

ALEXANDRE MACEDO DE OLIVEIRA

**AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 16S - 23S DO RNA RIBOSSOMAL
DE *Staphylococcus aureus* E SUA APLICAÇÃO NO ESTUDO
DAS INFECÇÕES HOSPITALARES**

Campinas

2001

i

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

ALEXANDRE MACEDO DE OLIVEIRA

**AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 16S - 23S DO RNA RIBOSSOMAL
DE *Staphylococcus aureus* E SUA APLICAÇÃO NO ESTUDO
DAS INFECÇÕES HOSPITALARES**

*Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do título de Mestre em Clínica
Médica, área de Clínica Médica.*

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos

Campinas

2001

ii

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

UNIDADE	30
Nº CHAMADA	UNICAMP 0L4a
V	
TOMBO BC	48771
PROC.	16-837102
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	07/10/02
Nº CPD	

CM00167133-0

BIB ID 239207

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

O14 a Oliveira, Alexandre Macedo de
Amplificação da região 16S – 23S do RNA ribossomal de
Staphylococcus aureus e sua aplicação no estudo das infecções
hospitalares / Alexandre Macedo de Oliveira. Campinas, SP : [s.n.],
2001.

Orientador : Marcelo de Carvalho Ramos
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Reação em cadeia de polimerase. 2. Biologia Molecular -
Métodos. 3. Infecção Hospitalar. 4. Epidemiologia. I. Marcelo de
Carvalho Ramos. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas. III. Título.

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): *Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos*

Márcia Capriles Reis

Membros:

Profa. Dra. Lucieni de Oliveira Conterno

Lucieni

Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira

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

Data: 14.11.2001

DEDICATÓRIA

À Luísa, minha filha,
que um dia possa saber o tamanho do meu amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela alegria que é estar vivo e poder sonhar.

Ao meu professor e orientador, Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos, pelo cuidado em ensinar e guiar meus passos na realização deste trabalho.

À equipe do laboratório: Alessandra Costa Panunto, Ana Lúcia Roscani Calusni, Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza, Christian Cruz Höfling, Clarisa Ramos, Evelyn Regina Couto, Gláucia Roscani, Maria Cecília Barisson Vilares, pelo agradável convívio e ajuda prestada.

À equipe do laboratório de Patologia Clínica do Hospital Municipal Dr. Mário Gatti, em especial à Dra. Elenice Hideko Katayama Rigitano, Ana Maria Bertollo Pozzi, Diva Barone, Orlando José Bratfich e Rogério Kobayama, que ajudaram na coleta das amostras deste estudo.

À enfermeira Maria Clara Padoveze e à Profa. Dra. Maria Luiza Moretti Branchini, que cederam amostras para a realização deste estudo.

À equipe do Laboratório de Microbiologia da Divisão de Patologia Clínica do HC Unicamp, pela forma como me receberam e me ensinaram o que sabem.

Aos docentes, médicos e demais profissionais da Disciplina de Moléstias Infeciosas e Parasitárias, Faculdade de Ciências Médicas, Unicamp, pessoas que muito contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

À Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari, Instituto de Biologia, Unicamp, que orientou meu projeto de iniciação científica e despertou meu senso de pesquisador.

À Renata Maia, secretária da Subcomissão de Pós-Graduação em Clínica Médica, pelo grande incentivo e ajuda na formatação desta dissertação.

Aos pacientes, razão maior do meu desejo de aprimoramento profissional.

Aos meus amigos, suporte mais que fundamental em todos os momentos da vida.

Ao Sr. José Aldemar de Macedo, meu avô, grande exemplo em minha caminhada pelo mundo.

A Enildo e Marilene, meus pais, incansáveis estimuladores.

A todos que colaboraram na realização deste trabalho.

*“No fim tudo dá certo,
se não deu certo é porque ainda não chegou ao fim.”*

Fernando Sabino

	<i>Pág</i>
RESUMO	xv
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Técnicas de fenotipagem.....	20
1.1.1. Biotipagem.....	21
1.1.2. Antibiograma.....	21
1.1.3. Sorotipagem.....	22
1.1.4. Fagotipagem.....	22
1.1.5. “Multi locus enzyme electrophoresis” (MLEE)	23
1.1.6. “Immunobloting” e tipagem por eletroforese de proteínas.....	23
1.2. Técnicas de genotipagem.....	24
1.2.1. Análise plasmideal.....	24
1.2.2. Análise do DNA cromossômico.....	25
1.2.3. Técnicas baseadas em amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR)	27
1.3. Aplicação e dificuldades das diversas técnicas.....	29
1.4. Importância das infecções estafilocócicas.....	34
1.5. As técnicas de ribotipagem aplicadas a <i>Staphylococcus aureus</i>	38

2. OBJETIVOS.....	41
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1. Organização do estudo.....	44
3.2. Etapa I – Padronização da técnica de PCR e escolha do par de iniciadores....	44
3.2.1. Extração de DNA.....	44
3.2.2. Quantificação e diluição do DNA.....	45
3.2.3. Amplificação por PCR.....	45
3.2.4. Eletroforese.....	48
3.3. Etapa II – Determinação de atributos.....	48
3.4. Etapa III – Análise genotípica de amostras colhidas de um ambiente hospitalar.....	48
3.4.1. Características gerais do Hospital Municipal Dr. Mário Gatti (HMMG).....	49
3.4.2. Armazenamento dos isolados.....	50
3.5. Estimativa do peso molecular dos amplificados e análise.....	50
4. RESULTADOS.....	51
4.1. Etapa I – Padronização da técnica de PCR e escolha do par de iniciadores....	52
4.2. Etapa II –Determinação de atributos.....	53
4.3. Etapa III – Análise genotípica de amostras colhidas de um ambiente hospitalar.....	55

5. DISCUSSÃO.....	61
6. CONCLUSÕES.....	70
7. SUMMARY.....	72
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
9. ANEXOS.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS

AP-PCR	“Arbitrarily Primed PCR”, reação em cadeia de polimerase utilizando iniciadores aleatórios
ATCC	“American Type Culture Collection”, banco de bactérias americano
BHI	“Brain Heart Infusion”, meio de cultura líquido para bactéria
CDC	“Centers for Disease Control and Prevention”, órgão governamental americano
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ERIC	“Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus”, Consenso Intergênico Repetitivo de Enterobactérias
EXT	Amostras de fonte externa do HMMG
HC-Unicamp	Hospital de Clínicas da Unicamp
HMMG	Hospital Municipal Dr. Mário Gatti
IS	“Insertion Sequence”, Sequência de Inserção
Kb	Quilobase, unidade de medida
MLEE	“Multi Locus Enzyme Electrophoresis”, Eletroforese de Iso Enzimas
NCCLS	“National Committee for Medical Laboratory Standards”, órgão americano
NNIS	“National Nosocomial Infection Surveillance”, programa governamental americano para vigilância de infecções hospitalares
pb	Pares de bases, unidade de medida

PCR	“Polymerase Chain Reaction”, Reação em Cadeia de Polimerase
PFGE	“Pulsed Field Gel Electrophoresis”, Eletroforese em Gel em Campo Pulsátil
PS	Pronto-socorro
RAPD	“Random Amplified Polimorphic PCR”, reação em cadeia de polimerase utilizando iniciadores randômicos
REP	“Repetitive Extra-genic Palindromic”, Sequência Extra Gênica Palindrômica
RFLP	“Restriction Enzyme Fragment Polimorphism”, Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição
RNA	Ácido Ribonucleico
SAMR	<i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina Resistente
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
UPGMA	“Unweighted Pair Group Method using Averages”, sem tradução corrente na língua portuguesa
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UTI PED	Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica
V	Volts

LISTA DE TABELAS

	<i>Pág</i>
TABELA 1 : Pares de iniciadores empregados na etapa de escolha do protocolo de reação.....	47
TABELA 2 : Distribuição das cepas tipadas por PFGE (C1 a C6) e resultados obtidos com a ribotipagem por PCR.....	54
TABELA 3 : Distribuição dos isolados de <i>S. aureus</i> , segundo o local de isolamento e sensibilidade à oxacilina.....	56
TABELA 4 : Perfil de sensibilidade a antimicrobianos das amostras coletadas do HMMG.....	87
TABELA 5 : Perfil de sensibilidade a antimicrobianos das amostras P, R, C.....	90

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág</i>
FIGURA 1 : Representação esquemática da porção 16S-23S do DNA ribossomal e região de amplificação de cada um dos pares de iniciadores utilizados na fase de escolha do protocolo de reação..	47
FIGURA 2 : Produtos de amplificação a partir de 3 amostras tomadas ao acaso com os três pares de iniciadores empregados na fase de escolha do protocolo de reação.....	52
FIGURA 3 : Perfil genotípico de 3 amostras de <i>S. aureus</i> de um mesmo paciente colhidas em dias diferentes.....	54
FIGURA 4 : Perfil genotípico das amostras R e seis amostras de PADOVEZE (1998) amplificadas por ribotipagem por PCR.....	55
FIGURA 5 : Padrão genotípico de 12 amostras de <i>S. aureus</i> oxacilina resistentes.....	58
FIGURA 6 : Padrão genotípico de 12 amostras de <i>S. aureus</i> oxacilina sensíveis.....	58
FIGURA 7 : Dendrograma montado a partir do coeficiente de similaridade por “Simple Matching” para os isolados oxacilina sensíveis obtidos do HMMG (Treecon Software).....	59
FIGURA 8 : Dendrograma montado a partir do coeficiente de similaridade por “Simple Matching” para todos os isolados do HMMG (Treecon Software).....	60



RESUMO

A caracterização das bactérias em níveis subespecíficos, relacionando isolados em cepas, tem grande aplicação no estudo das infecções dentro do ambiente hospitalar. Permite fazer inferências sobre a extensão de surtos, rotas de transmissão e avaliação de medidas empregadas para controle. Os métodos de tipagem podem ser divididos em fenotípicos, quando se baseiam em características expressas pelo organismo, ou genotípicos, quando a comparação se dá pelo seu material genético. Estes últimos apresentam vantagens sobre os primeiros pois são baseados em características mais estáveis e menos sujeitas a pressões ambientais. O *Staphylococcus aureus* é um germe bastante comum tanto no ambiente hospitalar, quanto na comunidade, sendo responsável por quadros clínicos de gravidade variável. A técnica considerada de escolha para a genotipagem desse microorganismo é a Eletroforese em Gel com Campo Pulsátil, PFGE. Esse método exige aparato caro, é trabalhoso e fornece resultados somente após 4-5 dias de trabalho. É, portanto, importante a padronização de métodos mais simples e que forneçam resultados em prazos menores de tempo. Com o objetivo de avaliar a tipabilidade, reprodutibilidade e poder discriminatório para a tipagem de *Staphylococcus aureus* pela amplificação da região 16S - 23S do RNA ribossomal, ribotipagem por PCR, desenvolveu-se o presente estudo. O primeiro passo foi a escolha do par de iniciadores. Escolheu-se o par que produzia menores fragmentos e facilitava a interpretação dos resultados. A reprodutibilidade e tipabilidade foram também avaliadas e mostraram ser bastante satisfatórias. A etapa seguinte foi tipar 88 isolados de *S. aureus* obtidos do Hospital Municipal Dr. Mário Gatti, um hospital terciário em Campinas, SP. Dentre os 27 isolados oxacilina sensíveis, foi possível identificar 22 genótipos distintos. O coeficiente de similaridade por "Simple Matching" variou de 45 a 100%. Obteve-se apenas um único perfil genotípico dentre os 61 isolados oxacilina resistentes. Estes resultados demonstram que, por possuir boa tipabilidade, reprodutibilidade, ser de fácil execução e interpretação, a técnica de ribotipagem por PCR deve ser considerada para a tipagem de *Staphylococcus aureus* oxacilina sensíveis. No grupo de bactérias oxacilina resistentes, houve monotonia no padrão genotípico, fato que ocorre também com outras técnicas. Existe necessidade do desenvolvimento de técnicas, talvez como seqüenciamento de regiões conservadas do genoma, para que possam ser feitas inferências sobre a ancestralidade de isolados.



1. INTRODUÇÃO

A classificação dos seres vivos em espécies, respeitando normas de taxonomia e relações filogenéticas, constitui uma necessidade para melhor estudá-los. O agrupamento de indivíduos de uma mesma espécie em subgrupos torna o seu estudo mais fácil, bem como ajuda a compreender as diversas relações que indivíduos, ou um conjunto deles, têm entre si. No campo da microbiologia, talvez mais do que em qualquer outra ciência, existe a necessidade dos organismos serem classificados em níveis mais detalhados do que o das espécies.

Não foi por outro motivo que Herbert John Walber, em 1903, utilizou a palavra clone para conceituar uma população em que todos os membros fossem derivados de um progenitor comum, através de multiplicação não sexual (ORSKOV & ORSKOV, 1983). É de se esperar que os membros de um dado clone compartilhem características fenotípicas (expressas pelo organismo) e genotípicas (informações contidas no genoma), e é buscando e analisando essas características que podemos agrupá-los em níveis subespecíficos.

Baseados nesses conceitos, dizemos que um isolado representa uma cultura, dita pura, obtida a partir de um único microorganismo e que uma cepa corresponde a um grupo de isolados de uma mesma espécie que compartilham características fenotípicas e genotípicas particulares e que diferem dos demais seres da mesma espécie por essas mesmas características (ARBEIT, 1999). Fica evidente que a classificação em cepas depende da comparação dos isolados entre si e, também, do poder da técnica empregada em revelar semelhanças e diferenças.

Essa tipagem de microorganismos em níveis cada vez mais detalhados tem aplicação em diferentes áreas da microbiologia, como, por exemplo, auxiliar na investigação de surtos de infecção hospitalar (BINGEN, 1994; JARVIS, 1994), determinação da relação filogenética entre organismos (GRIMONT & GRIMONT, 1986) e estudo da dinâmica das infecções bacterianas na prática clínica (LIPUMA *et al.*, 1989). Entretanto, a escolha de qual técnica de tipagem em especial utilizar nem sempre é uma decisão simples. Cada uma delas possui características próprias que devem ser avaliadas à luz do propósito da investigação.

MASLOW & MULLIGAN, em 1996, citam propriedades desejáveis das técnicas de tipagem, que são: tipabilidade, reprodutibilidade, poder discriminatório, facilidade de execução e interpretação, disponibilidade e custo.

Tipabilidade refere-se à capacidade de um teste fornecer um resultado preciso e único para a amostra em estudo. MULLIGAN & ARBEIT (1991) acrescentam que uma amostra com resultado nulo, ou não tipável, por uma dada técnica é um achado inespecífico e, portanto, de pouco valor.

Reprodutibilidade, por sua vez, é a capacidade de se obter o mesmo resultado quando o teste é repetido mais de uma vez (MASLOW & MULLIGAN, 1996). Isso envolve tanto propriedades da técnica, quanto estabilidade da característica em estudo. VAN DER ZEE *et al.*, em 1999, ainda levantam questão sobre a importância da reprodutibilidade interlaboratorial, a fim de que testes realizados em laboratórios distintos possam ser comparados.

Poder discriminatório refere-se à capacidade do teste em discernir entre amostras relacionadas e não relacionadas, ou seja, se o teste realmente classifica as amostras de forma a permitir inferências sobre sua ancestralidade (MASLOW, MULLINGAN, ARBEIT, 1993). Essa propriedade é comumente avaliada através da inclusão de amostras de controle, sabidamente não relacionadas, para as quais esperam-se resultados diferentes das demais em estudo. Os autores chegam a criticar esta prática, argumentando que a maioria das técnicas empregadas é capaz de distinguir as cepas de um surto bem definido de amostras coletadas ao acaso. O poder discriminatório seria melhor avaliado comparando-se um grupo de amostras relacionadas epidemiologicamente com outros isolados esporádicos.

Características referentes aos procedimentos técnicos a serem realizados também devem ser avaliadas. Assim, a análise de custos, infra-estrutura de equipamentos e dificuldade de execução e/ou interpretação devem ser levados em conta na escolha do método a ser empregado. O tempo para a obtenção dos resultados também pode ser um fator importante em algumas situações, como por exemplo, um surto de infecção hospitalar em curso com altas taxas de letalidade.

As técnicas de tipagem têm aplicação em diferentes áreas de estudo e investigação. Seu uso não se limita à classificação em níveis subespecíficos. GRIMONT & GRIMONT (1986) demonstram que cada espécie de ser vivo apresenta um padrão quando se utiliza a ribotipagem como caracterização genômica, sugerindo que esta possa ser utilizada como instrumento para a identificação de espécies quando as características bioquímicas ou morfológicas são escassas ou atípicas.

Essas técnicas também podem ser úteis na prática clínica, auxiliando na elucidação de dúvidas, como por exemplo, se uma dada bactéria isolada reiteradamente em amostras clínicas está envolvida em novas infecções causadas pelo mesmo microorganismo, ou trata-se de uma mesma infecção que não foi adequadamente tratada. LIPUMA *et al.* (1989) estudaram amostras de *Escherichia coli* de pacientes com bacteriúria assintomática chegando à conclusão de que aqueles que tiveram negatização da urocultura após o tratamento antimicrobiano se infectavam por bactérias que possuíam características genotípicas distintas, evidenciadas por “Restriction Fragment Length Polimorphism”, RFLP, e análise de plasmídeos. Conclui-se, portanto, que este tipo de abordagem permite também uma melhor compreensão da fisiopatologia das infecções bacterianas.

Os métodos de tipagem atualmente disponíveis dividem-se em dois grupos principais: os fenotípicos e os genotípicos. Os primeiros baseiam-se na classificação de microorganismos através de características expressas, como por exemplo: a capacidade de crescimento em extremos de pH ou aglutinação na presença de substratos, enquanto que nos últimos, a classificação se dá por análise do material genético cromossomal ou extra-cromossomal (ARBEIT, 1999).

1.1. TÉCNICAS DE FENOTIPAGEM

As técnicas de fenotipagem baseiam-se no estudo das características expressas pelos organismos. A expressão dessas características pode não ser estável e, portanto, mudar ao longo do tempo em função de pressões ambientais como, por exemplo, aquela representada pelo uso de antimicrobianos. Além disso, é fruto da regulação gênica e esta pode não se dar de maneira previsível, levando isolados de uma mesma cepa a apresentarem resultados distintos (MULLIGAN & ARBEIT, 1991).

Algumas características fenotípicas são codificadas por plasmídeos, que correspondem a uma porção de material genético com replicação e transmissão independentes do DNA cromossomal e que, por esse motivo, podem transitar entre os organismos de uma mesma espécie e mesmo entre espécies diferentes de maneira muito variável.

Essas limitações, de maneira geral, acarretam baixa reprodutibilidade e fraco poder discriminatório das técnicas baseadas em características fenotípicas, além do fato de alguns isolados poderem ser classificados como 'não tipáveis', resultando na baixa tipabilidade dessas técnicas.

1.1.1. Biotipagem

Consiste em técnica amplamente utilizada para fins de taxonomia. Baseia-se no estudo do padrão de atividade metabólica de cada organismo, como: reações bioquímicas, características morfológicas das culturas e tolerância a extremos de temperatura e pH (ARBEIT, 1999). Muitos desses procedimentos já são automatizados e fazem parte do cotidiano da maioria dos laboratórios de microbiologia. Para fins de estudos de classificação em nível subespecífico, a técnica não apresenta resultados satisfatórios, como apresentado por TENOVER *et al.* 1994, pois subdividem isolados pertencentes a um mesmo clone em subgrupos menores com pouca, ou nenhuma, correlação epidemiológica.

1.1.2. Antibiograma

As bactérias podem ser classificadas de acordo com sua susceptibilidade a diferentes antimicrobianos. Essa técnica constitui uma rotina na prática clínica a fim de guiar a escolha do tratamento, mas seu uso para tipagem é sujeito a críticas e considerações.

A aquisição ou perda de resistência a uma certa droga pode dar-se de diferentes maneiras: mutação do DNA cromossômico, plasmideal ou, simplesmente, por alteração na regulação gênica, fruto da pressão seletiva do meio. Portanto, o poder discriminatório e reprodutibilidade da técnica são bastante variáveis (MULLIGAN & ARBEIT, 1991).

BLANC *et al.* (1994), utilizando a técnica de antibiograma quantitativo, através do emprego da medida do diâmetro da zona de inibição de cinco drogas diferentes, encontraram poder discriminatório semelhante à técnica de ribotipagem. BLANC *et al.*, em 1996, num estudo prospectivo, confirmaram estes resultados, analisando 37 amostras colhidas durante um ano de observação. Esses autores sugeriram o emprego dessa técnica de fenotipagem como alternativa em locais onde não fossem disponíveis metodologias mais sofisticadas.

É de grande consenso na literatura que a susceptibilidade a antimicrobianos serve como um sinal de alerta. Assim sendo, o sucessivo aparecimento de um padrão de resistência bacteriana até então inexistente ou pouco freqüente deve desencadear uma investigação epidemiológica e o emprego de técnicas de tipagem mais adequadas.

1.1.3. Sorotipagem

Organismos de uma mesma espécie podem exibir diferenças antigênicas na membrana e/ou parede celular. Estas podem ser devidas à presença de lipopolissacárides, proteínas de membrana ou fimbrias, por exemplo. Técnicas de aglutinação direcionadas a estes constituintes são úteis na tipagem de microorganismos.

Esta técnica exige a manutenção de estoques grandes de anti-soros e, mesmo assim, muitos isolados são classificados como não-tipáveis, o que acarreta uma baixa tipabilidade. Ela ainda é utilizada para a tipagem de *Salmonella*, *Shiguela* e *Streptococcus pneumoniae* (TENOVER, ARBEIT, GOERING, 1997).

1.1.4. Fagotipagem

A técnica de fagotipagem baseia-se na pesquisa da susceptibilidade das amostras em estudo a serem analisadas frente a um painel de bacteriófagos, que são vírus capazes de lisar bactérias. A comparação dos padrões de susceptibilidade e resistência a esses fagos permite relacionar isolados, agrupando-os em cepas (MASLOW *et al.*, 1993).

Foi muito empregada para a tipagem de *Staphylococcus aureus*, porém laboratórios de referência, como o do “Centers for Disease Control and Prevention”, CDC, dos EUA, acabaram por substituí-la por métodos de genotipagem (BANNERMAN *et al.*, 1995).

1.1.5. “Multi locus enzyme electrophoresis” (MLEE)

Compara os microorganismos com base no padrão obtido por eletroforese de um grupo de enzimas metabólicas. Tem boa tipabilidade e permite análise matemática muito precisa, mas seu baixo poder discriminatório limita seu uso em estudos de epidemiologia hospitalar. É um bom instrumento para análises populacionais (ARBEIT, 1997).

1.1.6. “Immunoblotting” e tipagem por eletroforese de proteínas

Analisa diferenças na estrutura de proteínas de bactérias em estudo. Proteínas, glicoproteínas e lipopolissacárides são submetidos à separação por eletroforese em gel de poliacrilamida. No caso do “immunoblotting”, o material é transferido do gel para uma membrana de nitrocelulose. O material fixado à membrana reage com uma coleção de anti-soros, revelando bandas que correspondem aos epitopos dos anti-soros empregados. A comparação dos diversos padrões de bandas serve para classificá-las em diferentes grupos (MASLOW *et al.*, 1993).

Mais uma vez, ressalta-se que a expressão de características fenotípicas depende de fatores de regulação gênica nem sempre bem conhecidos. Assim, até mesmo uma única mutação pode levar à alteração do fenótipo de um dado microorganismo, classificando-o erroneamente quanto à sua ancestralidade.

Em resumo, as técnicas de fenotipagem foram utilizadas por muito tempo, porém, pouco a pouco, vêm sendo substituídas por técnicas de genotipagem que apresentam maior poder discriminatório, reprodutibilidade e tipabilidade.

1.2. TÉCNICAS DE GENOTIPAGEM

O avanço da biologia molecular levou ao aparecimento de técnicas de tipagem que analisam o material genético cromossômico e/ou extracromossomal dos microorganismos, permitindo avaliar se pertencem a um mesmo clone.

Comparadas às técnicas de fenotipagem, apresentam melhor poder discriminatório, tipabilidade e reprodutibilidade, já que as características sob análise, presentes no material genético, são mais estáveis que as características fenotípicas e estão menos sujeitas a alterações de expressão por pressão seletiva do meio ambiente (ICHIYAMA *et al.*, 1991; TENOVER *et al.*, 1994). De maneira geral, essas técnicas exigem infra-estrutura de equipamentos, mas que, cada vez mais, passa a fazer parte do cotidiano de laboratórios clínicos.

1.2.1. Análise plasmideal

A análise de plasmídeos, seqüência de genes extracromossomal, foi a primeira técnica de genotipagem desenvolvida e utilizada em estudos epidemiológicos (MASLOW *et al.*, 1993). Essa análise é feita separando o DNA plasmideal da fração cromossômica do genoma e submetendo-o a provas, que vão desde a simples eletroforese em gel, que se encarregará de separar os vários plasmídeos porventura existentes com base no seu peso molecular, carga elétrica e estrutura espacial, até a análise utilizando-se enzimas de restrição. Nesse último caso, o conteúdo plasmideal é submetido a digestão através de enzimas que atuam em sítios específicos de clivagem, gerando um número maior de bandas a serem analisadas após a eletroforese em gel de agarose. Com este procedimento, são maiores as chances de serem detectadas diferenças genotípicas entre as amostras.

Uma limitação dos estudos de base plasmideal é o fato de nem todos os organismos possuírem plasmídeos, acarretando um prejuízo para a tipabilidade da técnica e impossibilitando o seu uso para alguns isolados (TENOVER *et al.*, 1994). Some-se ainda a possibilidade de transmissão desses fragmentos entre microorganismos de uma mesma espécie, e mesmo interespecies, o que pode levar à rápida disseminação de um plasmídeo

numa dada instituição. O poder discriminatório da técnica pode, então, sofrer grandes interferências (ARBEIT, 1997). Mesmo assim, ainda é uma alternativa para o gênero *Staphylococcus* e algumas espécies de enterobactérias (TENOVER *et al.*, 1997). Segundo MASLOW *et al.*, 1993, seu emprego é mais efetivo em estudos bem delimitados em relação a tempo e espaço, como os surtos de curta duração.

1.2.2. Análise do DNA cromossômico

Uma das técnicas para a análise do DNA cromossômico é chamada de Análise do DNA Cromossomal por Enzima de Restrição. Nesse caso é utilizada uma enzima de restrição que reconhece sítios (seqüências de poucas bases) freqüentes no genoma e que cliva o DNA nestes pontos. As técnicas baseadas neste tipo de abordagem são designadas de Polimorfismo no Comprimento do Fragmento por Restrição, “Restriction Fragment Length Polymorphism”, ou simplesmente, RFLP. O produto da digestão contém muitos fragmentos que podem variar de 0,5 Kb a 50 Kb (MASLOW *et al.*, 1993). O padrão de eletroforese pode ser de interpretação extremamente complexa, dada a presença de um grande número de bandas, algumas podendo estar sobrepostas, e os fragmentos maiores não migrarem satisfatoriamente ficando represados na parte superior do gel (TENOVER *et al.*, 1997). Em 1992, CLABOTS *et al.* utilizaram esta técnica como instrumento auxiliar na compreensão da disseminação intra-hospitalar de *Clostridium difficile*.

Visando facilitar a etapa de interpretação, o produto da eletroforese pode ser transferido para uma membrana de náilon ou nitrocelulose. Hibridiza-se o DNA com uma conhecida seqüência de DNA ou RNA complementares a um ou vários sítios do DNA fixado na membrana (sonda ou “probe”). A sonda é marcada radiativamente ou quimicamente, permitindo que os fragmentos contendo seqüências complementares possam ser visualizados na membrana. Este processo é conhecido como “Southern blot” em reconhecimento ao seu autor (ARBEIT, 1997).

A análise por RLFP usando a seqüência IS 6110, por exemplo, é o método de escolha para tipagem de amostras de *Mycobacterium tuberculosis*. No genoma dessa

espécie existem seqüências de DNA, chamadas de IS 6110, que se intercalam com regiões de tamanhos variáveis. O DNA é clivado por uma enzima de restrição, dá-se a corrida por eletroforese, a transferência para membrana de náilon, a hibridação com uma sonda e o material resultante é revelado para evidenciar onde existem seqüências IS6110. Dessa forma, isolados podem ser classificados em cepas.

Em 1984, SCHATZ & CANTOR descreveram uma técnica de eletroforese capaz de separar adequadamente grandes fragmentos de DNA. O DNA cromossômico é digerido por uma enzima de restrição que reconhece um sítio de pouca frequência no genoma. O resultado desse processo é um conjunto de 10 a 30 fragmentos com 10 a 800 Kb de tamanho. A eletroforese em gel com campo elétrico unidirecional não é capaz de separar fragmentos tão grandes. Para este fim, passou-se a alternar a direção do campo elétrico a intervalos de tempo determinados, pulsos (TENOVER *et al.*, 1997). Esta técnica foi batizada de Eletroforese em Gel com Campo Pulsátil, "Pulsed Field Gel Electrophoresis", PFGE.

A técnica de PFGE apresenta excelente reprodutibilidade e tipabilidade já que todos os microorganismos são, ao menos em teoria, tipáveis por ela. Seu poder discriminatório é bastante elevado para *Escherichia coli* e *Mycobacterium avium*, uma vez que existe grande variabilidade no genoma desses organismos. Bactérias com pequena variabilidade do genoma, como *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae* tipo b apresentam grande dificuldade para tipagem, ainda assim a PFGE é considerada o método de escolha para essas espécies (MASLOW *et al.*, 1993).

As dificuldades e restrições da técnica residem, em primeiro lugar, no custo inicial do equipamento, que é bastante elevado. Além disso, o DNA precisa ser extraído com alto rendimento e qualidade, o que torna esse processo demorado e que somado ao tempo de eletroforese pode levar de cinco a seis dias. Isso em algumas situações pode ser inadequado. Houve também a necessidade do estabelecimento de critérios claros e precisos para a interpretação dos resultados, permitindo comparações interlaboratoriais (TENOVER, 1995).

PADOVEZE, 1998, utilizando a técnica de PFGE, pôde traçar o perfil epidemiológico molecular das infecções e colonizações por *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina em pacientes HIV positivos atendidos na unidade de leito dia e enfermaria de moléstias infecciosas do Hospital de Clínicas da Unicamp, mostrando o valor desta técnica de genotipagem para o entendimento das infecções estafilocócicas neste grupo de pacientes. Concluiu que existia grande prevalência de colonização ou infecção por SAMR dentre os pacientes destas duas unidades, 35%, levantando também a hipótese de transmissão cruzada entre pacientes das duas unidades, já que o perfil genômico predominante foi encontrado em ambas as unidades de acompanhamento.

1.2.3. Técnicas baseadas em amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR)

A técnica de Reação em Cadeia de Polimerase, PCR, consiste em realizar cópias *in vitro* de uma determinada seqüência de DNA. Desse modo, um único fragmento de DNA pode ser replicado várias vezes a fim de permitir sua visualização em gel após separação por eletroforese.

O procedimento consiste em realizar a síntese de DNA a partir de um molde de material genético, que contenha a seqüência que se deseja amplificar. É feita uma reação contendo o DNA molde, polimerase de DNA, nucleotídeos e um par de iniciadores, ou "primers", que são seqüências de DNA complementares às extremidades do fragmento que se deseja amplificar. O processo de síntese ocorre em ciclos. Cada ciclo compreende uma fase de desnaturação do DNA (separação da dupla fita), anelamento (ligação de cada fita simples com os iniciadores) e a fase de extensão (síntese propriamente dita das fitas complementares pela ação da polimerase). Esta seqüência de ações é conseguida pela simples variação da temperatura do material em reação, já que cada uma das ações se dá em temperaturas distintas. O processo é repetido sucessivas vezes e, após 30 ciclos, uma única cópia de DNA pode originar milhares de cópias.

A técnica de PCR foi utilizada por EISENSTEIN (1990) como recurso diagnóstico, permitindo a identificação de agentes etiológicos com precisão em situações em que as técnicas de cultura convencionais não elucidaram essas dúvidas. Não foi mencionada nessa pesquisa a possível utilização da técnica como auxiliar em estudos ou investigações epidemiológicas. ROSENBLUM et al., 1991, também utilizando a técnica de PCR, pôde concluir que o tempo de excreção de vírus da hepatite A em neonatos é maior que em outros grupos etários, levando ao melhor conhecimento da fisiopatogênese da doença nessa parcela da população.

Técnicas apoiadas em metodologia por PCR passaram a ser utilizadas também como artifício para genotipagem de bactérias. VERSALOVIC, KOEUTH, LUPSKI (1991) descreveram a existência de seqüências repetitivas no genoma de bactérias chamadas de “Repetitive Extragenic Palindromic Elements” (REP) e “Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus” (ERIC). Amplificações do genoma utilizando essas duas regiões como iniciadores produzem seqüências de nucleotídeos que podem ser analisados por eletroforese em gel de agarose com capacidade de identificar espécies e cepas. Tal fato ocorre porque a distribuição destas seqüências é variável no genoma, mas guardam semelhanças nos isolados que possuem ancestral comum, isto é, que pertencem a um mesmo clone.

VAN BELKUM, 1994, descreveu duas alternativas para a escolha desses iniciadores. A primeira delas são seqüências conhecidas que se repetem ao acaso no genoma. São de função não bem determinada, entretanto sugere-se que elas estejam relacionadas com a regulação da transcrição e tradução do material genético ou a manutenção da organização cromossômica. Este tipo de abordagem permite que a amplificação seja bastante reprodutível, pois são empregadas condições de reação bastante específicas.

KOSTMAN et al. (1992) descreveram o uso das seqüências 16S e 23S de RNA ribossomal como alternativa para a tipagem de *Pseudomonas cepacia*. No seu estudo, a técnica de ribotipagem por PCR foi empregada em um conjunto de amostras de fontes não relacionadas, mostrando para cada uma delas um padrão específico tendo, portanto, um bom poder discriminatório. O autor também se preocupou em testar a mesma amostra após

40 passagens *in vitro* da colônia; os padrões, antes e após sucessivas subculturas, foram idênticos, assegurando a boa reprodutibilidade da técnica. A tipabilidade e a facilidade de execução são também bastante satisfatórias na opinião dos autores.

A segunda opção de escolha dos iniciadores pode ser uma seqüência aleatória de até 10 nucleotídeos. Estas não são complementares a seqüências conhecidas do genoma. Essa técnica é chamada de “Arbitrarily Primed PCR” (AP-PCR) ou “Random Amplified Polymorphic PCR” (RAPD). VAN BELKUM, BAX, PREVOST (1994) utilizaram técnica de RAPD em amostras de *S. aureus* previamente tipadas por PFGE. Os resultados mostraram concordância nas duas técnicas, principalmente se fosse utilizado mais de um iniciador. Nesse tipo de abordagem, utilizam-se condições de reação de pouca especificidade, a complementaridade entre o iniciador e o genoma pode não ser total, e a amplificação pode se dar de forma irregular, o que prejudica a reprodutibilidade da técnica (TENOVER *et al.*, 1997).

1.3. APLICAÇÃO E DIFICULDADES DAS DIVERSAS TÉCNICAS

Os métodos de caracterização de clones de microrganismos têm grande aplicação na área de epidemiologia das infecções hospitalares, servindo como instrumento para a confirmação de surtos, determinação de rotas de transmissão e avaliação de medidas empregadas para controle dessas infecções (STRUELENS, 1998). JARVIS, 1994, descreveu que no período de janeiro de 1991 a março de 1994, 41 surtos de infecção hospitalar foram investigados pelo CDC e que as técnicas de genotipagem foram empregadas em 26 desses surtos. Elas tiveram papel auxiliar na investigação epidemiológica, permitindo confirmar ou afastar hipóteses sobre vias de contágio. MASLOW *et al.* (1993) também defendem o uso de técnicas de tipagem molecular como complementares à investigação epidemiológica clássica, já que são metodologias dispendiosas, trabalhosas e cuja interpretação depende da comparação com dados epidemiológicos. WEBER, PFALLER, HERWALDT (1997), diferentemente de JARVIS (1994) e MASLOW *et al.* (1993), citam que a biologia molecular pode ser empregada como método de triagem para decidir se uma dada situação merece uma investigação mais

detalhada ou não. Isto é, usa técnicas de biologia molecular para comparar os isolados suspeitos de estarem envolvidos num surto. Mostrando-se diferentes, a hipótese de surto é afastada e a investigação epidemiológica não é conduzida; caso contrário, procede-se a uma investigação detalhada.

BACK *et al.* (1993) investigaram dois surtos de infecção pelo *Staphylococcus aureus* num berçário com intervalos de 15 meses. A investigação do primeiro episódio, baseada em estudo epidemiológico clínico e tipagem por antibiograma das amostras, apontou um determinado profissional como sendo a fonte do surto. Quando um segundo surto pela mesma bactéria e na mesma enfermaria ocorreu, a investigação foi complementada por análise do DNA plasmideal e cromossômico de amostras coletadas nas duas investigações, pois especulava-se que elas poderiam estar relacionadas. A bactéria que colonizava o profissional, inicialmente implicado como fonte do primeiro surto, mostrou ser genotipicamente diferente das isoladas nos casos de infecção. Um outro profissional de saúde, lotado na enfermaria onde ocorreram os dois episódios, apresentava colonização por *Staphylococcus aureus* de mesmo padrão genotípico. Esse estudo demonstra claramente a aplicabilidade das técnicas de genotipagem de bactérias no campo da epidemiologia hospitalar.

A opção de empregar um método de tipagem molecular para classificar os isolados de uma mesma espécie inclui admitir que isolados relacionados são descendentes de um mesmo precursor, guardando, portanto, semelhanças em seu genótipo e que isolados não relacionados têm genótipos diferentes (TENOVER *et al.*, 1997).

A interpretação dos resultados laboratoriais não é tarefa fácil. Esperamos que estes nos dêem respostas simples e objetivas, do tipo: as amostras representam um mesmo clone ou não. Chegar a essa conclusão exige grande esforço do pesquisador e o estabelecimento de padronização para a interpretação dos achados laboratoriais.

Para os estudos baseados em PFGE, há consenso na literatura sobre os critérios de análise dos resultados. Há que se levar em conta que o método analisa apenas parte do genoma, preferindo-se designar como indistinguíveis amostras que apresentam o mesmo padrão de análise e não mais de idênticas. Mutações podem ocorrer ao acaso no genoma

das bactérias e é graças a isso que teremos a diferenciação entre as cepas. É preciso considerar que, quando são observadas diferenças no genoma que podem ser explicadas por apenas um ou dois eventos de mutação percebidos pela comparação de bandas na corrida de eletroforese, as cepas são designadas de relacionadas ou possivelmente relacionadas, respectivamente. Amostras cuja diferença genotípica é baseada em diferenças de mais que três eventos são designadas de não-relacionadas (TENOVER *et al.*, 1995; TENOVER *et al.*, 1997).

Este padrão de análise de PFGE foi definido a fim de uniformizar a interpretação das análises e permitir comparação entre estudos realizados em diferentes laboratórios. Para as técnicas de genotipagem baseadas em PCR, análise plasmideal e RFLP, a análise ainda é fruto de muita discussão, não existindo consenso sobre sua uniformização (TENOVER *et al.*, 1997).

Vale a pena comentar que as técnicas de tipagem molecular baseadas em PCR representam um grande desafio também no que concerne à sua padronização. A técnica de AP-PCR, por utilizar iniciadores aleatórios, que não são dirigidos a sítios específicos do genoma, emprega parâmetros de reação de pouca especificidade, como temperaturas de anelamento baixas, visando facilitar a ligação dos iniciadores com o genoma objeto de estudo. Como consequência, ocorre ligação com sítios que não guardam homologia perfeita (ARBEIT, 1999). Esse tipo de abordagem torna a metodologia muito sensível a variações nas condições da reação, equipamentos, concentração e qualidade de reagentes.

TYLER *et al.*, 1997, mostraram como variações nas condições da reação podem alterar sobremaneira os resultados do PCR. Esse ponto já havia sido mencionado por outros autores como VAN BELKUM *et al.* (1995) que citam a grande variabilidade entre os experimentos realizados em diferentes laboratórios. Nota-se que existe grande interesse em uniformizar as técnicas para que os resultados de diferentes grupos de trabalho possam ser comparáveis. Mesmo com essa limitação, estes últimos autores encontraram boa correlação entre a técnica de AP-PCR e PFGE na tipagem molecular de *Staphylococcus aureus*, mencionando o valor daquela para fins de estudo de isolados de ambiente hospitalar, uma vez que proporciona resultados em curto período de tempo.

Em 1993, SAULNIER *et al.* compararam a técnica de AP-PCR com a de PFGE para a tipagem de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. No seu estudo, a técnica de AP-PCR apresentou poder discriminatório pior que a PFGE. É interessante ressaltar que o autor utilizou 26 cepas de *S. aureus* que de antemão possuíam padrões distintos de PFGE. A técnica de PCR não foi, portanto, posta a prova para validar um estudo epidemiológico prévio. Acredita-se que o poder discriminatório de uma técnica deva ser avaliado em situações bem definidas, como estudos epidemiológicos, e não simplesmente testando cepas que possuem padrões genotípicos diferentes entre si por outra metodologia.

Na técnica de REP-PCR, empregam-se iniciadores homólogos a seqüências conhecidas do genoma, os quais, via de regra, possuem de 15 a 20 nucleotídeos. Esse fato favorece a reprodutibilidade da técnica pois podem ser utilizadas condições de reação mais específicas, como temperaturas de anelamento elevadas, o que diminui a chance de ocorrerem ligações inespecíficas ou parciais (TYLER *et al.*, 1997). É importante ressaltar que, para fins de tipagem molecular, não basta que a seqüência esteja presente no genoma, mas que também esta se repita de forma aleatória dentro dele, uma vez que as variações de tamanho dos segmentos entre estas seqüências servirão para estimar o grau de relação entre as amostras em estudo.

Com este objetivo, já foram descritas seqüências em enterobactérias, “Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus” (ERIC) e, em *Streptococcus pneumoniae*, o elemento BOX (TYLER *et al.*, 1997).

Em 1993, VAN BELKUM *et al.* utilizaram como iniciadores trechos das seqüências ERIC para a tipagem de *S. aureus* resistente à oxacilina. Os autores comentaram que tal seqüência não fora descrita na espécie em estudo e que a temperatura de anelamento de 25°C permitia a ligação em sítios com homologia incompleta. Parece bem razoável concluir que se trata de um experimento mais próximo de AP-PCR do que REP-PCR. Os autores foram capazes de identificar 23 genótipos numa coleção de 48 isolados. Foi feita também a técnica de fagotipagem e, quando as duas técnicas empregadas foram analisadas em conjunto, o número de cepas distintas subiu para 34. Foram incluídas nesse estudo amostras de um surto e estas apresentaram o mesmo padrão pela técnica de PCR, o que pode ser considerado como um indicador de sua utilidade em estudos epidemiológicos.

FORTALEZA, 1999, utilizou a técnica de PCR empregando a seqüência ERIC como iniciador para caracterizar cepas de *Pseudomonas aeruginosa* no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista. Seus resultados permitiram inferir hipóteses sobre a disseminação deste agente dentro do ambiente hospitalar, contribuindo para o estabelecimento de medidas de controle.

Em 1988, STULL, LIPUMA, EDLIND descreveram o uso da seqüência de DNA ribossomal como sendo uma alternativa para a tipagem molecular de bactérias. Usou-se a técnica de RFLP, ou seja, o DNA bacteriano foi digerido por uma enzima de restrição, submetido à eletroforese em gel, e hibridação com sonda complementar ao DNA ribossomal. A técnica mostrava-se capaz de tipar *Escherichia coli*, *Pseudomonas cepacia* e *Haemophilus influenzae*. A utilização da seqüência de DNA ribossomal baseou-se nos estudos de GRIMONT & GRIMONT (1986) que mostravam existir repetições desta seqüência no genoma de bactérias. Valendo-se do fato de existirem espaçadores, “spacers”, de tamanhos variáveis entre as seqüências que codificam as unidades 16S e 23S do RNA ribossomal, KOSTMAN *et al.* (1992) propuseram o emprego da técnica de PCR tendo como iniciadores estas extremidades.

COLLIER *et al.*, 1996, compararam duas técnicas de PCR para tipagem de *Clostridium difficile*. A primeira foi a técnica de AP-PCR, utilizando-se iniciadores aleatoriamente determinados. A segunda correspondeu à técnica de ribotipagem por PCR. Esta última mostrou melhor poder discriminatório e, também, maior concordância (83%) com os resultados obtidos por PFGE, que corresponde a uma técnica amplamente difundida e aceita para tipagem desta espécie.

VAN DER ZEE *et al.* (1999) também comentaram sobre a superioridade das técnicas de PCR que empregam como iniciadores seqüências repetitivas e conhecidas dentro do genoma, quando comparadas às técnicas de AP-PCR. Foi utilizada uma seqüência repetitiva de *Mycoplasma pneumoniae* que se acredita existir também no genoma de *Staphylococcus aureus*. A análise de seus dados permitiu concluir que a técnica de REP-PCR apresenta boa reprodutibilidade e poder discriminatório semelhante à PFGE, permitindo ainda a análise dos resultados por métodos informatizados.

1.4. IMPORTÂNCIA DAS INFECCÕES ESTAFILOCÓCICAS

As infecções causadas por *Staphylococcus aureus* são conhecidas há muito tempo. Em 1880 e 1882, *OGSTON descreveu os aspectos clínicos da doença estafilocócica, comentando a capacidade desta bactéria promover septicemias e induzir a formação de abscessos. Infecções estafilocócicas são bastante comuns tanto na comunidade, quanto no ambiente hospitalar. Seu tratamento tornou-se mais difícil em razão do aparecimento de cepas resistentes a antimicrobianos.

O *Staphylococcus aureus* é um coco Gram positivo com diâmetro de 0,7 a 1,2 µm, que pode aparecer isolado, aos pares, tétrades, ou agrupados formando cadeias curtas ou cachos. Pertence à família *Micrococcaceae*, são bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas, imóveis e não esporuladas (KLOODS & BANNERMAN, 1999).

Em meios sólidos, as colônias de *S. aureus* são bem definidas, convexas, lisas e com diâmetro de 6 a 8 mm. Podem ter coloração amarelada, cor de ouro, devido à produção de carotenóides, daí a sua denominação. A produção de pigmentos pode ser intensificada por incubação em temperatura ambiente por 24 a 48 horas (WALDVOGEL, 1995; KLOODS & BANNERMAN, 1999). A confirmação da espécie se faz por provas bioquímicas. O *S. aureus* apresenta resultados positivos nas provas de catalase e coagulase. Esta última serve para diferenciá-lo dos demais membros do gênero *Staphylococcus*, que não são capazes de promover a coagulação de plasma sanguíneo.

A espécie humana é o reservatório natural desta bactéria. Esta pode colonizar e causar infecção tanto em pacientes hospitalizados, quanto em indivíduos da comunidade. Estima-se que de 30 a 50 % da população adulta possa albergar *S. aureus* em narinas anteriores, nasofaringe e áreas úmidas e pilificadas do corpo (JOHN & BARG, 1996; LOWY, 1998). Dessa forma, o organismo é capaz de estabelecer uma relação simbiótica com o homem, favorecendo sua manutenção no meio ambiente. Em momentos onde as barreiras de proteção naturais são quebradas (lesão de pele, trauma, implantação de dispositivos médicos, etc), a bactéria ganha acesso a tecidos e órgãos mais profundos e, a partir daí, pode causar doença.

* OGSTON A., apud LOWY, F.D. -*Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*, 339(8):520-32, 1998.

A transmissão por contato direto, pessoa a pessoa, parece ser a principal via de transmissão da doença estafilocócica dentro do ambiente hospitalar. O *Staphylococcus aureus* pode até ser isolado em materiais inanimados como mobiliário e superfícies do ambiente, mas o contato pessoa a pessoa é passo quase que fundamental para sua transmissão.

Antes do desenvolvimento da terapia antimicrobiana, a letalidade dos casos de bacteremia por *S. aureus* girava em torno de 90% (MARANAN *et al.*, 1997). Em 1940, com o advento da penicilina G, a história clínica da infecção estafilocócica pôde ser alterada. Houve, porém, o rápido aparecimento de cepas resistentes à penicilina no meio hospitalar e na comunidade. O mecanismo de resistência à penicilina é a produção de β -lactamases, enzimas que inativam o antimicrobiano, impedindo sua ação (WALDVOGEL, 1995).

Deu-se, então, o desenvolvimento de penicilinas que são resistentes à ação das β -lactamases. Em 1960, passa a ser disponível a oxacilina e a meticilina. Ainda na década de 60, começa a ocorrer a identificação de isolados resistentes a estes compostos. Esse fenômeno ocorreu inicialmente nos hospitais, onde houve a rápida disseminação dessa cepa, que passa a ser conhecida como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, SAMR, ou *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina, SARO. Este fenômeno também pôde ser observado na comunidade (SHOPSIN & KREISWIRTH, 2001). A resistência à oxacilina é relacionada à expressão do gene *mecA*, que provoca alteração no sítio de ação do antibiótico, dessa forma comprometendo sua eficácia. Como alternativa terapêutica para as cepas de *S. aureus* resistentes à oxacilina, surgiram os antibióticos glicopeptídeos: vancomicina e teicoplanina (KLOODS & BANNERMAN, 1999).

A tipagem de *S. aureus* passou por grandes transformações após o aparecimento e o aprimoramento das técnicas de biologia molecular. Até 1994, o CDC utilizava a fagotipagem como técnica de escolha para a tipagem de *Staphylococcus aureus*, procedimento que foi empregado por mais de 30 anos. Naquele ano, estudos mostravam superioridade no que se refere à tipabilidade, poder discriminatório e reprodutibilidade da técnica de PFGE e esta última passou a ser utilizada e defendida como técnica de escolha para a espécie (BANNERMAN *et al.*, 1995).

SCHLICHTING *et al.* (1993) compararam a técnica de PFGE com três outras: fagotipagem, sorotipagem e zimotipagem. Os autores encontraram melhores resultados com PFGE. É importante ressaltar que, neste estudo, a genotipagem foi comparada com técnicas de fenotipagem, que se acredita terem menor poder discriminatório. Achados semelhantes foram encontrados por ICHIYAMA *et al.*, 1991, ao analisarem isolados de ambiente hospitalar de SAMR.

TENOVER *et al.*, 1994, compararam a eficácia de métodos fenotípicos (biotipagem, fagotipagem, tipagem por antibiograma, “immunoblotting” e MLEE) e genotípicos (PFGE, ribotipagem clássica, amplificação por PCR do gene de coagulase, análise plasmideal) para a tipagem de *Staphylococcus aureus*. Fica claro nesse estudo a superioridade das técnicas de genotipagem para relacionar epidemiologicamente os isolados estudados, contudo nenhum dos métodos destacou-se significativamente dos demais. Os autores mencionaram existirem limitações para cada metodologia e que o emprego de mais de uma técnica poderia alcançar melhores resultados. Também se argumentou o papel auxiliar das técnicas de tipagem, servindo para elucidar questões levantadas por uma investigação epidemiológica.

As técnicas baseadas em PCR também foram extensamente empregadas e avaliadas em estudos de tipagem de *S. aureus*. Tal fato se deve, principalmente, à sua facilidade de execução e rapidez nos resultados. DOLZANI *et al.* (1994) aplicaram a técnica de ribotipagem por PCR em 84 amostras de *S. aureus* colhidas de dois hospitais ao longo de oito meses. Os resultados mostraram poder discriminatório de 0,92 pelo índice proposto por HUNTER & GASTON (1988). Se se comparar apenas os isolados resistentes à oxacilina, esse índice cai para 0,81, o que ainda assim é considerado um bom resultado.

AIRES DE SOUZA *et al.*, 2001, descreveram a extensa disseminação de um único clone de SAMR por países da América Latina: Argentina, Brasil, Chile, Uruguai e México. No seu estudo foram empregadas técnicas de hibridação por “Southern blot” e PFGE para relacionar 499 isolados coletados de 1996 a 1998. É interessante notar a monotonia dentre os isolados dessa subpopulação de *S. aureus* colhidos numa região de dimensão continental.

Achados semelhantes foram encontrados no Brasil. TEIXEIRA *et al.*, 1995, analisaram por técnicas de genotipagem amostras de *Staphylococcus aureus* de cinco hospitais de diferentes cidades brasileiras: São Paulo, Rio de Janeiro, Niterói, Porto Alegre e Manaus. Os autores puderam observar que 77% dos isolados apresentam o mesmo padrão de PFGE e o mesmo padrão de RFLP do gene *mecA*. Mais uma vez, evidenciando semelhança entre isolados colhidos em regiões geográficas distantes.

KREISWIRTH *et al.* (1993), analisando os padrões de RFLP do gene *mecA*, sugeriram existir uma origem comum e recente para as cepas de SAMR, o que poderia explicar a monotonia do genótipo destas. Os autores defendem a idéia de que as cepas desta parcela de *Staphylococcus aureus* são descendentes de um único ancestral, que apareceu há aproximadamente 30 anos. Este fato acaba acarretando grandes desafios para os testes de tipagem, pois são bactérias que guardam muitas semelhanças no seu fenótipo e genótipo. VAN LEEUWEN *et al.*, 1998, usaram técnicas de biologia molecular para avaliar a variabilidade gênica de cepas de SAMR. Estes autores puderam verificar a maior variabilidade gênica dentre isolados coletados de instituições distantes, geograficamente, uma da outra. Estas técnicas também foram utilizadas para caracterizar isolados de SAMR colhidos em extensos programas de vigilância epidemiológica, como o estudo SENTRY (DIEKEMA *et al.*, 2000).

O relacionamento de cepas de SAMR representa, portanto, um grande desafio tanto para epidemiologistas, quanto para profissionais de laboratório. Mesmo a técnica de PFGE apresenta pior poder discriminatório quando empregada em coleções de SAMR (CARLES-NURIT *et al.*, 1992). As dúvidas e resultados conflitantes acabam sendo resolvidos por técnicas filogenéticas (JORGENSEN *et al.*, 1996).

Diante destas considerações, são inúmeros os trabalhos na literatura avaliando métodos de tipagem para SAMR. Em 1993, STRUELENS *et al.* compararam a técnica de PFGE com PCR tendo como iniciadores seqüências dos genes *mecA*, a seqüência ERIC e iniciadores arbitrários. Os resultados mostraram boa correlação entre as duas técnicas, mencionando vantagens técnicas para o uso de PCR. Esta mesma opinião é compartilhada por autores como LUPSKI, 1993, que viram como promissores os resultados com as técnicas baseadas em PCR.

1.5. AS TÉCNICAS DE RIBOTIPAGEM APLICADAS A *Staphylococcus aureus*

Diferentes autores utilizaram a técnica de ribotipagem clássica, por hibridação, para tipar bactérias como *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas cepacia*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* (IRINO *et al.*, 1988; STULL *et al.*, 1988, GORDILLO, SINGH, MURRAY, 1993). Os resultados, no que se refere ao poder discriminatório, variaram bastante nesses trabalhos, talvez por diferenças metodológicas relacionadas à escolha das amostras de isolados em estudo.

Em 1992, KOSTMAN *et al.* propuseram mudanças na técnica de ribotipagem, passando a amplificar por PCR os espaçadores localizados entre as subunidades 16S e 23S do RNA ribossomal e a subsequente visualização destes fragmentos em gel de agarose após eletroforese. Esta técnica passou a ser chamada de ribotipagem por PCR. Foi empregada por esses autores em amostras de *Pseudomonas cepacia*. Esse novo método tem como vantagem a maior facilidade de execução e a não utilização de material radiativo. Este procedimento possibilita seu emprego e difusão em laboratórios clínicos, não o restringindo a laboratórios de referência. Os autores avaliaram a reprodutibilidade e tipabilidade, encontrando resultados bastante satisfatórios. O poder discriminatório não pôde ser adequadamente avaliado por causa do pequeno número de amostras empregadas.

KOSTMAN *et al.*, 1995, empregaram a técnica de ribotipagem por PCR em amostras de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* e *Enterobacter sp.* Os resultados obtidos foram comparados com provas fenotípicas, como antibiograma, e análise plasmideal com boa correlação, sugerindo que a ribotipagem por PCR poderia ser uma abordagem laboratorial 'universal' para a tipagem de bactérias. A técnica de ribotipagem por PCR mostrou bom poder discriminatório na tipagem de *Staphylococcus aureus*. Isolados colhidos em dias consecutivos de um mesmo paciente mostraram padrões idênticos na eletroforese e amostras controle conservavam seu padrão característico, mesmo após sucessivas passagens em meios de cultura, comprovando a estabilidade da técnica, tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

Também são descritas na literatura comparações entre técnicas de PCR, especialmente ribotipagem por PCR, e PFGE (KUMARI *et al.*, 1997). Fica claro que a

PFGE apresenta maior poder discriminatório, mas a ribotipagem por PCR oferece resultados tão discriminatórios quanto estes, quando utilizada em investigação de surtos epidemiológicos. Cabe aqui, então, lembrar algumas das premissas citadas por MASLOW & MULLIGAN (1996). Em primeiro lugar, as técnicas de tipagem laboratoriais são complementares a investigações epidemiológicas clássicas e os dados devem ser avaliados em conjunto antes de se alcançar qualquer conclusão. Em segundo lugar, nem sempre é possível utilizar o teste tido como o melhor para uma espécie, devido a dificuldades técnicas e econômicas. A melhor escolha acaba sendo aquela que resolve as hipóteses e dúvidas suscitadas pela investigação epidemiológica. Nesses casos, mesmo uma técnica de poder discriminatório menor pode fornecer resultados suficientemente adequados. Em resumo, a escolha de um método de tipagem envolve a consideração de vários fatores e a melhor técnica é aquela que atende às nossas necessidades, ou como estes autores relataram no seu trabalho: “a melhor técnica é aquela que funciona”.

A técnica de ribotipagem, quer por hibridação, quer por amplificação por PCR, baseia-se na análise dos espaçadores que existem entre as seqüências que codificam as diferentes subunidades do RNA ribossomal. Assume-se que estes espaçadores estão presentes em número suficiente e distribuídos ao acaso dentro do genoma e, em isolados que possuem um ancestral comum, sua distribuição guarda certa similaridade.

DE BUYSER *et al.* (1989) propuseram o emprego da técnica de ribotipagem clássica para a identificação de diferentes espécies dentro do gênero *Staphylococcus*. Os autores relataram diferentes padrões dentro de espécies como *S. epidermidis* e *S. aureus*, mesmo entre isolados de SAMR. O autor levantou, então, a possibilidade do emprego desta técnica para a tipagem dessas espécies.

BLUMBERG *et al.*, 1992, aplicaram a técnica de ribotipagem clássica para tipar amostras de *S. aureus* oxacilina sensíveis que não foram tipáveis por fagotipagem. Os autores evidenciaram poder discriminatório superior quando as duas técnicas foram realizadas em conjunto. Dessa forma, ressalta-se a complementaridade entre as técnicas de tipagem.

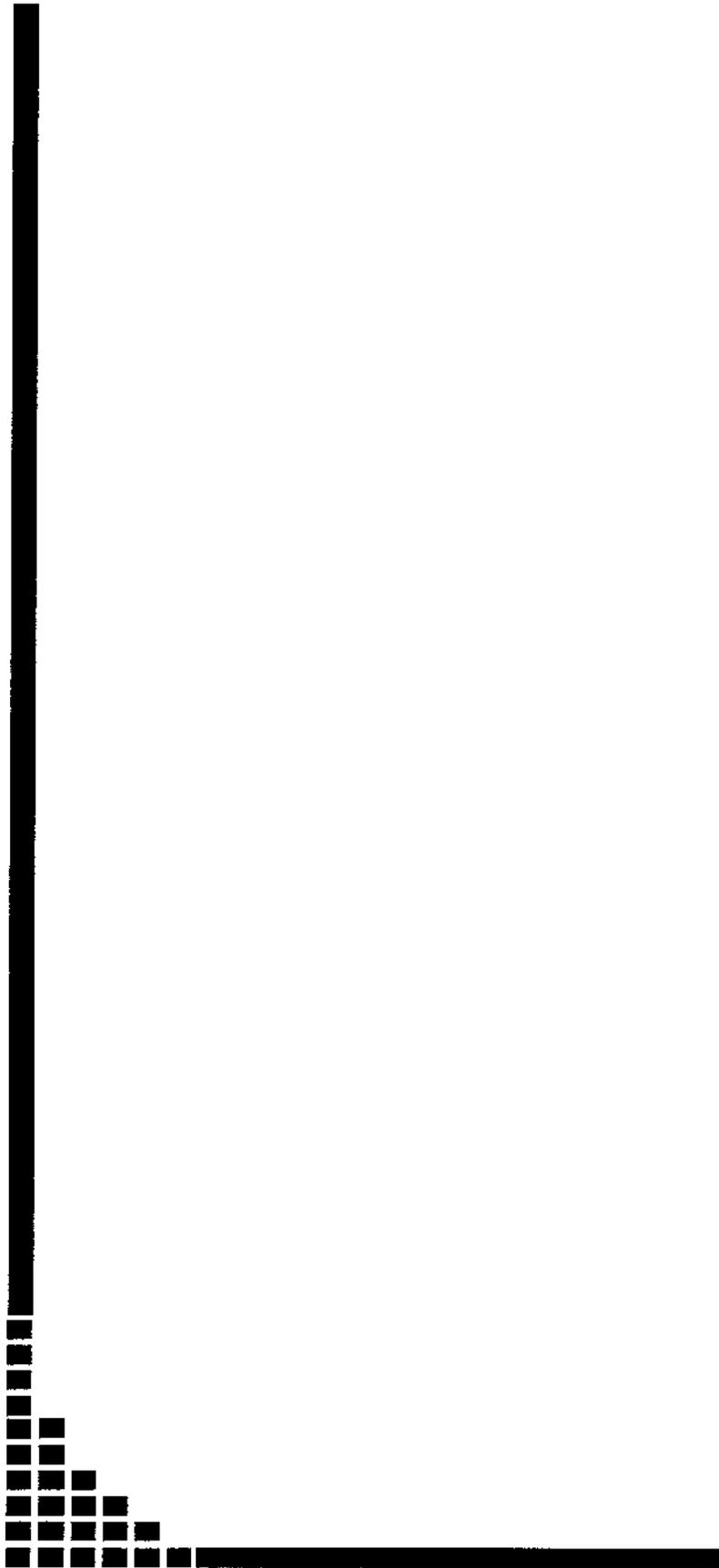
A escolha de uma técnica de genotipagem não é uma tarefa fácil. Não existe consenso bem definido ou definitivo sobre qual método se aplica melhor a uma dada espécie (MASLOW & MULLIGAN, 1996). Cada necessidade deve ser avaliada caso a caso e daí procede-se à escolha da metodologia a ser empregada, ciente e consciente de suas limitações.

Praticamente, todas as técnicas de genotipagem atualmente em uso utilizam apenas parte do genoma para relacionar, ou não, os isolados. Diante disso, não é infreqüente encontrarmos resultados discordantes quando duas técnicas são utilizadas num mesmo conjunto de isolados (BLUMBERG *et al.*, 1992; BINGEN, DENAMUR, ELION, 1994; NATH *et al.*, 1995). É difícil, então, saber qual técnica é a correta. Alcançar esta conclusão exige criteriosa interpretação por parte do pesquisador.



2. OBJETIVOS

- Identificar o par de iniciadores (“primers”) dirigido à região genômica 16S–23S mais adequado à caracterização genotípica de cepas de *Staphylococcus aureus*.
- Avaliar tipabilidade, reprodutibilidade e poder discriminatório da reação de ribotipagem por PCR, utilizando o conjunto de iniciadores definido.
- Determinar os perfis genotípicos de isolados de *Staphylococcus aureus* oxacilina sensíveis e oxacilina resistentes obtidos de um hospital geral.



3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ORGANIZAÇÃO DO ESTUDO

O presente estudo foi dividido em três etapas, a saber:

- I. Padronização da técnica de PCR e escolha do par de iniciadores.
- II. Determinação de atributos.
- III. Análise genotípica de amostras colhidas de um ambiente hospitalar.

3.2. ETAPA I – PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR E ESCOLHA DO PAR DE INICIADORES

3.2.1. Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído por técnica adaptada de VAN SOOLINGEN, HAAS, KREMER, 1999 (FORTALEZA, 1999). As amostras eram semeadas em meio líquido (BHI), incubadas a 37° C e, após doze horas, plaqueadas em ágar sangue e novamente incubadas a 37° C. Em 18 a 24 horas era possível ter um bom crescimento com colônias isoladas. Uma dessas era, então, ressemeada em 5ml de BHI em tubo de polipropileno e incubada por 12 horas a 37° C.

A inativação das bactérias era feita por aquecimento (80° C, por 20 min). Essa suspensão era centrifugada a 5000 rpm por 5 min e o precipitado ressuspendido em 1ml de solução GTE (Glicose 50mM, Tris 25mM, EDTA 10mM, pH 8,0). Repetia-se este procedimento três vezes e a última diluição era feita com 400 µl de TE (Tris 10 mM, EDTA 10 mM, pH 8,0). A suspensão era transferida para um tubo de microcentrífuga.

O processo de extração prosseguia com a adição de 100 µl de Lisozima (concentração de 10 mg/ml) e a suspensão era mantida a 37° C por 1 hora. Acrescentavam-se 70 µl de Sódio Dodecil Sulfato (SDS) a 10 % e 6 µl de Proteinase K (10 mg/ml) e a solução era incubada por 10 min a 65° C. Adicionavam-se 100 µl de NaCl 5M e, em seguida, 100 µl de solução de 10g Brometo de N-cetil-N,N,N-trimetil amônio (CTAB) e 4,1g de NaCl/100ml de água destilada, pré-aquecida a 65° C por 10 min. A solução era agitada até tornar-se leitosa e incubada por 10 min a 65° C.

O processo de separação do DNA e do conteúdo proteico prosseguia acrescentando-se 750 µl de solução de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). O tubo de microcentrífuga era agitado por 10 segundos e a solução centrifugada a 12 000 rpm por 5 min. Podia-se visualizar três fases no tubo. O sobrenadante era transferido para um novo tubo e a precipitação de ácidos nucleicos realizada pela adição de 1000 µl de etanol a 100%. O material era homogeneizado delicadamente, incubado por 30 min a -20° C e, em seguida, centrifugado a 12 000 rpm por 15 min. Notava-se um precipitado no fundo do tubo. O sobrenadante era desprezado e o precipitado lavado em 1000 µl de etanol a 70%. Repetia-se a centrifugação e o descarte do sobrenadante. O tubo aberto era incubado em estufa seca a 40° C por 20 min para que o precipitado secasse e, em seguida, ressuspenso em 50 µl de TE (pH 8,0). O DNA era mantido em refrigeração a 4° C até a sua utilização.

3.2.2. Quantificação e diluição do DNA

A concentração de DNA nas amostras era medida por espectrofotometria com luz ultravioleta, comprimento de onda de 260 nm (Genequant II, Amersham Pharmacia Biotech, USA). As amostras, uma vez quantificadas, eram rediluídas em TE pH 8,0 até a concentração final de 100 ng/µl e mantidas em congelador a -18° C até seu emprego.

3.2.3. Amplificação por PCR

As amplificações foram realizadas em termociclador (Perkin-Elmer 2400, USA) com volume final de reação de 50 µl. Empregaram-se três isolados de *S. aureus* escolhidos ao acaso de nosso banco de bactérias para a fase de escolha dos pares de iniciadores e do protocolo de reação.

O primeiro protocolo testado (iniciador A) empregava seqüências descritas por GÜRTLER & STANISICH (1996). Escolheram-se as seqüências mais próximas às extremidades do espaçador entre as porções 16S e 23S do DNA ribossomal. Os iniciadores empregados foram: 5'-TTG TAC ACA CCG CCC GTC-3' e 5'-TGC CAA GGC ATC

CAC CGT-3' (Gibco). A solução de reação continha 200 ng do DNA fonte, 100 pmoles de cada iniciador, 2,5 U de Taq-DNA polimerase (Amersham Pharmacia Biotech), Nucleotídeos trifosfato (dATP, dTTP, dGTP e dCTP; Amersham Pharmacia Biotech) 200 µM cada um, 5 µl de Solução Tampão 10 vezes (KCL a 500 mM, MgCl₂ a 15 mM e Tris-HCl a 100 mM, pH 9,0; Amersham Pharmacia Biotech) e água milli-Q para atingir o volume de 50 µl. Era feito um aquecimento inicial a 94° C por 5 min, seguidos de 40 ciclos de: desnaturação a 94° C por 1 min, anelamento a 55° C por 1 min e extensão a 72° C por 2 min. A extensão do último ciclo era aumentada em 7 min. Os produtos da amplificação foram estocados a -18° C até sua separação por eletroforese.

O segundo protocolo (iniciador B) utilizava as seguintes seqüências: 5'-TTG TAC ACA CCG CCC GTC-3' e 5'-GGT ACC TTA GAT GTT TCA GTT C-3' (Gibco), que foram descritos por KOSTMAN *et al.* (1992). As concentrações de reagentes e condições de reação eram idênticas às do protocolo anterior.

A terceira reação proposta (iniciador C) seguiu protocolo descrito por JENSEN, WEBSTER, STRAUS (1993). Os oligonucleotídeos iniciadores possuíam as seguintes seqüências: 5'-GAA GTC GTA ACA AGG-3' e 5'-CAA GGC ATC CAC CGT-3' (Gibco). O volume final de reação também era de 50 µl e com os seguintes constituintes: 100 ng do DNA fonte, 100 pmoles de cada iniciador, 2,5 U de Taq-DNA polimerase (Amersham Pharmacia Biotech), Nucleotídeos trifosfato (dATP, dTTP, dGTP e dCTP; Amersham Pharmacia Biotech) a 100 µM cada um, 5 µl de Solução Tampão 10 vezes (KCL a 500 mM, MgCl₂ a 15 mM e Tris-HCl a 100 mM, pH 9,0; Amersham Pharmacia Biotech) e água milli-Q para completar o volume de reação. Era feito um aquecimento inicial a 94° C por 5 min, seguidos por 25 ciclos: desnaturação a 94° C por 1min, anelamento a 55° C por 7 min e extensão a 72° C por 2 min. A extensão do último ciclo era aumentada em 7 min. Como nos protocolos anteriores, os produtos de PCR foram estocados a -18° C até sua separação por eletroforese.

Em cada um dos ensaios de PCR, era incluída uma reação de controle negativo, onde o DNA fonte era substituído por água destilada.

Uma visão esquemática da região amplificada, bem como os iniciadores utilizados podem ser vistos na Figura 1 e na Tabela 1.

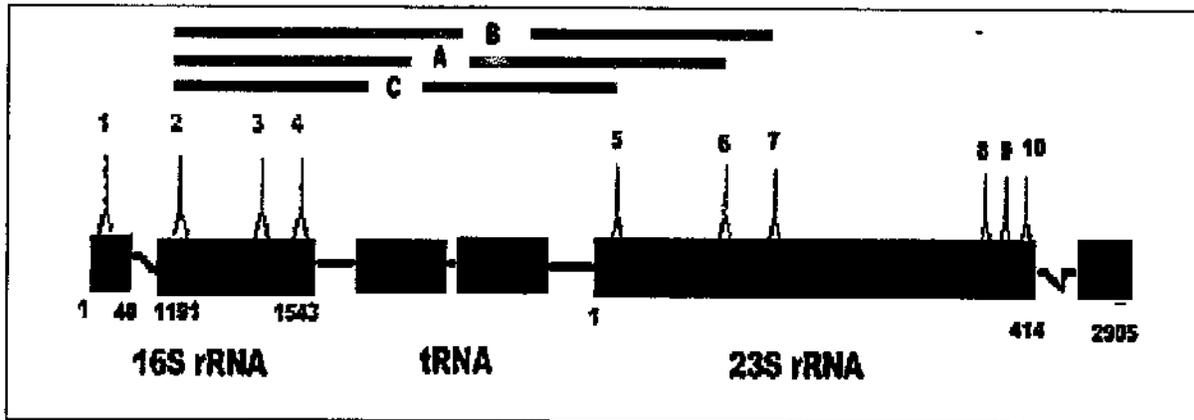


Figura 1. Representação esquemática da porção 16S-23S do DNA ribossomal e região de amplificação de cada um dos pares de iniciadores utilizados na fase de escolha do protocolo de reação.

Tabela 1. Pares de iniciadores empregados na etapa de escolha do protocolo de reação.

Iniciadores	Região de amplificação	Referência
5'-TTG TAC ACA CCG CCC GTC-3'	A	GÜRTLER & STANISICH (1996)
5'-TGC CAA GGC ATC CAC CGT-3'		
5'-TTG TAC ACA CCG CCC GTC-3'	B	KOSTMAN <i>et al.</i> (1992)
5'-GGT ACC TTA GAT GTT TCA GTT C-3'		
5'-GAA GTC GTA ACA AGG-3'	C	JENSEN, WEBSTER, STRAUS (1993)
5'-CAA GGC ATC CAC CGT-3'		

3.2.4. Eletroforese

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2%, previamente impregnado com Brometo de Etideo a 0,5 µg/ml, juntamente com marcador de 100 pb (Gibco). Foi utilizada corrente elétrica de 85 V por 4 horas a temperatura ambiente.

As imagens foram obtidas com câmera digital e armazenadas em banco de dados para posterior análise.

3.3. ETAPA II – DETERMINAÇÃO DE ATRIBUTOS

Nesta etapa utilizaram-se os isolados relacionados abaixo. A estratégia para a definição da reprodutibilidade da técnica também é apresentada a seguir.

A. Três isolados obtidos de hemoculturas de um mesmo paciente com diagnóstico de endocardite por *S. aureus*, atendido no HC-Unicamp, obtidas com intervalo de 24 a 48 horas entre as coletas. Amostras designadas P1, P2, P3.

B. Três isolados obtidos da cepa de *S. aureus* ATCC - 25923 após 1, 10 e 30 passagens em meio de cultura líquida (BHI) e incubadas por 18 horas após cada semeadura. Amostras designadas R1, R10, R30.

C. Seis amostras de *S. aureus*, cedidas gentilmente por PADOVEZE (1998), que correspondem a diferentes perfis genotípicos pela técnica de PFGE. Amostras designadas C1, C2, C3, C4, C5, C6.

3.4. ETAPA III – ANÁLISE GENOTÍPICA DE AMOSTRAS COLHIDAS DE UM AMBIENTE HOSPITALAR

Foram utilizados no estudo todos os isolados identificados pelo Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Municipal Dr. Mário Gatti, HMMG, como *Staphylococcus aureus*, no período de 22 de junho de 2000 a 12 de setembro de 2000. A identificação da

espécie se deu por métodos convencionais para esse propósito. As provas de suscetibilidade a antimicrobianos foram realizadas pelo método de difusão em disco de KYRB & BAUER. Utilizou-se painel de antimicrobianos composto por: penicilina, oxacilina, gentamicina, cloranfenicol, eritromicina, clindamicina, vancomicina, ciprofloxacina e sulfametoxazol-trimetoprina. Os isolados eram considerados sensíveis ou resistentes de acordo com as recomendações do “National Committee for Medical Laboratory Standards”, NCCLS, de 2000 (KLOODS & BANNERMAN, 1999; NCCLS, 2000a; NCCLS, 2000b).

3.4.1. Características gerais do Hospital Municipal Dr. Mário Gatti (HMMG)

O HMMG é um hospital de 178 leitos, referência do município de Campinas para internação clínica, cirúrgica e pediátrica. É um hospital terciário com unidades de terapia intensiva adulta e pediátrica. O prédio do hospital conta com quatro andares de unidades de internação. Na época do estudo, o primeiro andar era ocupado pela UTI adulto e a Ala B com os leitos das especialidades de ortopedia, cirurgia buco-maxilo-facial, urologia, cirurgia vascular e cirurgia plástica. O segundo andar abrigava a Ala D com os leitos das especialidades de cirurgia geral, neurologia clínica e neurocirurgia. Nesse andar havia quartos destinados a procedimentos diagnósticos como ultra-sonografia, broncoscopia e endoscopia. O terceiro piso abrigava a Ala P, destinada à retaguarda de pacientes clínicos e cirúrgicos do pronto-socorro, e a Ala E com os leitos da clínica médica e moléstias infecciosas. O quarto andar era ocupado pela enfermaria de pediatria e pela UTI pediátrica. São realizados atendimentos ambulatoriais em prédio separado da unidade de internação.

O corpo clínico é formado por médicos contratados pela Prefeitura do Município de Campinas e médicos-residentes.

O laboratório de Patologia Clínica é responsável por exames dos pacientes internados e ambulatoriais. Eventualmente são encaminhados exames da rede básica de saúde de Campinas para identificação nesse laboratório.

3.4.2. Armazenamento dos isolados

Uma ou duas colônias, identificadas em placa de ágar-sangue, foram ressemeadas em BHI com glicerol a 10%, incubadas por uma noite a 37° C e mantidas estocadas a -20° C até seu processamento.

3.5. ESTIMATIVA DE PESO MOLECULAR DOS AMPLIFICADOS E ANÁLISE

As imagens foram analisadas através de programa de computador próprio para o cálculo do tamanho das bandas (Kodak Digital Science 1D Image Analysis Software). Desta forma, para cada isolado determinou-se o tamanho dos amplificadores, “amplicons”, obtidos através da reação de amplificação. Essas informações foram comparadas por meio de coeficiente de similaridade por “Simple Matching” em programa de computador (Treecon for Windows, Yves van der Peer, University of Antwerp, Bélgica). Os dendrogramas foram construídos utilizando agrupamentos UPGMA (“Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages”).



4. RESULTADOS

4.1. ETAPA I – PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR E ESCOLHA DO PAR DE INICIADORES

Observa-se que as amplificações empregando o par de iniciadores descrito por JENSEN *et al.*, 1993, produziavam fragmentos menores, fazendo com que o espaçamento entre as bandas após a eletroforese fosse maior. Esse fato facilitava a interpretação. Optou-se por utilizar este protocolo em todas as demais fases deste estudo.

Na Figura 2 pode-se ver os produtos de amplificação obtidos com cada um dos iniciadores testados.

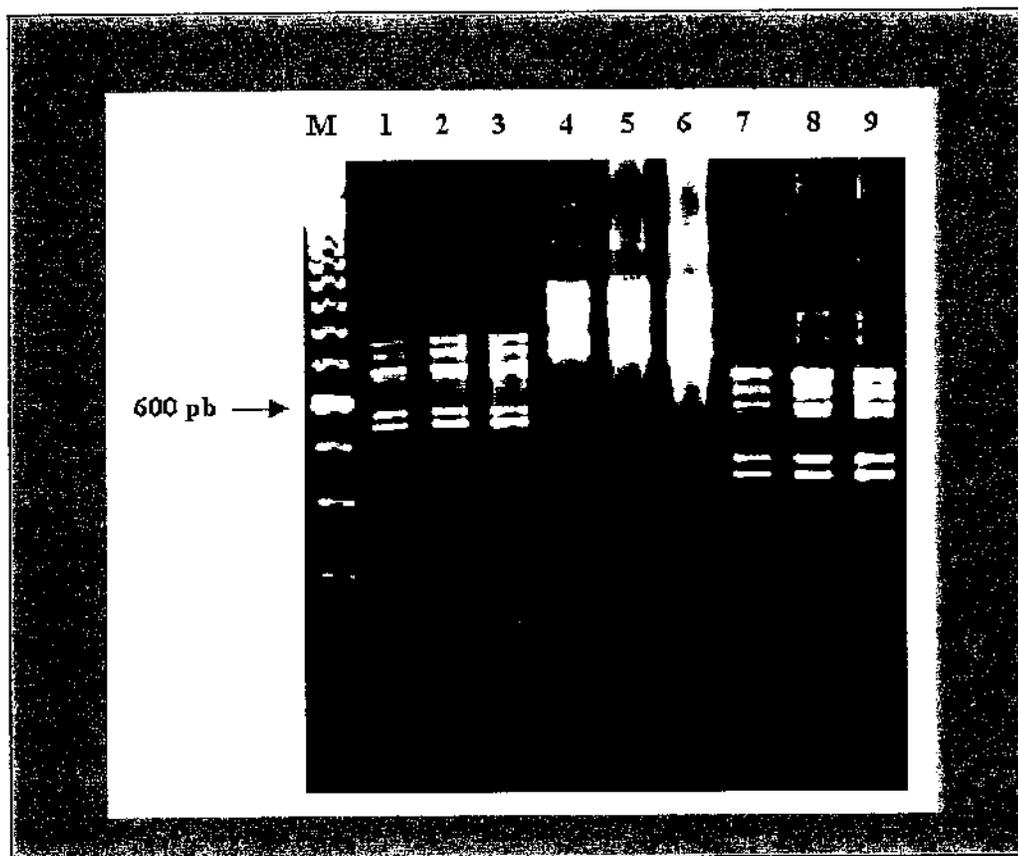


Figura 2. Produtos de amplificação, a partir de 3 amostras tomadas ao acaso com os três pares de iniciadores empregados na fase de escolha do protocolo de reação. Canaleta M, marcador de peso molecular de 100 pb (Gibco); canaletas 1-3, amplificação com o par de iniciadores A; canaletas 4-6, com o par B e canaletas 7-9, com o par C.

4.2. ETAPA II – DETERMINAÇÃO DE ATRIBUTOS

As amostras de hemocultura provenientes de um mesmo paciente, designadas de P1 a P3, são de isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina e possuem o mesmo padrão de susceptibilidade aos antimicrobianos testados.

Os isolados dos repiques da cepa ATCC, designados de R1, R10 e R30, mostravam ser sensíveis a todos os antimicrobianos de nosso painel. No processo de repique da cepa ATCC, a partir do oitavo repique, era possível notar dois aspectos macroscópicos das colônias na placa de ágar-sangue: uma colônia de diâmetro menor e coloração bem esbranquiçada e uma colônia maior e acinzentada. Todos os cuidados para evitar contaminação foram tomados, afastando, assim, essa possibilidade. Optou-se por seguir o processo de ressemeadura em separado para cada uma das ‘linhagens’ de bactéria. Dessa maneira, no décimo e trigésimo repiques havia um representante de cada aspecto macroscópico de colônia, chamados de R1, R10B, R10C, R30B e R30C, onde B representa a colônia branca e C, a cinza.

As amostras cedidas por PADOVEZE, 1998, designadas de C1 a C6, apresentavam padrões de susceptibilidade variados. Destaca-se que as amostras C1 e C2 eram sensíveis à oxacilina e as amostras C3 a C6 eram resistentes a este antibiótico. Esses dados podem ser vistos na Tabela 2.

A técnica de ribotipagem por PCR mostrou padrões bem definidos e inequívocos para as amostras designadas de P e R. Os padrões obtidos para as amostras de hemoculturas de um mesmo paciente foram idênticos e podem ser visualizados na Figura 3. O mesmo ocorreu com as amostras da cepa ATCC após repiques sucessivos. Não se observam diferenças nos padrões genotípicos entre as amostras de colônias de fenótipo branco ou cinza. Esses perfis genotípicos podem ser vistos na Figura 4.

As seis amostras do HC-Unicamp, cedidas por PADOVEZE, 1998, mostraram três padrões distintos. Cada uma das duas cepas oxacilina sensíveis tinha um padrão próprio. É possível observar que todas as amostras oxacilina resistentes apresentavam o mesmo padrão. Os perfis genotípicos obtidos com estes isolados podem ser vistos na Figura 4. Os pesos moleculares dos amplificadores estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2. Distribuição das cepas tipadas por PFGE (C1 a C6) e resultados obtidos com a ribotipagem por PCR.

Isolado	Sensibilidade à oxacilina	PFGE*	Tamanho das bandas geradas por ribotipagem por PCR (pb)
C1	S	H	600, 618.
C2	S	G	400, 460, 525, 550, 582.
C3	R	F	440, 480, 571, 582, 618, 660.
C4	R	A	440, 480, 571, 582, 618, 660.
C5	R	B	440, 480, 571, 582, 618, 660.
C6	R	I	440, 480, 571, 582, 618, 660.

* Nomenclatura adotada por PADOVEZE, 1998.

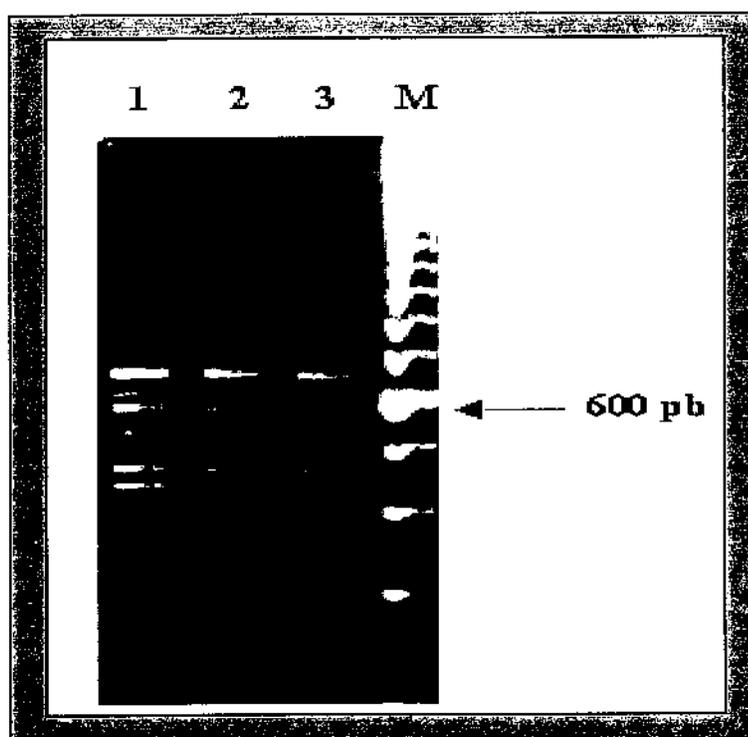


Figura 3: Perfil genotípico de 3 amostras de *S. aureus* de um mesmo paciente colhidas em dias diferentes. Canaleta M, marcador de peso molecular de 100 pb (Gibco), canaletas 1-3, amostras amplificadas.

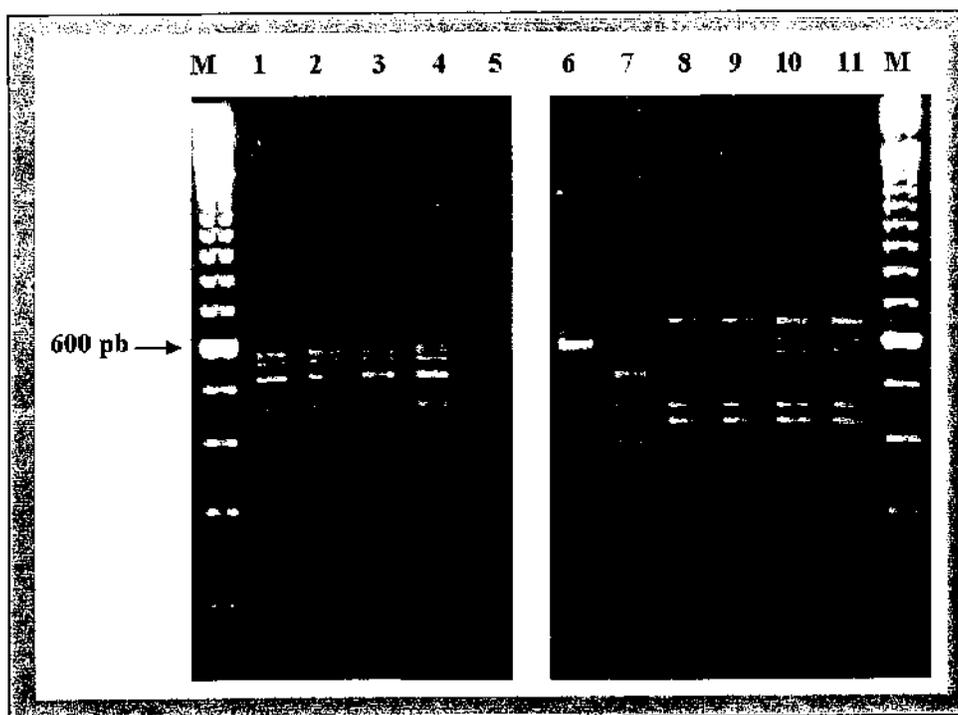


Figura 4: Perfil genotípico das amostras R e C amplificadas por ribotipagem por PCR. Canaletas M, marcador de peso molecular de 100 pb (Gibco); canaletas 1-5, isolados R1, R10B, R10C, R30B e R30C, respectivamente; canaletas 6-11, isolados C1 a C6, respectivamente.

4.3 ETAPA III – ANÁLISE GENOTÍPICA DE AMOSTRAS COLHIDAS DE UM AMBIENTE HOSPITALAR

Foi coletado um total de 88 amostras de *Staphylococcus aureus* do HMMG durante o período de estudo. O *S. aureus* representou 15% dentre todos os agentes etiológicos isolados e identificados nos meses de junho a setembro de 2000. Pôde-se isolar amostras em todas as unidades de internação do hospital. A frequência relativa de cada unidade variou de 1,1% (UTI Pediátrica) a 25% do total de amostras (UTI Adulto e Ala D, cada uma destas unidades).

Quanto à susceptibilidade à oxacilina, encontraram-se 27 isolados sensíveis à oxacilina (30,7%) e 61 isolados resistentes a este antibiótico (69,3%). Foi possível constatar a presença de isolados de *S. aureus* resistentes à oxacilina em amostras de 3 pacientes não

internados: JM2, JRS e PV. Esses pacientes, porém, já haviam sido internados no hospital no ano anterior ao período de coleta de amostras. Esses resultados podem ser vistos na Tabela 3.

Tabela 3. Distribuição dos isolados de *S. aureus*, segundo o local de isolamento e sensibilidade à oxacilina

Unidade Hospitalar	Isolados Oxacilina Sensíveis	Isolados Oxacilina Resistentes	Total
Ala B	3	6	9
Ala D	2	20	22
Ala E	3	11	14
Pediatria	3	1	4
PS	1	0	1
UTI	2	20	22
UTI Pediátrica	1	0	1
Externo	12	3	15
Total	27 (30,7%)	61 (69,3%)	88 (100%)

Dezesseis pacientes tiveram mais de uma amostra de *S. aureus* considerada no estudo. O número de amostras para cada um destes pacientes variou de duas a cinco, colhidas com intervalos que atingiram 34 dias. Estes isolados apresentavam o mesmo padrão de antibiograma com exceção de um paciente (VE), que teve três amostras coletadas e destas, duas eram resistentes apenas à penicilina e a terceira era resistente a todos os antibióticos do painel empregado, com exceção da vancomicina.

Todas as amostras provenientes do laboratório de patologia clínica do HMMG foram tipáveis pela técnica de ribotipagem por PCR. O número de amplificadores gerados pela reação de PCR de cada isolado variou de três a nove com pesos moleculares de 360 a 733 pb.

Foram identificados 22 padrões diferentes de bandas quando se consideram todas as amostras empregadas no estudo. O coeficiente de similaridade por “Simple Matching” variou de 40 a 100%. Isolados provenientes de um mesmo paciente apresentaram o mesmo padrão de bandas, exceto no caso do paciente VE. As três amostras colhidas deste paciente foram provenientes de diferentes locais e colhidas em dias também diferentes: secreção traqueal (31/07/00), secreção de ferida cirúrgica (31/07/00) e “swab” nasal (08/08/00). A amostra de secreção de ferida era a única resistente à oxacilina. Cada uma das amostras apresentou um padrão próprio de bandas após a amplificação por PCR.

Se se considerar apenas as 61 amostras de *S. aureus* resistentes à oxacilina, pode-se observar a existência de apenas um padrão genotípico. Aqui estão incluídas as amostras colhidas de um mesmo paciente em mais de uma ocasião, com exceção das de VE. Nota-se que todas guardavam o mesmo padrão de bandas mesmo com coletas a intervalos de até 34 dias. A Figura 5 ilustra o padrão genotípico dos isolados oxacilina resistentes.

Quando são estudadas apenas as amostras de bactérias sensíveis à oxacilina, 27 isolados, observam-se maiores variações nos resultados. Puderam ser definidos 22 padrões distintos com similaridade variando de 45 a 100% por “Simple Matching”. A Figura 6 ilustra parte dos padrões genotípicos obtidos com os isolados oxacilina sensíveis. Duas amostras do grupo de *S. aureus* oxacilina sensíveis, CB e TCGG, apresentaram padrão de bandas iguais ao das amostras oxacilina resistentes.

Nas Figuras 7 e 8 podem ser vistos os dendrogramas construídos a partir do coeficiente de similaridade por “Simple Matching” entre os isolados oxacilina sensíveis e entre todos os isolados do HMMG, respectivamente.

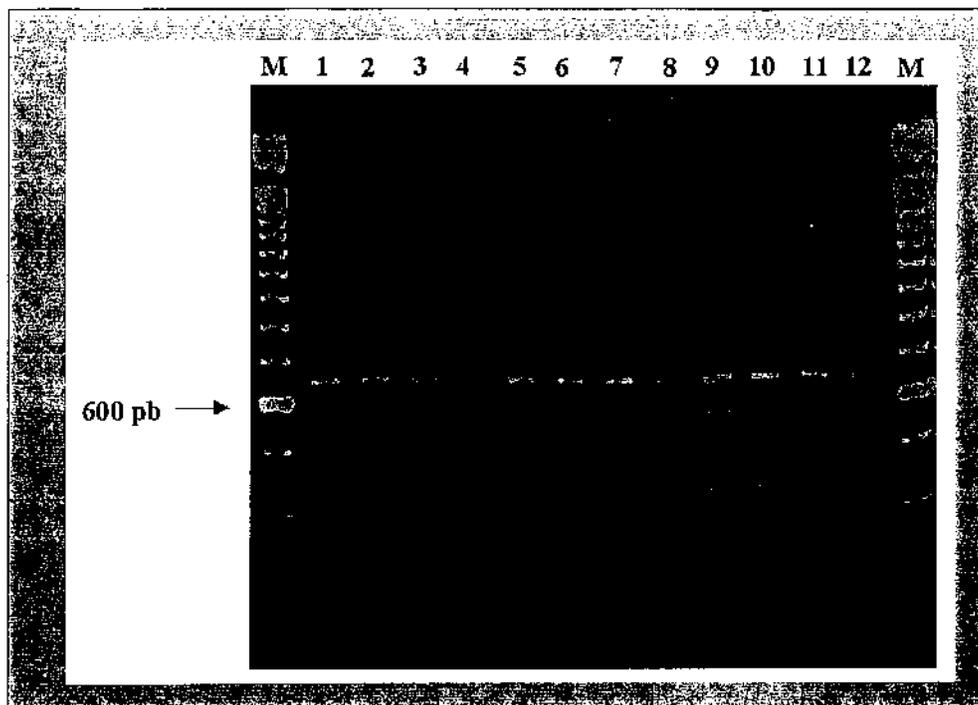


Figura 5. Padrão genotípico de 12 amostras de *S. aureus* oxacilina resistentes. Canaletas M, marcador de peso molecular de 100 pb (Gibco); canaletas 1-12, 12 isolados oxacilina resistentes.

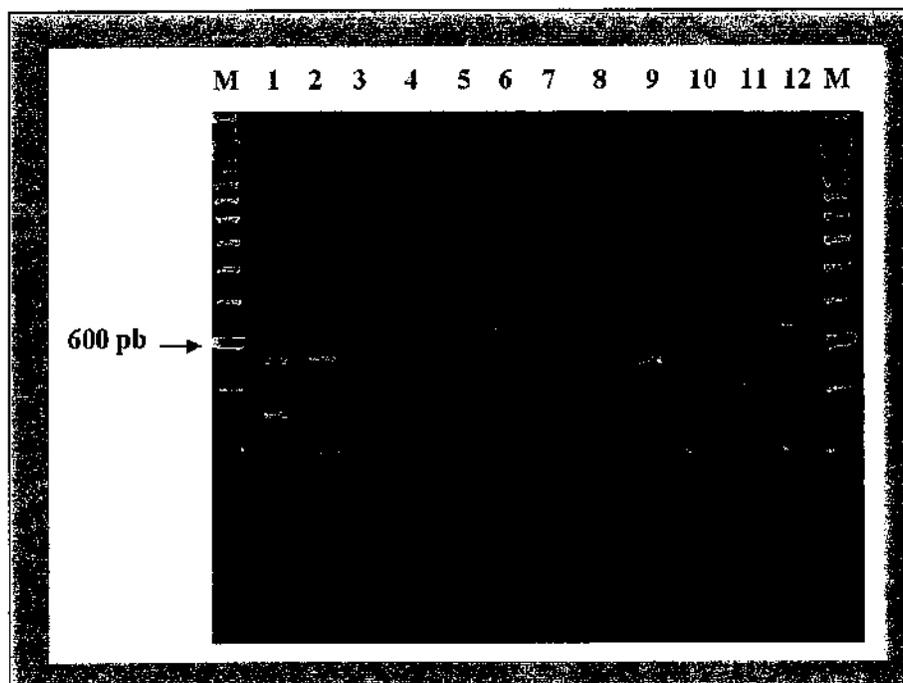


Figura 6. Padrão genotípico de amostras de *S. aureus* oxacilina sensíveis. Canaletas M, marcador de peso molecular de 100 pb (Gibco); canaletas 1-12, 12 isolados oxacilina sensíveis.

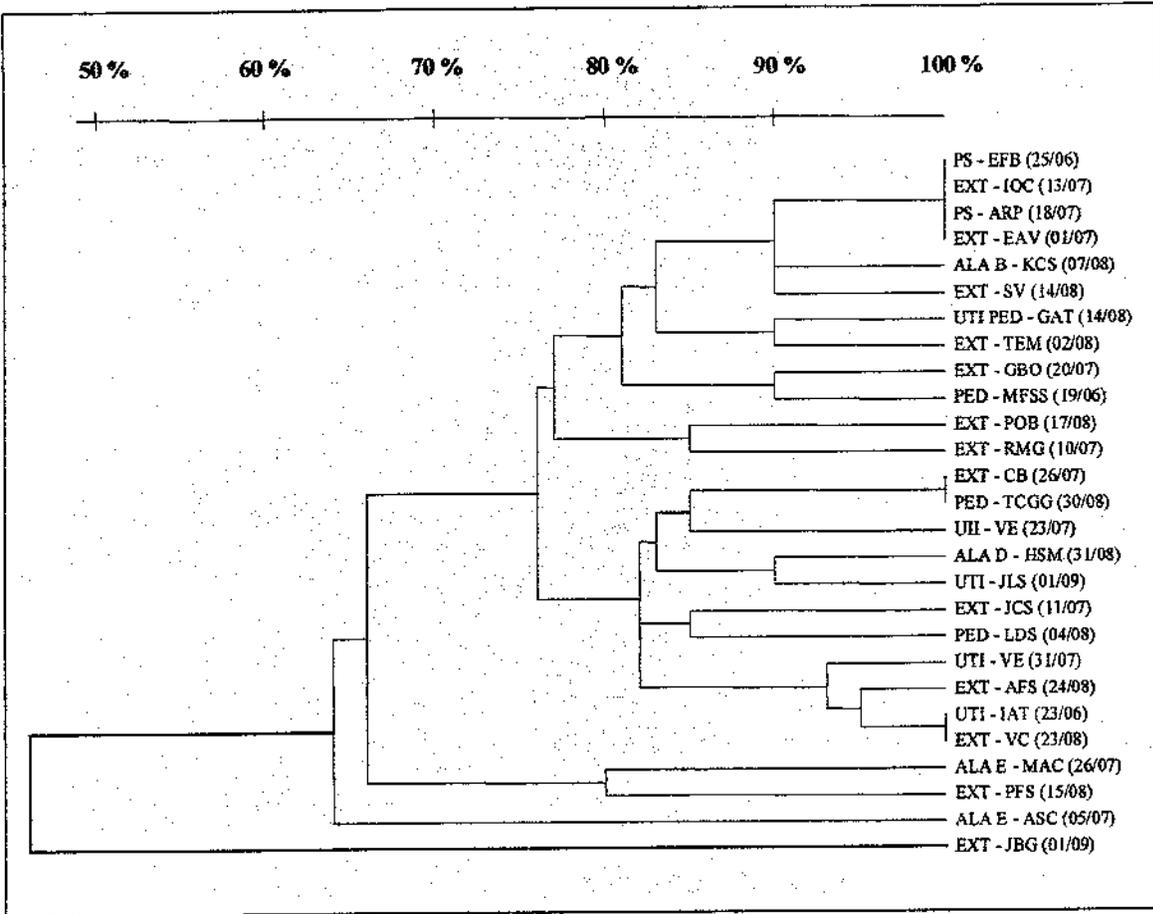


Figura 7: Dendrograma montado a partir do coeficiente de similaridade por “Simple Matching” para os isolados oxacilina sensíveis obtidos do HMMG (Treecon Software).

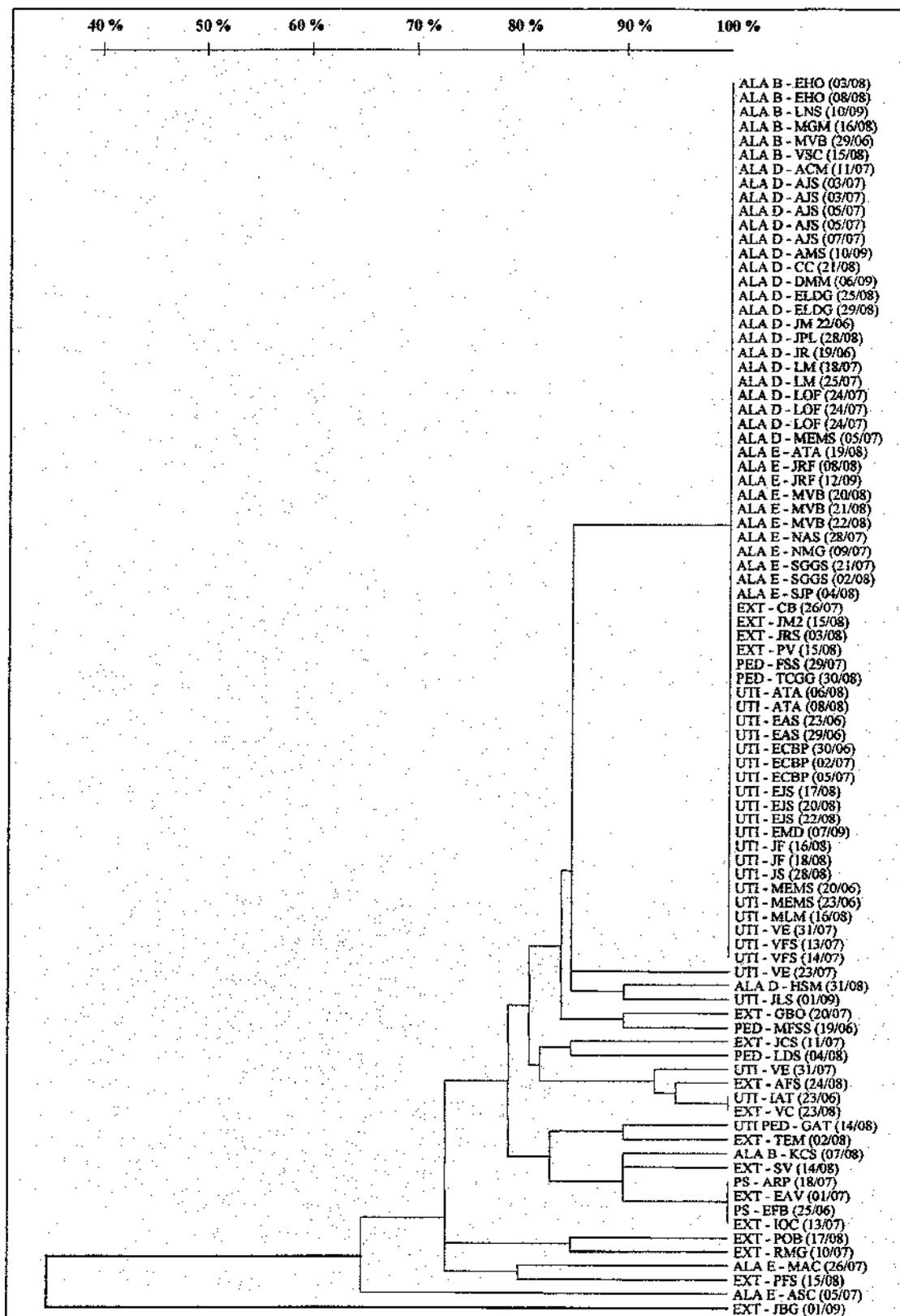


Figura 8: Dendrograma montado a partir do coeficiente de similaridade por “Simple Matching” para todos os isolados do HMMG (Treecon Software).



5. *DISCUSSÃO*

O *Staphylococcus aureus* é agente etiológico bastante comum em infecções comunitárias e no ambiente hospitalar. Provoca desde infecções leves de pele e tecido subcutâneo a infecções graves como endocardites bacterianas e septicemias. Tais fatos se devem, em parte, à sua capacidade em sobreviver no meio ambiente por longos períodos de tempo, mesmo em condições não ideais para o crescimento bacteriano (WALDVOGEL, 1995). É sabido, também, que esta espécie pode colonizar intermitentemente o organismo humano, favorecendo-se de eventos em que haja quebra das barreiras naturais de proteção para invadir e multiplicar-se no organismo.

Dados do “National Nosocomial Infections Surveillance System” (NNISS) revelam que o *S. aureus* é responsável por 12,6% das infecções de corrente sanguínea em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) dos hospitais participantes deste sistema de vigilância, ocupando o terceiro lugar dentre os agentes mais frequentemente isolados. Quando se consideram apenas as pneumonias em pacientes internados em UTI, o percentual de participação deste agente sobe para 18,1% e ele passa a ocupar o primeiro lugar dentre todos os agentes etiológicos desta parcela de infecções (NATIONAL..., 1999).

Vem merecendo atenção o crescente isolamento de cepas resistentes à oxacilina, SAMR, no ambiente hospitalar e na comunidade. No período de janeiro a maio de 1999, 54,5% dos *S. aureus* isolados em pacientes internados em UTIs dos hospitais participantes do NNISS eram resistentes à oxacilina (NATIONAL..., 1999). Esse fato acarreta dificuldades terapêuticas para as infecções estafilocócicas e o aumento dos custos de tratamento. Em alguns hospitais da cidade de Nova Iorque, o SAMR é responsável por 29% das infecções hospitalares e 50% das mortes associadas à infecção hospitalar (RUBIN *et al.*, 1999).

A busca de métodos que permitam relacionar isolados de bactérias tem muitas e importantes aplicações na área médica e de epidemiologia hospitalar. É através desse tipo de metodologia que podemos avançar no entendimento de mecanismos fisiopatológicos e de dinâmica epidemiológica de infecções, por exemplo. Sem nenhuma dúvida, estes representam uma grande arma para o melhor conhecimento da disseminação de um dado microorganismo, quer na comunidade, quer no ambiente hospitalar. Essas técnicas tornam possível a verificação de hipóteses sobre vias de transmissão, reservatórios de infecção e avaliação de medidas de controle adotadas frente a surtos e epidemias (BINGEN *et al.*, 1994; MASLOW *et al.*, 1995; HARTSTEIN, LEMONTE, IWAMOTO, 1997; WEBER *et al.*, 1997).

Nas últimas décadas, houve uma crescente busca de métodos que pudessem permitir o relacionamento de isolados de *Staphylococcus aureus*. Técnicas fenotípicas, como antibiograma e fagotipagem, foram substituídas por técnicas genotípicas, como PFGE, já que estas apresentam maior poder discriminatório e melhor tipabilidade (BANNERMAN *et al.*, 1995).

Isolados de *S. aureus* resistentes à oxacilina continuam sendo objeto de grande desafio e dificuldade para pesquisadores no que se refere às técnicas de tipagem (PREVOST, JAULHAC, PIEMONT, 1992; JORGENSEN *et al.*, 1996). Mesmo aquelas de base molecular têm dificuldades para agrupar isolados em cepas. A razão para isto parece estar no fato desta subpopulação de *Staphylococcus aureus* ser de aparecimento relativamente recente dentro da espécie, não tendo havido suficiente tempo para que isolados pudessem adquirir características próprias e, portanto, diferenciar-se em clones com características distintas (KREISWIRTH *et al.*, 1993).

A necessidade de métodos de tipagem dotados de bons atributos faz-se presente pela alta prevalência desse agente como etiologia de diversas doenças e pelo fato de possuírem mecanismos de transmissão não tão bem elucidados. Pode-se observar, por exemplo, que uma cepa pode disseminar-se em diferentes hospitais de uma dada área geográfica, talvez por intermédio de profissionais da área da saúde que exerçam atividades em diferentes instituições (ROBERTS *et al.*, 1998; TEIXEIRA *et al.*, 1995).

Não há dúvidas de que as técnicas de tipagem de bactérias são de grande auxílio na investigação da disseminação de *S. aureus* dentro do ambiente hospitalar (STRUELENS *et al.*, 1992; FANG *et al.*, 1993; LESSING, JORDEN, BOWLER, 1995). A técnica de PFGE é tida como de escolha para tipagem de *S. aureus*, especialmente para isolados resistentes à oxacilina, por laboratórios de referência como o CDC (BANNERMAN *et al.*, 1995). PREVOST *et al.*, 1992, compararam-na com a ribotipagem clássica, encontrando superioridade no poder discriminatório da PFGE. São levantadas, porém, limitações da técnica como a necessidade de grande investimento em equipamentos e tempo para a obtenção de resultados, que pode atingir 3 a 4 dias a partir de seu isolamento em placas de meio de cultura. Esse fato pode atrasar a tomada de decisões sobre medidas de controle em situações de surtos.

Merece menção, também, a atual preocupação de autores como SHOPSIN & KREISWIRTH, 2001, que comentaram a dificuldade em se organizar banco de dados para técnicas baseadas em comparação de imagens, como é o caso da PFGE. Essa característica da técnica dificulta em muito a comparação interlaboratorial dos resultados, apesar das recomendações de TENOVER *et al.* (1995), no que se refere a critérios de interpretação. Aqueles pesquisadores citam as vantagens, em relação à PFGE, das técnicas baseadas no polimorfismo do gene da Proteína A, verificado através de seqüenciamento de fragmentos amplificados do genoma bacteriano. Esta técnica foi descrita como método para a tipagem de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina por FRÉNAVY *et al.* (1996), apresentando maior poder discriminatório e melhor tipabilidade quando comparado à fagotipagem.

VAN BELKUM *et al.* (1996) questionaram se as diferenças nas seqüências de genes seriam suficientes para classificar isolados em clones, já que foram frutos de eventos genéticos únicos e de ocorrência ao acaso. É interessante observar que o conceito de clonalidade guarda claramente estreita dependência do critério adotado e, por vezes, há dúvidas se um conjunto de características pode ou não definir um clone ou cepa.

Diversos autores buscaram estratégias para a tipagem de *S. aureus* que fossem de elaboração mais simples, de menor custo e que apresentassem resultados em menor prazo de tempo (BRANCHINI *et al.*, 1993; FANG *et al.*, 1993; DEL VECHIO *et al.*, 1995; GÜRTLER & BARRIE, 1995). Os resultados obtidos com abordagens diferentes da PFGE são bastantes diversos. Embora TENOVER *et al.*, 1994, tenham mostrado superioridade no referente a poder discriminatório da PFGE para *Staphylococcus aureus*, os autores enfatizaram que existe complementaridade entre os métodos de tipagem molecular, isto é: duas técnicas diferentes realizadas conjuntamente fornecem resultados mais válidos que cada uma isoladamente. Além disso, deve-se ter em mente que um teste de tipagem é complementar a uma investigação epidemiológica clássica, servindo para comprovar hipóteses levantadas por esta última (FANG *et al.*, 1993; MASLOW *et al.*, 1993; JARVIS, 1994).

Em 1988, STULL *et al.* descreveram o uso da região do DNA que codifica as porções 16S e 23S do RNA ribossomal como ferramenta para a tipagem de bactérias Gram negativas: *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas cepacia*. Nesse

trabalho já se falava que a técnica de ribotipagem, como passa a ser designada, poderia ser aproveitada para outras espécies. Como inconveniente e dificuldade para a sua difusão em laboratórios clínicos, ela exigia a utilização de material radioativo para a visualização de bandas através da técnica de hibridação por “Southern blot”.

Em 1995, KOSTMAN *et al.* propuseram o estudo da mesma região do genoma das eubactérias através da amplificação por PCR. Os resultados foram bastante promissores pois tratava-se de uma metodologia mais simples que a PFGE e não empregava material radiativo, já que as bandas podiam ser visualizadas no gel de eletroforese após o emprego de um intercalante como o brometo de etídeo.

O trabalho de KOSTMAN *et al.* (1995) gerou divergências na literatura. CARTWRIGHT, 1995, criticou o valor deste método de tipagem para *S. aureus* resistente à oxacilina e *Enterococcus faecium*, pois encontrou muito baixo poder discriminatório quando o aplicou em suas amostras. Em resposta, KOSTMAN & STULL argumentaram que a aplicabilidade e o valor de uma técnica estavam intimamente relacionados com a situação com a qual ela é empregada e que em certas situações a ribotipagem por PCR seria capaz sim de apresentar resultados satisfatórios (CARTWRIGHT, 1995).

KUMARI *et al.* 1997 avaliaram a técnica de ribotipagem por PCR para *Staphylococcus aureus*, comparando-a com a PFGE em situações de surto. Nesse estudo, a genotipagem foi utilizada como complementar à investigação epidemiológica clássica e forneceu resultados bastantes satisfatórios e semelhantes para as duas técnicas empregadas.

Neste mesmo período, ganhava importância e destaque na literatura a tipagem de bactérias por técnica de RAPD e REP-PCR (STRUELENS *et al.*, 1993; VAN BELKUM *et al.*, 1995; VAN DER ZEE *et al.*, 1999). Ficava clara a busca por metodologias simples e de fácil execução. Os resultados com este método apresentavam poder discriminatório variável na dependência dos iniciadores empregados e sua grande dificuldade era estabelecer a padronização da reação, tornando os resultados reprodutíveis, tanto intralaboratorial, quanto interlaboratorial (SAULINER *et al.*, 1993).

Buscam-se, hoje, técnicas simples e exeqüíveis que possam fornecer resultados confiáveis para a tipagem de bactérias. Com o propósito de avaliar a técnica de ribotipagem por PCR, aplicou-se essa técnica em uma coleção de isolados colhidos ao longo de quase três meses em um hospital terciário. Não havia preocupação em traçar rotas de transmissão ou perfis de infecção hospitalar na instituição, mas apenas por à prova os quesitos básicos de uma técnica de genotipagem, isto é: tipabilidade, reprodutibilidade, poder discriminatório, facilidade de execução e interpretação.

A primeira etapa do trabalho foi padronizar a reação de amplificação, tornando-a capaz de fornecer resultados reprodutíveis e confiáveis. Escolheram-se os iniciadores mais próximos às extremidades dos segmentos 16S e 23S como descrito por JENSEN *et al.* (1993). Essa abordagem permitiu que os produtos da amplificação fossem menores que os obtidos com os demais iniciadores propostos (KOSTMAN *et al.*, 1992; GÜRTLER & STANISICH, 1996). O intuito desse procedimento era facilitar a etapa de análise dos resultados, pois fragmentos menores percorrem distâncias maiores no gel de agarose na fase de eletroforese. Isso permitia diferenciá-los com maior precisão, facilitando o uso de programas de computador na fase de análise dos resultados.

As condições de eletroforese, a saber: espessura do gel, concentração de agarose, voltagem do campo elétrico e tempo de corrida, foram escolhidos após inúmeras tentativas para que bandas bem determinadas e inequívocas pudessem ser visualizadas. Dessa forma, obtiveram-se os resultados apresentados no trabalho. Foi possível separar o produto de amplificação com precisão, encontrando bandas bem definidas.

A etapa seguinte foi avaliar as características de tipabilidade, reprodutibilidade e estabilidade *in vivo* da característica em estudo. Houve resultados inequívocos para as amostras empregadas na fase de padronização, fato que também se repetiu quando os oitenta e oito isolados experimentais foram empregados. Isso sem dúvida provava que se estava diante de uma excelente técnica no que se refere a estas características.

Os isolados quando tipados repetidamente, mesmo após sucessivas sementeiras em meio líquido (1, 10 e 30 passagens), mostraram o mesmo padrão de bandas como pode ser visto na Figura 4. O perfil genotípico permanecia estável mesmo quando as colônias em

placa de ágar-sangue apresentavam diferentes aspectos macroscópicos. Esse resultado comprova a boa reprodutibilidade da técnica e que se está diante de uma característica estável da bactéria. A genotipagem das três amostras de *S. aureus* de um mesmo paciente obtidas em dias diferentes serviram para demonstrar que a característica mantinha-se estável também *in vivo*, quando sujeita a pressões ambientais, como a representada pelo tratamento antimicrobiano. A obtenção do mesmo padrão de bandas para estas 3 amostras comprovou esta hipótese (Figura 3).

No início dos experimentos, observou-se a ocorrência de amplificação de DNA nas reações de controle negativos da técnica. Estas bandas fantasmas já foram encontradas por outros autores (FORTALEZA, 1999). Suspeita-se que este fato deva-se à amplificação de pequenas quantidades de DNA presentes na Taq polimerase (TYLER *et al.*, 1997). A hipótese de contaminação dos reagentes também foi levantada e a troca dos nossos reagentes acabou solucionando este problema e as bandas fantasmas deixaram de ser observadas.

A tipagem dos seis isolados de PADOVEZE, 1998, revelou três padrões de bandas. Dois deles corresponderam aos isolados oxacilina sensíveis. O terceiro foi apresentado por todos os quatros isolados oxacilina resistentes. Este achado parecia ser um indício de um baixo poder discriminatório da técnica para a tipagem de isolados de SAMR.

Passou-se, então, à etapa de coleta de isolados em uma situação de campo, através dos isolados obtidos do laboratório de patologia clínica do Hospital Municipal Dr. Mário Gatti.

A análise do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos testados revelou uma alta frequência de isolados resistentes à oxacilina, 69,3% do total. Este percentual alerta para a alta prevalência de isolados resistentes à oxacilina dentro daquele ambiente. Chamou atenção o encontro de bactérias oxacilina resistentes em 3 amostras de pacientes externos: JM2, JRS e PV. Revisados estes casos, pôde-se verificar que estes pacientes haviam tido internação hospitalar no ano anterior à coleta e atribui-se o encontro deste agente às suas internações hospitalares prévias. Não se estava, portanto, diante de isolados oxacilina resistentes 'verdadeiramente' oriundos da comunidade.

Dos 16 pacientes que apresentavam mais de uma amostra coletada no período do estudo, apenas um, VE, teve colonização por mais de um clone. Neste caso, as amostras eram provenientes de sítios não estéreis e usualmente sujeitos a colonização por diferentes cepas.

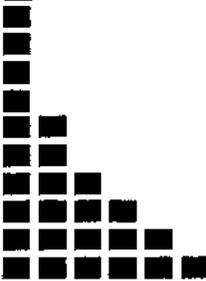
Ao se considerarem apenas os isolados oxacilina resistentes, encontrou-se apenas um padrão de amplificação de bandas pela ribotipagem por PCR. Padrão este de 5 bandas com peso molecular variando de 431 a 644 pb. São possíveis duas explicações para o fato: a técnica possui um poder discriminatório baixo, incapaz de discriminar os diferentes clones dentro da coleção empregada, ou trata-se de um único e grande clone disseminado no hospital. Não é possível responder a esta pergunta com base nos resultados deste estudo. Em primeiro lugar, porque não se trata da avaliação de uma técnica de genotipagem em isolados epidemiologicamente relacionados, com seria num surto de infecção hospitalar, situação adequada para este tipo de análise. Os isolados foram coletados seriadamente do laboratório de patologia clínica do HMMG. Em segundo lugar, seria necessário comparar a ribotipagem por PCR com outra técnica de genotipagem, por exemplo, a PFGE. Essa prática, por fugir dos objetivos deste estudo, não foi realizada. Há que se considerar também o curto período de coleta de amostras, 3 meses, o que pôde ter dificultado o aparecimento de diversidade genotípica.

As observações feitas na fase de padronização da técnica com as seis amostras do trabalho de PADOVEZE (1998) mostraram que o perfil de bandas amplificadas era o mesmo para os 4 isolados oxacilina resistentes que possuíam diferentes genótipos por PFGE. A técnica parece realmente possuir limitações no seu poder discriminatório para isolados oxacilina resistentes. Esses resultados estão em conformidade com a literatura, em que é evidenciada a grande dificuldade para genotipar este subgrupo dentro dos *Staphylococcus aureus*, uma vez que a aquisição da resistência à oxacilina foi fruto de um evento genético recente dentro da espécie (KREISWIRTH *et al.*, 1993; SAULINIER *et al.*, 1993; VAN BELKUM *et al.*, 1994; KUMARI *et al.*, 1997).

Os resultados da genotipagem para *S. aureus* oxacilina sensíveis são encorajadores. O número de bandas variou de 3 a 9 por isolado com pesos moleculares variando de 360 a 733 bp. Identificaram-se 22 padrões diferentes. Dois isolados de dois

pacientes, CB e TCGG, apresentaram padrão de bandas semelhantes ao dos isolados oxacilina resistentes. Estes dois isolados poderiam tratar-se de bactérias que possuíam os genes de resistência à oxacilina, mas que, por fatores relacionados à regulação gênica, não expressaram este fenótipo. O coeficiente de similaridade no grupo de *S. aureus* oxacilina sensível variou de 45% a 100% por “Simple Matching”. Fica claro que a técnica de ribotipagem por PCR pode ter seu valor na genotipagem de *Staphylococcus aureus* deste subgrupo.

Deve-se lembrar que o bom teste é aquele que satisfaz as necessidades impostas numa dada situação. Mesmo não sendo a melhor técnica, no que se refere a poder discriminatório para isolados oxacilina resistentes, a ribotipagem por PCR parece ter valor na tipagem de *Staphylococcus aureus*, especialmente cepas oxacilina sensíveis. Acrescenta-se que existe imperiosa necessidade do desenvolvimento e padronização de técnicas mais simples que a PFGE, talvez como o seqüenciamento de genes, para a tipagem desta bactéria.



6. CONCLUSÕES

- A amplificação da região 16S – 23S do RNA ribossomal possui tipabilidade e reprodutibilidade adequadas para a genotipagem de *Staphylococcus aureus*.
- O poder discriminatório parece ser adequado para a tipagem de isolados de *S. aureus* oxacilina sensíveis, produzindo fragmentos de cerca de 500 pb.
- Houve monotonia no padrão obtido a partir dos isolados de *S. aureus* oxacilina resistentes, talvez pelo recente aparecimento dessa subpopulação da espécie.
- Há necessidade do desenvolvimento de técnicas mais simples e menos trabalhosas do que a PFGE para a tipagem de cepas oxacilina resistentes de *S. aureus*, aquelas baseadas em seqüenciamento de genes apresentam resultados promissores.



7. SUMMARY

Strain typing represents an important tool for understanding the epidemiology of nosocomial infections. It is useful to determine the extension of outbreaks and routes of transmission, for example. The available techniques nowadays can be based on characteristics expressed by the organisms, fenotyping methods, or on genomic material, genotyping methods. The former ones are based on more stable characteristics and provide better results in terms of reproducibility, typeability, and discriminatory power. *Staphylococcus aureus* is a major pathogen both in community and in hospital setting. *Pulsed Field Gel Electrophoresis*, PFGE, is the current method of choice for this bacteria but it is laborious, requires expensive apparatus, and the results are available only after 4 to 5 work-days. It is necessary to develop simpler methodologies, that can give results in shorter periods of time. We evaluate in this study the polymorphism in the spacer regions between the 16S and 23S units of the rRNA genes, PCR based ribotyping, as a strain typing technique for *S. aureus*. The first step was to choose the most suitable primer pair and the technique was then checked for reproducibility, stability and typeability. These preliminary results were satisfactory. We had chosen the primer pair that produced the smallest amplicons, which allowed better analysis. The discriminatory power was assessed using a collection of 88 isolates from Hospital Municipal Dr. Mário Gatti, a general tertiary-care hospital in Campinas, São Paulo State, Brazil. The results obtained from the 61 methicillin resistant isolates produced one single pattern, but it was possible to identify 22 different patterns among the 27 methicillin sensitive isolates. The bands could be visualized in the agarose gels with simple Ethidium Bromide staining, which permits the use of computer based software to compare band patterns. Given the results and the technical simplicity, PCR based ribotyping appears to be useful in strain typing *S. aureus* methicillin sensitive isolates, but the discriminatory power among the methicillin resistant isolates seems to be poor. There is a crescent need to develop and standardize new techniques to genotype bacteria, such as DNA sequencing, in order to evaluate the relatedness among isolates.



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRES DE SOUSA, M.; MIRAGAIA, M.; SANCHES, I.S.; AVILA, S.; ADAMSON, I.; CASAGRANDE, S.T.; BRANDILEONE, M.C.; PALACIO, R.; DELL'ACQUA, L.; HORTAL, M.; CAMOU, T.; ROSSI, A.; VELAZQUEZ-MEZA, M.E.; ECHANIZ-AVILES, G.; SOLORZANO-SANTOS, F.; HEITMANN, I.; DE LENCASTRE, H. - Three-year assessment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America from 1996 to 1998. **J Clin Microbiol**, **39**(6):2197-2205., 2001.
- ARBEIT, R.D. -Laboratory procedures for epidemiologic analysis. In: GROOSSLY, K.B. & ARCHER, G.L. -**The staphylococci in human disease**. New York, Churchill Livingstone Inc., 1997. p.253-86.
- ARBEIT, R.D. -Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J., PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. -**Manual of clinical microbiology**. 7 ed. Washington, American Society of Microbiology Press, 1999. p.116-37.
- BACK, N.A.; LINNEMANN, C.C., JR.; PFALLER, M.A.; STANECK, J.L.; MORTHLAND, V. -Recurrent epidemics caused by a single strain of erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus*. The importance of molecular epidemiology [see comments]. **Jama**, **270**(11):1329-33, 1993.
- BANNERMAN, T.L.; HANCOCK, G.A.; TENOVER, F.C.; MILLER, J.M. -Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol**, **33**(3):551-5, 1995.
- BINGEN, E. -Applications of molecular methods to epidemiologic investigations of nosocomial infections in a pediatric hospital. **Infect Control Hosp Epidemiol**, **15**(7):488-93, 1994.
- BINGEN, E.H.; DENAMUR, E.; ELION, J. -Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks. **Clin Microbiol Rev**, **7**(3):311-27, 1994.

- BLANC, D.S.; LUGEON, C.; WENGER, A.; SIEGRIST, H.H.; FRANCIOLI, P. - Quantitative antibiogram typing using inhibition zone diameters compared with ribotyping for epidemiological typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol**, 32(10):2505-9, 1994.
- BLANC, D.S.; PETIGNAT, C.; MOREILLON, P.; WENGER, A.; BILLE, J.; FRANCIOLI, P. -Quantitative antibiogram as a typing method for the prospective epidemiological surveillance and control of MRSA: comparison with molecular typing. **Infect Control Hosp Epidemiol**, 17(10):654-9, 1996.
- BLUMBERG, H.M.; RIMLAND, D.; KIEHLBAUCH, J.A.; TERRY, P.M.; WACHSMUTH, I.K. -Epidemiologic typing of *Staphylococcus aureus* by DNA restriction fragment length polymorphisms of rRNA genes: elucidation of the clonal nature of a group of bacteriophage-nontypeable, ciprofloxacin-resistant, methicillin-susceptible *S. aureus* isolates. **J Clin Microbiol**, 30(2):362-9, 1992.
- BRANCHINI, M.L.; MORTHLAND, V.H.; TRESOLDI, A.T.; VON NOWAKONSKY, A.; DIAS, M.B.; PFALLER, M.A. -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**, 17(4):275-81, 1993.
- CARLES-NURIT, M.J.; CHRISTOPHLE, B.; BROCHE, S.; GOUBY, A.; BOUZIGES, N.; RAMUZ, M. -DNA polymorphisms in methicillin-susceptible and methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol**, 30(8):2092-6, 1992.
- CARTWRIGHT, C.P. -Polymerase chain reaction ribotyping: a "universal" approach?. **J Infect Dis**, 172(6):1638-9, 1995. [letter]
- CLABOTS, C.R.; JOHNSON, S.; OLSON, M.M.; PETERSON, L.R.; GERDING, D.N. - Acquisition of *Clostridium difficile* by hospitalized patients: evidence for colonized new admissions as a source of infection. **J Infect Dis**, 166(3):561-7, 1992.

- COLLIER, M.C.; STOCK, F.; DEGIROLAMI, P.C.; SAMORE, M.H.; CARTWRIGHT, C.P. -Comparison of PCR-based approaches to molecular epidemiologic analysis of *Clostridium difficile*. **J Clin Microbiol**, **34**(5):1153-7, 1996.
- DE BUYSER, M.L.; MORVAN, A.; GRIMONT, F.; EL SOLH, N. -Characterization of *Staphylococcus* species by ribosomal RNA gene restriction patterns. **J Gen Microbiol**, **135**:989-99, 1989.
- DEL VECCHIO, V.G.; PETROZIELLO, J.M.; GRESS, M.J.; MCCLESKEY, F.K.; MELCHER, G.P.; CROUCH, H.K.; LUPSKI, J.R. -Molecular genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via fluorophore-enhanced repetitive-sequence PCR. **J Clin Microbiol**, **33**(8):2141-4, 1995.
- DIEKEMA, D.J.; PFALLER, M.A.; TURNIDGE, J.; VERHOEF, J.; BELL, J.; FLUIT, A.C.; DOERN, G.V.; JONES, R.N. -Genetic relatedness of multidrug-resistant, methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates from SENTRY Antimicrobial Resistance Surveillance Centers worldwide, 1998. **Microb Drug Resist**, **6**(3):213-221., 2000.
- DOLZANI, L.; TONIN, E.; LAGATOLLA, C.; MONTI-BRAGADIN, C. -Typing of *Staphylococcus aureus* by amplification of the 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences. **FEMS Microbiol Lett**, **119**(1-2):167-73, 1994.
- EISENSTEIN, B.I. -The polymerase chain reaction. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. **N Engl J Med**, **322**(3):178-83, 1990.
- FANG, F.C.; MCCLELLAND, M.; GUINEY, D.G.; JACKSON, M.M.; HARTSTEIN, A.I.; MORTHLAND, V.H.; DAVIS, C.E.; MCPHERSON, D.C.; WELSH, J. -Value of molecular epidemiologic analysis in a nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak. **Jama**, **270**(11):1323-8, 1993.
- FORTALEZA, C.M.C.B. -Aplicação da reação em cadeia de polimerase baseada em elemento repetitivo "ERIC" à caracterização de clones de *Pseudomonas aeruginosa*. Botucatu, 1999. (Tese - Mestrado – Universidade Estadual Paulista)

- FRÉNAV, H.M.; BUNSCHOTEN, A.E.; SCHOULS, L.M.; VAN LEEUWEN, W.J.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M.; VERHOEF, J.; MOOI, F.R. -Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, 15(1):60-4, 1996.
- GORDILLO, M.E.; SINGH, K.V.; MURRAY, B.E. -Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for subspecies differentiation of strains of *Enterococcus faecalis*. **J Clin Microbiol**, 31(6):1570-4, 1993.
- GRIMONT, F. & GRIMONT, P.A. -Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. **Ann Inst Pasteur Microbiol**, 137B(2):165-75, 1986.
- GÜRTLER, V. & BARRIE, H.D. -Typing of *Staphylococcus aureus* strains by PCR-amplification of variable-length 16S-23S rDNA spacer regions: characterization of spacer sequences. **Microbiology**, 141:1255-65, 1995.
- GÜRTLER, V. & STANISICH, V.A. -New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S- 23S rDNA spacer region. **Microbiology**, 142:3-16, 1996.
- HARTSTEIN, A.I.; LEMONTE, A.M.; IWAMOTO, P.K. -DNA typing and control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at two affiliated hospitals. **Infect Control Hosp Epidemiol**, 18(1):42-8, 1997.
- HUNTER, P.R. & GASTON, M.A. -Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **J Clin Microbiol**, 26(11):2465-6, 1988.
- ICHIYAMA, S.; OHTA, M.; SHIMOKATA, K.; KATO, N.; TAKEUCHI, J. -Genomic DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological marker for study of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol**, 29(12):2690-5, 1991.

- IRINO, K.; GRIMONT, F.; CASIN, I.; GRIMONT, P.A. -rRNA gene restriction patterns of *Haemophilus influenzae* biogroup aegyptius strains associated with Brazilian purpuric fever. **J Clin Microbiol**, 26(8):1535-8, 1988.
- JARVIS, W.R. -Usefulness of molecular epidemiology for outbreak investigations. **Infect Control Hosp Epidemiol**, 15(7):500-3, 1994.
- JENSEN, M.A.; WEBSTER, J.A.; STRAUS, N. -Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. **Appl Environ Microbiol**, 59(4):945-52, 1993.
- JOHN, J.F. & BARG, N.L. -*Staphylococcus aureus*. In: MAYHALL, C.G. -**Hospital epidemiology and infection control**. Baltimore, Williams & Wilkins, 1996. p.271-290.
- JORGENSEN, M.; GIVNEY, R.; PEGLER, M.; VICKERY, A.; FUNNELL, G. -Typing multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*: conflicting epidemiological data produced by genotypic and phenotypic methods clarified by phylogenetic analysis. **J Clin Microbiol**, 34(2):398-403, 1996.
- KLOODS, W.E. & BANNERMAN, T.L. -*Staphylococcus* and microbiology. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J., PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. -**Manual of clinical microbiology**. 7 ed. Washington, American Society of Microbiology Press, 1999. p.264-82.
- KOSTMAN, J.R.; ALDEN, M.B.; MAIR, M.; EDLIND, T.D.; LIPUMA, J.J.; STULL, T.L. -A universal approach to bacterial molecular epidemiology by polymerase chain reaction ribotyping. **J Infect Dis**, 171(1):204-8, 1995.
- KOSTMAN, J.R.; EDLIND, T.D.; LIPUMA, J.J.; STULL, T.L. -Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. **J Clin Microbiol**, 30(8):2084-7, 1992.

- KREISWIRTH, B.; KORNBLUM, J.; ARBEIT, R.D.; EISNER, W.; MASLOW, J.N.; MCGEER, A.; LOW, D.E.; NOVICK, R.P. -Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Science**, **259**(5092):227-30, 1993.
- KUMARI, D.N.; KEER, V.; HAWKEY, P.M.; PARNELL, P.; JOSEPH, N.; RICHARDSON, J.F.; COOKSON, B. -Comparison and application of ribosome spacer DNA amplicon polymorphisms and pulsed-field gel electrophoresis for differentiation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **J Clin Microbiol**, **35**(4):881-5, 1997.
- LESSING, M.P.; JORDENS, J.Z.; BOWLER, I.C. -Molecular epidemiology of a multiple strain outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* amongst patients and staff. **J Hosp Infect**, **31**(4):253-60, 1995.
- LIPUMA, J.J.; STULL, T.L.; DASEN, S.E.; PIDCOCK, K.A.; KAYE, D.; KORZENIOWSKI, O.M. -DNA polymorphisms among *Escherichia coli* isolated from bacteriuric women. **J Infect Dis**, **159**(3):526-32, 1989.
- LOWY, F.D. -*Staphylococcus aureus* infections. **N Engl J Med**, **339**(8):520-32, 1998.
- LUPSKI, J.R. -Molecular epidemiology and its clinical application. **Jama**, **270**(11):1363-4, 1993.
- MARANAN, M.C.; MOREIRA, B.; BOYLE-VAVRA, S.; DAUM, R.S. -Antimicrobial resistance in staphylococci. Epidemiology, molecular mechanisms, and clinical relevance. **Infect Dis Clin North Am**, **11**(4):813-49, 1997.
- MASLOW, J. & MULLIGAN, M.E. -Epidemiologic typing systems. **Infect Control Hosp Epidemiol**, **17**(9):595-604, 1996.
- MASLOW, J.N.; BRECHER, S.; GUNN, J.; DURBIN, A.; BARLOW, M.A.; ARBEIT, R.D. -Variation and persistence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains among individual patients over extended periods of time. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, **14**(4):282-90, 1995.

- MASLOW, J.N.; MULLIGAN, M.E.; ARBEIT, R.D. -Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. **Clin Infect Dis**, 17(2):153-162, 1993.
- MULLIGAN, M.E. & ARBEIT, R.D. -Epidemiologic and clinical utility of typing systems for differentiating among strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Infect Control Hosp Epidemiol**, 12(1):20-8, 1991.
- NATH, S.K.; SHEA, B.; JACKSON, S.; ROTSTEIN, C. -Ribotyping of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a Canadian hospital. **Infect Control Hosp Epidemiol**, 16(12):717-24, 1995.
- NATIONAL Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1990-May 1999, issued June 1999. **Am J Infect Control**, 27(6):520-32, 1999.
- NCCLS, National committee for medical laboratory standards. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. 7th ed. Approved standard M2-A7. NCCLS, Wayne, EUA, 2000a .
- NCCLS, National committee for medical laboratory standards. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. 5th ed. Approved standard M100-S10. Wayne, EUA, 2000b .
- ORSKOV, F. & ORSKOV, I. -From the national institutes of health. Summary of a workshop on the clone concept in the epidemiology, taxonomy, and evolution of the enterobacteriaceae and other bacteria. **J Infect Dis**, 148(2):346-57, 1983.
- PADOVEZE, M.C. -Estudo da epidemiologia molecular dos *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina em pacientes portadores de síndrome de imunodeficiência adquirida. Campinas, 1998. (Tese – Mestrado – Universidade Estadual de Campinas)
- PREVOST, G.; JAULHAC, B.; PIEMONT, Y. -DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. **J Clin Microbiol**, 30(4):967-73, 1992.

- ROBERTS, R.B; DE LENCASTRE, A; EISNER, W.; SEVERINA, E.P.; SHOPSIN, B.; KREISWIRTH, B.N.; TOMASZ, A. -Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 12 New York hospitals. MRSA Collaborative Study Group **J Infect Dis**, **178**(1): 164-71, 1998.
- ROSENBLUM, L.S.; VILLARINO, M.E.; NAINAN, O.V.; MELISH, M.E.; HADLER, S.C.; PINSKY, P.P.; JARVIS, W.R.; OTT, C.E.; MARGOLIS, H.S. -Hepatitis A outbreak in a neonatal intensive care unit: risk factors for transmission and evidence of prolonged viral excretion among preterm infants. **J Infect Dis**, **164**(3):476-82, 1991.
- RUBIN, R.J.; HARRINGTON, C.A.; POON, A.; DIETRICH, K.; GREENE, J.A.; MOIDUDDIN, A. -The economic impact of *Staphylococcus aureus* infection in New York City hospitals. **Emerg Infect Dis**, **5**(1):9-17, 1999.
- SAULNIER, P.; BOURNEIX, C.; PREVOST, G.; ANDREMONT, A. -Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminant than pulsed- field gel electrophoresis for typing strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol**, **31**(4):982-5, 1993.
- SCHLICHTING, C.; BRANGER, C.; FOURNIER, J.M.; WITTE, W.; BOUTONNIER, A.; WOLZ, C.; GOULLET, P.; DORING, G. -Typing of *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis, zymotyping, capsular typing, and phage typing: resolution of clonal relationships. **J Clin Microbiol**, **31**(2):227-32, 1993.
- SCHWARTZ, D.C. & CANTOR, C.R. -Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, **37**: 67-75, 1984.
- SHOPSIN, B. & KREISWIRTH, B.N. -Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Emerg Infect Dis**, **7**(2):323-6, 2001.
- STRUELENS, M.J. -Molecular epidemiologic typing systems of bacterial pathogens: current issues and perspectives. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, **93**(5): 581-5, 1998.

- STRUELENS, M.J.; BAX, R.; DEPLANO, A.; QUINT, W.G.; VAN BELKUM, A. - Concordant clonal delineation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by macrorestriction analysis and polymerase chain reaction genome fingerprinting [published erratum appears in J Clin Microbiol 1994 Apr;32(4):1134]. **J Clin Microbiol**, 31(8):1064-70, 1993.
- STRUELENS, M.J.; DEPLANO, A.; GODARD, C.; MAES, N.; SERRUYS, E. - Epidemiologic typing and delineation of genetic relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by macrorestriction analysis of genomic DNA by using pulsed-field gel electrophoresis. **J Clin Microbiol**, 30(10):2599-605, 1992.
- STULL, T.L.; LIPUMA, J.J.; EDLIND, T.D. -A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA. **J Infect Dis**, 157(2):280-6, 1988.
- TEIXEIRA, L.A.; RESENDE, C.A.; ORMONDE, L.R.; ROSENBAUM, R.; FIGUEIREDO, A.M.; DE LENCASTRE, H.; TOMASZ, A. -Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. **J Clin Microbiol**, 33(9):2400-4, 1995.
- TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.; ARCHER, G.; BIDDLE, J.; BYRNE, S.; GOERING, R.; HANCOCK, G.; HEBERT, G.A.; HILL, B.; HOLLIS, R.; JARVIS, W.R.; KREISWIRTH, B.; EISNER, W.; MASLOW, J.; MCDUGAL, L.K.; MILLER, M.; MULLIGAN, M.; PFALLER, M.A. -Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol**, 32(2):407-15, 1994.
- TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V. -How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. **Infect Control Hosp Epidemiol**, 18(6):426-39, 1997.

- TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V.; MICKELSEN, P.A.; MURRAY, B.E.; PERSING, D.H.; SWAMINATHAN, B. -Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed- field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol**, 33(9):2233-9, 1995.
- TYLER, K.D.; WANG, G.; TYLER, S.D.; JOHNSON, W.M. -Factors affecting reliability and reproducibility of amplification- based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. **J Clin Microbiol**, 35(2):339-46, 1997.
- VAN BELKUM, A. -DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. **Clin Microbiol Rev**, 7(2):174-84, 1994.
- VAN BELKUM, A.; BAX, R.; PEERBOOMS, P.; GOESSENS, W.H.; VAN LEEUWEN, N.; QUINT, W.G. -Comparison of phage typing and DNA fingerprinting by polymerase chain reaction for discrimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **J Clin Microbiol**, 31(4):798-803, 1993.
- VAN BELKUM, A.; BAX, R.; PREVOST, G. -Comparison of four genotyping assays for epidemiological study of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, 13(5):420-4, 1994.
- VAN BELKUM, A.; KLUYTMANS, J.; VAN LEEUWEN, W.; BAX, R.; QUINT, W.; PETERS, E.; FLUIT, A.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.; VAN DEN BRULE, A.; KOELEMAN, H.; MELCHERS, W.; MEIS, J.; ELAICHOUNI, A.; VANEECHOUTTE, M.; MOONENS, F.; MAES, N.; STRUELENS, M.; TENOVER, F.; VERBRUGH, H. -Multicenter evaluation of arbitrarily primed PCR for typing of *Staphylococcus aureus* strains. **J Clin Microbiol**, 33(6):1537-47, 1995.
- VAN BELKUM, A.; RIEWERTS ERIKSEN, N.; SIJMONS, M.; VAN LEEUWEN, W.; VANDENBERGH, M.; KLUYTMANS, J.; ESPERSEN, F.; VERBRUGH, H. -Are variable repeats in the spa gene suitable targets for epidemiological studies of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains? **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, 15(9):768-70, 1996.

- VAN DER ZEE, A.; VERBAKEL, H.; VAN ZON, J.C.; FRENAY, I.; VAN BELKUM, A.; PEETERS, M.; BUITING, A.; BERGMANS, A. -Molecular genotyping of *Staphylococcus aureus* strains: comparison of repetitive element sequence-based PCR with various typing methods and isolation of a novel epidemicity marker. **J Clin Microbiol**, **37**(2):342-9, 1999.
- VAN LEEUWEN, W.; VAN BELKUM, A.; 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**, **149**(7):497-507, 1998. [published erratum appears in Res Microbiol 1998 Nov-Dec;149(10):775]
- VAN SOOLINGEN, D.; HAAS, P.E.W.; KREMER, K. -**Restriction fragment length polymorphism (RFLP) typing of mycobacteria**. Bilthoven, Holanda, National Institute of Public Health and the Environment, 1999.
- VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. -Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Res**, **19**(24):6823-31, 1991.
- WALDVOGEL, F.A. -*Staphylococcus aureus* (Including toxic shock syndrome). In: MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. -**Principles and practice of infectious diseases**. 4 ed. New York, Churchill Livingstone Inc., 1995. p.1754-77.
- WEBER, S.; PFALLER, M.A.; HERWALDT, L.A. -Role of molecular epidemiology in infection control. **Infect Dis Clin North Am**, **11**(2):257-78, 1997.



9. ANEXOS

Tabela 4. Perfil de sensibilidade a antimicrobianos das amostras coletadas do HMMG.

Iniciais	Ala	Amostra coletada	Data coleta	peni	oxa	gen	clo	eri	cli	van	cip	sft	lev	Cl
ACM	ALA D	SWAB NASAL	11/07/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R
AFS	EXT	SEC. URETRAL	24/08/2000	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R
AJS	ALA D	HEMO	03/07/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
AJS	ALA D	HEMO	03/07/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
AJS	ALA D	HEMO	05/07/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
AJS	ALA D	HEMO	05/07/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
AJS	ALA D	PONTA CATETER	07/07/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
AMS	ALA D	SEC. FER. CIR.	10/09/2000	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R
ARP	PS	SEC. CELULITE	18/07/2000	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ASC	ALA E	BAL	05/07/2000	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R
ATA	UTI	SEC. TRAQUEAL	06/08/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
ATA	UTI	PONTA CATETER	08/08/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
ATA	ALA E	HEMO	19/08/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
CB	EXT	SEC. CELULITE	26/07/2000	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CC	ALA D	PONTA CATETER	21/08/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
DMM	ALA D	PONTA CATETER	06/09/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
EAS	UTI	PONTA CATETER	23/06/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	
EAS	UTI	PONTA CATETER	29/06/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
EAV	ALA B	ABESCESSO MÃO	01/07/2000	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ECBP	UTI	PONTA CATETER	30/06/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
ECBP	UTI	SEC. TRAQUEAL	02/07/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
ECBP	UTI	SEC. TRAQUEAL	05/07/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
EFB	ALA B	SEC. ABDOMINAL	25/06/2000	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
EHO	ALA B	PONTA CATETER	03/08/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
EHO	ALA B	SWAB NASAL	08/08/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
EJS	UTI	SEC. FER. CIR.	17/08/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
EJS	UTI	PONTA CATETER	22/08/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
EJS	UTI	SEC. TRAQUEAL	20/08/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
ELDG	ALA D	LIQ. PLEURAL	25/08/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
ELDG	ALA D	PONTA CATETER	29/08/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
EMD	UTI	PONTA CATETER	07/09/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
FSS	PED	PONTA CATETER	29/07/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
GAT	UTIPED	SEC. TRAQUEAL	14/08/2000	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
GBO	EXT	SEC. URETRAL	20/07/2000	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
HSM	ALA D	HEMO	31/08/2000	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
IAT	UTI	HEMO	23/06/2000	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	
IOC	EXT	ABSC. CERVICAL	13/07/2000	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
JBG	EXT	SEC. PELE	01/09/2000	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
JCS	EXT	SEC. PELE	11/07/2000	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
JF	UTI	HEMO	16/08/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
JF	ALA E	SEC. ABDOMINAL	18/08/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R

Tabela 4. Perfil de sensibilidade a antimicrobianos das amostras coletadas do HMMG (cont.).

Iniciais	Ala	Amostra coletada	Data coleta	peni	oxa	gen	clo	eri	cli	van	cip	sft	lev	cla
JLS	EXT	SEC. FER. CIR.	01/09/2000	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
JM	ALA D	HEMO	22/06/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
JM2	EXT	SEC. ÓSSEA	15/08/2000	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R
JPL	ALA D	PONTA CATETER	28/08/2000	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R
JR	ALA D	PONTA CATETER	19/06/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	
JRF	ALA E	PONTA CATETER	08/08/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
JRF	ALA E	URI	12/09/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
JRS	EXT	SEC. FER. CIR.	03/08/2000	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R
JS	UTI	PONTA CATETER	28/08/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
KCS	ALA B	SEC. FER. CIR.	07/08/2000	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
LDS	PED	HEMO	04/08/2000	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
LM	ALA D	PONTA CATETER	18/07/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
LM	ALA D	SWAB NASAL	25/07/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R
LNS	ALA B	PONTA CATETER	10/09/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
LOF	ALA D	HEMO	24/07/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
LOF	ALA D	HEMO	24/07/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
LOF	ALA D	HEMO	24/07/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
MAC	ALA E	HEMO	26/07/2000	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
MEMS	UTI	HEMO	20/06/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	
MEMS	UTI	PONTA CATETER	23/06/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	
MEMS	ALA D	LÍQUOR	05/07/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
MFSS	PED	ABSC. MAMA	19/06/2000	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
MGM	ALA B	BIOPSIA MUSCULAR	16/08/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
MLM	UTI	PONTA CATETER	16/08/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
MVB	ALA B	SEC. ABDOMINAL	29/06/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
MVB	ALA E	PONTA CATETER	22/08/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
MVB	ALA E	HEMO	21/08/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
MVB	ALA E	SEC. FER. CIR.	20/08/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
NAS	ALA E	SEC. FER. CIR.	28/07/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
NMG	ALA E	PONTA CATETER	09/07/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
PFS	EXT	SEC. AXILA	15/08/2000	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
POB	EXT	SEC. URETRAL	17/08/2000	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PV	EXT	SEC. PROTESE	15/08/2000	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R
RMG	ALA E	ABSC. PERNA	10/07/2000	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SGGS	ALA E	URI	21/07/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
SGGS	ALA E	URI	02/08/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
SJP	ALA E	SEC. TRAQUEAL	04/08/2000	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R
SV	EXT	ABSCSSO NASAL	14/08/2000	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TCGG	PED	HEMO	30/08/2000	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R
TEM	EXT	TECIDO BOCA	02/08/2000	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
VC	EXT	SEC. PELE	23/08/2000	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Tabela 4. Perfil de sensibilidade a antimicrobianos das amostras coletadas do HMMG (cont.).

Iniciais	Ala	Amostra coletada	Data coleta	peni	oxa	gen	clo	eri	cli	van	cip	sft	lev	cla
VE	UTI	SEC. TRAQUEAL	23/07/2000	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
VE	UTI	SEC. FER. CIR.	31/07/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
VE	ALA D	SWAB NASAL	08/08/2000	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
VFS	UTI	SEC. ABDOMINAL	13/07/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
VFS	UTI	HEMO	14/07/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
VSC	ALA B	SWAB NASAL	15/08/2000	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R

Legenda. ABSC. – Abscesso, HEMO-hemocultura, SEC. ABDOMINAL – Secreção abdominal, SEC. FER. CIR. –Secreção de ferida cirúrgica, URI – Urina; peni – penicilina, oxa – oxacilina, gen – gentamicina, clo – cloranfenicol, eri – eritromicina, cli – clindamicina, van – vancomicina, cip – ciprofloxacina, sft – sulfametoxazol-trimetoprina, lev – levofloxacina, cla – amoxicilina + ác. clavulânico

Tabela 5. Perfil de sensibilidade a antimicrobianos das mostras P, R e C.

AMOSTRA	peni	oxa	gen	clo	eri	cli	van	cip	sft
P1	R	R	R	R	R	R	S	R	R
P2	R	R	R	R	R	R	S	R	R
P3	R	R	R	R	R	R	S	R	R
R1	S	S	S	S	S	S	S	S	S
R10B	S	S	S	S	S	S	S	S	S
R10C	S	S	S	S	S	S	S	S	S
R30B	S	S	S	S	S	S	S	S	S
R30C	S	S	S	S	S	S	S	S	S
C1	S	S	S	S	S	S	S	S	S
C2	R	S	S	S	R	S	S	S	S
C3	R	R	R	R	R	R	S	R	R
C4	R	R	R	R	R	R	S	R	R
C5	R	R	R	R	R	R	S	R	R
C6	R	R	R	R	R	R	S	R	R

Legenda. peni – penicilina, oxa – oxacilina, gen – gentamicina, clo – cloranfenicol, eri – eritromicina, cli – clindamicina, van – vancomicina, cip – ciprofloxacina, sft – sulfametoxazol-trimetoprina

Coefficiente de Similaridade por “Simple Matching”

Este é talvez o mais antigo coeficiente de similaridade. Sua introdução em estudos taxonômicos foi feita por *SOKAL & MICHENER em 1958. Valoriza concordâncias positivas e negativas.

$$S_{SM} = a/b,$$

Onde:

a = total de concordâncias positivas e negativas

b = total de discordâncias e concordâncias

* SNEATH, P.H.A; SOKAL, R.R. –The estimation of taxonomic resemblance. In: _____. **Numerical Taxonomy**. San Francisco, W. H. Freeman and Company, 1973. p. 114-87.