a utilização da enzima de restrição *smaI* em cepas de MRSA. A: Canaleta PM: marcador de peso molecular 1000 Kb (Lambda Ladder PFG Marker, BioLabs), canaletas 1, 2, 5, 8 e 9: padrão de PFGE tipo 2, canaleta 3: padrão de PFGE tipo 2a, canaleta 4: padrão de PFGE tipo 2b, canaleta 6: padrão de PFGE tipo 2c, canaleta 7: padrão de PFGE tipo 7.

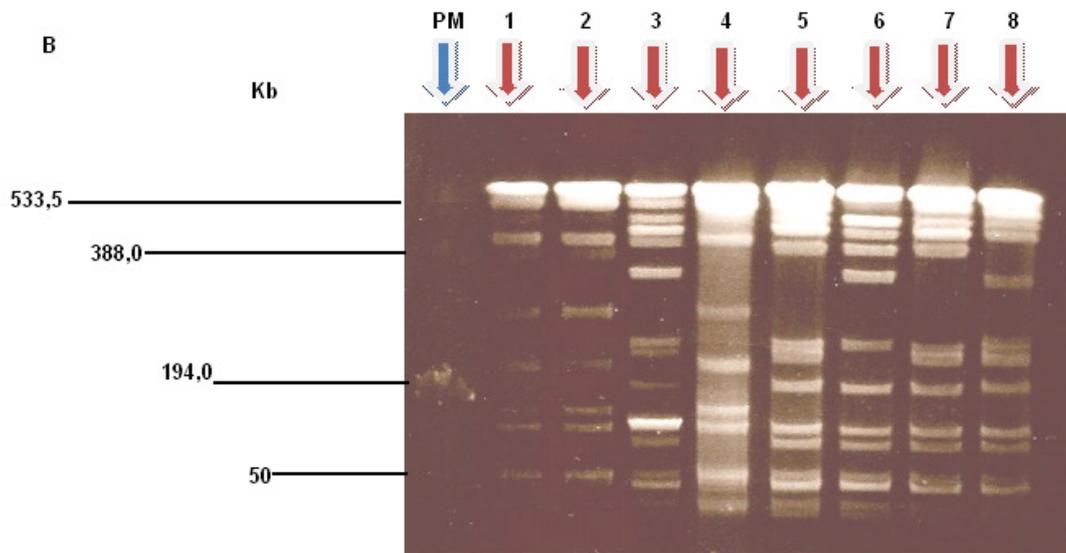


Figura 4. Representação do perfil de bandas obtidos a partir do PFGE com a utilização da enzima de restrição *smaI* em cepas de MRSA. B: Canaleta PM: marcador de peso molecular 1000 Kb (Lambda Ladder Marker, BioLabs), canaletas 1, 2 e 4: padrão de PFGE tipo 4d, canaleta 3: padrão de PFGE tipo 4b, canaletas 5 e 7: padrão de PFGE tipo 4, canaleta 6: padrão de PFGE tipo 4a, canaleta 8: padrão de PFGE tipo 4c.

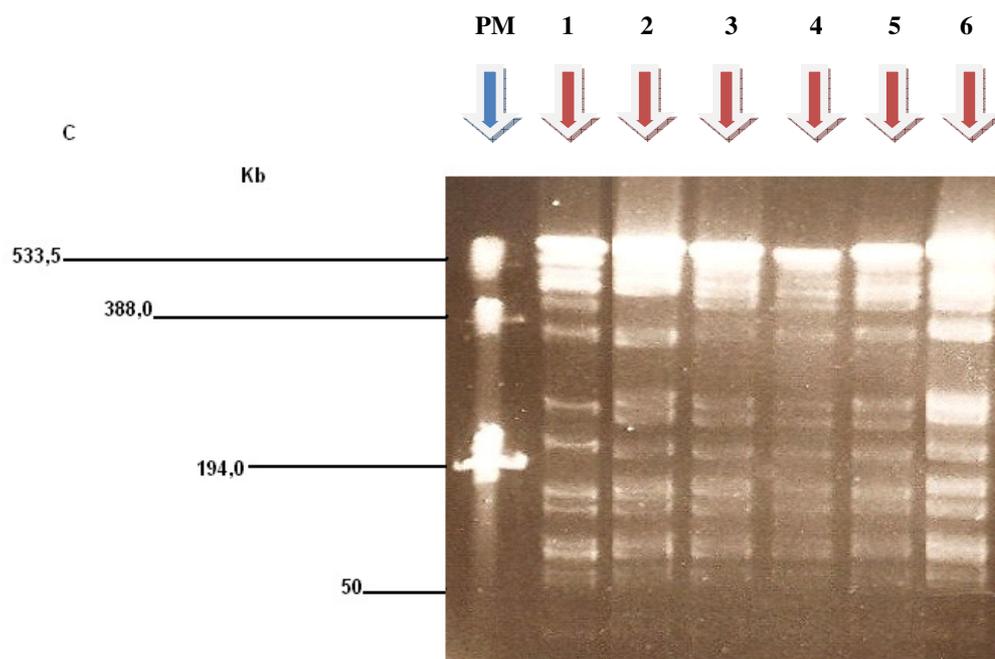


Figura 5. Representação do perfil de bandas obtidos a partir do PFGE com a utilização da enzima de restrição *smaI* em cepas de MRSA. C: Canaleta PM: marcador de peso molecular 1000 Kb (Lambda Ladder Marker, BioLabs), canaletas 1, 3-6: padrão de PFGE tipo 1c, canaleta 2: padrão de PFGE 1d.

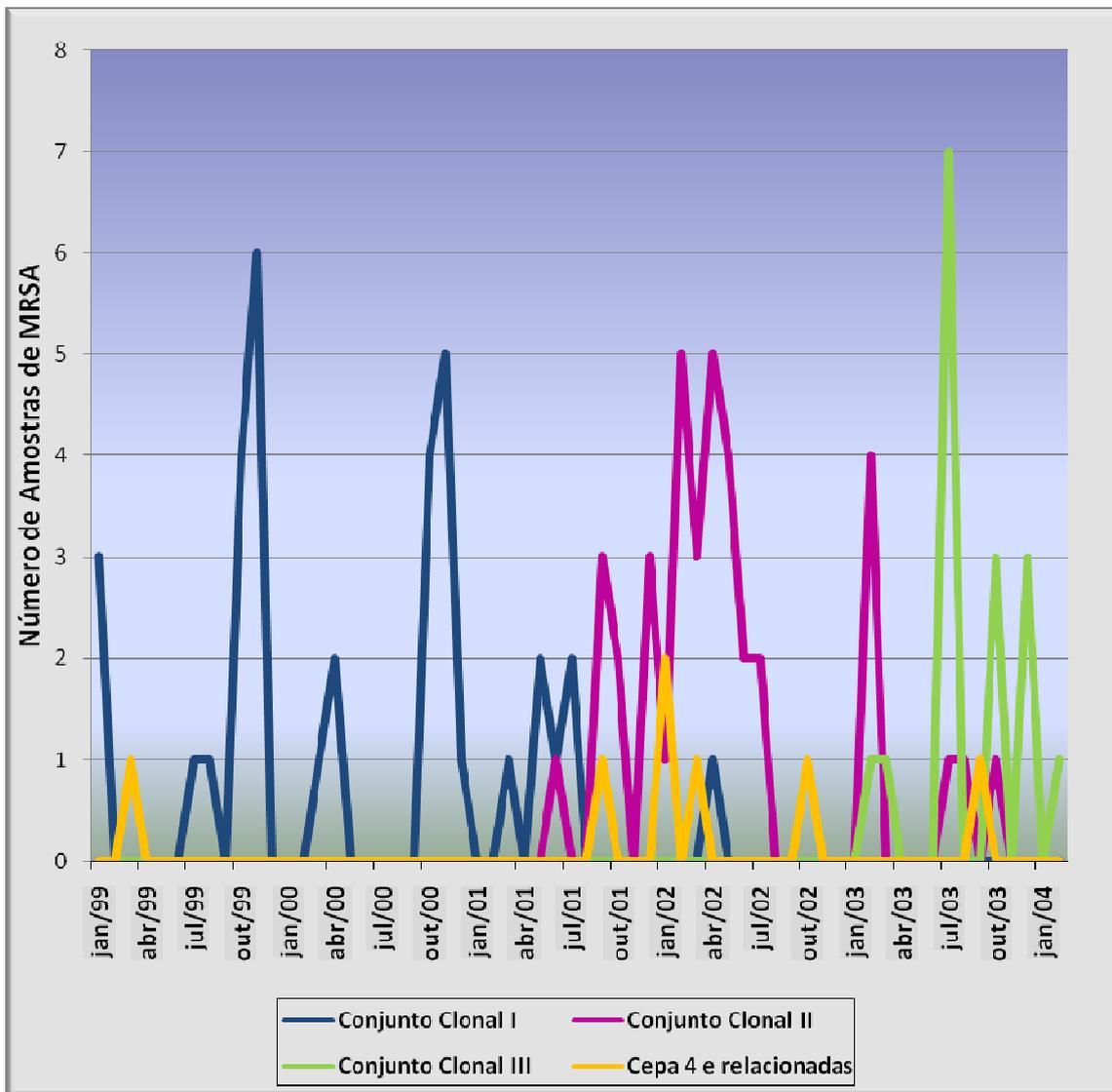


Figura 6. Distribuição temporal dos conjuntos clonais determinados pela análise do perfil de PFGE de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina (MRSA). HC-Unicamp, janeiro de 1999 a fevereiro de 2004.

No **Quadro 4** é possível observar a distribuição dos perfis de PFGE nas diferentes unidades de internação de acordo com sua localização dentro do HC-Unicamp.

Quadro 4. Distribuição de frequência do número de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina (MRSA) segundo o perfil genômico por PFGE nas respectivas unidades/especialidade de internação, de acordo com a localização geográfica (andar). HC-Unicamp, janeiro de 1999 a fevereiro de 2004.

Andar	Unidade/Especialidade	Perfil de PFGE	Número de amostras
2º	UER *	4 e relacionadas	1
		6 e relacionadas	1
	UTI**	1 e relacionadas	1
		2 e relacionadas	3
		3 e relacionadas	1
		4 e relacionadas	1
		8 e relacionadas	2
		11 e relacionadas	1
		12 e relacionadas	1
		18 e relacionadas	2
		21 e relacionadas	1
23 e relacionadas	1		
4º	Transplante de medula óssea	3 e relacionadas	1
		12 e relacionadas	2
	Pediatría	1 e relacionadas	2
		2 e relacionadas	1
	UTIP***	6 e relacionadas	1
11 e relacionadas	1		
5º	Neurocirurgia	1 e relacionadas	1
		3 e relacionadas	1
		4 e relacionadas	1
		20	1
		24	1
	Ortopedia	2 e relacionadas	1
	Traumatologia	1 e relacionadas	1
		4 e relacionadas	1
		18 e relacionadas	1
	Reumatologia	21 e relacionadas	1
	Hematologia	1 e relacionadas	2
		9 e relacionadas	1
		10 e relacionadas	2
		12 e relacionadas	1
		17	1
		18 e relacionadas	1
		23 e relacionadas	1
	Nefrologia	1 e relacionadas	1
		21 e relacionadas	2
Oncologia	12 e relacionadas	1	

6º		
Pneumologia	2 e relacionadas	1
Moléstias Infecciosas	3 e relacionadas	2
	5	1
	6 e relacionadas	1
	8 e relacionadas	1
	12 e relacionadas	1
Medicina Interna	1 e relacionadas	3
	2 e relacionadas	2
	3 e relacionadas	1
	4 e relacionadas	2
	7	1
	8 e relacionadas	2
	9 e relacionadas	1
	10 e relacionadas	1
	12 e relacionadas	1
	13	1
	14	1
	16	1
	19	1
	21 e relacionadas	3
22	1	
26	1	
Gastrocirurgia	1 e relacionadas	1
	2 e relacionadas	1
	3 e relacionadas	1
	10 e relacionadas	1
	15	1
Cardiologia	4 e relacionadas	1
Unidade de Leito-Dia	1 e relacionadas	1
	4 e relacionadas	1
	9 e relacionadas	1
	17	1
	18 e relacionadas	1
	25	1

***UER: Unidade de Emergência Referenciada; UTI: Unidade de Terapia Intensiva de Adultos; UTIP: Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica.**

A distribuição geográfica dos conjuntos clonais apresentou-se dispersa nas diferentes unidades de internação e está representada na **Figura 7**.

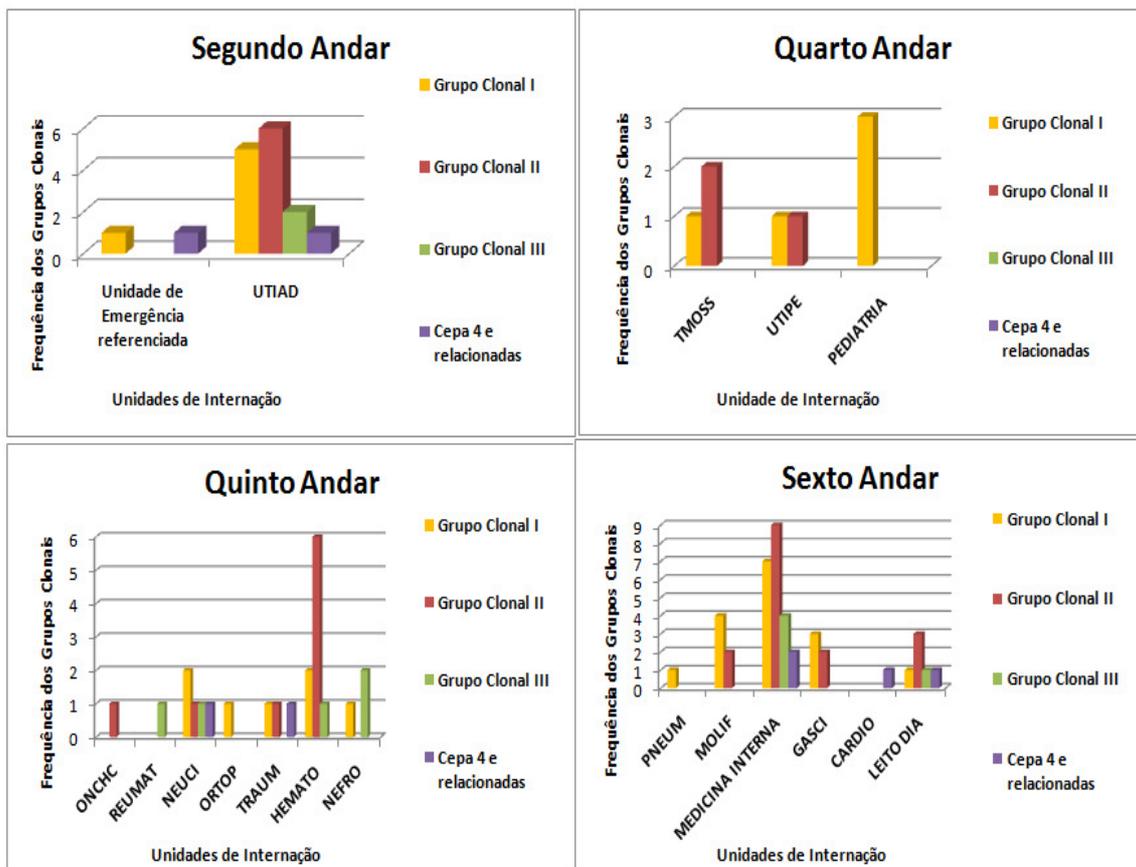


Figura 7. Distribuição de frequência dos conjuntos clonais de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina (MRSA) determinados pela análise do perfil genômico por PFGE de acordo com a localização geográfica (andar). HC-Unicamp, janeiro de 1999 a fevereiro de 2004.

4.3. Determinação do tipo de SCCmec

A determinação do tipo de SCCmec das 99 amostras demonstrou que 92 (92,7%) apresentaram o SCCmec tipo IIIA e 7 (7,1%) apresentaram o SCCmec sugestivo de tipo IV. Os dois diferentes tipos de SCCmec podem ser visualizados na **Figura 8**.

O estudo das características dos pacientes cujas amostras de MRSA apresentaram SCCmec sugestivo de tipo IV não indicou a presença de fatores que pudessem sugerir a

aquisição extra-hospitalar ou que tenha ocorrido uma disseminação de um único clone carreando este elemento (**Quadro 5**).

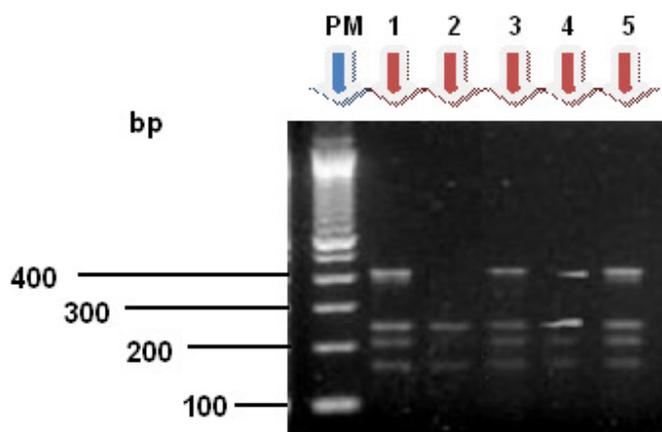


Figura 8. Reação em cadeia da polimerase (PCR-multiplex) para determinação do tipo de *SCCmec* em amostras de MRSA, HC-UNICAMP, Campinas. Canaleta PM: marcador de peso molecular (100bp DNA Ladder, Invitrogen), canaletas 1, 3- 5: isolados apresentando *SCCmec* tipo IIIA, canaleta 2: isolado apresentando *SCCmec* tipo IV.

Buscou-se também caracterizar melhor as cepas que apresentaram o *SCCmec* tipo IV tendo sido realizado um estudo do perfil de sensibilidade por meio do teste de difusão em disco de outros antimicrobianos não β -lactâmicos. Os seguintes antimicrobianos foram testados: ciprofloxacina, gentamicina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina, oxacilina, penicilina e vancomicina; todas as cepas apresentaram-se resistentes a todos estes antimicrobianos testados, exceto para vancomicina.

Quadro 5. Características dos pacientes cujas amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina (MRSA) apresentaram SCCmec tipo IV. HC-Unicamp, janeiro de 1999 a fevereiro de 2004.

Pacientes com SCCmec tipo IV							
Características	BM	CPM	DPS	ERM	FRS	OAS	PPL
Idade	34	46	44	27	29	54	52
Sexo	M	M	M	M	M	M	M
Unidade de internação	UTI	NEFRO	GASCL	LEITO	UTI	EECLI	MOLIF
Especialidade	EECIR	NEFRO	GASCL	MOLIF	NEFRO	EECLI	MOLIF
Coleta de exames por punção	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Data da internação	19/11/01	05/01/99	05/10/01	09/03/00	12/07/01	26/03/02	24/06/02
Data da coleta	29/11/01	25/01/99	30/12/01	08/04/00	15/07/01	19/04/02	09/07/02
Tempo entre internação e coleta	10 dias	20 dias	85 dias	29 dias	3 dias	21 dias	15 dias
Consulta ambulatorial	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
Cirurgia	Drenagem abscesso	Não	Não	Não	Transplante renal	Não	Não
HIV	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim
Diálise	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não	Não
Internação recente	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Internação remota	Não	Não	Não	Sim	Sim	Não	Sim
Tipo de PFGE	12d	1f	9	1g	1e	16	8a
Uso de injetáveis (tipo)	Não	Sim (*)	Não	Sim (**)	Sim (***)	Não	Não

UTI: Unidade de Terapia Intensiva; NEFRO: Nefrologia, GASCL: Gastroclínica, EECLI: Emergência Clínica, MOLIF: Moléstias Infeciosas, EECIR: Emergência Cirúrgica. (*) insulina; () antibióticos; (***)eritropoietina.**

5. DISCUSSÃO

Este estudo foi realizado com amostras de MRSA de um banco de bactérias isoladas de sangue e cateter de pacientes internados no HC-Unicamp, correspondente a um período de cinco anos, permitindo caracterizar melhor a dinâmica da ocorrência de MRSA na instituição.

A análise dos isolados pelo método de PFGE demonstrou uma grande diversidade do padrão, sendo encontrados 26 clones e seus respectivos relacionados. Padoveze et al (33) demonstrou em estudo anterior, no mesmo Hospital, uma grande similaridade entre os isolados de MRSA. Entretanto, aquele estudo avaliou apenas um conjunto de amostras obtidas em apenas duas unidades assistenciais, o que poderia não refletir a característica do Hospital como um todo. Posteriormente, estudo realizado por Beretta et al (39) na mesma instituição apresentou um aumento da diversidade entre os isolados de MRSA, apesar de ainda existir predominância da similaridade. Os diferentes estudos na mesma instituição, embora utilizando conjuntos de amostras com características diferentes, podem auxiliar na compreensão da epidemiologia do MRSA no HC-Unicamp. O **Quadro 6** apresenta um resumo das características destes estudos. A principal hipótese é de que a diversidade genômica do MRSA foi ampliando-se na medida em que, após a introdução do MRSA no HC-Unicamp, a presença deste agente assumiu paulatinamente uma característica endêmica disseminando-se nas diversas unidades de internação. Provavelmente, esta diversidade aumentou significativamente a partir de 2001, quando o conjunto clonal II esteve presente

nas amostras de sangue e cateter com até 12 tipos de perfis de PFGE identificados no presente estudo.

Quadro 6. Características resumidas de estudos publicados sobre epidemiologia molecular de *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina (MRSA) de amostras obtidas no HC-Unicamp.

Estudo	Período de coleta das amostras	Colonização/ Infecção	Tipo de espécime	Número de amostras (nº de pacientes)	Número de perfis* observados	Perfil* predominante (% em relação ao nº de amostras)
Beretta et al, 2003 (39)	Período I: abr/91 a fev/93 (2 anos); Período II: mai/95 a ago/01 (6 anos)	Infecção	Diversos	73 (58)	5	A (75,3%)
		Infecção	Diversos	117 (94)	INP	A (68,8%)
Padoveze et al, 2001 (5)	mar/95 a mar/96 (1 ano)	Ambos	Diversos	60 (33)	7	A (86,7%)
Leite, 2010**	Jan/99 a fev/04	Infecção	Sangue e cateter	99 (89)	26	1 (13,7%)*

* Perfis genômicos definidos por PFGE. **Presente estudo. INP = informação não publicada. ***Perfil 1 correspondente ao Perfil A.

No presente estudo foi possível observar que a mudança na distribuição dos perfis genômicos foi amplamente temporal, sendo que os conjuntos clonais foram sendo substituídos ao longo do tempo sem uma aparente explicação, mas não apresentou qualquer distribuição geográfica em nichos específicos de ambientes hospitalares. O primeiro conjunto clonal permaneceu entre o período de janeiro de 1999 a abril de 2002, o segundo conjunto iniciou-se em junho de 2001 e persistiu até outubro de 2003 e o terceiro conjunto iniciou-se em março de 2003 e persistiu até o final do período de estudo, com exceção de

um único perfil (tipo 4 e relacionadas) que persistiu por um período prolongado, ou seja, de março de 1999 a setembro de 2003. Ainda, é possível que o conjunto clonal III tenha se estendido por um tempo maior, não abrangido pelo presente estudo, o que traria maiores informações quanto à progressão da diversidade genômica dos MRSA.

Para melhor compreender as características desta substituição clonal, seria conveniente a realização de um seqüenciamento genético destas cepas. Contudo, outros estudos utilizando diferentes métodos moleculares demonstraram a diversificação de perfis ou até mesmo a substituição clonal, não apenas em cepas de uma mesma unidade hospitalar e sim entre cepas com genótipos disseminados localmente, nacionalmente e internacionalmente, sugerindo que quanto maior a disseminação geográfica, maior a evolução genômica (43). Trindade et al (44) relatam em seu estudo uma grande variabilidade entre os perfis relacionados ao BEC, onde o perfil predominante foi observado em 15% das cepas. Oliveira et al. (45,26) relataram em seu estudo realizado em hospitais de diversas regiões do Brasil, que 70% das cepas pertenciam ao perfil do BEC. Coimbra et al. (46) relataram que 49% dos isolados de MRSA, provenientes de três hospitais em duas cidades argentinas apresentavam perfil do BEC. Ghebremedhin et al. (47) relataram maior heterogeneidade entre as cepas de MRSA em um hospital alemão em estudo realizado no período de um ano.

As cepas de origem hospitalar geralmente possuem *SCCmec* tipo I, II ou III (48). As cepas de MRSA com *SCCmec* tipo IIIA são caracteristicamente encontradas no que se convencionou denominar como BEC e apresentam não só resistência a oxacilina como também a outros antimicrobianos devido a presença de outros genes de resistência (49). Por

meio da tipagem molecular das amostras observamos que 92,7% apresentaram *SCCmec* tipo IIIA, e apenas 7,1% apresentaram *SCCmec* tipo IV.

Em geral as cepas de origem comunitária relatadas na literatura apresentam *SCCmec* tipo IV, resistência aos β -lactâmicos e sensibilidade a outras classes de antimicrobianos; nos relatos de ocorrência de CA-MRSA no Brasil os isolados possuíam *SCCmec* tipo IV (48). Há relato de disseminação de cepas de CA-MRSA no ambiente hospitalar, como, por exemplo, por Trindade et al. (44) no Hospital das Clínicas de São Paulo, assim como caso de endocardite causada por CA-MRSA em hospital universitário no Rio de Janeiro (50). As amostras que apresentaram o perfil de *SCCmec* tipo IV foram todas de pacientes adultos e do sexo masculino, assim como se mostraram resistentes tanto a oxacilina quanto aos outros antimicrobianos não β -lactâmicos. A identificação de cepas de MRSA com *SCCmec* tipo IV resistente a não β -lactâmicos também foi um achado da pesquisa de Silva-Carvalho et al, em cepas obtidas de dois hospitais no Rio de Janeiro (27). Em um hospital universitário de Salvador, observou-se que entre as cepas de MRSA, aquelas adquiridas no hospital apresentaram mais resistência a outros antibióticos além da meticilina quando comparadas às cepas adquiridas na comunidade (51).

As características dos pacientes nas quais estas amostras foram identificadas não sugere uma origem comunitária das mesmas, entretanto, não pôde ser completamente descartada. Caso semelhante foi relatado por Huang et al. (52), que encontrou cepas de HA-MRSA com *SCCmec* tipo IV e afirma que em seu estudo os casos mais comuns desse tipo de cepa ocorrem em pacientes adultos do sexo masculino. Em outro estudo realizado por Robinson et al. (30), são relatados casos de *SCCmec* tipo IV adquiridos em hospitais, embora a prevalência de infecções causadas por clones que carregam *SCCmec* tipo I, II e

III seja atualmente maior do que a causada por clones que exercem *SCCmec* tipo IV. Ainda, segundo Deurenberg & Stobberingh as alegadas diferenças entre HA-MRSA e CA-MRSA começam a se obscurecer e atualmente o CA-MRSA manifesta-se endêmico em muitos hospitais nos EUA (53).

As características referentes aos pacientes cujas amostras apresentaram a análise de *SCCmec* sugestiva para o tipo IV, indicam a necessidade de um estudo mais aprofundado sobre estas cepas. A técnica utilizada, baseada nos estudos de Oliveira & Lencastre pode não ter sido suficientemente sensível para detectar tipos de *SCCmec* não identificáveis pelos primers utilizados. Possivelmente, técnicas mais sensíveis, capazes de detectar variantes, possam contribuir para um melhor esclarecimento deste cenário epidemiológico. Milheiriço et al (54) desenvolveram uma nova técnica de PCR Multiplex para subtipar cepas que apresentam *SCCmec* tipo IV, particularmente importante para investigar cepas CA-MRSA, e entender o mecanismo de aquisição deste clone, uma vez que até 2002 a relevância epidemiológica do *SCCmec* tipo IV não era bem estabelecida e a técnica empregada por Oliveira & Lencastre não identificava propriamente esse tipo estrutural. Os tipos de *SCCmec* e suas variantes são detalhadamente abordados por Deurenberg et al, que sugeriram a utilização de um método universal padronizado para a tipificação deste fragmento cromossômico (55). Para o seguimento do presente estudo, propõe-se a aplicação de técnica alternativa a fim de desenvolver estudos complementares que permitam assegurar a perfeita tipificação do *SCCmec*.

Estudos têm falhado em demonstrar diferenças epidemiológicas entre os episódios infecciosos de pacientes com MRSA portando *SCCmec* IV quando comparado aos demais tipos. Um estudo de caracterização epidemiológica e clínica de infecções associadas com

MRSA com *SCCmec* tipo IV adquiridas no hospital não encontrou diferenças significativas entre estas quando comparada com aquelas associadas com outros tipos de *SCCmec*, no que se referia a idade, sexo, unidade de internação, *score* de gravidade, tipo de infecção ou doenças de base, exceto pela presença de queimaduras. Entretanto, as primeiras apresentaram um início mais precoce dos sintomas de infecção (28). Cepas características de CA-MRSA foram encontradas também em infecções da corrente sanguínea adquiridas no hospital, bem como as adquiridas na comunidade (29). Este fenômeno foi também observado por pesquisadores que avaliaram cepas obtidas em 4 hospitais na Coreia (56). No Brasil, Vidal et al analisaram pacientes com MRSA portadores de *SCCmec* tipo IV e verificaram que os clássicos fatores de risco não se aplicavam ao grupo de pacientes estudados e que havia uma diversidade de clones portando este *SCCmec*. Entre outras particularidades, estas cepas de aquisição nosocomial não possuíam fatores de virulência, como PVL (57). Segundo Rossney et al, a identificação de PVL não pode ser utilizada como marcador único para caracterização de cepas de CA-MRSA, pois estudos realizados na Irlanda demonstraram baixa frequência desta toxina nos isolados avaliados previamente classificados como CA-MRSA (58).

O presente estudo reforça o conceito de que a epidemiologia de MRSA em unidades hospitalares é dinâmica e que técnicas complementares de biologia molecular podem ser úteis para aprofundar o seu conhecimento.

6. CONCLUSÕES

- No conjunto de amostras avaliadas no período do estudo, identificou-se uma grande diversidade no perfil genômico dos isolados de MRSA analisados por meio do PFGE.
- A prevalência dos perfis de PFGE das amostras de MRSA caracterizou-se em três conjuntos clonais, cuja distribuição foi temporal, com substituição sucessiva ao longo do tempo.
- Observou-se predomínio de cepas portadoras do *SCCmec* tipo IIIA e uma menor incidência de cepas portadoras do *SCCmec* tipo IV.
- A revisão dos prontuários de todos os pacientes sugeriu provável aquisição hospitalar dos isolados analisados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Holt JG, Krieger NR. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9a ed. Williams & Wilkins. 1994; p.544-551.
2. Boyce, JM. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: detection, epidemiology and control measures. **Infect Dis Clin North Am**. 1989; 3: 901-913.
3. Bannerman, TL. *Staphylococcus Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: Murray PM, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. Editors. **Manual of clinical microbiology**. 8th Ed. Washington: ASM Press; 2003, cap.28, p.384-404.
4. Oliveira DC, Tomasz A, Lancaster H. Secrets of success of a human pathogen; molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet Infect Dis**. 2002; 2: 180-189.
5. Padoveze MC, Pedro RJ, Blum-Menezes D, Bratfich O, Moretti ML. *Staphylococcus aureus* nasal colonization: in HIV patients: persistent or transient? **Am J Infect Control**. 2008; 36:187-91.
6. Sissolak D, Geusau A, Heinze G, Witte W, Rotter ML. Risk factors for nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in Infectious Disease Patients, including patients infected with HIV, and molecular typing of colonizing strains. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. 2002; 21: 88-96.

7. Kluytmans J, Van Belkum A, Berbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. **Clin Microbiol Rev.** 1997; 10(3): 505-20.
8. Schmit H, Hensel M. Pathogenicity Island in Bacterial Pathogenesis. **Clin Microbiol Rev.** 2004, 17: 14-56.
9. Boid, RF. The Gram-positive Cocci. In: **Basic Medical Microbiology** 5a ed. Boston, Little, Brown and Company. 1995, 17: 246-262.
10. Lopes, HV. CA- MRSA Um novo problema para o infectologista. **Revista Pan-americana de Infectologia.** 2005, 7(3): 34-36.
11. Diederer, BMW. Published by Elsevier. The emergence of infection with community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **J Infect.** 2005; 52(3): 157-168.
12. Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K. Insights on antibiotic resistant of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. **Drug Resist Updat.** 2003, 6: 41-52.
13. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Louie T, Conly JM. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol.** 2005; 43:5026-33.
14. Chambers, HF. Methicillin resistant in *Staphylococcus*: Molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clin Microbiol Rev.** 1997, 10(4): 781-791.
15. Sharma VK, Hackbarth CJ, Dickinson TM, Archer GL. Interaction of Native and Mutant *MecI* Repressor with Sequences that Regulate *mecA*, the Gene Encoding

- Penicillin Binding Protein 2a in Methicillin-Resistant *Staphylococci*. **J Bacteriol.** 1998; 180: 2160-6.
16. Milheiro C, Oliveira CD, Lencastre H. Update to the Multiplex PCR Strategy for Assignment of *mec* Element Types in *Staphylococcus aureus* Antimic Agents and Chemoth. 2007; 51 (9): 3374–3377.
17. Mimica MJ, Mendes CMF. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. **J. Bras Patol Med Lab.** 2007, 43(6): 399-406.
18. Souza MA, Miragaia M, Sanches HS, Avilas S, Casagrande ST. Three-year assessment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America from 1996 to 1998. **J Clin Microbiol.** 2001; 39: 2107-205.
19. Senna JPM, Pinto CA, Mateos S, Quintana A, Santos DC. Spread of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone between Uruguayan and South of Brazil Hospitals. **J Hosp Infect.** 2003; 53: 156-7.
20. Razera F, De Stefani S, Bonamigo RR, Olm GS, Dias CAG, Narvaez GA.. CA MRSA in furunculosis: Case report of Southern Brazil. **An Bras Dermatol.** 2009; 84(5): 515-8.
21. Ribeiro A, Dias C, Silva-Carvalho MC, Berquo L, Ferreira FA, Santos RNS, Ferreira-Carvalho BT, Figueiredo AM. First Report of Infection with Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in South America. **J Clin Microbiol.** 2005, p. 1985–1988.
22. Reinert C, McCulloch JA, Watanabe S, Ito T, Hiramatsu K, Mamizuka EM. Type IV SCC*mec* Found in Decade Old Brazilian MRSA Isolates. **Braz J Infect Dis.** 2008; 12(3): 213-216.

23. Gelatti LC, Sukiennik T, Becker AP, Inoue FM, Carmo MS, Castrucci FMS et al. Sepse por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina adquirida na comunidade no sul do Brasil. **Rev Bras Med Trop.** 2009; 42(4): 458-460.
24. Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends Microbiol.** 2001, 9: 486-493.
25. Charlebois ED, Perdreau-Remington F, Kreiswirth B, Bangsberg DR, Ciccarone D, Diep BA et al. Origins of Community Strains of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clin Infect Dis.** 2004, 39: 47-54.
26. Oliveira GA, Juarez BF, Levy CE, Mamizuka EM. Characterization of the Brazilian Endemic Clone of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Hospitals Throughout Brazil. **Braz J Infec Diseases** 2001; 5(4): 163-170.
27. Silva-Carvalho MC, Bonelli RR, Souza RR, Moreira S, dos Santos LC, de Souza CM, de Mello Junior SJ, Carballido JM, Rito PN, Vieira VV, Teixeira LA, Sá Figueiredo AM. Emergence of multiresistant variants of the community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage ST1-SCCmecIV in 2 hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 2009; 65(3): 300-5
28. Davis SL, Rybak MJ, Amjad M, Kaatz GW, McKinnon PS. Characteristics of patients with healthcare-associated infection due to SCCmec type IV methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Infect Control Hosp Epidemiol.** 2006; 27(10): 1025-31. Epub 2006 Sep 19.
29. Gonzalez BE, Rueda AM, Shelburne SA 3rd, Musher DM, Hamill RJ, Hulten KG. Community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as the

- cause of healthcare-associated infection. **Infect Control Hosp Epidemiol.** 2006; 27(10): 1051-6. Epub 2006 Sep 18.
30. Robinson DA, Enright MC. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother.** 2003; 47(12): 3926-3934.
31. Bannerman TL, Hancock GA, Tenover FC, Miller JM. Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol.** 1995; 33: 551-555.
32. Goering RV, Duensing TD. Rapid Field Inversion Gel Electrophoresis in Combination with an rRNA gene probe in The Epidemiological Evaluation of *Staphylococcus*. **J Clin Microbiol**, 1990, 28: 426-429.
33. Padoveze MC, Tresoldi AT, Von Nowakonski A, Aoki FH, Branchini MLM. Nasal MRSA Colonization of AIDS Patients Cared for in a Brazilian University Hospital. **Infect Control Hosp Epidemiol.** 2008; 22: 783-785.
34. Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother.** 2002, 46: 2155-61.
35. Tresoldi AT, Branchini MLM, Moreira Filho DC, Padoveze MC, Dantas SRPE, Reginato et al. Relative frequency of nosocomial microorganisms at UNICAMP University Hospital from 1987 to 1994. **Rev Inst Med Trop São Paulo.** 1997; 39: 33-36.

36. Tresoldi AT, Branchini MLM, Padoveze MC, Dantas SRPE, Reginato L, Novakonski AV et al. Controle de *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina em um hospital universitário: cinco anos de vigilância. **Revista FCM**. 1999; 1:87-101.
37. Trabasso P, Tresoldi AT, Padoveze MC, Dantas SRPE. Infections due to multidrug resistant bacteria in a university hospital in Brazil. CDC 4th Decennial International Conference on Nosocomial and Healthcare-associated infections. Atlanta, GA, EUA. March 2000a. Abstract n. P-S2-32. P. 116.
38. Trabasso P, Tresoldi AT, Dantas SRPE, Padoveze MC, Nowakonski A. Daily prevalence of multi-drug resistant bacteria in a Brazilian university hospital. CDC 4th Decennial International Conference on Nosocomial and Healthcare-associated infections. Atlanta, GA, EUA. March 2000b. Abstract n. P-S2-31. P. 116.
39. Beretta ALRZ, Moretti ML. Use of molecular epidemiology to monitor the nosocomial dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a University Hospital from 1991 to 2001. **Bras Journal of Medical and Biol Research**. 2004, 37: 1345-51.
40. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. **National Committee for Clinical Laboratory Standards**, Villanova, Pa, E.U.A. Approved Standards. 2005, M2-15.14(16).
41. Branchini ML, Morthland VH, Tresoldi AT, Von Nowakonsky A, Dias MB, Pfaller MA. Application of genomic DNA subtyping by pulsed-field gel electrophoresis and restriction enzyme analysis of plasmid DNA to characterize methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from two nosocomial outbreaks. **Diagn Microbiol Infect Dis**. 1993; 17:275- 281.

42. Dice, LR. Measures of the amount of ecologic association between species. **Ecology**. 1945; 26: 297-302.
43. Van Leeuwen W, Van BA, Kreiswirth B, Verbrugh H. Genetic diversification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a function of prolonged geographic dissemination and as measured by binary typing and other genotyping methods. **Res. Microbiol.** 1998; 149: 497-507.
44. Trindade PA, Pacheco RL, Costa SF, Rossi F, Barone AA, Mamizuka EM et al. Prevalence of SCCmec type IV in nosocomial bloodstream isolates of MRSA. **J Clin Microbiol.** 2005; 43(7): 3435-3437.
45. Oliveira, GA. Caracterização de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de diferentes regiões do Brasil baseada em métodos fenotípicos e genotípicos (dissertação). São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1998.
46. Coimbra MVS, Teixeira LA, Ramos RLB, Predari SC et al. Spread of the Brazilian epidemic clone of a multiresistant MRSA in two cities in Argentina. **J Medic Microbiol.** 2000; 49: 187-92.
47. Ghebremedhin B, König W, König B. Heterogeneity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains at a German university hospital during a 1-year period [cited 2005 Jun 10]. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** 2005; Available from: http://www.springerlink.com/media/3AA8LU4D750QUPDB6P6J/Contributions/N/7/5/K/N75K25107G157970_html/fulltext.html
48. Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, et al. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. **Lancet.** 2002, 359: 1819-27.

49. Teixeira LA, Resende CA, Ormonde LR, et al., Geografic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. **J Clin Microbiol.** 1995; 33: 2400-4.
50. Fortes CQ, Espanha CA, Bustorff FP, Zappa BC, Ferreira ALP, Moreira RB et al. First report case of infective endocarditis caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* not associated with healthcare contact in Brazil. **Braz J Infect Dis.** 2008; 12(6): 541-543.
51. Nascimento-Carvalho CM, Lyra TG, Alves NN, Caldas RM, Barberino MG. Resistance to methicillin and other antimicrobials among community-acquired and nosocomial *Staphylococcus aureus* strains in a pediatric teaching hospital in Salvador, Northeast Brazil. **Microb Drug Resist.** 2008; 14(2): 129-31.
52. Huang HY, Tseng SP, Hu JM, Tsai JC, Hsueh PR, Teng LJ. Clonal spread of SCCmec type IV methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between community and hospital. **Clin Microbiol Infect.** 2007; 13: 717-724.
53. Deurenberg RH, Stobberingh EE. The molecular evolution of hospital- and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Curr Mol Med.** 2009; 9(2): 100-15.
54. Milheiriço C, Oliveira DC, Lencastre H. Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome mec type IV in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: 'SCCmec IV multiplex'. **J of Antimicrobial Chemotherapy.** 2007; 60, 42–48

55. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clin Microbiol Infect.** 2007; 13: 222–235.
56. Park SH, Park C, Yoo JH, Choi SM, Choi JH, Shin HH, Lee DG, Lee S, Kim J, Choi SE, Kwon YM, Shin WS. Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains as a cause of healthcare-associated bloodstream infections in Korea. **Infect Control Hosp Epidemiol.** 2009; 30(2): 146-55.
57. Vidal PM, Trindade PA, Garcia TO, Pacheco RL, Costa SF, Reinert C, Hiramatsu K, Mamizuka EM, Garcia CP, Levin AS. Differences between "classical" risk factors for infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and risk factors for nosocomial bloodstream infections caused by multiple clones of the staphylococcal cassette chromosome mec type IV MRSA strain. **Infect Control Hosp Epidemiol.** 2009; 30(2): 139-45.
58. Rossney AS, Shore AC, Morgan PM, Fitzgibbon MM, O'Connell B, Coleman DC. The emergence and importation of diverse genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) harboring the Panton-Valentine leukocidin gene (pvl) reveal that pvl is a poor marker for community-acquired MRSA strains in Ireland. **J Clin Microbiol.** 2007; 45(8): 2554-63. Epub 2007 Jun 20.

8. ANEXOS

ANEXO 1 – SOLUÇÕES E REAGENTES

SOLUÇÃO TAMPÃO EC:

SOLUÇÃO ESTOQUE/SAL	VOLUME/PESO	CONCENTRAÇÃO FINAL
1M TRIS	3 ml	6 mM
5 mM NaCl	100 ml	1 M
0,5M EDTA	10 ml	10 mM
Na deoxycholic acid	1g	0,2%
Polyoxyethylene 20 cetyl ether	2,5g	0,5%
N-Lauroyl-Sarcosine	2,5g	0,5%
Água Destilada	500 ml	

OBS: Misturar todos os componentes da fórmula e ajustar o pH para 7,5

GEL DE AGAROSE DE BAIXO PONTO DE FUSÃO PARA BLOCOS

SOLUÇÃO ESTOQUE/SAL	VOLUME/PESO	CONCENTRAÇÃO FINAL
Agarose Low Melt Preparative	1g	1%
Tampão EC	100 ml	

OBS: Diluir a agarose e aquecer até a sua completa dissolução.

SOLUÇÃO DE LISOSTAPHINA

SOLUÇÃO ESTOQUE/SAL	VOLUME/PESO	CONCENTRAÇÃO FINAL
Lisostaphina	1800U/mg	100U/ml
	proteína	
Diluyente TES	5 ml	

OBS: Estocar em alíquotas de 0,5 ml e manter à -20°C

TES DILUENTE PARA LISOSTAPHINA

SOLUÇÃO ESTOQUE	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
TRIS 1M pH7,5	2,5ml	0,05M
EDTA 5M pH8	0,5ml	0,005M
5mM NaCl	1,5ml	0,15M
Água Destilada	45,5ml	

OBS: Misturar todos os componentes da fórmula

SOLUÇÃO EPS (para 10 amostras)

SOLUÇÃO ESTOQUE	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
EDTA 625M pH9,3	16 ml	0,4M
N-Lauroyl-Sarcosine 5%	4 ml	1%
Proteinase K 20mg/dl	0,1ml	0,1mg/ml

OBS: misturar todos os componentes da fórmula

TE DE ALTA MOLARIDADE

SOLUÇÃO ESTOQUE	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
EDTA 0,5M pH 7,5	50 ml	0,1M
TRIS 1M pH 7,5	100 ml	0,1M
Água Destilada	350 ml	

OBS: Misturar todos os componentes da fórmula

SOLUÇÃO "DUMMY NO SALT"

SOLUÇÃO ESTOQUE	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
TRIS 1M pH 8,0	5 ml	0,1M

MgCl ₂ 1M	0,25ml	0,005M
Água Destilada	500 ml	

OBS: Misturar os componentes da fórmula e guardar à temperatura ambiente

TE DE BAIXA MOLARIDADE

SOLUÇÃO ESTOQUE VOLUME CONCENTRAÇÃO FINAL

EDTA 0,5M pH 7,5	0,2ml	1mM
TRIS 1M pH 7,5	1 ml	10mM
Água Destilada	98,8ml	

OBS: Misturar todos os componentes da fórmula

TAMPÃO TBE ESTOQUE (5 vezes concentrado)

SOLUÇÃO ESTOQUE/SAL VOLUME/PESO CONCENTRAÇÃO FINAL

Trisma base	54g	
Ácido bórico	27,5g	
EDTA 0,5M pH 8,0	10,0ml	
Água Destilada	1000 ml	

OBS: Diluir o trisma base, o ácido bórico, em água destilada, adicionar o EDTA e estocar à temperatura ambiente

SARCOSYL 5%

SOLUÇÃO ESTOQUE/SAL VOLUME/PESO CONCENTRAÇÃO FINAL

Sarcosyl	25g	
Água Destilada	500 ml	

9. APÊNDICE

APÊNDICE 1 – FICHA DE COLETA DE DADOS

FICHA DE COLETA DE DADOS DOS PRONTUÁRIOS DOS PACIENTES COM AMOSTRAS POSITIVAS PARA MRSA. HC-UNICAMP		
Nome paciente:		
HC:	Idade:	Sexo:
Unidade Internação:	Especialidade:	
Data de internação:	Data da coleta:	
Tempo entre internação e coleta (dias):		
Internação recente: sim <input type="radio"/> não <input type="radio"/>	Internação remota: sim <input type="radio"/> não <input type="radio"/>	
Data de alta internação recente:	Data de alta internação remota:	
Tempo int. recente e coleta:	Tempo int. remota e coleta:	
Cirurgia na internação: sim <input type="radio"/> não <input type="radio"/>	Cirurgia ambulatorial: sim <input type="radio"/> não <input type="radio"/>	
Tipo de cirurgia:		
Data da cirurgia:	Data da cirurgia ambulatorial:	
Tempo entre cirurgia e coleta:	Tempo entre cirurgia e coleta:	
Coleta de exames por punção: sim <input type="radio"/> não <input type="radio"/>		
Vacinação: sim <input type="radio"/> não <input type="radio"/>	Diálise: sim <input type="radio"/> não <input type="radio"/>	
Uso de insulina injetável: sim <input type="radio"/> não <input type="radio"/>	Uso de outros injetáveis: sim <input type="radio"/> não <input type="radio"/>	
HIV: sim <input type="radio"/> não <input type="radio"/>	HIV acompanhado p/ hospital: sim <input type="radio"/> não <input type="radio"/>	
Consulta ambulatorial: sim <input type="radio"/> não <input type="radio"/>		
Data ultima consulta amb.	Tempo entre ultima consulta e coleta:	
Evolução:		

APÊNDICE 2 - DADOS DOS PACIENTES INCLUSOS NO ESTUDO

Dados completos dos pacientes com amostras positivas para MRSA incluídos no estudo

Pacientes	Unidade de internação	Tipo de amostras	Data da coleta	Tipo de PFGE	Tipo de SCCmec
MBG	TRAUM	CATETER	11/11/2000	1	IIIA
CMSF	GASCI	CATETER	3/12/2000	1	IIIA
AO	ENFGA	CATETER	7/5/2001	1	IIIA
ASN	ENFGA	SANGUE	29/6/2001	1a	IIIA
LFLR	NEUCI	CATETER	31/10/2000	1b	IIIA
PHM	HEMAT	SANGUE	8/11/2000	1b	IIIA
FRS	UTIAD	SANGUE	15/7/2001	1e	IV
CPM	NEFRO	SANGUE	25/1/1999	1f	IV
AAG	PEDIA	SG/CAT	6/10/2000	1c	IIIA
ZB	ENFGA	SANGUE	6/7/2001	1c	IIIA
LCC	*	SANGUE	*	1c	IIIA
EPS	HEMAT	SANGUE	23/10/1999	1d	IIIA
ERM	LEITO	SANGUE	8/4/2000	1g	IV
AGB	UTIAD	SANGUE	18/1/1999	2	IIIA
RIO	ENFGA	CATETER	7/10/1999	2	IIIA
APA	GASCI	CATETER	14/10/1999	2	IIIA
MAP	ENFGA	SANGUE	7/11/1999	2	IIIA
ARO	PNEUM	SANGUE	6/5/2001	2	IIIA
ICCM	UTIAD	SANGUE	2/11/1999	2a	IIIA
OGA	ORTOP	SANGUE	26/4/2002	2a	IIIA
PSBM	UTIAD	CATETER	7/10/1999	2b	IIIA
LFC	PEDIA	CATETER	26/11/1999	2c	IIIA
FPL	GASCI	CATETER	1/7/1999	3	IIIA
OS	NEUCI	SANGUE	22/8/1999	3	IIIA
MMC	MOLIF	SANGUE	15/11/1999	3	IIIA
AAG	*	SANGUE	*	3	IIIA
VR	UTIAD	SG/CAT	24/11/1999	3a	IIIA
AP	ENFGA	SANGUE	3/3/2001	3c	IIIA
PEAC	TMOSS	SANGUE	24/1/1999	3d	IIIA
MPC	UTIAD	SANGUE	27/1/2002	4	IIIA
MAM	*	SANGUE	*	4	IIIA
JGM	TRAUM	CATETER	23/9/2001	4a	IIIA
JAM	LEITO	SANGUE	24/1/2002	4a	IIIA

FAD	PSADU	SANGUE	10/3/1999	4b	III A
ARB	NEUCI	SANGUE	25/10/2000	4c	III A
JTT	ENFGA	SANGUE	20/3/2002	4d	III A
MNM	CARDIO	SANGUE	27/9/2003	4d	III A
AO	MOLIF	CATETER	10/3/2000	5	III A
MRC	UTIPED	SG/CAT	1/11/2000	6	III A
LMT	MOLIF	CATETER	5/4/2000	6a	III A
RMS	PSADU	SANGUE	29/11/2000	6a	III A
WBM	ENFGA	SANGUE	18/10/2000	7	III A
JLPG	MOLIF	SANGUE	27/7/2002	8	III A
AAM	UTIAD	CATETER	23/11/2003	8	III A
PPF	MOLIF	SANGUE	9/7/2002	8a	IV
ACS	ENFGA	SANGUE	15/9/2001	8b	III A
DLV	UTIAD	SANGUE	29/6/2001	8c	III A
DPS	ENFGA	SANGUE	30/12/2001	9	IV
ARS	LEITO	SANGUE	2/9/2001	9a	III A
IRO	HEMAT	CATETER	23/7/2003	9b	III A
FEN	HEMAT	SANGUE	22/3/2002	10	III A
MRO	HEMAT	SANGUE	4/4/2002	10	III A
AM	ENFGA	SANGUE	17/4/2002	10	III A
SKA	GASCI	CATETER	18/10/2001	10a	III A
AHD	UTIPED	SANGUE	20/2/2002	11	III A
RRA	UTIAD	CATETER	10/10/2001	11a	III A
IC	MOLIF	CATETER	13/2/2002	12	III A
GSE	TMOSS	SG/CAT	23/3/2002	12	III A
VMCC	ONCHC	SANGUE	6/2/2002	12a	III A
AGD	ENFGA	CATETER	13/2/2002	12b	III A
BM	UTIAD	SANGUE	2/12/2001	12d	IV
CAL	ENFGA	CATETER	3/12/2001	12c	III A
OG	GASCI	SANGUE	25/1/2002	12c	III A
JAC	ENFGA	CATETER	7/2/2002	13	III A
MAM	ENFGA	CATETER	6/4/2002	14	III A
AJS	GASCI	SANGUE	28/4/2002	15	III A
OAS	ENFGA	SANGUE	19/4/2002	16	IV
EAS	HEMAT	SG/CAT/CAT	25/5/2002	17	III A
JL	LEITO	SANGUE	21/2/2003	17	III A
MAMP	HEMAT	SG/CAT	4/2/2003	18	III A
SFO	TRAUM	CATETER	10/8/2003	18a	III A
NC	UTIAD	CATETER	8/5/2002	18b	III A
AS	LEITO	SANGUE	4/6/2002	18c	III A

LCR	*	SANGUE	*	18c	IIIA
ACP	ENFGA	SANGUE	30/6/2002	19	IIIA
AJM	NEUCI	SANGUE	5/2/2003	20	IIIA
SDT	ENFGA	SANGUE	5/3/2003	21	IIIA
OO	NEFRO	SANGUE	15/10/2003	21	IIIA
JOF	ENFGA	SANGUE	6/7/2003	21a	IIIA
LCT	ENFGA	SANGUE	1/2/2004	21b	IIIA
ARV	NEFRO	SANGUE	17/7/2003	21c	IIIA
ACF	UTIAD	SANGUE	11/12/2003	21d	IIIA
ECC	REUMA	SANGUE	18/12/2003	21e	IIIA
PHRS	ENFGA	SANGUE	1/7/2003	22	IIIA
CMC	HEMAT	CATETER	7/7/2003	23	IIIA
IPL	UTIAD	SANGUE	9/7/2003	23a	IIIA
VF	NEUCI	CATETER	27/7/2003	24	IIIA
OAL	LEITO	SANGUE	15/11/2003	25	IIIA
HMA	ENFGA	CATETER	8/12/2003	26	IIIA

Prontuário não disponível para análise *

APÊNDICE 3. DENDOGRAMA GERAL (uma amostra de cada perfil genômico)

