



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Odontologia de Piracicaba



WAGNER LUIS DE CARVALHO BERNARDO

CIRURGIÃO DENTISTA

POLIMORFISMO GENÉTICO DE LINHAGENS DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS, OBTIDAS NO AMBIENTE CLÍNICO ODONTOLÓGICO.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de mestre em Biologia Buco-Dental, na área de Microbiologia e Imunologia.

PIRACICABA

2002



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Odontologia de Piracicaba



WAGNER LUIS DE CARVALHO BERNARDO

CIRURGIÃO DENTISTA

POLIMORFISMO GENÉTICO DE LINHAGENS DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS, OBTIDAS NO AMBIENTE CLÍNICO ODONTOLÓGICO.

Este exemplar foi devidamente corrigido
de acordo com a Resolução CPG-036/R3
CPG 14/02/03
Assinatura do Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de mestre em Biologia Buco-Dental, na área de Microbiologia e Imunologia.

Orientador:

Prof. Dr. José Francisco Höfling

Banca Examinadora:

Prof^a Dr^a Taís Maria Bauab

Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves

Prof. Dr. José Francisco Höfling

PIRACICABA

2002

UNIDADE	Be
Nº CHAMADA	TI/UNICAMP B456p
V	EX
TOMBO BC	54282
PROC.	124103
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	14/10/03
Nº CPD	

CM00185222-1

BIB ID 293788

Ficha Catalográfica

B456p Bernardo, Wagner Luis de Carvalho.
Polimorfismo genético de linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos, obtidas no ambiente clínico odontológico. / Wagner Luis de Carvalho Bernardo. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2002. xiii, 79f. : il.

Orientador : Prof. Dr. José Francisco Höfling.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

I. Odontologia. I. Höfling, José Francisco. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 22 de Novembro de 2002, considerou o candidato WAGNER LUIS DE CARVALHO BERNARDO aprovado.

1. Prof. Dr. JOSE FRANCISCO HOFLING

2. Profa. Dra. TAÍS MARIA BAUAB

3. Prof. Dr. REGINALDO BRUNO GONCALVES

0002206211

*"Jamais considere seus estudos como uma obrigação,
mas como uma oportunidade invejável para aprender
a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito,
para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade
à qual seu futuro trabalho pertencer".*

Albert Einstein

Dedico este trabalho...

... a **Deus** que é a inteligência suprema, causa primária de todas as coisas. Aquilo que não tem começo nem fim; o desconhecido; todo o desconhecido é infinito. **Deus** é infinito nas suas perfeições, mas o infinito é uma abstração: dizer que **Deus** é o infinito é tomar o atributo de uma coisa por ela mesma, definir uma coisa, ainda não conhecida, por outra que também não o é. *Muito Obrigado!*

... aos meus pais **Jorge Serafim Bernardo** e **Leny Célia de Carvalho Bernardo**, se for verdade que nós escolhemos (no plano espiritual) o lar onde queremos viver, eu não poderia ter nascido em melhor família, pois vocês são um exemplo de caráter, honradez, honestidade, força, determinação, compreensão, dignidade, sensibilidade, confiança, incentivo, dedicação, coragem, zelo e muito amor. A vocês o meu *Muito Obrigado!*

... aos meus irmãos **Klaus Fernando de Carvalho Bernardo** e **Jorge Gustavo de Carvalho Bernardo** pelo incentivo e apoio nos momentos onde eu precisei de um ombro amigo para chorar e naqueles onde eu precisei de um irmão para sorrir. Amo Vocês!

... as minhas cunhadas **Geruza Motta Bernardo** e **Gislaine C. Pavini**, pela torcida e apoio que me dedicaram, principalmente nos momentos mais difíceis.

Agradeço especialmente...

... ao meu amigo e orientador *José Francisco Höfling*, na tradução da palavra (orientar) é que me inspiro em lhe agradecer, pois você nunca desistiu em direcionar-me ao melhor caminho, fosse ele científico ou pessoal, sabendo sublimemente elogiar nos acertos e censurar nas faltas. Sua competência científica proporcionou o desenvolvimento desse trabalho. Obrigado!

... a amiga e professora *Denise Madalena Palomari Spolidório*, por acreditar sempre no meu potencial e me ajudar em todos os momentos de minha carreira científica. Você foi e é minha maior incentivadora.

... aos amigos *Edvaldo A. R. Rosa, Rosimeire T. Rosa, Marcelo F. G. Boriollo, Anderson L. Teixeira* e *Numara Pallucci Berto*, pelo companheirismo, ensinamentos e apoio dispensados a minha pessoa.

... aos amigos *Fabio Roberto Dametto, Giovani de Oliveira Corrêa* e *Rogério Vieira Reges*, que em nos últimos dois anos de convivência aprendemos a dividir os problemas, somar as alegrias e multiplicar as vitórias.

... aos meus amigos/irmãos *Fernando H. Marques, André L. J. Ferraz, Fausto e Rosíria de Ponte, Martinho Júnior, Cleber de Marco, Eric K. Muto, Kelton P. Alves* e *Gerson Fonseca* pelo anos compartilhados e pelos momentos de alegria que passamos juntos até o presente momento.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do seu diretor professor Dr. Thalles Rocha de Mattos Filho, pelo apoio institucional a pesquisa.

Ao professor Dr. Lourenço Correr Sobrinho, Coordenador geral do curso de Pós-graduação da FOP-UNICAMP.

À professora Dra. Silvana Pereira Barros, Coordenadora do curso de pós-graduação em Biologia Buco-Dental da FOP-UNICAMP.

À todos os professores do curso de pós-graduação em Biologia Buco-Dental da FOP-UNICAMP, pelos ensinamentos transmitidos durante o curso de Mestrado.

Ao professor Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves e professor Dr. Celso Paulino da Costa, pelo companheirismo e apoio presentes na disciplina de Microbiologia e Imunologia da FOP-UNICAMP.

À professora Dra. Taís Maria Bauab (UNESP - Araraquara), pelos ensinamentos e por ter aceitado compor a banca examinadora para avaliar esta dissertação.

À amiga Ezilmara Leonor Rolim de Sousa e aos amigos da disciplina de Microbiologia e Imunologia da FOP-UNICAMP, pela solidariedade em todos os momentos.

Aos funcionários da disciplina de Microbiologia e Imunologia da FOP-UNICAMP, pela amizade e respeitos proporcionados.

A todos aqueles que um dia passaram pela nossa vida, esses nunca nos deixam sós, permanece um pouco de si e levam um pouco de nós.

A FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro deste trabalho.

SUMÁRIO

Resumo	01
Abstract	02
Introdução	03
Revisão de Literatura	06
Material e Métodos	21
Resultados	33
Discussão	51
Conclusões	63
Referências Bibliográficas	64
Anexo	74

LISTA DE ABREVIATURAS

AMS – Ágar Manitol Salgado	mL – Mililitros
AMH – Ágar Mueller-Hinton	MRSA – <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina Resistente
ATCC – American Type Culture Collection	MIC – Mínima Concentração Inibitória
BHI – Infusão de Cérebro e Coração	MLEE – Multi Locus Enzyme Electrophoresis
β-lac (+) - β-lactamase positivo	μg/mL – Microgramas por Mililitros
β-lac (-) - β-lactamase negativo	NaCl – Cloreto de Sódio
CHROMagar – Meio Cromogênico	NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards
°C – Graus Centígrados	NA – Ágar Nutriente
Ø – diâmetro	OSSA – <i>Staphylococcus aureus</i> Oxacilina Sensível
d.d.p. – diferença de potencial isoeletrico.	PBPs – Proteínas Ligantes da Penicilina
DNA – Ácido Desoxirribonucleico	pH – Concentração de íons de H ⁺
Etest – Epsilometer Test	PCR – Polymerase Chain Reaction
EDTA – Ácido Etilenodiaminotetraacético	PFGE – Pulsed-Field Gel Electrophoresis
FOP – Faculdade de Odontologia de Piracicaba	RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism
KCl – Cloreto de Potássio	rpm – Rotações por Minuto
Kb – Kilobases	R_m – Mobilidade Relativa
LPS – Lipopolissacarídeos	SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
μL – Microlitros	TE – Tampão Tris-EDTA
mM – Milimols	UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas
mm – Milímetros	UPGMA – Média das Distâncias

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Cadeia epidemiológica da infecção na prática odontológica	11
Figura 02 - Planta esquemática da clínica odontológica e disposição das placas.....	22
Figura 03 - Clínica odontológica com as placas dispostas nos setores determinados....	23
Figura 04 - Isolamento plasmidial das linhagens 01 a 22.....	40
Figura 05 - Isolamento plasmidial das linhagens 23 a 44.....	40
Figura 06: Dendograma de similaridade do perfil plasmidial de <i>S. aureus</i>	41
Figura 07 - Eletroforegrama representativo dos perfis de migração das enzimas CAT e ADH para isolados de <i>S. aureus</i>	43
Figura 08 - Eletroforegrama representativo dos perfis de migração das enzimas G6PDH e GDH para isolados de <i>S. aureus</i>	44
Figura 09 - Eletroforegrama representativo dos perfis de migração das enzimas MDH e GLDH para isolados de <i>S. aureus</i>	45
Figura 10 - Eletroforegrama representativo do perfil de migração da enzima α – EST para isolados de <i>S. aureus</i>	46
Figura 11 - Eletroforegrama representativo do perfil de migração da enzima β – EST para isolados de <i>S. aureus</i>	47
Figura 12 - Eletroforegrama representativo do perfil de migração da enzima M1P para isolados de <i>S. aureus</i>	48
Figura 13 - Dendograma representativo de diferentes tipos genéticos dos isolados da clínica odontológica durante as coletas.....	50

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 01 - Linhagens coletadas na clínica odontológica	33
Tabela 02 - Mínima concentração inibitória (MIC).....	39
Quadro 01 - Distribuição, fonte/procedência e viabilidade no ambiente	12
Quadro 02 - Interpretação para a produção de β -lactamase.....	26
Quadro 03 - Valores para interpretação de halos de inibição.....	27
Quadro 04 - Padrão para interpretação para MIC com o Etest oxacilina.....	28
Quadro 05 - Prevalência das linhagens dentro da clínica odontológica	35
Quadro 06 - Produção de β -lactamase pelas linhagens de <i>S. aureus</i>	36
Quadro 07 - Produção de β -lactamase comparando com o antibiograma	36
Quadro 08 - Padrão de susceptibilidade - antibiograma	37
Quadro 09 - Resistência aos antimicrobianos	38
Quadro 10 - Perfil plasmidial das linhagens de <i>S. aureus</i>	41
Quadro 11 - Perfil plasmidial X antibiograma	42
Quadro 12 - Agrupamento enzimático e resistência aos antimicrobianos	49

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01 - Prevalência das linhagens dentro da clínica odontológica.....	35
--	----

RESUMO

Nos últimos anos, ocorreu um grande aumento na incidência de infecções hospital-associadas (nosocomiais). Dentre as espécies bacterianas, o *Staphylococcus aureus* tem merecido uma atenção especial, tanto pela importância da sua disseminação, quanto por sua resistência a diversos tipos de antimicrobianos. Por sua vez, o ambiente clínico odontológico possui um alto índice de contaminação bacteriana, incluindo o *S. aureus*, sendo assim, o objetivo dessa pesquisa foi detectar o polimorfismo genético de *Staphylococcus aureus* resistentes a antimicrobianos, obtidos na clínica odontológica.

Para tanto, foram realizadas 24 coletas. As linhagens foram identificadas pelo Gram, catalase, coagulase e meio cromogênico. Após a identificação as mesmas foram submetidas ao teste de susceptibilidade antimicrobiana, a análise plasmidial e ao MLEE. Foram identificadas 44 linhagens de *S. aureus*, desses 80% foram resistentes ao antibiótico ampicilina e todas foram oxacilina sensíveis – OSSA. Na análise plasmidial foram detectados três agrupamentos de diferentes perfis plasmidiais. O estudo do perfil enzimático mostrou a presença de agrupamentos clonais entre os isolados. Os dados obtidos demonstraram a disseminação das linhagens de *S. aureus* resistentes no ambiente odontológico. A análise plasmidial sugere que essa resistência está relacionada ao cromossomo (DNA) e a análise dos perfis enzimáticos revelou o polimorfismo genético de *S. aureus* isolados dentro desse ambiente.

ABSTRACT

In the last years, an increase occurred in the incidence of hospital-associated infections. Among the bacterial species, *Staphylococcus aureus* has deserved a special attention, so much for the importance of spread, as for resistance to several antibiotics. For this time, the dental clinical possesses a high index of bacterial contamination, including the *S. aureus*. The objective of that research was to detect the genetic polymorphism of *Staphylococcus aureus* resistant, obtained in the dental clinic.

Twenty-four collections were accomplished. The lineages were identified for Gram, catalase, coagulase and chromogenic medium. After the identification, the microorganisms were submitted to the test of antibiotic susceptibility, the plasmidial analysis and to MLEE. They were identified 44 lineages of *S. aureus*, 80% they were resistant to ampicillin and 100% oxacillin sensitive - OSSA. In the plasmidial analysis, three clusters were formed of different plasmidial profiles. The study of the enzymatic profile showed the formation of groupings of clones among the isolates.

The spread of lineages of *S. aureus* resistant was observed in the dental clinic. The analysis plasmidial suggests that that resistance is related to the chromosome and analysis of the enzymatic profiles detected the genetic polymorphism of *S. aureus* isolated inside of that environment.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o gênero *Staphylococcus* é composto por 27 espécies, sendo algumas freqüentemente associadas a uma variedade de infecções de caráter oportunista, em seres humanos e outros animais. As principais espécies de estafilococos encontrados em humanos são *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus* (JANDA *et al.*, 1994; TRABULSI *et al.*, 1999). O *S. epidermidis* é encontrado primariamente como residente da pele, tendo um baixo potencial patogênico, assim como o *S. saprophyticus*, que faz parte da microbiota normal da pele e região periuretral do homem.

Ao contrário, o *S. aureus* é um patógeno, que habita assintomaticamente a superfície da pele, nasofaringe e fossas nasais, podendo causar graves infecções ao entrar no organismo através de soluções de continuidade (SNEATH *et al.*, 1986; ZANON & NEIG, 1987; TRABULSI *et al.*, 1999). Entre as doenças infecciosas causadas, por esse microrganismo, está a septicemia, pneumonia, endocardite, osteomielite, gastroenterites, abscessos, inclusive aquelas localizadas na região da cabeça e pescoço (NISENGARD & NEWMAN, 1995).

O *S. aureus*, nos últimos anos, tem se tornado um problema constante para os hospitais e centros clínicos, pois é um dos maiores agentes causadores das infecções hospitalares, entre várias espécies de microrganismos. As linhagens multirresistentes dessa bactéria são as que prevalecem nos setores que envolvem

a área da saúde, em particular nos ambientes clínicos e hospitalares (HORIBA *et al.*, 1995; VALENCIA *et al.*, 1997; BERNARDS *et al.*, 1998). Essa resistência aos antimicrobianos é determinada pela presença de genes cromossômicos preexistentes, provenientes de mutações cromossômicas e pela presença de plasmídios de resistência (SKURRAY & FIRTH, 1997).

As principais vias de propagação desse microrganismo nesses ambientes são as mãos, as roupas dos profissionais da saúde, o ar, os instrumentos utilizados nas clínicas, a passagem de pessoa para pessoa, e assim por diante (ZANON & NEIG, 1987; HORIBA *et al.*, 1995), sendo que alguns fatores de risco são apontados para a aquisição e seleção de linhagens de *Staphylococcus aureus* multirresistentes, como por exemplo, o uso extensivo e freqüente de antibióticos de amplo espectro, hospitalização prolongada, etc (NICOLLE *et al.*, 1996; GOSPAL RAO, 1998).

A clínica odontológica é, também, um ambiente onde pode ocorrer com freqüência a infecção cruzada pela transmissão de agentes infecciosos. Vários estudos têm indicado que o *Staphylococcus aureus*, incluindo o MRSA (*Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente), pode ser transmitido durante o tratamento dental (SUZUKI *et al.*, 1997). Torna-se, portanto, importante saber a relação desse microrganismo com o ambiente odontológico, desde o isolamento, caracterização, resistência aos antimicrobianos, perfil genético e até a sua prevalência nesse tipo de ambiente, já que a existência de vários microrganismos na clínica odontológica é incontestável e envolve entre eles o *S. aureus*.

Com base na literatura, o objetivo da presente pesquisa foi: realizar o isolamento e a caracterização de linhagens de *Staphylococcus aureus* obtidos do ar da clínica odontológica durante 12 meses; avaliar a resistência dessas linhagens a diferentes antibióticos, usados na terapêutica odontológica (ampicilina, a amoxicilina/ácido clavulânico, a cefalosporina, a clindamicina, a eritromicina, a oxacilina, a tetraciclina e vancomicina) e verificar a mínima concentração inibitória (MIC) frente a oxacilina; fazer o isolamento e caracterização plasmidial das linhagens de *Staphylococcus aureus*, contendo potencialmente genes de resistência a antimicrobianos; e, demonstrar o polimorfismo genético desses microrganismos, utilizando a técnica de eletroforese de isoenzimas (*Multi Locus Enzymes Electrophoresis - MLEE*).

2. REVISÃO LITERATURA

Staphylococci, juntamente com pneumococci e streptococci, são membros de um grupo de patógenos Gram positivos invasivos, conhecidos também como cocos piogênicos, nos quais causam infecções supurativas ou formadoras de pus em humanos e outros animais. Os staphylococci, caracteristicamente, não possuem mobilidade, são anaeróbios facultativos, catalase positivos, microscopicamente são agrupados em massas irregulares ou em forma de cachos de uva, podendo ser divididos em patogênicos e potencialmente patogênicos com base na síntese da enzima coagulase. As linhagens não produtoras de coagulase, como o *S. epidermidis*, são não-pigmentados e geralmente menos invasivos, porém estão sendo cada vez mais associados com sérias infecções nosocomiais (PARISI, 1985).

A espécie coagulase positiva classificada como *Staphylococcus aureus*, freqüentemente produz um pigmento amarelo-alaranjado (cor do ouro) e causa tanto infecções agudas como crônicas, incluindo pústulas, furúnculo, abscessos em tecidos profundos, enterocolites, bacteremia, osteomielite, pneumonia, endocardite, meningite, septicemia e artrite (LYON & SKURRAY, 1987; MIYAKE *et al.*, 1991).

Da década de 40 até o presente momento, ocorreu um grande aumento na incidência de infecções associadas ao ambiente hospitalar, causada por linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes, algumas apresentando

resistência por mais de 20 compostos antimicrobianos incluindo anti-sépticos e desinfetantes (LYON & SKURRAY, 1987; PEARCE, *et al.*, 1999).

Antes dessa década, o prognóstico de um indivíduo que apresentasse uma infecção estafilocócica grave era extremamente ruim. A introdução da penicilina no uso da clínica médica, no começo do ano de 1940, quando teve início à chamada era antibiótica, inverteu essa situação (PLORDE & SHERRIS, 1974). Porém o período da efetividade universal da terapia antimicrobiana com a penicilina teve vida curta.

Em poucos anos foram relatadas as primeiras linhagens penicilina resistente de *S. aureus* e em 1946 foi estimado que 60% das linhagens isoladas em hospitais do Reino Unido eram resistentes esse antimicrobiano (LYON & SKURRAY, 1987). A sucessiva introdução da streptomina, tetraciclina, cloranfenicol e dos macrolídeos, também conseguiram combater com sucesso os microrganismos resistentes (PLORDE & SHERRIS, 1974). Porém as linhagens além de serem resistentes às penicilinas, pela produção da β -lactamase (penicilinase), adquiriram resistência a esses novos antibióticos.

A introdução da penicilina semi-sintética β -lactamase resistente, como a metilicina e a oxacilina, levou a diminuição na prevalência dos *S. aureus* múltiplos resistentes durante os anos 60. Essas penicilinas possuem radicais químicos, nas suas estruturas moleculares, que as protegem da ação das β -lactamases. (WADA & WATANABE, 1998). Já nos anos 70 e meados de 1980, linhagens multirresistentes incluindo a metilicina e a oxacilina eram as grandes responsáveis

pelas infecções hospitalares em vários países do mundo (LYON & SKURRAY, 1987).

Em muitas instâncias, contudo, a persistência e a propensão para a disseminação desse microrganismo tornaram-se um problema clínico muito sério, envolvendo numerosos pacientes de diferentes hospitais. Os microrganismos envolvidos na propagação de eventos epidemiológicos como o *S. aureus*, têm a capacidade de neutralizar quase todos os antibióticos acessíveis para o tratamento de infecções severas. O aparecimento de staphylococci multirresistentes, passados 40 anos, tem sido atribuída inevitavelmente às características genéticas desses microrganismos, que sofreram a pressão seletiva imposta pela terapia antimicrobiana. A rápida emergência da resistência pela introdução de antibióticos na área clínica, deve a habilidade da população microbiana em adaptar-se agilmente às mudanças de seu ambiente (RICHMOND, 1972).

Quando a resistência antimicrobiana foi determinada pela primeira vez, acreditou-se que somente ocorreu este evento, por causa de uma mutação no DNA ou por seleção dos organismos. Porém, o senso evolucionário pressupôs, que o acúmulo de mutações cromossômicas seria insatisfatório para explicar a rápida expansão de linhagens de bactérias multirresistentes (LYON & SKURRAY, 1987).

Uma pequena importância foi estabelecida, para o repentino aparecimento de um microrganismo antibiótico resistente, quando confirmaram a descoberta de um gene de transferência ("*transposons*") e pela demonstração de

que essa bactéria poderia adquirir ou possuir um material genético na forma extracromossomal, chamado de DNA plasmidial. Mas posteriormente se instituiu que todos esses fatores contribuíram para o sucesso evolucionário da resistência antibiótica pelos microrganismos (SAUNDERS, 1984). Ou seja, facilidade da disseminação de microrganismos que possuem resistência antimicrobiana e o agrupamento de inserções de transferência carregando determinantes de resistência em plasmídios ou no cromossomo, fornece argumentos para a existência de bactérias multirresistentes (COHEN, 1976; SAUNDERS, 1984).

Os determinantes de resistência, juntamente com o material genético, são transferidos por diversos mecanismos entre os staphylococci. Eles são os tradicionais processos de transdução, transformação, conjugação e um processo chamado de transferência por cultura mista ou conjugação fago-mediada. Embora esses mecanismos tenham sido demonstrados em laboratório, a contribuição plena que cada processo determina nas trocas de resistência, entre o habitat natural do microrganismo, ainda é incerto (LYON & SKURRAY, 1987).

Essa transferência do material genético com os determinantes de resistência, juntamente com outros fatores, levou as linhagens *S. aureus* isoladas de ambientes clínicos a serem 90% resistentes ao antibiótico penicilina. Esses antimicrobianos, chamados de antibiótico β -lactâmicos, produzem um efeito bactericida por inibição da enzima que sintetiza a parede celular do microrganismo, pelo catabolismo no estágio vital da biossíntese da parede. Desse modo, a inibição é resultado direto da ligação covalente do antibiótico com uma ou

mais enzimas penicilinas sensíveis, denominadas de proteínas ligantes da penicilina (PBPs).

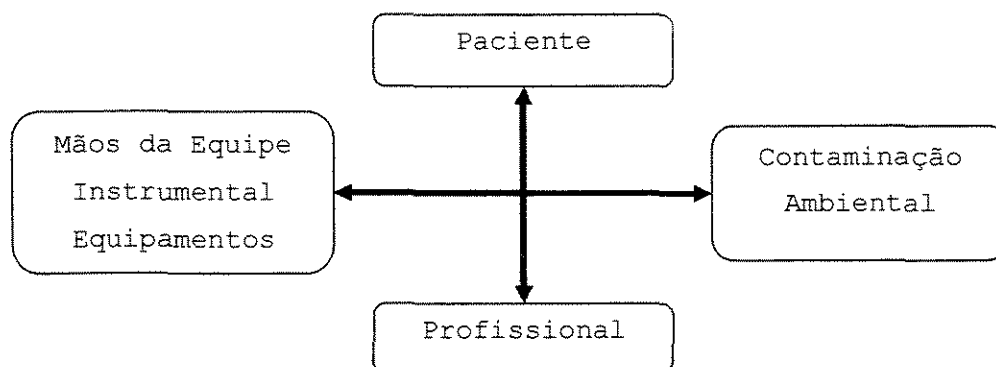
O *Staphylococcus aureus* possui três mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, clinicamente significativos. O primeiro é a inativação da penicilina através da hidrólise do anel β -lactâmico pela penicilinase ou β -lactamase. O segundo mecanismo é igualmente efetivo contra penicilinas β -lactamase sensíveis e resistentes, pois envolve a baixa afinidade à substância PBPs, uma vez que o antibiótico dificilmente se ligará a essa proteína. O último mecanismo é a tolerância desse microrganismo aos efeitos bacterianos dos antibióticos β -lactâmicos. (SABATH, 1982; NETO *et al.*, 2000).

Como os *Staphylococcus aureus* multirresistentes se tornaram um problema constante aos hospitais e para a comunidade relacionada com a área da saúde (HORIBA *et al.*, 1995; VALENCIA *et al.*, 1997; BERNARDS *et al.* 1998), é de grande interesse observar a disseminação desse microrganismo, também na clínica odontológica.

Esse é um ambiente que possui um alto índice de contaminação tanto bacteriana, como fúngica e viral. Por sua vez a disseminação desse microrganismo no ambiente ontológico, também ocorre, pois os profissionais dessa área estão expostos direta e continuamente a uma grande variedade de microrganismos presentes, especialmente, no sangue, na saliva e nas vias aéreas respiratórias dos pacientes (FERNANDES, 2000).

Muitos aspectos da prática odontológica contribuem para a transmissão de *S. aureus* e outros microrganismos em um ambiente clínico (FIG. 01). As principais rotas de transmissão e disseminação de microrganismos, entre eles o *S. aureus*, é: - o contato direto com lesões infectadas, inoculação de sangue ou saliva contaminados através de inalação ou ingestão dos microrganismos; - transmissão indireta através de objetos contaminados; - extravasamento de sangue, saliva ou secreções contaminadas; - e a aerossolização dos fluidos biológicos com transferência de microrganismo (AUTIO *et al.*, 1980; SAMARANAYAKE *et al.*, 1995; FERNANDES, 2000), sendo esta aerossolização formada, quando se utilizam instrumentos rotatórios de baixa e alta rotação ou seringas acopladas ao sistema ar/água (ITO *et al.*, 1998).

FIGURA 01: Cadeia epidemiológica da infecção na prática odontológica



Estudos relatam que os microrganismos da cavidade bucal e do trato respiratório podem ser transportados pelo aerossol e pelos respingos gerados durante os procedimentos operatórios dentais, podendo contaminar a pele, as membranas mucosas da cavidade bucal, do sistema respiratório e da conjuntiva

dos olhos da equipe odontológica (MILLER *et al.*, 1971; EARNEST & LOESCHE, 1991; BENTLEY *et al.*, 1994). Segundo CRAWFORD (1983) muitas infecções, que se originam no consultório odontológico, podem ser causadas por transmissão de *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Treponema pallidum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Hemophilus* spp, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, vírus respiratórios e hepatite virais. A viabilidade desses microrganismos dentro do ambiente é de alguns minutos até semanas (QUAD. 01).

QUADRO 01: Distribuição, fonte/procedência e viabilidade no ambiente.

Microrganismo	Fonte/Procedência	Viabilidade
<i>Staphylococcus aureus</i>	Saliva, pele, exsudato.	Cinco dias
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Saliva, secreções.	Dois dias
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Escarro.	Duas semanas
Vírus Herpes Simples (HVS)	Saliva, vesícula.	Minutos
Vírus Herpes Zoster (VHZ)	Saliva, vesícula.	Horas
Vírus Caxumba	Saliva.	Horas
Vírus Influenza	Saliva, secreções.	12 horas
Vírus Hepatite A (HVA)	Saliva, sangue, urina.	Semanas
Vírus Hepatite B (HVB)	Saliva, sangue.	Semanas
Vírus AIDS (HIV)	Sangue.	Minutos
<i>Streptococcus</i> "grupo mutans"	Saliva.	Horas

Fonte: PIMENTA *et al.*, 1999.

Como a contaminação do ambiente clínico pelo aerossol proveniente do sistema de refrigeração desses instrumentos rotatórios é muito grande, a redução ao máximo da possibilidade de contaminação cruzada requer a lavagem das

mãos, o uso de luvas, máscaras, protetores oculares, aventais, de campos cirúrgicos, etc. (WOOD, 1993; BUGARDT & LEÃO, 1997). Além disso, outros procedimentos são realizados para diminuir essa contaminação, como a utilização de barreiras físicas (diques de borracha) e sugadores de alta potência (MILLER *et al.*, 1971, COCHRAN *et al.*, 1989).

Ocasionalmente, essa contaminação pode levar a uma infecção. Porém o desenvolvimento de um processo infeccioso dependerá da relação que o microrganismo estabelece com seu hospedeiro. Para combater o processo infeccioso, normalmente utiliza-se de antimicrobianos, e o resultado do tratamento, vai depender da correta identificação, tipabilidade do microrganismo e a seleção da droga mais eficiente (NEIDLE & YAGIELA, 1991).

Devido à importância da disseminação dos estafilococos multirresistentes, torna-se necessário à caracterização e diferenciação dos isolados, além do nível de espécie de uma determinada cepa. Para caracterizar esses isolados, diversos tipos de técnicas, tanto fenotípicas como genotípicas, são utilizadas nos laboratórios de microbiologia.

A tipagem de microrganismos em níveis cada vez mais detalhados tem aplicação em diferentes áreas da microbiologia como, por exemplo, auxiliar na investigação de surtos nosocomiais (BINGEN, 1994; JARVIS, 1994), determinação da relação filogenética entre organismos (GRIMONT & GRIMONT, 1986) e estudos da dinâmica das infecções bacterianas na prática clínica (LIPUMA *et al.*, 1989).

Entretanto, a escolha de quais técnicas de tipagem em especial utilizar nem sempre é uma decisão simples, pois elas possuem características intrínsecas próprias e deve-se levar em conta o propósito da investigação. MASLOW *et al.*, 1993 caracterizaram métodos de tipagem usando cinco critérios ou propriedades desejáveis, que são: tipabilidade, reprodutibilidade, poder discriminatório, facilidade de interpretação e facilidade de uso.

Tipabilidade refere-se à habilidade que a técnica possui em fornecer resultado preciso e único para cada isolado examinado; isolados não tipáveis são aqueles que apresentam resultados nulos ou de dupla interpretação. A reprodutibilidade é a capacidade da técnica produzir o mesmo resultado quando o isolado é testado repetidamente. Já o poder discriminatório refere-se à habilidade que a técnica apresenta em discernir entre amostras relacionadas e não relacionadas. Essa discriminação é importante, porque alguns sistemas de tipagem têm a capacidade de posicionar os organismos em alguns grupos principais, enquanto outros dividem os isolados em alguns pequenos agrupamentos ("clusters"), freqüentemente subdividindo grupos de isolados que estão estreitamente ligados em um evento epidemiológico (TENOVER *et al.*, 1994). Facilidades de interpretação e de uso são da mesma maneira ferramentas de grande importância para as várias técnicas.

Características referentes aos procedimentos técnicos realizados também devem se avaliadas. Assim, a análise de custo, infra-estrutura de equipamentos e a dificuldade de execução e/ou interpretação devem ser levadas em conta na escolha do método a ser empregado. O tempo para a obtenção dos

resultados também pode ser um fator importante em determinadas situações, como por exemplo, um surto de infecção hospitalar em curso com altas taxas de mortalidade.

A análise de várias bactérias isoladas por métodos fenotípicos e genotípicos pode ser usada para identificar características de espécies particulares. A divisão de descendência dentro de subgrupos definidos é chamada de tipagem bacteriana. O pré-requisito para todo método de tipagem existente é que as linhagens derivadas de um mesmo clone compartilham as mesmas características em comparação com linhagens derivadas de diferentes clones. O clone bacteriano pode ser considerado como único. Quando esse clone bacteriano se divide, a prole mostra uma composição genética idêntica. Contudo durante o processo de multiplicação diferenças ao nível do DNA podem ser detectadas, por exemplo, a troca de um simples par de bases, a deleção de um gene ou quando há uma transformação com a entrada do DNA de outra bactéria. Essas mudanças são dependentes do número de divisões celulares e a distância genética entre as linhagens derivadas de um único clone, podendo aumentar essa distância com o passar do tempo (BUSCH & NITSCHKO, 1999).

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 os isolados de uma mesma cepa a apresentarem resultados distintos (MULLIGAN

& ARBEIT, 1991). Entre essas técnicas podemos citar: - a biotipagem; - o antibiograma; - a sorotipagem; - a fagotipagem; - análise isoenzimática ou "*Multi Locus Enzymes Electrophoresis*" (MLEE); e, etc.

Um painel de reagentes bioquímicos pode ser utilizado para identificar um determinado microrganismo pela sua reação e pode-se classificar os mesmos ao nível do gênero e de espécies (BUSCH & NITSCHKO, 1999). Essa técnica denomina-se de biotipagem e consiste em uma técnica amplamente utilizada, também, para fins de taxonomia, pois se baseia 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, 1997). A fermentação da glicose, lactose e outros açúcares podem, por exemplo, serem detectados através da formação de gases ou por mudança de cor de um indicador de pH, causadas pela produção de ácidos. Para fins de estudo de classificação ao nível de subespécie, essa técnica não apresenta resultados satisfatórios, pois subdividem isolados pertencentes a um mesmo clone em subgrupos menores com pouca, ou nenhuma, correlação epidemiológica, como apresentado por TENOVER *et al.* 1994 e por BUSCH & NITSCHKO, 1999.

Já com a técnica de antibiograma as bactérias podem ser classificadas de acordo com o seu crescimento ou susceptibilidade a presença de 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 reflexões. Como a aquisição ou perda de resistência a uma certa droga pode-se dar de diferentes maneiras, como por exemplo, mutação do DNA cromossômico, perda

ou aquisição de plasmídeo ou por alteração na regulação gênica, o poder discriminatório e a reprodutibilidade da técnica são bastante variáveis (MULLIGAN & ARBEIT, 1991; BUSCH & NITSCHKO, 1999). Somente em casos individuais é que a susceptibilidade aos antimicrobianos pode ser utilizada como procedimento de tipagem.

A técnica de fagotipagem se baseia na susceptibilidade das amostras em estudo a serem analisadas com um painel de bacteriófagos. A comparação dos padrões de susceptibilidade e resistência a esses fagos permite relacionarem isolados agrupando-os em cepas (MASLOW *et al.*, 1993). A tipagem por fagos é extensivamente utilizada para analisar a epidemiologia de *S. aureus*, porém essa técnica não se mostra muito discriminatória e possui um uso limitado. A sorotipagem é uma técnica onde organismos de uma mesma espécie podem exibir diferenças antigênicas ao nível de membrana ou parede celular. Estas podem ser devidas à presença de lipopolissacarídeos (LPS), proteínas de membrana ou fimbrias, por exemplo. Esse método de análise também não possui um bom poder discriminatório e está restrito a certas aplicações.

O estudo das isoenzimas, ou também conhecido, como “*Multi Locus Enzymes Electrophoresis – MLEE*” compara os microrganismos com base no perfil obtido por eletroforese de um grupo de enzimas metabólicas. Tem boa tipabilidade e permite a análise matemática muito precisa, mais seu baixo poder discriminatório limita seu uso em estudos de epidemiologia hospitalar e análise populacional (ARBEIT, 1997; BUSCH & NITSCHKO, 1999). Esse método de tipagem foi usado por décadas no campo da genética populacional e sistemática

de eucarióticos. Contudo SELANDER, *et al.*, 1986, foram pioneiros na utilização dessa técnica em microrganismos procarióticos, principalmente em estudos com *Escherichia coli*, onde surgiu o interesse dos microbiologistas da área médica por esse método (BOERLIN, 1997).

No *MLEE*, uma cultura pura do organismo a ser testado tem o seu crescimento em condições ideais, as células são lavadas com uma solução tampão e posteriormente são adequadamente lisadas por métodos específicos, como por exemplo, com tratamento com ultra-som, vortexização com pérolas de vidro ou congelamentos e descongelamentos repetidos. A fração solúvel em água do lisado é obtida por centrifugação e as enzimas citoplasmáticas contidas na solução são separadas pela sua função, pela sua massa molecular, carga elétrica e pela conformação eletroforética. A eletroforese é realizada, mais comumente, em gel de amido ou poliacrilamida e os procedimentos de coloração específicos são subseqüentemente usados para revelar a atividade metabólica das enzimas após a migração eletroforética (SELANDER *et al.*, 1986; BOERLIN, 1997).

Após a coloração do gel a posição de cada banda, que é intrínseca a cada enzima, é marcada e comparada com os diferentes isolados nos estudos. As enzimas estudadas usualmente participam do metabolismo básico da célula e são menos sujeitas às alterações das pressões seletivas do ambiente. Diferentes interpretações poderão ser utilizadas por essa técnica, por exemplo, na verificação de clones de um determinado microrganismo podendo utilizar o *MLEE* para obter o grau de relação genética entre os isolados ou populações como apresentar

implicações sistemáticas e taxonômicas (SELANDER *et al.*, 1986; BOERLIN, 1997).

A partir dos estudos realizados por SELANDER e colaboradores em 1986, diversos outros foram e estão sendo feitos utilizando essa técnica para microrganismos patógenos, entre eles *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Haemophilus parasuis*, *Vibrio cholerae*, *Brucella* spp, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* grupo mutans (SELANDER *et al.*, 1986; KAPUR *et al.*, 1995; MASLOW *et al.*, 1995; TOMAYKO & MURRAY, 1995; BLACKALL, *et al.*, 1997; BÉLTRAN *et al.*, 1999; ROSA, *et al.*, 2000; GÁNDARA *et al.*, 2001; ROSA, 2001).

Em contraste com os métodos fenotípicos, os métodos genotípicos analisam diretamente o DNA (BUSCH & NITSCHKO, 1999). As técnicas de genotipagem apareceram com o avanço da biologia molecular, pois analisam o material genético cromossômico ou extracromossômico dos microrganismos. Se comparadas com as técnicas de fenotipagem, apresentam melhor poder discriminatório, tipabilidade e reprodutibilidade (OLIVEIRA & RAMOS, 2002), já que as características sob análise, presentes no material genético, são mais estáveis que as características fenotípicas e estão menos sujeitas a alterações por pressão seletiva do meio ambiente (TENOVER *et al.*, 1994). Essas técnicas podem ser realizadas e interpretadas através da análise plasmidial e da análise do DNA cromossômico, entre elas estão, o perfil do DNA cromossômico por enzimas de restrição, também denominadas de polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP*), reação em

cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction - PCR*), ribotipagem, eletroforese de campo pulsado (*Pulsed-field Gel Electrophoresis – PFGE*), etc.

A análise de plasmídios foi a primeira técnica de genotipagem desenvolvida e utilizada em estudos epidemiológicos (MASLOW, *et al.*, 1993). Essa análise é feita separando o DNA plasmidial da fração cromossômica do genoma e submetendo-o a provas, que vão desde a eletroforese em gel, que se encarregará de separar os vários plasmídios porventura existentes com base em sua massa molecular, carga elétrica e estrutura espacial, até a análise utilizando-se enzimas de restrição. Nesse último caso, o conteúdo plasmidial é submetido à 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.

Uma limitação dos estudos de base plasmidial é o fato de que nem todos os organismos os possuem, acarretando prejuízo para a tipabilidade da técnica e impossibilitando o seu uso para alguns isolados (TENOVER *et al.*, 1994). Ainda há a possibilidade de transmissão desses fragmentos entre microrganismos de uma mesma espécie ou interespecie, o que pode levar há uma rápida disseminação de um plasmídio em uma dada instituição, onde o poder discriminatório pode assim, sofrer interferências (ARBEIT, 1997). Mesmo assim, ainda é uma alternativa para o gênero *Staphylococcus* e algumas espécies de enterobactérias (TENOVER *et al.*, 1994).

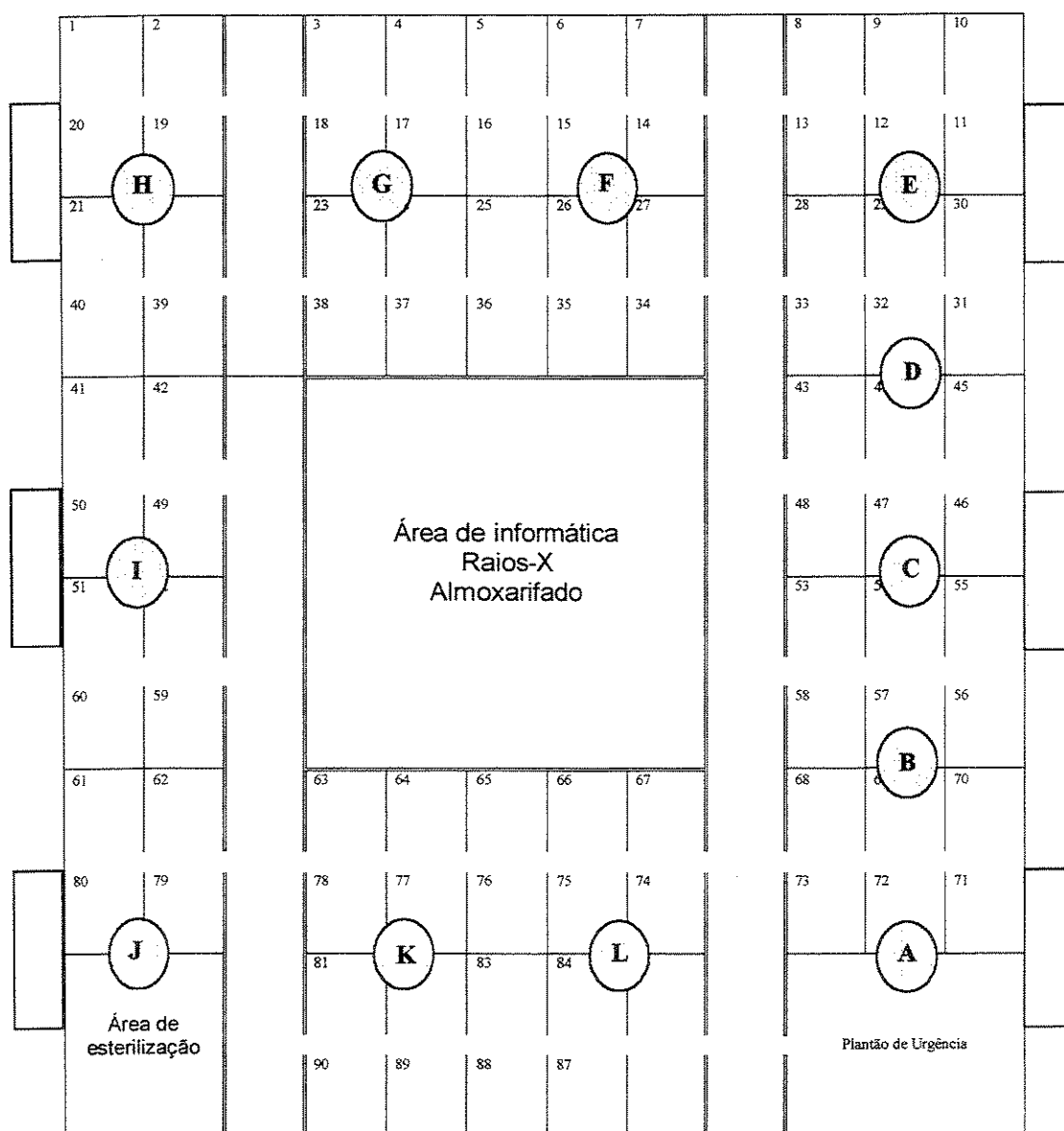
3. MATERIAL E MÉTODOS

a. Isolamento e Identificação de *Staphylococcus aureus*

As amostras de *S. aureus* foram coletadas do ar ambiente da clínica odontológica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP/UNICAMP, em um período de 12 meses, sendo que estas coletas foram conduzidas duas vezes ao mês, totalizando 24 amostragens. Determinou-se, conjuntamente, o número de pacientes atendidos em cada período da coleta, consultando-se a área de informática da instituição.

A clínica de graduação da Faculdade possui 90 equipos odontológicos separados por barreiras físicas de alvenaria, com uma altura aproximada de 1.40m, sobre as quais foram colocadas doze (12) placas de Petri dispostas por toda área da clínica, contendo o meio seletivo para *Staphylococcus*, Ágar Manitol Salgado (AMS) (FIG. 02).

No dia da coleta, elas foram mantidas abertas por 2 horas no período da tarde, durante os trabalhos da clínica integrada e plantão de urgência (FIG. 03). Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa a 37°C, por 48 horas no laboratório de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Diagnóstico Oral da FOP/UNICAMP. Após esse período, foram selecionadas das placas de cultura, colônias que apresentaram um halo amarelo indicativo da fermentação do manitol por estafilococos patogênicos (FINEGOLD & BARON, 1989).

FIGURA 02: Planta esquemática da clínica odontológica e disposição das placas.

A Placas e setores da clínica



FIGURA 03: Clínica odontológica com as placas dispostas nos setores determinados

A caracterização morfológica inicial dos isolados dessa espécie foi feita através da coloração de Gram, as quais se apresentaram ao microscópio como células esféricas de cerca de $1\mu\text{m}$ de diâmetro, Gram positivas, agrupados em massas irregulares ou em forma de cachos de uva. Concomitantemente, as colônias características foram submetidas ao teste da catalase, observando-se a formação de bolhas, indicativo de uma reação positiva.

A confirmação da identificação e caracterização da espécie *Staphylococcus aureus* foi baseada ainda, na utilização de meio cromogênico CSA (CHROMagar *Staphylococcus aureus*) e pelo teste da coagulase.

b. Meio Cromogênico - CHROMagar *Staphylococcus aureus*

As linhagens de *Staphylococcus*, previamente selecionadas, foram repicadas em meio de cultura cromogênico CHROMagar *Staphylococcus aureus* (CHROMagar - Paris), e incubadas a 37° C por 24 horas. As colônias de *Staphylococcus aureus* demonstraram uma coloração malva/roxa, sendo que outras cores diferentes desta foram identificados como *Staphylococcus* spp. (GAILLOT *et al.*, 2000; MERLINO *et al.*, 2000). Essas colônias foram então, inoculadas em Ágar Nutriente (NA) e incubadas a 37°C por 24 horas. Posteriormente ao seu crescimento, foram submetidas ao teste da coagulase (FIGS. 02 e 03 – ANEXOS).

c. Teste da Coagulase

Esse teste detecta a coagulase livre, que é secretada extracelularmente e que reage com o plasma, atuando sobre a protrombina e o fibrinogênio, formando um complexo de fibrina (KONEMAN *et al.*, 1994; MAZA *et al.*, 1999). Para o teste foi utilizado plasma de coelho liofilizado (Coagu-Plasma/LABORCLIN – Ltda.), acrescentando ao frasco 3,0mL de solução fisiológica (NaCl 0,85%), homogeneizando suavemente até a completa dissolução

do produto. Foi adicionado a um tubo de ensaio 0,5mL do plasma e uma quantia de colônias do microrganismo homogeneizando a suspensão. O tubo foi incubado (35°C por 4 -18 horas) e após esse intervalo detectou-se a formação de um coágulo, movimentando-se levemente o tubo. (KONEMAN *et al.*, 1994; MAZA *et al.*, 1999). As amostras coagulase positivas foram identificadas como *S. aureus*, as quais foram mantidas em NA, para uso posterior (FIG. 04 – ANEXOS).

d. Teste da Produção de Beta-lactamase

As β -lactamases são enzimas produzidas por algumas bactérias, que atuam na hidrólise do anel β -lactâmico da penicilina transformando-a em ácido e neutralizando seu efeito bactericida. O disco de Cefinase (Becton Dickinson and Company - USA) é impregnado com uma cefalosporina cromogênica, chamada nitrocefina. Esse disco sofrerá uma mudança rápida de cor do amarelo para vermelho quando a ligação amida do anel β -lactâmico for hidrolisada pela β -lactamase.

Quando o *Staphylococcus aureus* produzir essa enzima em quantidade significativa, o disco de cor amarela se transformará em vermelha na região de contato com o microrganismo. O teste foi realizado colocando os discos sobre lâminas para microscopia, umedecidos com H₂O destilada estéril. Com uma alça de platina, foram coletadas algumas colônias de *S. aureus* do NA e espalhadas sobre os discos. Os resultados foram obtidos e a interpretação foi realizada segundo as instruções do fabricante (QUAD. 02) (FIGS. 05 e 06 – ANEXOS).

QUADRO 02: Interpretação para a produção de β -lactamase

Microrganismo	Resultado	Tempo/ reação	Interpretação
<i>Staphylococcus aureus</i>	positivo	1 hora	Resistente para penicilina, ampicilina, carbenicilina. Provável susceptibilidade para cefalotina, oxacilina e penicilinas β -lactamase resistentes.

e. Avaliação da Resistência - Antibiógrama

Para a avaliação da resistência aos antibióticos, pelo método de difusão em discos (BAUER *et al.*, 1966), foram utilizadas culturas jovens de *Staphylococcus aureus*, cultivadas em meio BHI caldo (Brain Heart Infusion Broth), incubadas a 37°C por 2 a 8 horas, e padronizadas com uma turbidez de 0,5 na escala MacFarland, a qual correspondem a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia (UFC/mL). Esta foi ajustada, quando necessário, para igualar ao padrão da escala por diluição, adicionando solução salina ou BHI (MAZA *et al.*, 1999).

Após a padronização, uma zaragatoa ("swab") estéril foi mergulhada no inóculo e espalhado por toda a superfície do Ágar Mueller-Hinton (AMH) por rotação. Nesta placa foram aplicados os discos impregnados com os respectivos antibióticos ampicilina, amoxicilina/ac. clavulânico, cefalotina, clindamicina, eritromicina, oxacilina, tetraciclina e vancomicina. As placas foram então, incubadas por 24 a 48 horas e após esse período procedeu-se à mensuração do halo de inibição, ao redor do disco (MAZA *et al.*, 1999).

Para a realização do teste foram utilizadas culturas jovens de *S. aureus*, cultivadas em tubos com o meio BHI caldo a 37°C por 2 a 8 horas e padronizadas para uma turbidez de 0,5 na escala MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Após a padronização, uma zaragatoa ("swab") estéril foi mergulhada no inóculo e espalhado por toda a superfície do AMH, suplementado com NaCl a 4%, por rotação de 60° e após alguns minutos, sobrepos-se à tira do antibiótico oxacilina. As placas foram colocadas na estufa a 37°C por 24 horas. Passado esse período, procedeu-se à leitura dos resultados seguindo os padrões estabelecidos no *QUAD. 04* conforme instruções do fabricante (*FIGS. 10 a 12 – ANEXOS*).

QUADRO 04: Padrão para interpretação para MIC com o Etest oxacilina.

Antibacteriano	Controle de Qualidade	Padrão Interpretativo Em µg/mL		
		Resistente	Intermediário	Sensível
Critério - NCCLS Oxacilina	S. aureus ATCC 43300 16-64	≥04	-	≤ 02
Critério - fenotípico Oxacilina		Gene mecA + ≥04		

g. Caracterização Plasmidial dos *S. aureus*

Para a realização do isolamento plasmidial foi utilizado o protocolo descrito por Giambiagi-de-Marval, 1990. As culturas foram crescidas em 3,0mL de meio de cultura BHI, incubadas por 18 horas (overnight), a 37°C. As células foram colhidas após centrifugação a 12.100g por 15 minutos. As mesmas foram lavadas 01 vez em TE (0,01M de Tris; 0,01M de EDTA; pH 8,0). O sedimento celular (pellet) foi ressuspenso em 400µL de tampão de lise (0,05M de Tris, pH 8,8; 0,04M de EDTA, pH 7,5; 0,05M de NaCl; sacarose 25% P/V). Foram adicionados 4µL de lisostafina (Sigma – 1mg/mL de TE). A suspensão celular foi incubada a 37°C por 1 hora. Decorrido esse período, a suspensão foi tratada com 50µL de pronase (Sigma – 10mg/mL de H₂O destilada) e incubada por 10 minutos, a 37°C. Após esse tempo foram adicionados 100µL de SDS (10% P/V, em H₂O destilada). A preparação foi incubada novamente a 37°C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 60µL de KCl 4M, a preparação foi aquecida a 65°C por 5 minutos e transferido imediatamente para o gelo. Aguardou-se de 15 a 20 minutos e a preparação foi centrifugada a 12.100g por 15 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e o DNA foi precipitado com dois volumes de etanol gelado (aproximadamente 800µL) a -20°C por 18 horas (ou a -70°C por 1 hora). Após esse período as preparações foram centrifugadas a 12100g por 30 minutos a 4°C.

Uma vez isolado, o DNA plasmidial foi ressuspenso em 50µL de TE e estocados a 4°C até o seu uso. As frações foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 0,8% por 2 horas (WOODFORD *et al.*, 1994), utilizando 10µL do

DNA plasmidial, juntamente com 5µL de tampão de corrida (stop mix - glicerol (50%), azul de bromofenol (0,125%) e xileno cianol (0,125%)).

Após a corrida eletroforética, os géis foram corados com brometo de etídio durante 30 minutos. Os mesmos tiveram as suas imagens capturadas pelo sistema de documentação de gel *ImageMaster VDS* (Amersham Pharmacia Biotech do Brasil – Ltda) e processadas pelo programa SigmaGel (Jandel Informatics), determinando-se as massas moleculares dos plasmídios através de procedimentos de regressão linear, estabelecidos a partir do padrão molecular *1 Kb DNA Extension Ladder* (Life Technologies – Ltda).

Em posse das massas moleculares, os perfis dos isolados foram convertidos em matriz de dados binários, a presença de banda recebeu o valor 1 e a ausência o valor 0. A mesma foi analisada pelo programa estatístico NTSYS (DHMOON – Applied Biostatistics), utilizando o coeficiente *SIMPLE MATCHING*, e o método de agrupamento *UPGMA*, formando o dendograma de similaridade entre os perfis plasmidiais.

h. Eletroforese de Isoenzimas – *MLEE*

As linhagens de *S. aureus* foram cultivadas por 24 horas, em frascos com 200mL de caldo de BHI, a 37°C em agitador orbital (shaker). Após esse período de incubação as culturas foram centrifugadas a 5000g por 3 minutos e as células foram lavadas duas vezes com tampão fosfato de potássio 40mM (pH 7,5).

Os sedimentos celulares foram transferidos para tubos criogênicos (2,0mL), ressuspensos com 250 μ L de tampão fosfato, aos quais foram adicionadas pérolas de vidro (0,45 - 0,55mm $\cdot$) em quantidades iguais as das massas celulares. Os tubos foram dispostos em um disruptor de células para oito tubos (Bead Beater – Biospec, Inc.), agitados a 4500rpm por 1 minuto, em tomadas de 30 segundos, com os tubos sempre mantidos a 0°C. Para obtenção dos sobrenadantes com as proteínas citoplasmáticas totais os tubos foram centrifugados a 15000g. Esses foram transferidos para tubos de microcentrífuga (1,5mL), mergulhando as tiras de papel de filtro (wicks) Whatman no.3 de 5x12mm, que foram mantidas a -70 °C, até o momento de uso.

A eletroforese foi processada em suporte de amido (SMITHIES, 1955) de milho hidrolisado (Penetrose 30 – Refinações de Milho Brasil Ltda) a 13% em solução tampão (Tampão A) na concentração de 1:30, de acordo com SELANDER (1986). O amido foi dissolvido e cozido sob aquecimento em forno de microondas e agitação. O mesmo foi vertido em molde de acrílico de 200x120x10mm (ALFENAS *et al.*, 1998) até o seu completo resfriamento.

Foi realizado um corte longitudinal a 25mm de uma das margens do gel de amido. A menor porção foi afastada e inseriram-se os “wicks” com as amostras protéicas. Uniram-se as duas partes e todo o conjunto foi levado ao refrigerador. Os moldes foram colocados sobre cubas contendo o sistema de tampão A (SELANDER *et al.*, 1986) e conectados por pontes de tecido (Perfex®) embebidas em tampão.

A partir de uma fonte de eletroforese foi utilizada uma d.d.p. de 130volts “overnight” com o indicador de migração (azul de bromofenol) entre 80-100mm em relação à linha de aplicação. Ao término da corrida o gel foi fatiado em plano transversal de modo a formar lâminas de aproximadamente 1,5mm de espessura por intermédio de réguas sobrepostas e de um fio de nylon (linha para pesca nº 15). Essas fatias foram removidas para cubas de porcelana, recipientes nos quais foram realizadas as revelações enzimáticas (FIG. 13). De acordo com SELANDER *et al.*, 1986 e ALFENAS *et al.*, 1998, os sistemas analisados foram: - catalase (CAT – EC 1.11.1.6); - álcool desidrogenase (ADH – EC 1.1.1.1); - glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH – EC 1.1.1.49); - glucose desidrogenase (GDH – EC 1.1.1.47); - malato desidrogenase (MDH – EC 1.1.1.37); - β -galactose desidrogenase (GLDH – EC 1.1.1.48); - α,β esterase (α,β EST – EC 3.1.1.1); - manitol-1-fosfato desidrogenase (M1P – EC 1.1.1.14).

Após a revelação das bandas de cada enzima, as imagens foram capturadas por “scanner” (HP – modelo ScanJet 4C/T) e analisada pelo programa SigmaGel (Jandel Informatics), obtendo os valores de mobilidade relativa (Rm) para cada banda, em função da distância de migração do azul de bromofenol. Esses perfis foram convertidos em matriz de dados binários, na qual a presença de banda recebeu o valor 1 e a ausência o valor 0. Essa matriz foi analisada pelo programa estatístico NTSYS, utilizando-se o coeficiente de similaridade *SIMPLE MATCHING* e o método de agrupamento *UPGMA*, originando o dendograma de similaridade, com o agrupamento de clones bacterianos formados.

4. RESULTADOS

As amostras de *Staphylococcus aureus* foram coletadas do ar ambiente da clínica odontológica, dentro do período de setembro de 2000 a dezembro de 2001, excetuando-se os meses de janeiro, fevereiro e julho de 2001, onde a clínica odontológica passou por uma ampla reforma, evitando-se assim, variáveis que pudessem alterar os dados da presente pesquisa. Cada região onde foram dispostas as placas de Petri na clínica foi denominada por letras **A** a **L**, incluindo a letra **K**.

Após cada coleta, as amostras foram processadas nos laboratórios de Microbiologia e Imunologia – FOP/UNICAMP. O número total de colônias isoladas nas placas de AMS, nas vinte e quatro coletas, foi de 9775, com uma média de aproximadamente 407 colônias por coleta. Desse total, 32% (3149) das colônias fermentaram o manitol (manitol-positivas), enquanto que dessas colônias apenas 1,4 % (44) foram identificadas como *S. aureus* após os testes bioquímicos, como ilustra a TAB. 01.

TABELA 01: Linhagens Coletadas na Clínica Odontológica.

Coletas	Total – UFC	MAS	Chromagar
24	9775	3149	44
Média por coleta	407,2	131,2	1,8
%	-	32,2	1,4

Os dados fornecidos pelo setor de informática da faculdade permitiram conhecer o número de pacientes atendidos em cada dia de coleta, uma vez que os mesmos são cadastrados no banco de dados disponível na clínica. A média foi de 128 pacientes atendidos por período de trabalhos clínicos.

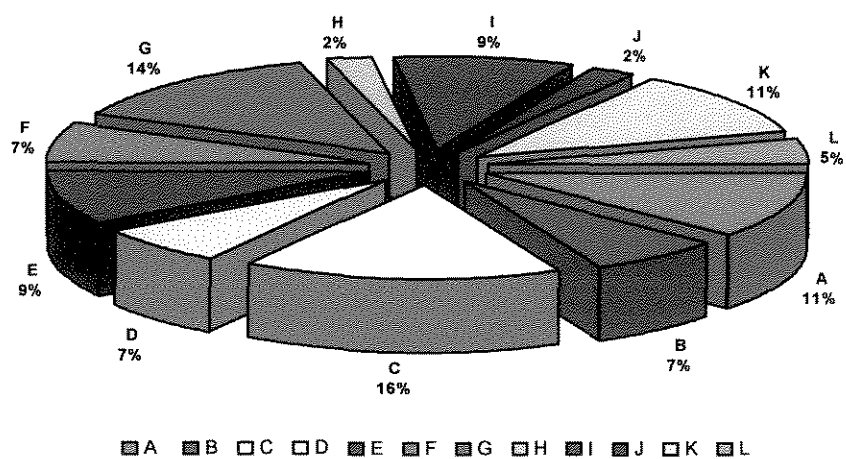
Depois de realizadas as coletas, todas linhagens que apresentaram um halo amarelo indicativo da fermentação do manitol, foram submetidas à coloração de Gram, ao teste da catalase, da coagulase, ao meio cromogênico e ao antibiograma. Foram identificadas 44 linhagens de *Staphylococcus aureus* no total das 24 coletas realizadas. Essas linhagens receberam uma sigla de identificação, indicando onde e quando foram coletadas (QUAD. 01 - ANEXOS).

Uma vez identificadas, determinou-se a prevalência das linhagens de *S. aureus* nas diferentes regiões da clínica odontológica, durante todas as coletas, conforme podemos demonstrar: - na data em que foi realizada a primeira coleta, 19/09/2000, foram isoladas quatro cepas em diferentes placas em diferentes partes da clínica **A, D, E, F**, como ilustra o QUAD. 05.

Com relação, ainda, à prevalência das amostras de *S. aureus*, dentro da clínica odontológica, podemos observar que foi isolado um maior número de linhagens de *S. aureus* no setor **C** (15,9%), seguido pelo setor **G** (13,6%), e pela área **A** (11,4%) onde são realizados os tratamentos odontológicos de emergência, seguido pelo setor **K, E** e assim por diante, como ilustra o GRAF. 01. Metade dos isolados (50%) foi coletada dos setores **A** a **E** indicando uma maior prevalência nos setores onde se encontram um maior número de equipes odontológicas.

QUADRO 05: Prevalência das Linhagens Dentro da Clínica Odontológica

Localização das linhagens na Clínica Odontológica												
Data	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
19/09/00	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
24/10/00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31/10/00	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
21/11/00	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
28/11/00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
05/12/00	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1
12/12/00	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
06/03/01	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27/03/01	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
03/04/01	0	1	2	0	0	0	1	0	0	0	1	0
17/04/01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15/05/01	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
29/05/01	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
19/06/01	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
26/06/01	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
07/08/01	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
28/08/01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11/09/01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25/09/01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
09/10/01	0	0	1	1	0	0	1	0	2	0	0	0
16/10/01	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
06/11/01	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0
27/11/01	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
04/12/01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total Parcial	5	3	7	3	4	3	6	1	4	1	5	2
Total	44											
%	11,4	6,8	15,9	6,8	9,1	6,8	13,6	2,3	9,1	2,3	11,4	4,5

GRÁFICO 01: Prevalência das Linhagens Dentro da Clínica Odontológica

Os resultados, para o teste de produção de β -lactamase, mostraram que 80% (35) das linhagens de *S. aureus* foram β -lactamase positivas e apenas 09 (20%) não produziram essa enzima, ou seja, β -lactamase negativas (QUAD. 06).

QUADRO 06: Produção de β -lactamase pelas linhagens de *S. aureus*

Produção de β -lactamase	n° de linhagens de <i>S. aureus</i>	%
β -lactamase positivos	35	80
β -lactamase negativos	09	20

A interpretação da produção dessa enzima em comparação com o antibiograma evidenciou que 11,3 % das amostras β -lac (–) foram sensíveis a todos antibióticos testados e 04 (8,7%) das β -lac (–) foram resistentes a eritromicina. As linhagens β -lac (+) foram resistentes a ampicilina conforme estabelecido pelo fabricante e comprovado pelo método de difusão em disco.

QUADRO 07: Produção de β -lactamase comparando com o Antibiograma

Resistência	Produção de β -lactamase		%
	β -lac positivos	β -lac negativos	
Sensível	—	05	11,3
Eritromicina	—	04	8,7
Ampicilina	35	—	80,0

O padrão de susceptibilidade das 44 linhagens de *S. aureus* isoladas, fornecido pelo método de difusão em disco, em relação aos oito antibióticos

analisados, após comparação dos resultados com os valores preconizados pelo NCCLS, foi estabelecido conforme ilustra o *QUAD. 08*.

QUADRO 08: Padrão de Susceptibilidade - Antibiógrama

S. aureus		Amp	Amc/Cla	Eri	Cli	Oxa	Tet	Cfl	Vac
01	WCA1909	R	S	S	S	S	S	S	S
02	WCD1909	R	S	S	S	S	S	S	S
03	WCE1909	S	S	R	S	S	S	S	S
04	WCF1909	R	S	S	S	S	S	S	S
05	WCB3110	R	S	R	S	S	S	S	S
06	WCD3110	R	S	R	S	S	S	S	S
07	WCB2111	R	I	S	S	S	S	S	S
08	WCF2111	R	S	S	S	S	S	S	S
09	WCE0512	R	S	S	S	S	S	S	S
10	WCI0512	R	S	S	S	S	S	S	S
11	WCK0512	R	S	S	S	S	S	S	S
12	WCL0512	S	S	R	S	S	S	S	S
13	WCC1212	S	S	S	S	S	S	S	S
14	WCA06031	R	S	R	S	S	S	S	S
15	WCA27031	S	S	S	S	S	S	S	S
16	WCC27031	R	S	S	S	S	S	S	S
17	WCF27031	R	S	R	S	S	S	S	S
18	WCB03041	R	S	S	S	S	S	S	S
19	WCC03041	S	S	R	S	S	S	S	S
20	WCC03041I	R	S	S	S	S	I	S	S
21	WCG03041	R	S	R	S	S	S	S	S
22	WCK03041	S	S	S	S	S	S	S	S
23	WCA15051	R	S	S	S	S	S	S	S
24	WCE15051	R	S	S	S	S	S	S	S
25	WCK15051	R	S	S	S	S	S	S	S
26	WCA29051	S	S	S	S	S	S	S	S
27	WCI29051	R	S	S	S	S	S	S	S
28	WCG19061	R	S	S	S	S	S	S	S
29	WCK19061	R	S	S	S	S	S	S	S
30	WCG26061	R	S	S	S	S	S	S	S
31	WCJ26061	S	S	S	S	S	S	S	S
32	WCL26061	R	S	S	S	S	S	S	S
33	WCC07081	R	S	S	S	S	I	S	S
34	WCK07081	R	S	S	S	S	R	S	S
35	WCC09101	R	S	R	S	S	S	S	S
36	WCD09101	R	I	S	S	S	I	S	S
37	WCG09101	R	S	S	S	S	I	S	S
38	WCI09101	S	S	S	S	S	S	S	S
39	WCI09101I	R	S	S	S	S	S	S	S
40	WCC19101	R	S	S	S	S	I	S	S
41	WCG06111	R	S	R	S	S	S	S	S
42	WCG06111I	R	S	S	S	S	S	S	S
43	WCH06111	R	S	S	S	S	I	S	S
44	WCE27111	R	S	S	S	S	I	S	S

Para o antibiótico ampicilina os resultados mostraram que 80% dos isolados foram resistentes, em relação a eritromicina 25% foram resistentes, e apenas duas linhagens (4,5%) demonstraram resistência intermediária para a amoxicilina/ácido clavulânico. Já para a tetraciclina 2,3% foram resistentes e 13,6% das linhagens apresentaram resistência intermediária. Para os outros antimicrobianos ensaiados a sensibilidade foi de 100% para os 44 isolados (QUAD. 09).

QUADRO 09: Resistência aos Antimicrobianos

Antibiótico	Resistência		
	Sensível	Intermediário	Resistente
Ampicilina	09/20	-	35/80
Eritromicina	34/75	-	10/25
Tetraciclina	37/84,1	06/13,6	01/2,3
Amoxac/ Ac. Clav	42/95,5	02/4,5	-

Na avaliação da mínima concentração inibitória (MIC) para a oxacilina, através do Etest (AB biodisk - Sweden) a interpretação seguiu os padrões estabelecidos de acordo com as instruções do fabricante. Baseados nestes dados foram obtidos os resultados da mínima concentração inibitória e susceptibilidade para o antibiótico oxacilina das linhagens de *S. aureus* isolados na clínica odontológica. Nenhuma linhagem se mostrou resistente a oxacilina (OSSA – *Staphylococcus aureus* Oxacilina Sensível). O maior valor para o MIC dentre

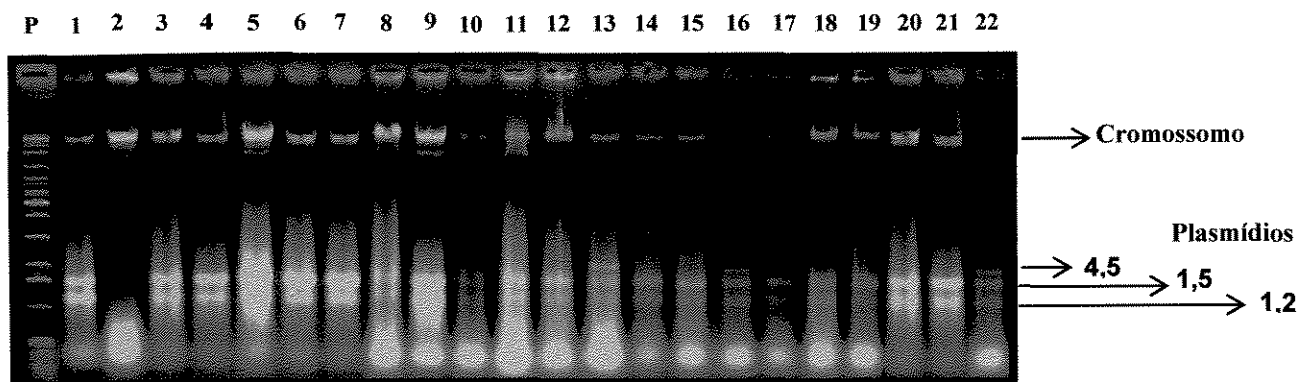
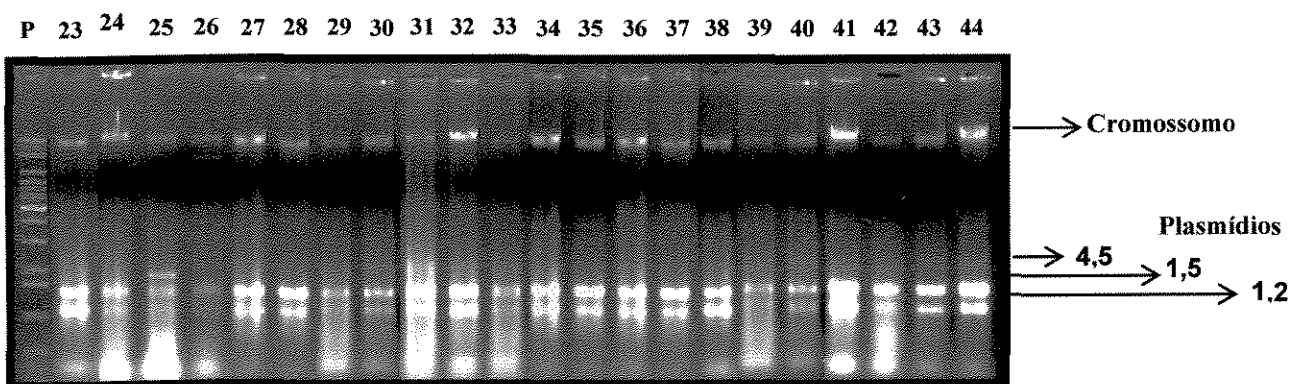
essas linhagens foi de 2 $\mu\text{g/mL}$ e o menor de 0,125 $\mu\text{g/mL}$ com uma média de 0,40 $\mu\text{g/mL}$, como pode ser observado na *TABELA 02*.

TABELA 02: Mínima Concentração Inibitória (MIC)

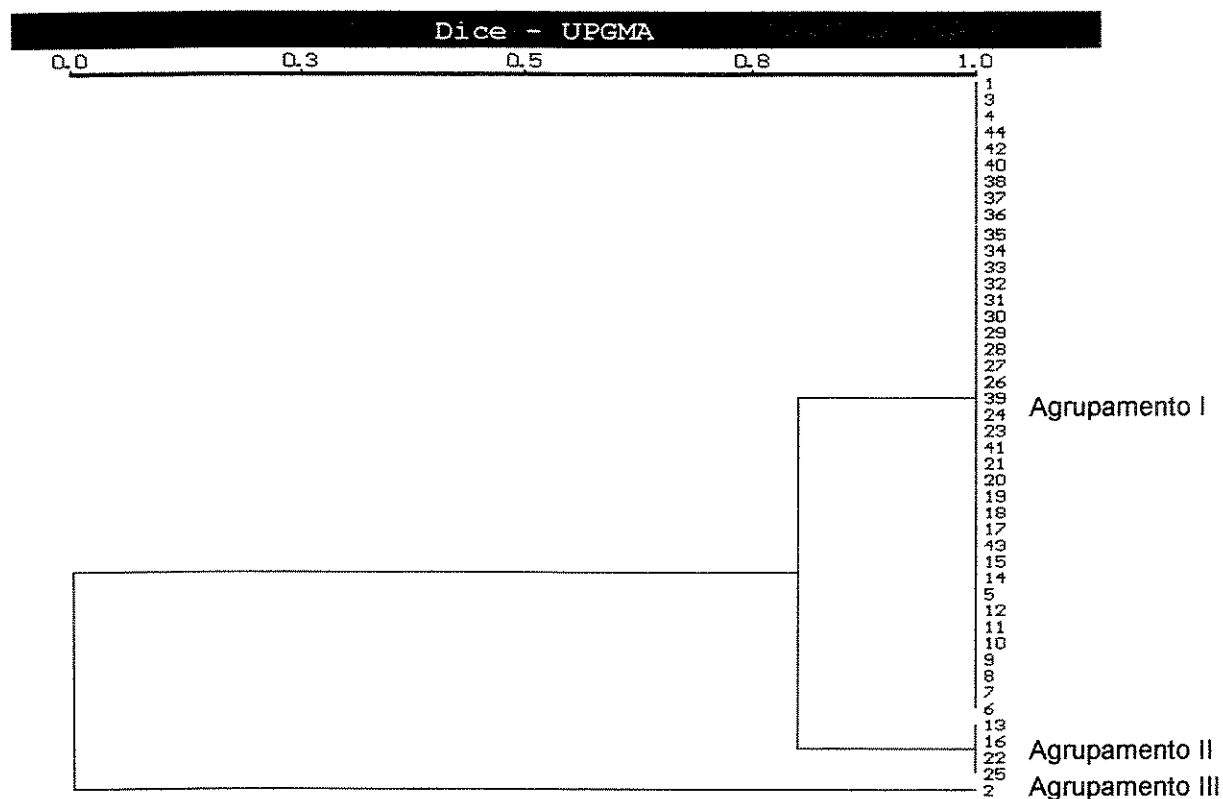
Linhagens	Etest	
	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	Sensível /Resistente
WCC27031	2,0	<u>S</u>
WCJ26061; WCI09101	0,125	<u>S</u>
Média Total	0,40	-

Após as análises dos parâmetros propostos, foi feito o isolamento e a caracterização plasmidial. A partir da corrida eletroforética, realizada em gel de agarose, a utilização do padrão de massa molecular de 1Kb (*1Kb DNA Extension Ladder - Life Technologies*) possibilitando a análise dos géis com o programa Sigma Gel (*Jandel Scientific*), nas quais foram determinadas as massas moleculares dos plasmídios. Os mesmos apresentaram 03 tamanhos distintos: - 4,5Kb; 1,5Kb; e, 1,2Kb respectivamente, conforme ilustra as *FIGS. 04 e 05*.

Com os perfis plasmidiais foi construída uma matriz de dados binários e utilizando o coeficiente de similaridade *SIMPLE MATCHING*, juntamente com o método de agrupamento *UPGMA*, construiu-se o dendograma de similaridade. Nele pôde-se observar a formação de 03 agrupamentos, denominados *I, II e III*, que foram obtidos a partir da presença e da massa molecular dos plasmídios isolados.

FIGURA 04: Isolamento Plasmidial das linhagens de *Staphylococcus aureus* de 01 a 22**FIGURA 05:** Isolamento Plasmidial das linhagens de *Staphylococcus aureus* de 23 a 44

No agrupamento *I* foram reunidas 18 linhagens de *S. aureus* apresentando o mesmo perfil plasmidial com 02 plasmídios isolados de massa molecular de 1,5Kb e 1,2Kb. Já no grupo *II* as linhagens 13, 16, 22 e 25 apresentaram 03 plasmídios com respectiva massa molecular de 4,5Kb, 1,5Kb e 1,2Kb. No agrupamento *III*, não foi isolado nenhum plasmídio (FIG. 06 E QUAD. 10). O perfil plasmidial, de todas as linhagens, foi comparado com a resistência (antibiograma), que pode ser observado no QUAD. 11.

FIGURA 06: Dendograma de Similaridade do Perfil Plasmidial de *S. aureus***QUADRO 10:** Perfil Plasmidial das linhagens de *S. aureus*

Agrupamento	Linhagens	%	Plasmídios
I	01, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44	88,6	02
II	13, 16, 22 e 25	9,1	03
III	02	2,3	00

QUADRO 11: Perfil Plasmidial X Antibiógrama

Agrupamento	Linhagens	Resistência - Antibiógrama
I	15, 26, 31, 38 01, 04, 08, 09, 10, 11, 18, 23, 24, 27, 28, 29, 30, 32, 39, 42 03, 12, 19 05, 06, 14, 17, 21, 35, 41 07 20 33, 37, 40, 43, 44 34 36	Sensível Amp Eri Amp/Eri Amp/Amc(I) Eri/Tet Amp/Tet(I) Amp/Tet Amp
II	13 16 e 25 22	Sensível Amp Eri
III	02	Amp

A padronização da técnica de eletroforese de isoenzimas (*MLEE*), foi realizada empregando-se os extratos celulares de *Staphylococcus aureus* (ATCC - 29213). Dentre todas as enzimas ensaiadas no processo, foram detectados perfis eletroforéticos analisáveis para as enzimas catalase, álcool desidrogenase, glucose-6-fosfato desidrogenase, glucose desidrogenase, malato desidrogenase, β -galactose desidrogenase, α , β - esterase, manitol-1-fosfato desidrogenase, sendo que, todas as enzimas acima citadas foram separadas em tampão A de acordo com os protocolos (*ANEXOS*). Uma vez padronizada a técnica, obtiveram-se as soluções protéicas das 44 linhagens isoladas de *Staphylococcus aureus*. Após a corrida eletroforética, aplicou-se os sistemas de coloração específica enzimáticos e obtiveram-se os perfis que foram expressos em eletroferogramas (*FIGS. 07 a 12*).

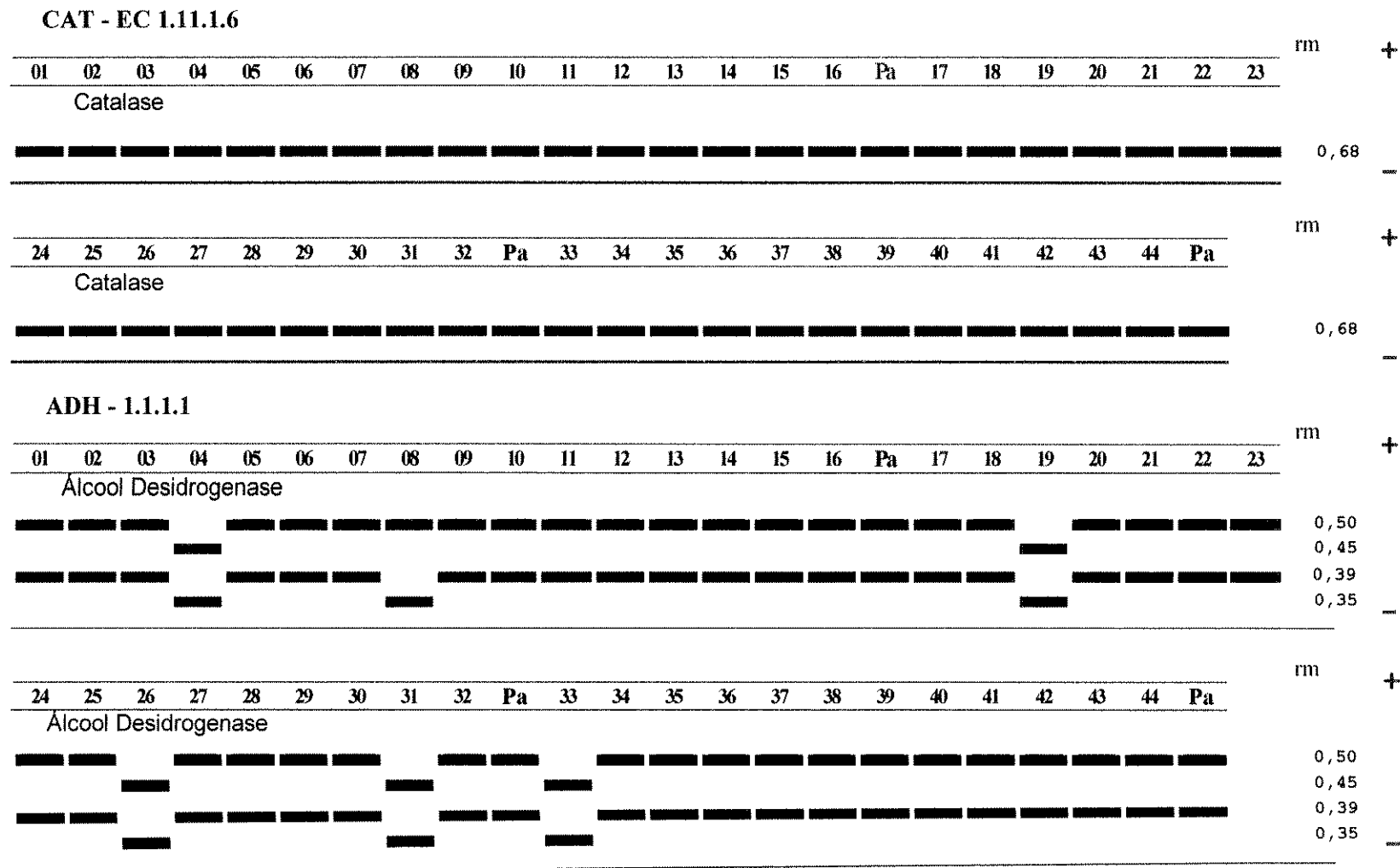
FIGURA 07: Eletroforegrama representativo dos perfis de migração das enzimas CAT e ADH para isolados de *S. aureus*.

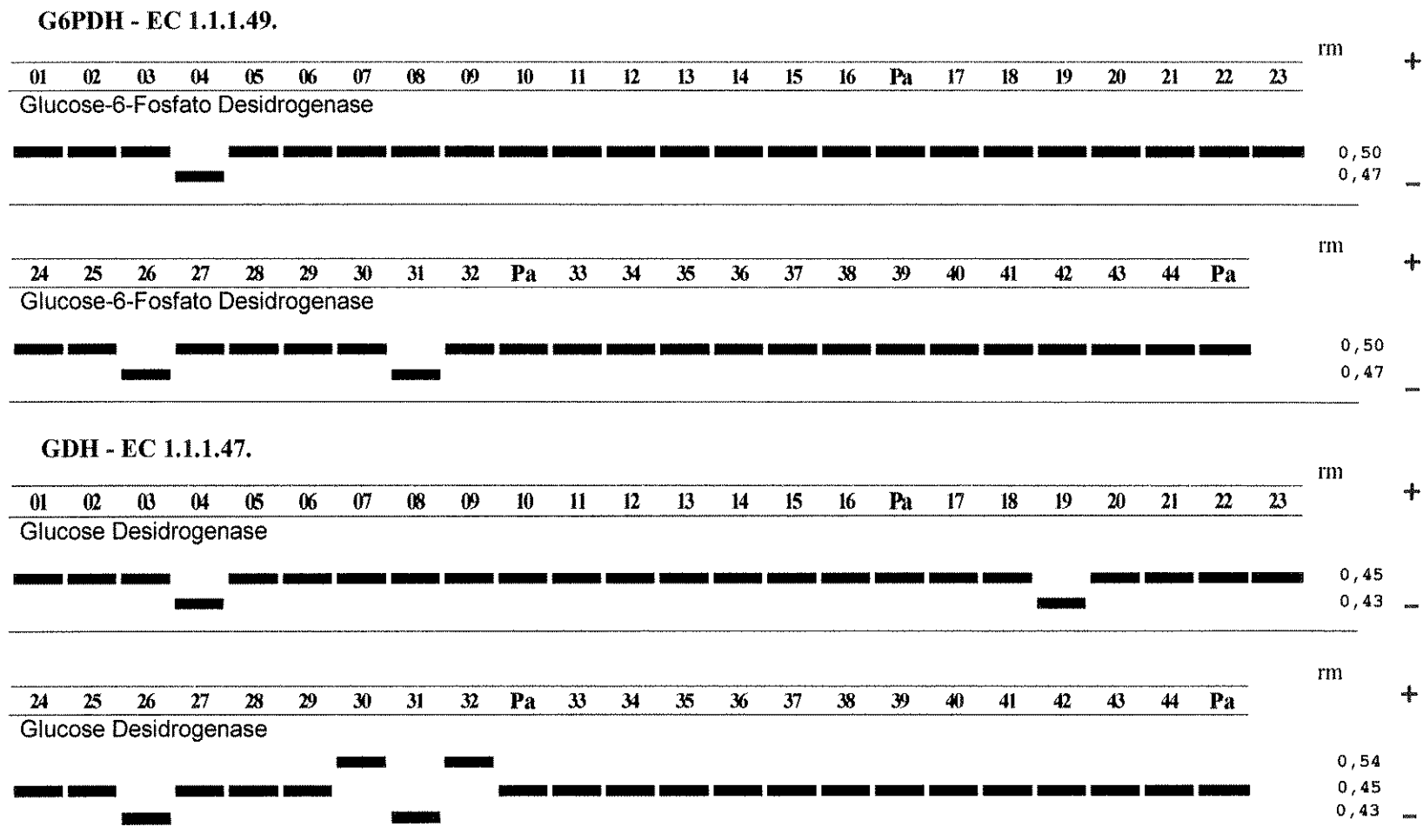
FIGURA 08: Eletroforegrama representativo dos perfis de migração das enzimas G6PDH e GDH para isolados de *S. aureus*.

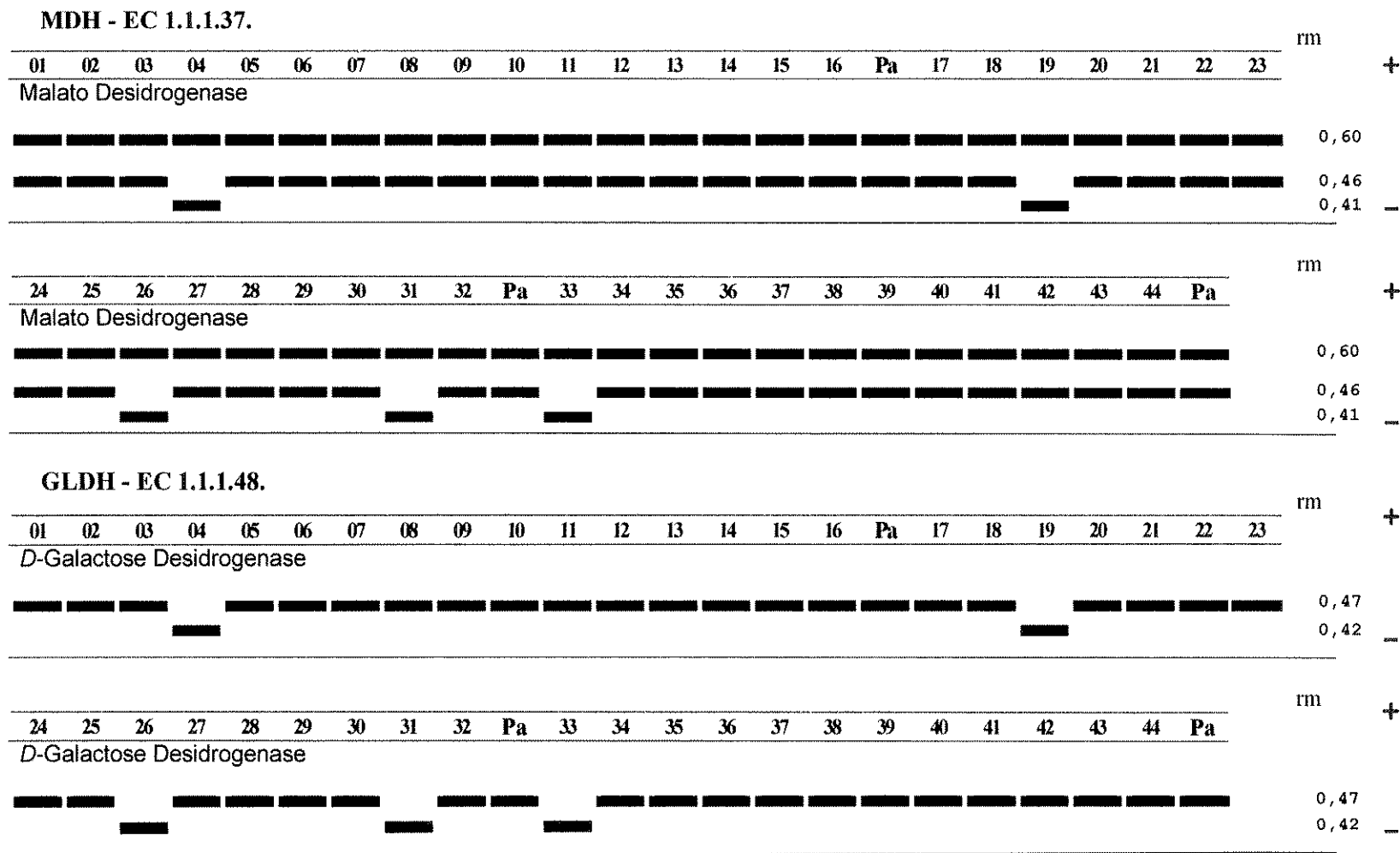
Figura 09: Eletroforegrama representativo dos perfis de migração das enzimas MDH e GLDH para isolados de *S. aureus*.

Figura 10: Eletroforegrama representativo dos perfis de migração das enzimas α – EST para isolados de *S. aureus*.

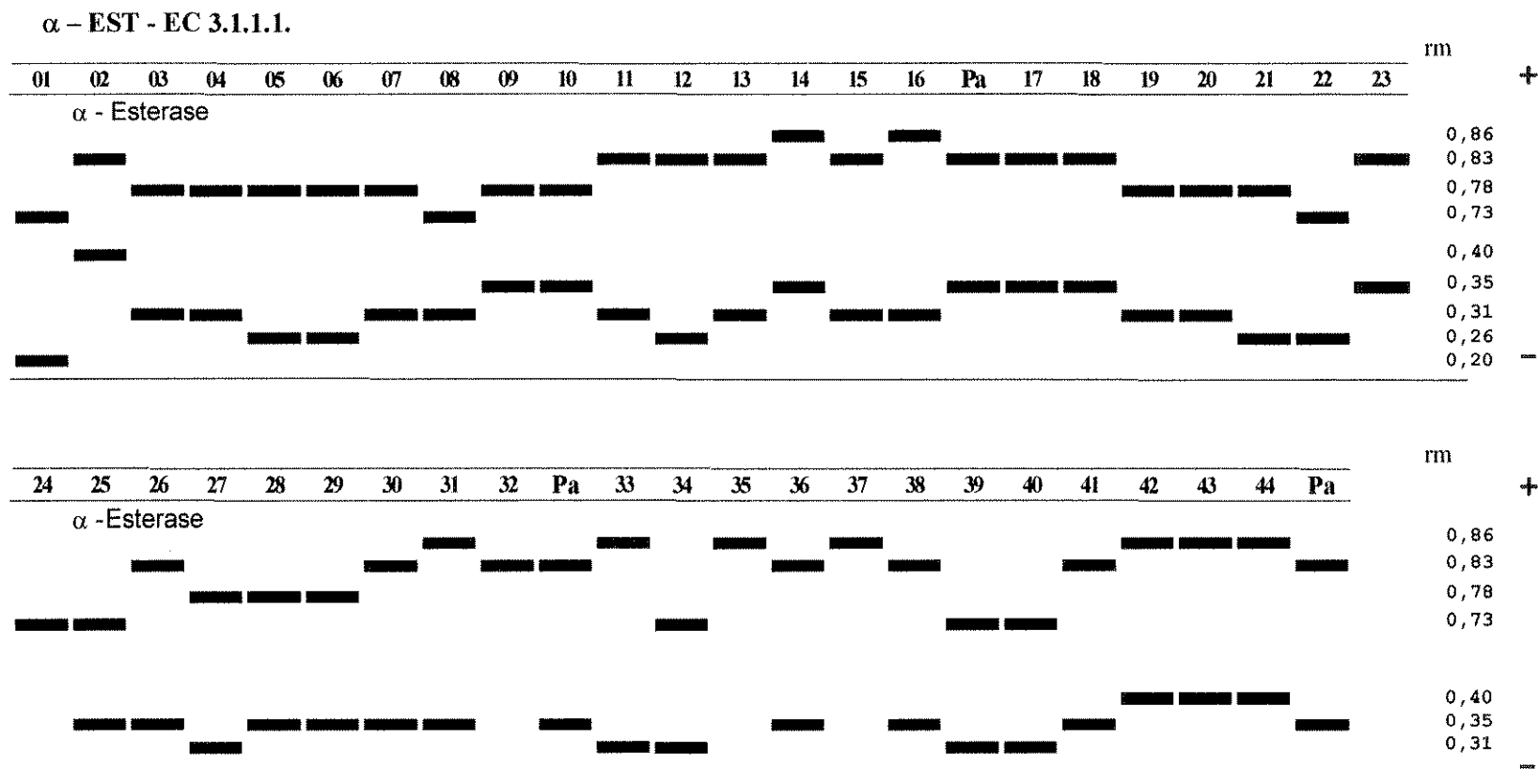


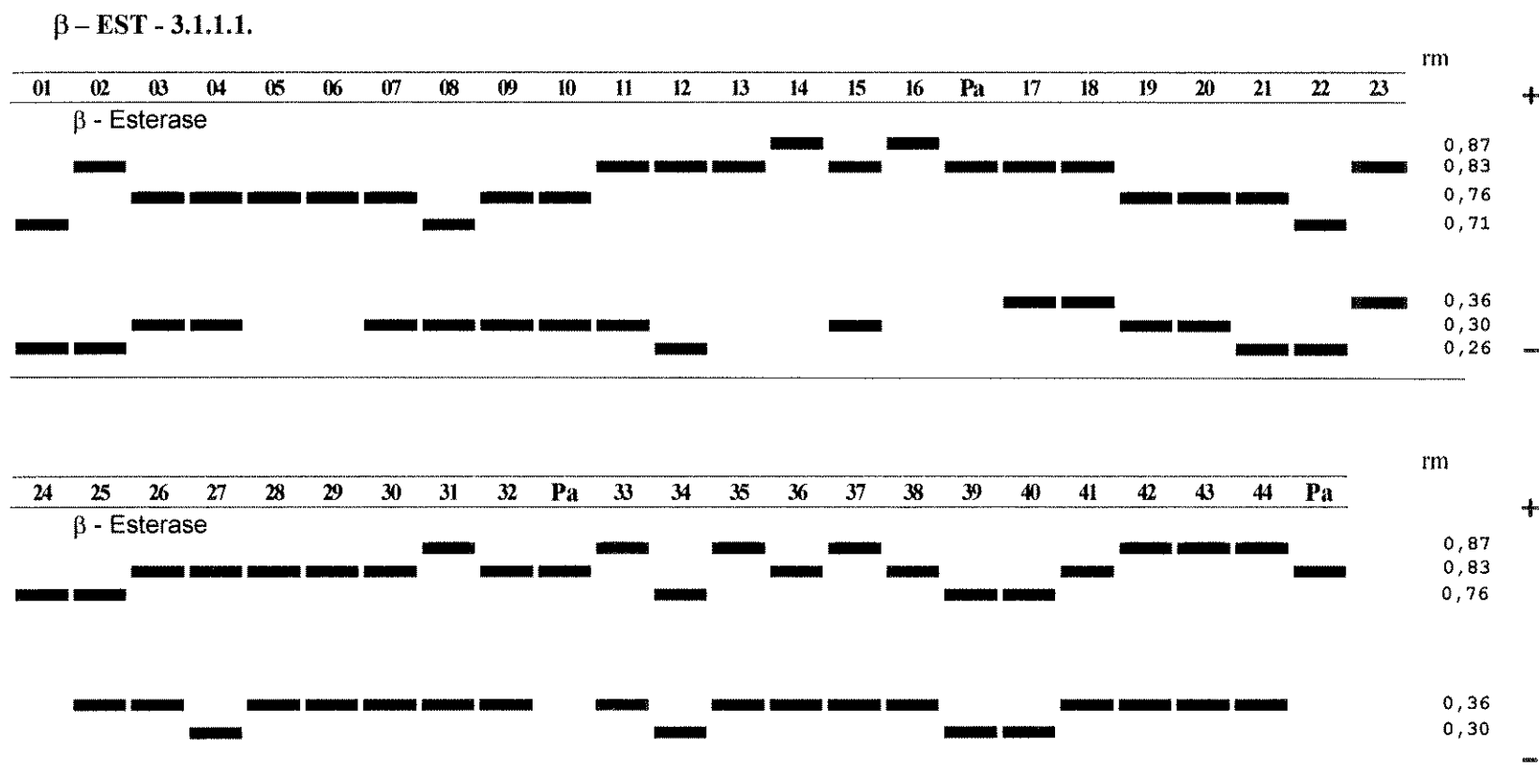
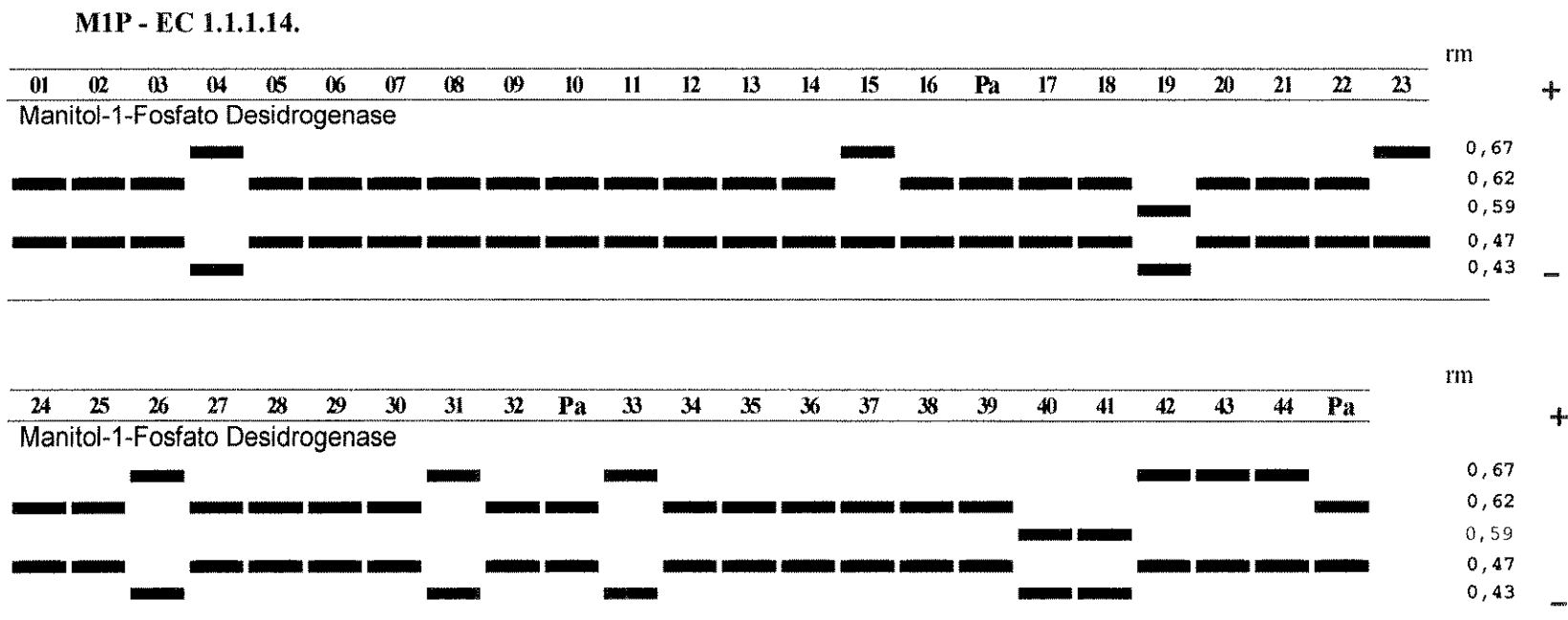
Figura 11: Eletroforegrama representativo dos perfis de migração das enzimas β – EST para isolados de *S. aureus*.

Figura 12: Eletroforegrama representativo dos perfis de migração das enzimas M1P para isolados de *S. aureus*.

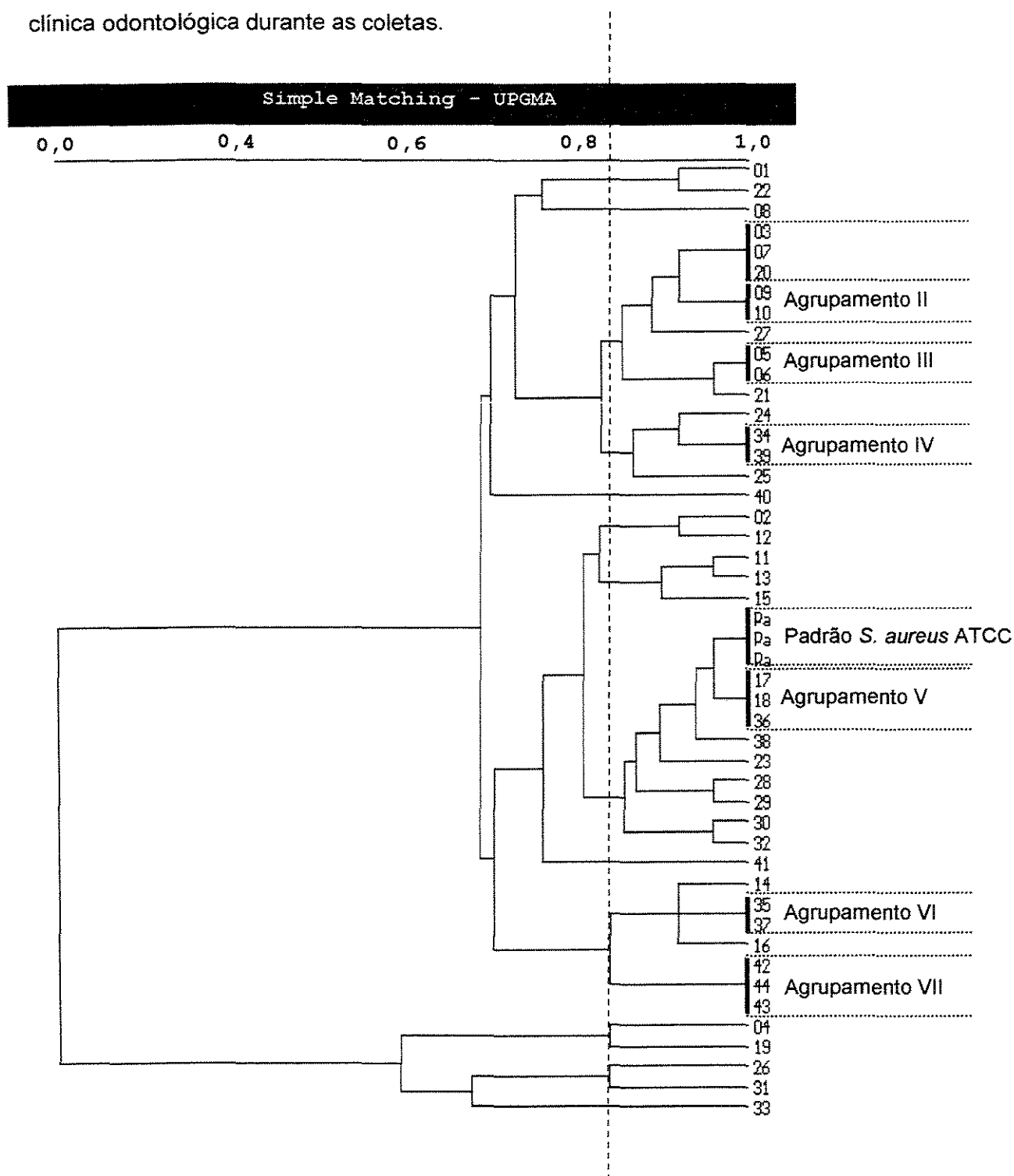
Através dos eletroforegramas, obtiveram-se os valores de dados binários, que por sua vez foram analisados no programa estatístico NTSYS, empregando-se o coeficiente de similaridade *SIMPLE MATCHING* e o método de agrupamento *UPGMA*, originando o dendograma de similaridade (FIG. 13).

Esse dendograma é representativo da análise dos perfis eletroforéticos isoenzimáticos (*MLEE*) do total as amostras isoladas (44 *S. aureus*) da clínica odontológica, durante as 24 coletas. Observa-se a formação de sete (07) agrupamentos de mesmo perfil eletroforético, onde se determinaram os clones de *S. aureus*. Esses agrupamentos foram denominados de I a VII. A característica fenotípica da resistência, a data da coleta e os clones formados estão relacionados no QUAD. 12.

QUADRO 12: Agrupamento enzimático e resistência aos antimicrobianos

Agrupamento de tipos eletroforéticos	Linhagens clones	Resistência	Data da Coleta
I	03	Eri	19/09/2000
	07	Amp/Amc(I)	21/11/2000
	20	Amp/Tet(I)	03/04/2001
II	09	Amp	05/12/2000
	10	Amp	05/12/2000
III	05	Amp/Eri	31/10/2000
	06	Amp/Eri	31/10/2000
IV	34	Amp/Tet	07/08/2001
	39	Amp	09/10/2001
V	17	Amp/Eri	27/03/2001
	18	Amp	03/04/2001
	36	Amp/Amc(I)/Tet	09/10/2001
VI	35	Amp/Eri	09/10/2001
	37	Amp/Eri	09/10/2001
VII	42	Amp	06/11/2001
	43	Amp/Tet(I)	06/11/2001
	44	Amp/Tet(I)	27/11/2001

FIGURA 13: Dendograma representativo de diferentes tipos genéticos dos isolados da clínica odontológica durante as coletas.



5. DISCUSSÃO

O *Staphylococcus aureus* é um microrganismo que pode sobreviver por longos períodos de tempo no ambiente, mesmo em condições não ideais para o seu crescimento. Isso, em parte, faz com que essa bactéria seja responsável por infecções hospitalares e comunitárias, de infecções de pele à endocardite bacteriana e septicemia (TENOVER *et al*, 1994).

Durante o período de amostragem (24 coletas em um período de 12 meses), o total de colônias de bactérias que se desenvolveram nas placas de Ágar Manitol Salgado (AMS) foi de 9775 UFC (Unidades Formadoras de Colônia), demonstrando um número elevado de microrganismos no ambiente clínico odontológico, provenientes da aerossolização de partículas e conseqüente disseminação desses microrganismos no ar ambiental, como também evidenciado por MATTOS FILHO *et al*, 1999, os quais demonstraram a prevalência de um alto número de microrganismos dentro da clínica odontológica, dentre eles espécies com morfologia de cocos, bacilos e fungos. Segundo LOGOTHETIS *et al*. (1988) partículas aero-suspensas, principalmente as não visíveis, permanecem dispersas no ar por até 30 minutos após o tratamento odontológico, podendo, as mesmas, conter microrganismos que transmitem doenças como a tuberculose, pneumonia, gripe, hepatite, infecções oculares e de pele.

Outros autores, mais especificamente, comprovaram a disseminação de microrganismos como, por exemplo, *S. aureus*, após procedimentos de profilaxia

bucal (AUTIO, 1980), procedimentos radiográficos (WHITE & GLAZE, 1978), e através do uso de canetas de alta rotação (BENTLEY *et al.*, 1994).

Esses resultados sugerem a necessidade de se desenvolver mecanismos ou formas de minimizar a dispersão de partículas no ambiente e conseqüentemente impedir a permanência de microrganismos contaminantes, os quais tem sido recomendados por vários pesquisadores, nesse campo de atividade ao longo dos anos (RANALI *et al.*, 1992; WOOD, 1993) envolvendo o grupo de profissionais que trabalham no ambiente clínico odontológico (cirurgião-dentista, THD, ACD, recepcionista, secretária, entre outros), através de medidas preventivas de proteção contra as aspersões provenientes do sistema de alta rotação (utilização de máscaras e óculos especiais protetores), anamnese rigorosa (quando há suspeitas de doenças infecto-contagiosas), sistemas de ventilação em consultórios, inclusive com ar condicionado com dispositivo de renovação de ar, para promoverem a dispersão das partículas suspensas, além da existência de mobiliário simples para tornar fácil a desinfecção das partículas precipitadas, medidas estas necessárias para reduzir ao máximo a possibilidade de contaminação cruzada dentro desse ambiente.

Do total das 9775 colônias que se desenvolveram no meio AMS, 32,2% (3149) fermentaram o manitol presente no meio de cultura, demonstrando a possibilidade de serem identificadas como microrganismos pertencentes ao grupo dos estafilococos. Segundo KLUYTMANS e colaboradores (1995) e GAILLOT *et al* (2000), o ágar manitol salgado (AMS) é um meio seletivo que possibilita fazer um “screening” ou seleção de *Staphylococcus aureus* em amostras potencialmente

contaminadas. O AMS tem sido utilizado desde 1945 como um meio seletivo para o isolamento desses microrganismos, já que a alta concentração de sal (7,5% NaCl) no meio inibe o crescimento da maioria dos microrganismos, porém é de grande importância para os microrganismos do grupo dos staphylococci (KAMPF, *et al.*, 1998). A adição de antimicrobianos tem permitido aos pesquisadores avaliar, ainda mais a seletividade desse meio de cultura.

Recentemente alguns estudos têm utilizado o AMS como meio base para seleção de *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina. van ENK & THOMPSON (1992) avaliaram a seletividade do AMS adicionando os antimicrobianos oxacilina (6mg/L) e polimixina B (10mg/L) após a inoculação de 30 espécies diferentes de bactérias e 5 fungos (leveduras), concluindo que apenas sete bactérias e um tipo de levedura se desenvolveu após 24 horas de incubação.

Esses mesmos autores avaliaram, ainda, 936 espécimes da flora do trato respiratório no OMSA (Ágar Manitol Salgado – Oxacilina) observando que 105 espécies se desenvolveram no meio fermentando o manitol, identificados como bacilo Gram-negativo (01), levedura (01), sendo o restante staphylococci (103). Desses, 29 foram identificados como *S. aureus* (97% detectado em 48h) e os demais foram staphylococci coagulase-negativos.

Os dados obtidos na nossa pesquisa, corroborados pela literatura, confirmam que ainda se faz necessário à utilização de outros métodos para se confirmar e identificar os *S. aureus*, pois algumas espécies de microrganismos e de staphylococci coagulase-negativos ainda se desenvolvem e fermentam o manitol presente no AMS. Para tanto, pode-se utilizar “kits” comerciais rápidos de

teste de coagulase baseados no fator de aglutinação (clumping factor), teste clássico da coagulase em tubo ("gold standard test") ou meios cromogênicos (CHROMagar *Staphylococcus aureus*) para a identificação do *S. aureus* (KONEMAN *et al.*, 1994; MAZA *et al.*, 1999; MERLINO *et al.*, 2000)

As 3149 colônias que se desenvolveram no AMS e fermentaram o manitol, foram coradas (coloração de Gram) e submetidas ao teste da catalase, sendo que as que apresentaram características de staphylococci, foram ainda inoculadas no meio de cultura cromogênico (CHROMagar *Staphylococcus aureus* - CSA), que possui um alto poder de resolução para a identificação desses microrganismos.

GAILLOT, *et al.* (2000) e MERLINO *et al.* (2000) determinaram que esse meio CSA possui uma alta especificidade e sensibilidade na detecção de *S. aureus*. As colônias, dessa bactéria, se desenvolvem nesse meio apresentando uma coloração malva, diferentemente das colônias das outras espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos, que se exibem nas cores branca, bege, verde e azul.

GAILLOT e colaboradores em 2000 isolaram 310 linhagens de *S. aureus* provenientes de 2.000 amostras clínicas, constatando uma sensibilidade de 95,5% do CSA em comparação com 81,9% dos métodos convencionais o mesmo ocorrendo com CARRICAJÓ, *et al.*, 2001 os quais relatam uma sensibilidade de 98,5% contra 91,8% dos métodos convencionais para a identificação desse microrganismo, demonstrando a importância deste teste na identificação de estafilococos coagulase positivos, porém é imprescindível, ainda,

que as linhagens sejam confirmadas com o teste da coagulase em tubo (KONEMAN *et al.*, 1994). Depois de realizado o teste da coagulase foi confirmado 44 linhagens de *S. aureus*, no total das 9775 colônias previamente coletadas do ambiente clínico odontológico.

Com base na identificação determinaram-se os locais de prevalência das linhagens dentro da clínica odontológica. Foram isolados *S. aureus* de todos os setores da clínica, porém aproximadamente 50% desses estiveram presentes nos setores de **A** a **E**, onde se encontra um maior número de equipos odontológicos e a área de atendimento de urgência. Durante as coletas (24) por 12 meses foram atendidos cerca de 3072 pacientes na clínica odontológica, sendo em média 128 pacientes por período de coleta. Isso mostra que um maior número de pacientes atendidos e a especificidade do tratamento pode favorecer a disseminação de microrganismos patogênicos, como descrito por SANTOS, 2000.

Após a identificação dos *Staphylococcus aureus*, foram feitos os testes para a caracterização da resistência a diversos antimicrobianos, através do teste da produção de β -lactamase, pelo método de difusão em disco (antibiograma) e pela mínima concentração inibitória (MIC).

O teste da produção de β -lactamase pelo método de disco cromogênico disponível comercialmente (Cefinase – Becton Dickinson Microbiology Systems) é um método rápido que fornece dados sobre a resistência dos *Staphylococcus aureus* e outros microrganismos como o *Haemophilus influenzae* e *Bacterioides* spp. (COCKERILL, 1999) aos antibióticos β -lactâmicos (penicilina G, ampicilina,

amoxicilina) e a suscetibilidade as penicilinas β -lactamase resistentes (metecilina e oxacilina) e a cefalosporina (cefalotina).

Os resultados obtidos mostraram que 80% das 44 linhagens foram β -lac (+) e de acordo com a interpretação fornecida pelo fabricante do teste, essas linhagens β -lactamase positivas são resistentes à penicilina e 100% (44) e deverão apresentar susceptibilidade aos outros antibióticos como a cefalotina e oxacilina. ZYGMUNT e colaboradores em 1992 investigaram o efeito específico dos tipos de β -lactamase sobre a resistência estafilocócica, frente aos substratos de penicilina e cefalosporina, mostrando que os tipos A e D exibem maiores atividades para a nitrocefina, cefazolina e cefapirina e o tipo D apresentou menor eficiência na hidrólise da penicilina G.

A interpretação dos dados obtidos para o teste de susceptibilidade pelo método de difusão em disco (antibiograma), segundo os valores preconizados pelo NCCLS, evidenciou que 80% dos 44 isolados de *Staphylococcus aureus* foram resistentes a ampicilina.

Esses dados estão de acordo com as pesquisas de THORNSBERRY (1995) e BOOTH *et al.* (2001), os quais demonstraram que, atualmente, cerca de 90% dos isolados *S. aureus* de sítios infecciosos são resistentes à penicilina, evidenciando assim que os isolados do ambiente clínico odontológico possuem resistência à penicilina similar aos isolados de hospitais e outros sítios de infecção.

Já NA'WAS e colaboradores em 1998, demonstraram que 73,2% de todos os isolados nasais e relacionados a infecções, foram resistentes apenas a penicilina G e a ampicilina. Esses dados permitem sugerir que nos casos de infecções odontológicas causadas por *S. aureus* deve-se utilizar outros antibióticos em substituição à penicilina.

O perfil de susceptibilidade para os demais antimicrobianos testados como a eritromicina, a tetraciclina e a amoxicilina/ac. clavulânico apresentaram valores de resistência de 25%, 16% e 4,5% respectivamente. Os demais antimicrobianos ensaiados demonstraram 100% de susceptibilidade para as 44 linhagens de *S. aureus*. Dezesesseis dessas linhagens (36,3%) foram resistentes a mais de um tipo de antibiótico podendo ser caracterizadas como multirresistentes.

Todos os isolados foram sensíveis a oxacilina (OSSA – *Staphylococcus aureus* Oxacilina Sensível) que é uma penicilina β -lactamase resistente. Esse fato pôde ser verificado tanto pelo teste de difusão em disco, quanto pelo método do Etest (MIC). Sabendo-se que essas linhagens são OSSA, o Etest fornece, também, um critério fenotípico de interpretação, sugerindo que as mesmas não possuem o gene *mecA* no DNA cromossomal, gene esse que codifica uma proteína ligante da penicilina alterada (PPB2a), a qual confere resistência as penicilinas sintéticas como a metilicina e a oxacilina, pela baixa afinidade a esses antibióticos (OLIVEIRA & RAMOS, 2002).

BOOTH e colaboradores em 2001 sugerem que outros fatores além da pressão seletiva de antibióticos, influencia na expansão de linhagens isoladas

ocasionalmente e que as mesmas apresentam um perfil de susceptibilidade variável em concordância com os dados obtidos na presente pesquisa.

A análise plasmidial de amostras isoladas de *S. aureus* tem sido um material de estudo importante como um fator determinante envolvendo a resistência antimicrobiana desses microrganismos. Estudos preliminares de KLOOS e colaboradores em 1981 revelaram que os plasmídios intactos de várias linhagens dessa espécie diferem muito pouco entre si quando comparados através da sua mobilidade eletroforética.

A análise do DNA plasmidial das linhagens de *S. aureus* isoladas do ambiente clínico odontológico, separados por eletroforese em gel de agarose com base em sua massa molecular, mostrou ter pouca diversidade quando comparados entre si, à semelhança das pesquisas de KLOOS *et al.*, 1981. A análise indicou a presença de 03 diferentes plasmídios com massa molecular de aproximadamente 4,5Kb, 1,5Kb e 1,2Kb. O perfil de similaridade plasmidial das 44 linhagens mostrou que 88,6% (39) apresentaram duas bandas plasmidiais, 9,1% (04) 03 bandas plasmidiais e em 2,3% (1) não foram detectados plasmídios.

A resistência antimicrobiana do *Staphylococcus aureus* pode ser codificada tanto por determinantes de resistência inseridos no cromossomo como aqueles carregados por um ou mais plasmídios comumente encontrados nas espécies clínicas. BERG, *et al.*, 1998, identificaram vários plasmídios nos staphylococci, demonstrando que aqueles de massa molecular menor que 5kb, geralmente são crípticos ou possuem apenas um único gene de resistência.

De acordo com LYON e colaboradores, em 1983, a classe de plasmídios mais isolados (70%) em 150 linhagens foi o de 1,5Kb e em relação à cura plasmidial, não foi demonstrada relação aparente com o antibiograma. Também esse mesmo autor isolou outro plasmídio de 4,5Kb de tamanho no qual codificava resistência apenas ao cloranfenicol. Nesta pesquisa, em 97,6% das linhagens foram isolados plasmídios de aproximadamente 1,5Kb e em 9,1% de 4,5Kb de tamanho.

A falta de um plasmídio de maior tamanho, onde possivelmente se encontre um ou mais genes de resistência, a pouca uniformidade do perfil de susceptibilidade e a falta de um evento que caracterize um surto epidemiológico, sugere que os isolados de *S. aureus* obtidos na clínica odontológica são dotados de determinantes de resistência associados ao cromossomo.

Já os plasmídios de maior massa molecular, de acordo com BERG, *et al.* (1998), comumente possuem determinantes genéticos de multirresistência. Esses determinantes podem abranger a resistência à penicilina, meticilina, eritromicina, tetraciclina, estreptomicina, neomicina, clindamicina, sulfonamidas e vários íons de metais pesados (LACEY, 1975).

A importância da tipagem de *Staphylococcus aureus* linhagem por linhagem das outras espécies bacterianas por razões epidemiológicas é geralmente apreciada, contudo a escolha de uma técnica de tipagem é difícil tanto pelos aspectos teóricos quanto pelas limitações técnicas (SCHLICHTING, *et al.*, 1993). A disseminação de mesmos clones de isolados de *Staphylococcus aureus* clínicos e outros patógenos em ambientes e em diferentes sítios podem ocorrer

com frequência. A diferenciação das linhagens nos laboratórios microbiológicos é realizada por diversas técnicas e entre elas utiliza-se a análise isoenzimática ou *MLEE*.

BOERLIM, em 1997, concluiu, em sua revisão de literatura, que na população clonal, o *MLEE* permite a identificação de tipos eletroforéticos (ET - clones) ou grupos geneticamente restritos nos quais podem ser associados com características particulares. Esses clones podem, subseqüentemente, serem estudados com maiores detalhes em relação a sua natureza em particular, a sua história e a epidemiologia.

Segundo BOOTH, 2001, vários autores utilizam essa técnica para caracterizar clones e fazer a análise do polimorfismo genético da população de *Staphylococcus aureus*.

MUSSER e SELANDER em 1990, aplicando a técnica de *MLEE* analisou 2.077 amostras clínicas e ambientais de *Staphylococcus aureus* e 81% dos isolados foram divididos em 5 tipos eletroforéticos (ET – electrophoretic types), ou seja, 05 agrupamentos clonais, onde um ET era meticilina resistente e outro ET era de linhagens produtoras da toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1). Já ROSDAHL *et al.*, 1994, em seus estudos comparativos entre duas técnicas de tipagem, constataram que a análise da epidemiologia molecular de 95 isolados de *Staphylococcus aureus* mostrou-se indistinguível tanto pelo PFGE quanto pelo *MLEE*, indicando que as linhagens possuíam a mesma origem clonal.

A análise dos perfis enzimáticos (*MLEE*) foi feita a partir dos perfis isoenzimáticos, construindo o dendograma de similaridade e agrupando os

isolados de mesmos tipos eletroforéticos – Ets. Dos 33 ETs evidenciados, 78% (22) são constituídos de apenas uma linhagem, demonstrando a diversidade genética das linhagens isoladas no ambiente odontológico. Os clones de *S. aureus* foram agrupados em 7 ETs diferentes, onde mais de um isolado apresentou os mesmos perfis isoenzimáticos dentro de cada agrupamento com 100% de similaridade para as enzimas ensaiadas.

O agrupamento I é formado pelas linhagens denominadas de 03, 07, 20 que foram coletadas no interior da clínica em dias diferentes. O mesmo ocorreu com os agrupamentos IV (34, 39), V (17, 18 e 36), sugerindo assim que houve a disseminação dentro da clínica odontológica de clones bacterianos de *Staphylococcus aureus* em períodos de tempo diferentes de coleta.

Os agrupamentos II (09, 10) e III (05, 06) foram isolados no mesmo dia da coleta, porém em diferentes placas localizadas em diferentes setores da clínica, sugerindo que essas linhagens clones se disseminaram durante os atendimentos odontológicos nos respectivos dias de coletas. Já o agrupamento VII é formado por clones que se disseminaram no dia da coleta pela clínica odontológica (isolado 42 e 43) e a mesma linhagem foi isolada na coleta subsequente.

Tais resultados mostram que mesmo utilizando-se das precauções já previamente estabelecidas de biosegurança, a formação de partículas pode disseminar microrganismos de mesma origem (clones), para diferentes lugares da clínica odontológica em um mesmo dia de trabalho e também se pode ainda isolar a mesma linhagem em dias diferentes. Esse fato pode ser ocasionado tanto pela

manutenção dessas linhagens no ambiente odontológico, quanto ser transmitido pelo mesmo foco de contaminação, por exemplo, um paciente carreador nasal de *Staphylococcus aureus*.

Uma dificuldade adicional no estudo da epidemiologia dos *S. aureus*, particularmente na análise da sua rota de transmissão e disseminação, é o conhecimento de que em grupos - aparentemente sem contato algum - serem detectados *Staphylococcus aureus* de mesma origem genética (SCHLICHTING *et al.*, 1993). A ocorrência de linhagens idênticas em diversas regiões geográficas parece ser uma característica intrínseca do *Staphylococcus aureus*.

Devido à importância do *Staphylococcus aureus*, como um microrganismo patógeno, tanto para a área de saúde quanto para a comunidade, os dados disponíveis na literatura até o momento, incluindo nossas observações, apontam uma necessidade de se conhecer mais sobre a contaminação e disseminação desse microrganismo dentro da clínica odontológica, a fim de se estabelecer as rotas de transmissão – através do uso de técnicas moleculares – além da determinação das relações filogenéticas entre esses, visando preencher as lacunas existentes a cerca do *Staphylococcus aureus*, principalmente a dinâmica das infecções bacterianas na prática odontológica.

6. CONCLUSÃO

Os dados obtidos na presente pesquisa permitem concluir que:

1. O *Staphylococcus aureus* está presente em baixo número, como contaminantes, nas amostras obtidas do ambiente clínico odontológico.
2. O uso do meio seletivo (AMS) e do meio cromogênico (CSA) permite o isolamento e a identificação dessa espécie em amostras contaminadas por uma grande variedade de microrganismos.
3. A maior parte das linhagens (80%) isoladas são produtoras de β -lactamase e resistentes a ampicilina. Algumas delas são, também, multirresistentes à eritromicina, tetraciclina e amoxicilina/ac. clavulânico.
4. As amostras de *S. aureus* isoladas do ar da clínica odontológica são *Staphylococcus aureus* Oxacilina Sensível (OSSA)
5. O perfil plasmidial dos 44 isolados de *S. aureus* possuem pouca diversidade em relação a sua massa molecular. Essas amostras revelam plasmídios de baixa massa molecular.
6. A análise comparativa dos perfis isoenzimáticos, por *MLEE* permite detectar clones de *Staphylococcus aureus* e avaliar a sua disseminação dentro do ambiente clínico odontológico.
7. A análise por *MLEE* permite determinar um caráter epidemiológico desses isolados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A. C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G. C. *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos*. UFV – Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- ARBEIT, R. D. Laboratory procedures for epidemiologic analysis. IN: GROOSSLY, K. B.; ARCHER, G. L. *The staphylococci in human disease*. Nova Iorque: Churchill Livingstone Inc., 1997, p. 253-286.
- AUTIO, K. L.; ROSEN S.; REYNOLDS, N. J.; BRIGHT, J. S. Studies on cross-contamination in the dental clinic. *J Am dent Ass*, v. 100, p. 358-61, 1980.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*, v. 45, p. 493-496, 1996.
- BÉLTRAN, P.; DELGADO, G.; NAVARRO, A.; TRUJILLO, F.; SELANDER, R. K.; CRAVIOTO, A. Genetic diversity and population structure of *Vibrio cholerae*. *J Clin Microbiol. Mar*, v. 37(3), p. 581-590, 1999.
- BENTLEY, C. D.; BURKHART, W. N.; CRAWFORD, J. J. Evaluating spatter and aerosol contamination during dental procedures. *J Am Dent Ass*, v. 125, p. 579-83, 1994.
- BERG, T.; FIRTH, N.; APISIRIDEJ, S.; HETTIARATCHI, A.; LEELAPORN, A.; SKURRAY, R. A. Complete nucleotide sequence of pSK41: evolution of staphylococcal conjugative multiresistance plasmids. *J Bacteriol*, v. 180(17), p. 4350-4359, 1998.
- BERNARDS, A. T.; FRENAY, H. M. E.; LIM, B. T.; HENDRIKS, W. D. H.; DIJKSHOORN, L.; van BOVEN, C. P. A. Methicillin-resistant *Staphylococcus*

- aureus* and *Acinetobacter baumannii*: an unexpected difference in epidemiologic behavior. *Am J Infect Control*, v. 26(6), p. 544-51, 1998.
- BINGEN, E. Applications of molecular methods to epidemiologic investigations of nosocomial infections in pediatric hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 15(7), p. 488-93, 1994.
- BLACKALL, P. J.; TROTT, D.J.; RAPP-GRABRIELSON, V.; HAMPSON, D. J. Analysis of *Haemophilus parasuis* by multilocus enzymes electrophoresis. *Vet Microbiol*, v. 56, p. 125-134, 1997.
- BOERLIN, P. Applications of multilocus enzyme electrophoresis in medical microbiology. *J Microbiol Methods*, v. 28, p. 221-231, 1997.
- BOOTH, M. C.; PENCE, L. M.; MAHARESHTI, P.; CALLEGAN, M. C.; GILMORE, M. S. Clonal associations among *Staphylococcus aureus* isolates from various sites of infection. *Infect Immun*, v. 69(1), p. 345-352, 2001.
- BROWN, D. F. J.; BRENWALD, N. P.; CONSTANTINE, C. E. Detection of Oxacillin/Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* with Etest MIC method. ICAAAC, Chicago, 1991.
- BUGARDT, C. I.; LEÃO, M. T. C. *Controle de Infecção em Odontologia*. Curitiba: Champagnat, 1997.
- BUSCH, U.; NITSCHKO, H. Methods for de differentiation of microorganisms. *J Chromatogr B*, v. 722, p. 263-278, 1999.
- CARRICAJÓ, A.; TRENY, A.; FONSALE, N.; BES, M.; REVERDY, M. E.; GILLE, Y.; AUBERT, G.; FREYDIÈRE, A. M. Performance of the chromogenic medium CHROMagar Staphy aureus and the Staphychrom coagulase test in detection and identification of *Staphylococcus aureus* in clinical specimens. *J Clin Microbiol*, v.

- 39(7), p. 2581-1583, 2001.
- COCHRAN, M. A.; MILLER, C. H.; SHELDRAKE, M. A. The efficacy of the rubber dam as a barrier to the spread of microorganisms during dental treatment. *J Am Dent Ass*, v. 119, p. 141-144, 1989.
- COCKERILL, F. R. Genetic methods for assessing antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 43(2), p. 199-212, 1999.
- COHEN, S. N. Transportable genetic elements and plasmid evolution. *Nature* (London), v. 263, p. 731-738, 1976.
- CRAWFORD, J. J. Sterilization, disinfection and asepsis in dentistry. In: BLOCK S. S., *Disinfection, sterilization and preservation*. 3ª ed., Philadelphia: Lea & Febiger, 1983.
- DIAS, C. A.; KADER, I. A.; d'AZEVEDO, P.; SUPERTI, S.; ALVES, D. OLM, G. Comparison of the E test with agar dilution for determining susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to penicillin. *Rev Microbiol*, v. 29, p. 130-133, 1998.
- EARNEST, R.; LOESCHE, W. Measuring harmful levels of bacteria in dental aerosols. *J Am Dent Ass*, v. 122, p. 55-57, 1991.
- FERNANDES, A. T. *Riscos de infecção para o cirurgião dentista e sua equipe: agentes etiológicos/ patologias, vias de transmissão e métodos diagnósticos*. IN: *Controle da Infecção na Prática Odontológica*. Associação Paulista de Estudos e Controle de Infecção Hospitalar - APECIH, 2000.
- FINEGOLD, M. S.; BARON, E. J. *Diagnóstico Microbiológico*. 7ª Ed., Buenos Aires: Medica Panamericana, 1989.
- GAILLOT, O.; WETSCH, M.; FORTINEAU, N.; BERCHE, P. Evaluation of chromagar Staph. aureus, a new chromogenic medium, for isolation and presumptive

- identification of *Staphylococcus aureus* from human clinical specimens. *J Clin Microbiol*, v. 38(4), p. 1587-1591, 2000.
- GÁNDARA, B.; MERINO, A. L.; ROGEL, M. A.; ROMERO-MARTINEZ, E. Limited genetic diversity of *Brucella* spp. *J Clin Microbiol*, v. 39(1), p. 235-240, 2001
- GOSPAL RAO, G. Risk factors for the spread of antibiotic-resistant bacteria. *Drugs*, v. 55(3), p. 322-330, 1998.
- GRIMONT, F. & GRIMONT, P. A. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann Inst Pasteur Microbiol*, v. 137B(2), p. 165-175, 1986.
- HORIBA, N.; YOSHIDA, T.; SUZUKI, K.; MAEKAWA, Y.; ITO, M.; MATSUMOTO, T.; NAKAMURA, H. Isolation of methicillin-resistant staphylococci in dental operator. *J Endod*, v. 21(1), p. 21-25, 1995.
- ITO, Y. I.; SOUZA-GULGEMIM, M. C. M.; LIMA, S. N. M. Assepsia e anti-sepsia em endodontia. IN: LEONARDO, M. R.; LEAL, J. M. *Endodontia: tratamento de canais radiculares*. 3ª Ed., São Paulo: Médica Panamericana, 1998, p. 261-297.
- JANDA, W. M.; RISTOW, K.; NOVAK, D. Evaluation of RapiDEC Staph for identification of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Staphylococcus saprophyticus*. *J Clin Microbiol*, v. 32(9), p. 2056-2059, 1994.
- JARVIS, W.R. Usefulness of molecular epidemiology for outbreak investigations. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 15(7), p. 500-508, 1994 (comments).
- KAMPF, G.; LECKE, C.; CIMBAL, A.; WEIST, K.; RÜDEN, H. Evaluation of mannitol salt agar for detection of oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* by disk diffusion and agar screening. *J Clin Microbiol*, v. 36 (8), p. 2254-2257, 1998.
- KAPUR V.; SISCHO, W. M.; GREER, R. S.; WHITTAM T. S.; MUSSER, J. M. Molecular

- population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *J Clin Microbiol*, v. 33(2), p. 376-380, 1995.
- KLOOS, W. E.; ORBAN, B. S.; WALKER, D. D. Plasmid composition of *Staphylococcus* species. *Can J Microbiol*, v. 27, p. 271-278, 1981.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; Jr. WINN, W. C. *Introduction to Diagnostic Microbiology*. J. B. Lippincott Company, 1994, p. 187-98.
- LACEY, R. W. Antibiotic resistance plasmids of *Staphylococcus aureus* and their clinical importance. *Bacteriol Rev*, v.39, 1-32, 1975.
- 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*, v. 159(3), p. 526-532, 1989.
- LOGOTHETIS, D. D.; GROSS, K. B. W.; EBERHART, A.; DRISKO, C. Bacterial airborne contamination with an air polishing device. *Gen Dent*, v. 36(6), p. 496-499, 1988.
- LYON, B. R.; MAY, J.; SKURRAY, R. A. Analysis of plasmids in nosocomial strains of multiple-antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, v.23 (6), p. 817-826, 1983.
- LYON, B. R.; SKURRAY, R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: Genetic Basis. *Microbiol Rev*, p. 88-134, 1987.
- MASLOW, J. N., SLUTSKY, A. M.; ARBEIT, R. D. Molecular epidemiology: the application of contemporary techniques to typing bacteria. *Clin Infect Dis*, v. 17, p. 153-162, 1993.
- MASLOW, J. N.; WHITTAM, T. S.; GILKS, C. F.; WILSON, R. A.; MULLIGAN, M. E.;

- ADAMS, K. S.; ARBEIT, R. D. Clonal relationships among bloodstream isolates of *Escherichia coli*. *Infect Immun*, v. 63(7), p. 2409-2417, 1995.
- MATTOS-FILHO, T. R.; PACHECO, A. B. N. D.; GROPPA, F. C. Identification and increase pattern of prevalent microorganisms in clinical environment. *J Den Res*, v. 78(5), p. 1006, 1999.
- MAZA, L. M.; PEZZOLO, M. T.; BARON, E. J. *Atlas de Diagnóstico em Microbiologia*. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 1999.
- MERLINO, J.; LEROI, M.; BRADBURY, R.; VEAL, D.; HARBOUR, C. New chromogenic identification and detection of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus*. *J Clin Microbiol*, v. 38(6), p. 2378-2380, 2000.
- MILLER, R. L. *et al.*, Studies on dental aerobiology. Microbial platters discharged from the oral cavity of dental patient. *J Dent Res*, v. 50, p. 621-625, 1971.
- MIYAKE, Y.; IWAI, T.; SUGAI, M.; SUGINAKA, H.; NAGASAKA, N. Incidence and characterization of *Staphylococcus aureus* from the tongues of children. *J Dent Res*, v. 70(7), p. 1045-1047, 1991.
- 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*, v. 12(1), p.20-28, 1991.
- MUSSER, J. M.; SELANDER, R. K. Genetic analysis of natural populations of *Staphylococcus aureus*. *VHC Publishers* - New York, N. Y., 1990.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. National Committee For Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa, E.U.A. *Approved Standard*. M2-15, v. 14(16), 1994.

- NA'WAS, T.; HAWWARI, A.; HENDRIX, E.; HEBDEN, J.; EDELMAN, R.; MARTIN, M.; CAMPBELL, W.; NASO, R.; SCHWALBE, R.; FATTOM, A. I. Phenotypic and genotypic characterization of nosocomial *Staphylococcus aureus* isolates from trauma patients. *J Clin Microbiol*, v. 36(2), p. 414-420, 1998.
- NEIDLE, E. A.; YAGIELA, J. A. *Farmacologia e Terapêutica para Dentistas*. 3ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1991.
- NETO, V. A.; LOPES, H. V.; BALDY, J. L. S.; LEVI, G. C.; MENDONÇA, J. S. *Antibióticos na prática médica*. 5ª Ed., São Paulo: Rocca, 2000.
- NICOLLE, L. E.; STRAUSBURGH, L. B.; GARIBALDI, R. A. Infection and antibiotic resistance bacteria in nursing homes. *Clin. Microbiol Rev*, v. 9(1), p. 01-17, 1996.
- NISENGARD, R. J.; NEWMAN, M. G. *Microbiologia Oral e Imunologia*. 2ª Ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.
- OLIVEIRA, A. M.; RAMOS, M. C. PCR ribotyping of *Staphylococcus aureus*. *Braz J Med Biol Res*, v. 35(2), p. 175-180, 2002
- PARISI, J. T. Coagulase-negative staphylococci and epidemiological typing of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiol Rev*, p. 126-139, 1985.
- PEARCE, H.; MENAGER, S.; MAILLARD, J. Y. Effect of biocides commonly used in the hospital environment on the transfer of antibiotic-resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infec*, v. 43(2), p. 101-107, 1999.
- PIMENTA, F. C.; ITO, I. Y.; LIMA, S. N. M. Biosegurança em Endodontia. IN: ESTRELA, C.; FIGUEIREDO, J. A. P. *Endodontia: Princípios Biológicos e Mecânicos*. São Paulo: Artes Médicas, 1999, p.387-438.
- FLORDE, J. J. & SHERRIS, J. C. Staphylococcal resistance to antibiotics: origin, measurement, and epidemiology. *Ann N Y Acad Sci*, v. 236, p. 413-434, 1974.

- RANALI, J.; MATTOS FILHO, T. R.; ANDRADE, E. D.; GONÇALVES, R. R.; MARTINS, W. W. Eficiência de máscaras cirúrgicas frente a aspersões produzidas por alta rotação. *RBO*, v. XLIX(3), p. 46-48, 1992.
- RICHMOND, M. H. Some environmental consequences of the use of antibiotics: or 'what goes up must come down'. *J Appl Bacteriol*, v. 35, p. 155-176, 1972.
- ROSA, E. R.; PEREIRA, C. V.; ROSA, R. T.; HÖFLING, J. F. Grouping oral *Candida* sp. by multilocus enzymes electrophoresis. *Inter J Sys Evol Microbiol*, v. 50, p. 1343-1349, 2000.
- ROSA, R. T. *Deteção do polimorfismo genético de Streptococcus mutans isolados de indivíduos livres de cárie (CPOD=0)*. Dissertação: FOP/UNICAMP, 2001.
- ROSDAHL, V. T.; WITTE, W.; MUSSER, M.; JARLOV, J. O. *Staphylococcus aureus* of 95 types. Spread of a single clone. *Epidemiol Infect*, v. 113, p. 463-470, 1994.
- SABATH, L. D. Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics in strains of *Staphylococcus aureus*. *Ann Inter Med*, v. 97, p. 339-334, 1982.
- SAMARANAYAKE, C. D.; SCHEUTZ, F.; COTTONE, J. A. *Controle da infecção para a equipe odontológica*. 2ª Ed., São Paulo: Santos, 1995.
- SANTOS, M. V. *Medidas de prevenção das infecções ocupacionais*. IN: *Controle da Infecção na Prática Odontológica*. Associação Paulista de Estudos e Controle de Infecção Hospitalar - APECIH, 2000.
- SAUNDERS, J. R. Genetics and evolution of antibiotic resistance. *Br Med Bull*, v. 40, p. 54-60, 1984.
- SCHLICHTING, C.; BRANGER, C.; FOURNIER, J-M.; WITTE, W.; BOUTONNIER, A.; WOLZ, C.; GOULLET, P.; DÖRING, G. Typing of *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis, zymotyping, capsular typing and phage typing:

- resolution of Clonal relationships. *J Clin Microbiol*, v. 31(2), p. 227-232, 1993.
- SELANDER, R. K.; CAUGANT, D. A.; OCHMAN, H.; MUSSER, J. M.; GILMOUR, M. N.; WHITTAM, T. S. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol*, v. 51, p. 873-884, 1986.
- SKURRAY, R. A.; FIRTH, N. Molecular evolution of multiply-antibiotic resistant staphylococci. *Ciba Found Symp*, v. 207, p. 167-191, 1997.
- SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gels: Group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem J*, v. 61, p. 629-641, 1955.
- SNEATH, P. H.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. N.; HOLT, J. G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. v. 2, Baltimore: Williams & Wilkins, 1986.
- SUZUKI, J.; KOMATSUZAWA, H.; KOZAI, K.; NAGASAKA, N. In vitro susceptibility of *Staphylococcus aureus* including MRSA to four disinfectants. *J Dent Child*, p. 260-263, 1997.
- TENOVER, F. C.; ARBEIT, R.; ARCHER, G.; BIDDLE, J.; BYRNE, S.; GOERING, R.; HANDCOCK, G.; HÉRBET, G. A.; HILL, B.; HOLIS, R.; JARVIS, W. R.; KREISWIRTH, B.; EISNER, W.; MASLOW, J.; McDOUGAL, L. K.; MILLER J. M.; MULLIGAN, J.; PFALLER, M. A. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, v. 32(2), p. 407-15, 1994.
- THORNSBERRY, C. Trends in antimicrobial resistance among today's bacterial pathogens. *Pharmacotherapy*, v.15(3S), 1995
- TOMAYKO, J. F.; MURRAY, B. E. Analysis of *Enterococcus faecalis* isolates from intercontinental sources by multilocus enzyme electrophoresis and pulsed-field gel

- electrophoresis. *J Clin Microbiol*, v. 33(11), p. 2903-2907, 1995.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. *Microbiologia*. 3ª Ed. São Paulo: Ateneu, 1999.
- VALENCIA, E. M.; ENRIQUEZ, A.; SORIANO, V.; MORENO, V.; LAGUNA, F.; GONZALEZ, L. J. Nosocomial infection with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in 14 human immunodeficiency virus infected patients. *Med Clin Barc*, Sep. 6, v. 109(7), p. 261-263, 1997.
- van ENK, R. A.; THOMPSON, K. D. Use of a primary isolation medium for recovery of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, v. 30, p. 504-505, 1992.
- WADA, A.; WATANABE, H. Penicillin-binding protein 1 of *Staphylococcus aureus* is essential for growth. *J. Bacteriol*, p. 2759-2765, 1998.
- WHITE, S. C.; GLASE, S. Interpatient microbiological cross-contamination after dental radiographic examination. *J Am Dent Ass*, v. 96(5), p. 801-804, 1978.
- WOOD, P. Controversies in Cross-Infection-Control. *Br Dent J*, v. 10, p. 249-251, 1993.
- WOODFORD, N.; JOHNSON, A. P.; THRELFALL, E. J. Extraction and fingerprinting of bacterial plasmids. IN: CHART, H. *Practical Laboratory Bacteriology*. Londres: CRC Press, 1994.
- ZANON, U.; NEIG, J. *Infecções Hospitalares: Prevenção, Diagnóstico e Tratamento*. Rio de Janeiro: Editora Médica Científica, 1987.
- ZYGMUNT, D. J.; STRATTON, C. W.; KERNODLE, D. S. Characterization of four beta-lactamases produced by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 36(2), p. 440-445, 1992.

8. ANEXOS

QUADROS :

QUADRO 01: Resultados dos Testes de Identificação das Linhagens de *S. aureus*

	Linhagem	Gram	Chromagar	Catalase	Coagulase	Data
01	WCA1909	+	malva	+	+	19/09/2000
02	WCD1909	+	malva	+	+	19/09/2000
03	WCE1909	+	malva	+	+	19/09/2000
04	WCF1909	+	malva	+	+	19/09/2000
05	WCB3110	+	malva	+	+	31/10/2000
06	WCD3110	+	malva	+	+	31/10/2000
07	WCB2111	+	malva	+	+	21/11/2000
08	WCF2111	+	malva	+	+	21/11/2000
09	WCE0512	+	malva	+	+	05/12/2000
10	WCI0512	+	malva	+	+	05/12/2000
11	WCK0512	+	malva	+	+	05/12/2000
12	WCL0512	+	malva	+	+	05/12/2000
13	WCC1212	+	malva	+	+	12/12/2000
14	WCA06031	+	malva	+	+	06/03/2001
15	WCA27031	+	malva	+	+	27/03/2001
16	WCC27031	+	malva	+	+	27/03/2001
17	WCF27031	+	malva	+	+	27/03/2001
18	WCB03041	+	malva	+	+	03/04/2001
19	WCC03041	+	malva	+	+	03/04/2001
20	WCC03041I	+	malva	+	+	03/04/2001
21	WCG03041	+	malva	+	+	03/04/2001
22	WCK03041	+	malva	+	+	03/04/2001
23	WCA15051	+	malva	+	+	15/05/2001
24	WCE15051	+	malva	+	+	15/05/2001
25	WCK15051	+	malva	+	+	15/05/2001
26	WCA29051	+	malva	+	+	29/05/2001
27	WCI29051	+	malva	+	+	29/05/2001
28	WCG19061	+	malva	+	+	19/06/2001
29	WCK19061	+	malva	+	+	19/06/2001
30	WCG26061	+	malva	+	+	19/06/2001
31	WCJ26061	+	malva	+	+	26/06/2001
32	WCL26061	+	malva	+	+	26/06/2001
33	WCC07081	+	malva	+	+	07/08/2001
34	WCK07081	+	malva	+	+	07/08/2001
35	WCC09101	+	malva	+	+	09/10/2001
36	WCD09101	+	malva	+	+	09/10/2001
37	WCG09101	+	malva	+	+	09/10/2001
38	WCI09101	+	malva	+	+	09/10/2001
39	WCI09101I	+	malva	+	+	09/10/2001
40	WCC19101	+	malva	+	+	19/10/2001
41	WCG06111	+	malva	+	+	06/11/2001
42	WCG06111I	+	malva	+	+	06/11/2001
43	WCH06111	+	malva	+	+	06/11/2001
44	WCE27111	+	malva	+	+	27/11/2001

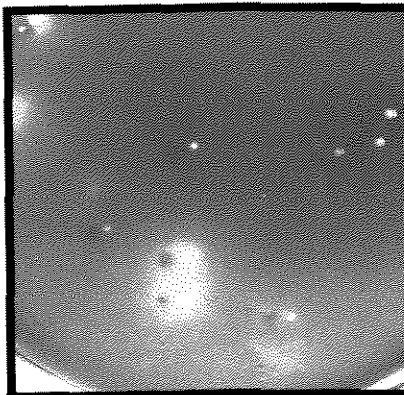
FIGURAS :

FIGURA 01: fermentação das colônias (manitol como fonte de carboidrato).

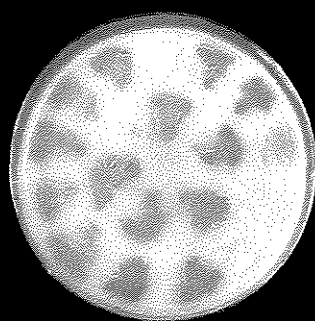


FIGURA 02: CHROMagar com *S. aureus* (cor malva) e os falsos positivos (FP).

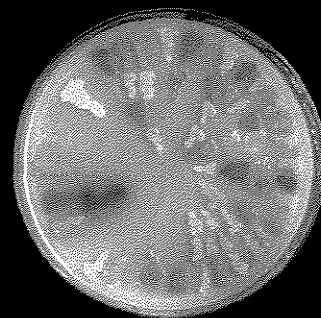


FIGURA 03: Diversidade de cores relacionada com os *Staphylococcus* spp.



FIGURA 04: coágulo formado (inferior), positivo para a espécie *S. aureus*.



FIGURA 05: Disco de Cefinase – BBL (teste de produção de β -lactamase).

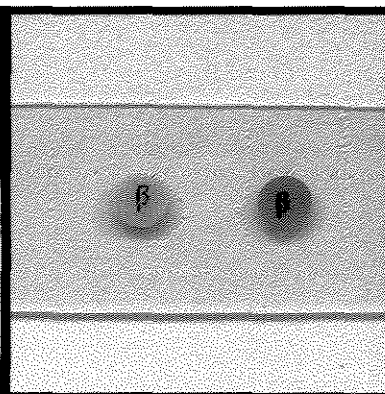


FIGURA 06: Linhagem β -lac negativa (esquerda) e positiva (direita.).



FIGURA 07: Oito diferentes antibióticos utilizados no teste (CECON-Ltda).

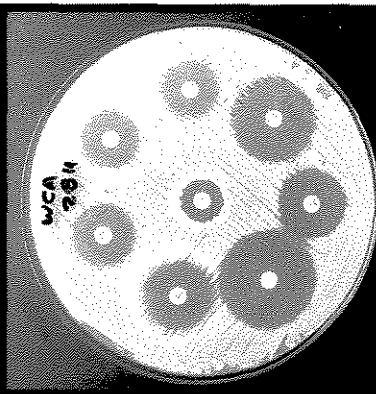


FIGURA 08: Formação dos halos de inibição pela difusão dos antibióticos.

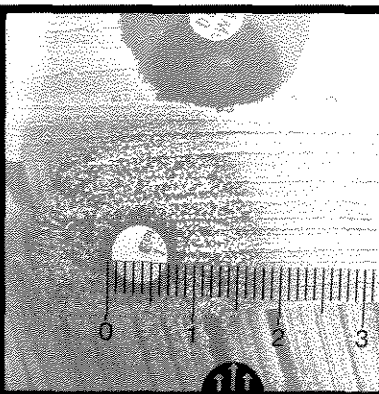


FIGURA 09: Mensuração do halo de inibição após o crescimento do *S. aureus*.

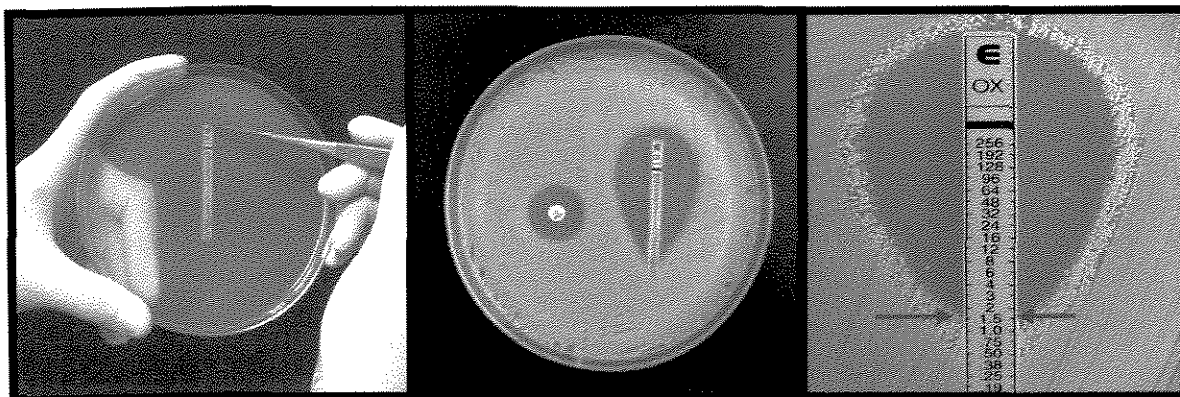
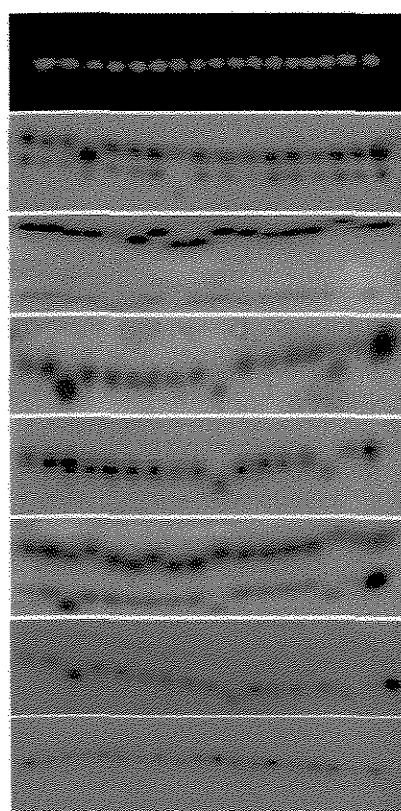


FIGURA 10: Tira do Etest com oxacilina, sendo aplicada no AMH NaCl 4%.

FIGURA 11: Halo esférico formado pelo disco e a elipse formada pelo MIC.

FIGURA 12: Linhagem apresenta um MIC de 1.5µg/mL para oxacilina.



catalase

álcool desidrogenase

α, β esterase

glucose desidrogenase

malato desidrogenase

galactose desidrogenase

manitol-1-fosfato desidrogenase

glucose-6-fosfato desidrogenase

FIGURA 13: Aparência dos géis, após a reação de coloração das diferentes enzimas testadas. As bandas fornecem o perfil das linhagens isoladas, permitindo a análise numérica.

PROTOCOLOS :**a. Álcool Desidrogenase (ADH) EC 1.1.1.1.**

Tris HCl 200mM pH 8,0	41,5mL
Etanol	3,0mL
Isopropanol.....	2,0mL
NAD 1%.....	2,0mL
MTT 1,25%.....	1,0mL
PMS 1%	500µL

b. Catalase (CAT) EC 1.11.1.6. *

Fosfato de Sódio 100mM pH 6,5 (A).....	50,0mL
Iodeto de Potássio 1,5% (B)	50,0mL
Peróxido de Hidrogênio H ₂ O ₂ 0,03% (C).....	50,0mL

* Colocar A por 30 minutos a 0°C. Descartar A e colocar B por 2 minutos. Descartar B e lavar o gel com H₂O. Colocar C.

c. α - Esterase (α-EST) EC 3.1.1.1.

Fosfato de Sódio 50mM pH 6,0	48,5mL
Fast Blue RR	25,0mg
α-naftil acetato (15mg/1,5mL de acetona).....	1,5mL

d. β-Esterase (β-EST) EC 3.1.1.1.

Fosfato de Sódio 50mM pH 6,0	48,5mL
Fast Blue RR	25,0mg
β-naftil acetato (15mg/1,5mL de acetona).....	1,5mL

e. Galactose Desidrogenase (GLDH) EC 1.1.1.48.

Tris HCl 100Mm pH 8,4	47,5mL
Galactose	450,0mg
NAD 1%.....	1,0mL
MTT 1,25%.....	1,0mL
PMS 1%	500µL

f. Glicose Desidrogenase (GDH) EC 1.1.1.47.

Tris HCl 200mM pH 8,0	47,5mL
D-Glucose	500mg
NAD 1%.....	1,0mL
MTT 1,25%.....	1,0mL
PMS 1%	500µL

g. Glicose 6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH) EC 1.1.1.49.

Tris HCl 200mM pH 8,0	41,5mL
MgCl ₂ 100mM	1,0mL
Glicose 6-fosfato dissódica	100mg
NADP 1%	1,0mL
MTT 1,25%.....	1,0mL
PMS 1%	500µL

h. Malato Desidrogenase (MDH) EC 1.1.1.37.

Tris HCl 200mM pH 8,0	40,5mL
Ácido Málico 2M pH 8,0 *.....	6.0mL
NAD 1%.....	2,0mL
MTT 1,25%.....	1,0mL
PMS 1%	500µL

* ácido málico 26,8g; NaOH 16g; H₂O destilada q.s.p. 100,0mL.

i. Manitol 1-Fosfato Desidrogenase (M1P) EC 1.1.1.17.

Tris HCl 200mM pH 8,0	46,5mL
Manitol 1-fosfato	5,0mg
NAD 1%.....	2,0mL
MTT 1,25%.....	1,0mL
PMS 1%	500µL

j. Tampão Fosfato de Potássio 40mM pH 7,5*

KH ₂ PO ₄	5,44g
H ₂ O destilada	q.s.p. 1000mL
* ajustar o pH com NaOH	

I. Tampão Fosfato de Sódio *

Solução A: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 27,6g
 H_2O destilada q.s.p. 1000mL
Solução B: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53,6g
 H_2O destilada q.s.p. 1000mL

* Misturar partes iguais das soluções, diluir conforme a molaridade e acertar o pH segundo a reação.

m. Tampão Tris-HCl *

Tris 120,0g
 H_2O destilada q.s.p 1000mL

* Diluir conforme a molaridade e acertar o pH com HCl segundo a reação.

n. Tampão A pH 8,0 *

Tris 83,20g
Ácido Cítrico Monoidratado..... 33,09g
 H_2O destilada 1000mL

*Eletrodo solução 1:1 de H_2O

*Gel solução 1:29 de H_2O