

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Ana Laura Remédio Zeni Beretta

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus*
RESISTENTES À OXACILINA ISOLADAS DE PACIENTES DO
HOSPITAL DAS CLÍNICAS - UNICAMP NO PERÍODO DE 1991 A
2001.**

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Genética e Biologia
Molecular na área de Microbiologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Luiza Moretti

Campinas

2004

Campinas, 18 de março de 2004.

Banca Examinadora

Presidente

Profª Dra. Maria Luiza Moretti (Orientadora)

Assinatura

Membros Titulares:

Profª Drª Raquel B. Stucchi

Assinatura

Profº Dr. Plínio Trabasso

Assinatura

Profª Drª Clarice Queico Fujimura Leite

Assinatura

Profº Dr Tomomasa Yano

Assinatura

Membros Suplentes:

Profº Drº Francisco Aoki

Assinatura

Profª Drª Clarice W. Arms

Assinatura

Para
Cesar e Victor.

"Todos aqueles que encontramos, profundamente, formam-nos, modificam-nos, constroem-nos. Por isso, não somos o que queríamos ser, não somos o que deveríamos ser e não somos o que iríamos ser, mas, sobretudo, não somos o que éramos".

Aos meus pais, Ignácio e Inês, pela dedicação e esforço durante todos os passos de minha vida. Existem coisas que são difíceis de transformar em palavras, mas, com carinho, para vocês, o resultado de mais uma caminhada.

Ao Cesar, meu marido, pelo incentivo, interesse, dedicação e companheirismo. Também por preencher com tanto amor e carinho todos os momentos difíceis, respeitando sempre minhas idéias e projetos.

Só os laços afetivos têm o dom de transformar o fel de tanta ausência forçada e sentida, no mel de tanta realização alcançada.

Ao Victor, meu filho, obra perfeita e acabada, esta outra obra, fruto de muito trabalho e força de vontade, esperando que um dia, quando entendê-la, possa ele orgulhar-se da mãe, que tentou crescer, ao mesmo tempo em que ele também crescia. Perdoe-me por tanta ausência.

**Homenagem especial à Prof^a Dr^a Maria
Luiza Moretti, pela orientação, supervisão,
apoio, compreensão e amizade. Muito
obrigada pela confiança.**

Aos meus avós Ângelo e Laura com carinho.

**Trabalho realizado no Laboratório de
Epidemiologia Molecular e Fungos da
Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas -
UNICAMP**

AGRADECIMENTOS

- À Deus, por ter me concedido a graça de concluir mais uma etapa da minha caminhada com sucesso.
- À Reitoria do Centro Universitário Hermínio Ometto - UNIARARAS Prof^a. Dr^a. Cristina Ferreira de Camargo, pelo apoio, incentivo e por ter permitido a utilização do laboratório de Microbiologia deste Centro Universitário para realizar parte deste trabalho.
- À Pró-Reitora da Graduação, Prof^a. Dr^a. Miriam Magalhães Levada pelo ensinamento e crescimento profissional, por suas sugestões valiosas e, em especial, pelo carinho e amizade que sempre reservou para mim. Muito além de minha amiga, foi a pessoa que sempre acreditou em minha capacidade profissional.
- A todos os meus coordenadores da UNIARARAS, obrigada pelo incentivo, pela força, pelo carinho e confiança que sempre depositaram em mim.
- Ao Dr Plínio Trabasso, meu agradecimento muito especial, embora convivemos pouco tempo durante a realização deste trabalho, porém, quando mais precisei gentilmente colaborou, passando seus humildes e preciosos ensinamentos, que muito contribuiu na valorização de meu estudo.
- À Dr^a. Raquel Stucchi, pelos preciosos ensinamentos na fase final, sua participação também foi muito especial.
- A querida amiga Sylvia Vilella, que por ser muito especial sabe o profundo significado da amizade, obrigada pelo apoio constante durante esta árdua jornada, pelos momentos alegres, tristes e difíceis.

- Aos professores amigos e aos companheiros de jornada do Centro Universitário Hermínio Ometto – UNIARARAS pela atenção, apoio e principalmente pela compreensão durante esse período tão marcante em minha vida.
- Aos companheiros de Pós-graduação do Laboratório de Epidemiologia Molecular de bactérias e Fungos-Unicamp, pela convivência, atenção e carinho durante o desenvolvimento desta tese.
- À Débora Geiger, minha querida amiga e companheira das horas difíceis de Unicamp, obrigada pelo carinho e amizade durante esses anos.
- À Sileuda Moreira, minha companheira de Unicamp, pela dedicação fraterna, em todos os momentos vividos durante o desenvolvimento deste trabalho, pela colaboração constante e prestativa.
- À equipe técnica do laboratório de fungo e epidemiologia molecular UNICAMP, Guaracy Ribeiro, Erivan e Márcia pelo apoio e auxílio técnico, durante a realização deste trabalho.
- Por fim, a todos os meus amigos que, mesmo não mencionados, estiveram ao meu lado, de alguma forma, contribuíram para minha formação e realização deste estudo e a conquista de mais uma vitória.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xviii
ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS.....	xix
RESUMO.....	xxii
ABSTRACT.....	xxv
<u>1. INTRODUÇÃO.....</u>	1
1.1. A Importância da Infecção Hospitalar.....	2
1.2. Aspectos epidemiológicos das infecções intra-hospitalares por <i>S.aureus</i> e <i>S.aureus</i> resistente à oxacilina (SARO).....	3
1.3. Características microbiológicas do <i>S. aureus</i>	5
1.4. Métodos moleculares para tipagem de SARO com fins epidemiológicos.....	6
1.5. Métodos moleculares aplicados para o estudo de patógenos hospitalares.....	9
<u>2. OBJETIVOS.....</u>	16
<u>3. CASUÍSTICAS E MÉTODOS.....</u>	18
3.1. Desenho do estudo.....	19
3.2. Descrição do Hospital das Clínicas – UNICAMP.....	19
3.3. Banco de bactérias.....	20
3.4. Isolados bacterianos de SARO.....	20
3.5. Processamento dos isolados bacterianos.....	21
3.6.Métodos de tipagem epidemiológica molecular.....	22
3.6.1. Obtenção do DNA genômico para a técnica de PFGE.....	22

3.6.1.1. Análise comparativa dos perfis determinados por PFGE.....	24
3.6.2. Obtenção do DNA genômico para a técnica de RAPD - PCR.....	25
3.6.2.1. Determinação da concentração de DNA genômico.....	26
3.6.2.2. Amplificação do DNA genômico de isolados SARO RAPD-PCR.....	26
3.6.2.3. Oligonucleotídeo iniciador utilizado nas amplificações do DNA genômico.....	27
3.6.2.4. Análise comparativa dos isolados SARO pela técnica de RAPD-PCR.....	28
4. RESULTADOS.....	30
4.1. Surto intra-hospitalar por SARO.....	31
4.2. Padrão de suscetibilidade a antimicrobianos.....	32
4.3. Análise do DNA genômico por PFGE.....	33
4.3.1. Estudo molecular das cepas SARO no período de 1995-2001.....	34
4.3.1.1. Estudo molecular de cepas hospitalares de SARO no período de 1991-1993.....	38
4.4. Análise do DNA genômico por RAPD-PCR.....	45
4.5. Análise comparativa dos métodos moleculares.....	45
5. DISCUSSÃO.....	49
6. CONCLUSÃO.....	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

8. ANEXOS.....	81
8.1. Anexo 1. Definição de infecção nosocomial.....	82
8.2. Anexo 2. Tabela padrão para interpretação de halos de inibição de antibacterianos para <i>Staphylococcus aureus</i>	84
8.3. Anexo 3. Cepas de SARO utilizadas na análise da epidemiologia molecular no período de 1995 a 2001.....	85
8.4. Anexo 4. Soluções utilizadas para o estudo.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BHI	Brain Heart Infusion
CDC	Centro de Controle de Doenças (Centers for Disease Control)
CAISM	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
IH	Infecção Hospitalar
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
kb	Kilobase
LB	Luria Bertani
LEMEDI	Laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Infecciosas
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
NCCLS	National Commitee For Clinical Laboratory Standards
NET	N-lauroilsarcosine/EDTA/Trizma base
Pb	Pares de bases
PCR	Reação de polimerização em cadeia
PFGE	(Pulsed Field Gel Electrophoresis) Eletroforese em campo pulsátil
RAPD	(Randon Amplification of Polymorphic DNA) Amplificação do DNA polimórfico aleatório
RNA	Ácido ribonucléico
SARO	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à oxacilina
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TBE	Tris ácido bórico EDTA
UV	Ultra Violeta
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

Quadro 1. Iniciador utilizado na técnica de RAPD-PCR para a caracterização molecular dos isolados de SARO de pacientes hospitalizados (1995-2001).....	29
Quadro 2. Protocolo da reação de RAPD-PCR para a caracterização molecular dos isolados SARO de pacientes hospitalizados.....	29
Quadro 3. Ciclos de amplificação padronizados e utilizados na técnica molecular RAPD-PCR.....	29
Tabela 1. Distribuição dos sítios de isolamento de 117 cepas de SARO isoladas de 94 pacientes hospitalizados no período de 1995-2001 e das 73 cepas SARO isoladas de 58 pacientes hospitalizados no período de 1991-1992 no HC-UNICAMP.....	31
Tabela 2. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das cepas de SARO isoladas de pacientes hospitalizados no período de 1991-2001 no HC-UNICAMP.....	32
Figura 1. Perfis de DNA genômico digerido com enzima de restrição <i>SmaI</i> por PFGE, das cepas de SARO isoladas de pacientes hospitalizados no período de maio de 1995 a agosto de 2001.....	35
Figura 2. Perfis de DNA genômico muito relacionados, possivelmente relacionados ao perfil endêmico A e perfil B de cepas hospitalares de SARO por PFGE, presentes no período de maio de 1995 a agosto de 2001.....	36

Tabela 3. Distribuição dos perfis de DNA genômico de cepas hospitalares de SARO no período de maio de 1995 a agosto de 2001, segundo TENOVER et al. (1995), referente a figura 1.....	37
Figura 3. Perfis de DNA genômico digerido com enzima de restrição <i>SmaI</i> seguido de PFGE das cepas SARO de pacientes hospitalizados entre o período de abril de 1991 a fevereiro de 1993, responsáveis por surto no HC-UNICAMP.....	39
Tabela 4. Distribuição dos perfis de DNA genômico das cepas de SARO de pacientes hospitalizados no período de abril de 1991 a fevereiro de 1993, segundo TENOVER et al. (1995) referente a figura 3.....	40
Figura 4. Dendrograma construído com base no coeficiente de similaridade de Dice ilustrando a relação das cepas de SARO de pacientes hospitalizados no período de maio de 1995 a agosto de 2001 por PFGE (figura 1).....	41
Figura 5. Dendrograma construído com base no coeficiente de similaridade de Dice ilustrando a relação das cepas de SARO de pacientes hospitalizados no período de maio de 1995 a agosto de 2001 por PFGE (Figura 2).....	41
Figura 6. Dendrograma construído com base no coeficiente de similaridade de Dice ilustrando a relação das cepas SARO de pacientes hospitalizados no período de abril de 1991 a fevereiro de 1993 por PFGE (Figura 3).....	42
Figura 7. Dendrograma construído com base no coeficiente de similaridade de Dice ilustrando a relação das cepas de SARO de pacientes hospitalizados no	

período de abril de 1991 a fevereiro de 1993 e maio de 1995 a agosto de 2001.....	43
---	----

Tabela 5. Distribuição dos perfis identificados por PFGE dos isolados de SARO de pacientes hospitalizados nos dois períodos de estudo do HC-UNICAMP.....	44
---	----

Figura 8. Gel de agarose a 1,5% demonstrando o resultado dos fragmentos polimerizados ao acaso por RAPD-PCR de DNA cromossômico de cepas de SARO isoladas de pacientes hospitalizados no período de maio de 1995 a agosto de 2001, utilizando o iniciador OPR8.....	46
--	----

Figura 9. Dendrograma construído com base no coeficiente de similaridade de Dice ilustrando a relação das cepas de SARO isoladas de pacientes hospitalizados no período de maio de 1995 a agosto de 2001, por RAPD-PCR.....	47
--	----

Tabela 6. Distribuição dos perfis identificados por RAPD-PCR de DNA cromossômico das cepas de SARO de pacientes com infecção hospitalar no período de maio de 1995 a agosto de 2001, utilizando o iniciador OPR8.....	48
--	----

Tabela 7. Comparação dos perfis identificados por PFGE e PCR-RAPD de DNA cromossômico de cepas de SARO isoladas de pacientes hospitalizados no período de maio de 1995 a agosto de 2001.....	48
---	----

RESUMO

RESUMO

Beretta, Ana Laura Remédio Zeni. **Epidemiologia molecular de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina isolados de pacientes do Hospital das Clínicas –UNICAMP no período de 1991 a 2001. Campinas, 2003.**

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Infecções hospitalares causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes oxacilina (SARO) representam grave problema médico e hospitalar no mundo todo e têm sido causadoras de surtos e endemias, principalmente nos hospitais de médio e grande porte e nos universitários, com altas taxas de mortalidade.

O emprego de técnicas discriminatórias por análise do DNA de cepas envolvidas nas infecções hospitalares é um recurso valioso para o conhecimento do comportamento epidemiológico dos SARO.

Nosso estudo analisou a diversidade genômica das cepas de SARO, isoladas de pacientes portadores de infecção hospitalar, internados no Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas, durante o período compreendido entre 1995-2001, comparativamente com os perfis genômicos obtidos no estudo, durante os anos de 1991 até 1993.

Foram aplicados dois métodos de tipagem molecular. O perfil do DNA genômico de cepas de SARO no período de 1995 a 2001 por “Eletroforese em Gel de Campo Pulsado” (PFGE), comparativamente com o perfil de cepas SARO estudadas em 1991 a 1993 pela mesma técnica molecular. Foi realizada a análise de DNA genômico por polimorfismo amplificado aleatoriamente, “Restriction Amplification Polymorphic DNA” (RAPD), nas cepas SARO de 1995 a 2001.

Foram estudadas 117 cepas de SARO obtidas de pacientes internados entre 1995 a 2001. Utilizando-se a técnica de PFGE, foi observado que 80 (68,4%) cepas pertenciam ao

mesmo perfil genômico A, 18 (15,4%) pertenciam a um perfil genômico muito relacionado AM, 18 (15,4%) pertenciam a um perfil genômico possivelmente relacionado AP e 1 (0,8%) cepa pertenciam a um perfil genômico não relacionado. No período de 1991 a 1993, as 73 cepas de SARO estudadas foram representadas por cinco diferentes perfis: A, B, C, D e E. O perfil A foi o mais freqüente e foi identificado em 55 (75,3%) cepas; três cepas muito relacionadas e 4 possivelmente relacionadas também foram identificadas.

Os perfis genômicos A, AM e AP encontrados no período de 1995-2001, foram idênticos àqueles obtidos entre 1991 a 1993, demonstrando a presença, a disseminação clonal e a persistência de uma cepa endêmica dentro do ambiente hospitalar num período de 10 anos. A análise dos padrões mostrou um coeficiente de similaridade de 96% entre os perfis A no período de 1991-1993 e 1995-2001.

Através da técnica de RAPD foram identificados dois diferentes padrões de agrupamento: o padrão a foi representado por 43 cepas e o número de bandas variou de 8 a 10, enquanto que o agrupamento b foi representado por 74 cepas e o número de bandas variou de 5 a 7. O coeficiente de similaridade entre os padrões a e b obtido através desta técnica foi de 86%.

A aplicação de métodos de biologia molecular permitiu uma melhor compreensão do comportamento epidemiológico de SARO no Hospital de Clínicas da Unicamp. A persistência do mesmo perfil genômico durante um período de 10 anos revela alta probabilidade de transmissão cruzada deste patógeno.

ABSTRACT

ABSTRACT

Beretta, Ana Laura Remédio Zeni. Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* isolates of patient at the Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas in the period 1991-2001. Campinas, 2003.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Nosocomial infections caused by MRSA represent a serious medical and nosocomial problem around the world and have been the cause of epidemics and outbreaks with a high mortality rate mainly in University Hospitals and large and medium sized hospitals.

The use of discriminatory techniques through DNA analysis of strains involved in nosocomial infections is an extremely valuable resource to confirm the efficacy of control measures related to the causing agents of nosocomial infections.

This study has analyzed the genomical diversity of MRSA strains isolated from nosocomial infection carriers hospitalized at the Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas, from 1995 to 2001, comparing them with the genomical profiles obtained from 1991 to February 1993. Two molecular typing methods were applied: - RAPD-PCR genomical DNA analysis in two periods of time and the DNA profile by PFGE.

117 MRSA strains were studied-obtained from carriers hospitalized from 1995 to 2001. Through PFGE, it has been observed that 80 (68.4%) strains had the same genomic profile A, 18 (15.4%) strains had a closely-related genomic profile AM, 18 (15.4%) strains had a possibly-related genomic profile AP and only 1 (0,8%) strain presented an unrelated profile. In the period from 1991 to 1993, 73 strains presented five distinctive DNA profiles: A, B, C, D and E. Profile A was the most frequent DNA

pattern and was identified 55 (75.3%) strains; three closely-related and four possibly-related profiles were also identified.

The genomic profiles A, AM and AP identified in the period from 1995-2001 were identical to those obtained from 1991 to 1993, demonstrating the presence, the clonal dissemination and the persistence of an endemic strain in a nosocomial environment within a ten-year period.

The computer analysis of the endemic profile A identified in period 1991-1993 and profile A from period 1995-2001 showed a 96% of similarity and they were considered to be the same profile A and they came from the common MRSA clone widely recognized in Sao Paulo and other Brazilians hospitals.

Two different cluster patterns have been identified through RAPD; the profile a was represented by 43 (36.7%) strains and there was a variation from 8 to 10 fragments while profile b was represented by 74 (53.3%) strains and there was a variation from 5 to 7 fragments. Cluster analysis showed an 86% coefficient of similarity.

A better understanding of the epidemiological behavior of MRSA strains at Hospital de Clínicas da Unicamp has been achieved with the application of molecular biology methods. The persistence of the same genomic profile within a ten-year period has shown a high probability of a crossed transmission of such pathogen.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. A importância da Infecção Hospitalar

As infecções adquiridas durante a hospitalização são definidas como infecções hospitalares (IH) ou nosocomiais e têm sido responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade e aumento dos custos hospitalares (JARVIS e MARTONE, 1992; MIMS et al., 1995; PANNUTI e GRINBAUN, 1995; AYLIFEE et al., 1998; CONTERNO et al., 1998; STARLING e SILVA, 1998; GRUNDMANN et al., 2002).

Apesar de não haver dados registrados, sabe-se que desde o início dos primeiros hospitais era alta a incidência de infecções neles adquiridas. Porém, somente na primeira metade do século XIX a questão IH passou a ser enfocada pelos profissionais da saúde (LAFORCE, 1997; ENRIGHT et al., 2002; MELTER et al., 2003).

A era moderna do controle da IH começou na década de 50, quando ocorreram grandes epidemias da doença estafilocócica nos hospitais da Europa e dos Estados Unidos. As investigações iniciais sobre as epidemias foram conduzidas pelo Centro de Controle de Doenças e Prevenção (CDC, EUA). A persistência das epidemias estafilocócicas nos hospitais durante a década de 60 motivou uma abordagem mais organizada no controle da IH (HENRY, 1995; BLANC et al., 2001a).

Os estudos da literatura mostram que, aproximadamente, 10% dos pacientes que desenvolvem a IH fazem parte de um quadro epidêmico hospitalar (WENZEL et al., 1983; MORETTI-BRANCHINI, 1998; ENRIGHT et al., 2002).

Os trabalhos de incidência e prevalência das IH relatam taxas de incidência entre 5% e 10%, média de 8% e prevalência entre 6,1% a 12,1%, com média de 10%, nos Estados Unidos. As taxas de incidência de IH diferem de um país para outro, como também de uma instituição para outra, dependendo de fatores como o estado imunológico do paciente, a situação socioeconômica, bem como do sistema de controle

e de vigilância epidemiológica das IH e das características do hospital (TESS et al., 1993; BINGEN, 1994; DURMAZ et al., 1997; BRACHAMAN, 1998; JARVIS, 1998; COSSERON et al., 1998; HUANG et al., 2000; FISHBAN et al., 2003; HUANG et al., 2004).

As taxas de IH também têm variação em relação às áreas de internação, gravidade dos pacientes e tipo de hospital. Podem ser citados como exemplos, as unidades de terapia intensiva geral onde as infecções hospitalares apresentam um índice de 6-10 casos por 100 pacientes, os pacientes graves internados e infectados com HIV apresentam índice de 15 casos por 100 pacientes, aumentando o risco para a aquisição de IH (JOHN e RIBNER, 1991; GOETZ e MURDER, 1992; TEIXEIRA et al., 1995; BRACHMAN, 1998; GORAK et al., 1999; GRUNDMANN et al., 2002).

1.2. Aspectos epidemiológicos das infecções intra-hospitalares causadas por *S.aureus* e *S.aureus* resistente à oxacilina (SARO).

A epidemiologia das infecções nosocomiais causadas por *S. aureus*, passou a ser bem estudada a partir das décadas de 1950 e 1960, quando este foi considerado o agente que predominava no ambiente hospitalar proporcionando o aumento de infecção (BARBER, 1961; BARG, 1993; HARTSTEIN et al., 1999; TENOVER e GAYNES, 2000; WANG et al., 2002; MONTESINOS et al., 2003).

Até o meio da década de 70, cepas de SARO ocorriam esporadicamente e não constituíam problema clínico sério (MULLIGAN et al., 1993; NICOLE et al., 1996; TAMBIC et al., 1997; ARCHER e NIEMEYER, 1998; BLANC et al., 2001a; SAMY et al., 2003). Mais recentemente muitos estudos de vigilância têm mostrado aumento da prevalência de SARO, entre cepas de *S. aureus* (WALKER et al., 1999; WITTE, 1999; SIMOR et al., 2001; SOLA et al., 2002; AIRES et al., 2003; MELTER et al., 2003; MIRAGAIA et al., 2003). Estudos americanos mostraram que esse patógeno foi a

principal causa de infecções em diversas unidades hospitalares, destacando um aumento na incidência de 2,4% para 29% entre 1975 a 1991. Atualmente, encontra-se em torno de 40% (ARCHER e NIEMEYER, 1998; PADOVEZE, 1998; LOUREIRO et al., 2000). Na Inglaterra os índices aumentaram de 1,5% para 13,2% entre 1989 e 1995 (SPELLER, et al., 1998; HERWALT et al., 1999; WITTE et al., 1999; AIRES et al., 2000; ALFIZAH et al., 2002; MELTER et al., 2003).

No Brasil, a situação não é muito diferente. O SARO é reconhecido como um dos principais causadores de surtos nosocomiais, embora com grande variação em diversos hospitais do país, em proporção de 26,6 a 71% (SADER et al., 1994; SADER et al., 1995; SANTOS-FILHO et al., 1996; MORETTI-BRANCHINI, 1998; LOUREIRO et al., 2000). A letalidade atribuída às infecções causadas por SARO é na ordem de 4,5 a 50%, (PUJOL et al., 1996; CORBELLA et al., 1997; CONTERNO et al., 1998; GRANZOW et al., 1998; MOREIRA et al., 1998; SALMENLINNA et al., 2001; MIRAGAIA et al., 2003).

Sobre IH por SARO, os dados da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (HC-UNICAMP) mostraram que esta bactéria foi introduzida nesta instituição em 1990. Desde então os níveis endêmicos são mantidos em várias unidades com uma prevalência em torno de 50% (TRESOLDI et al., 1997; MORETTI-BRANCHINI, 1998).

O mecanismo de disseminação dos SARO dentro dos hospitais durante surtos epidêmicos não está bem definido (TENOVER e GAYNES, 2000; SOLA et al., 2002), sabe-se que principal forma de transmissão ocorre através do pessoal da saúde durante o atendimento direto prestado aos pacientes, nas diferentes áreas. Durante os surtos, os pacientes colonizados ou infectados pelo SARO agem como reservatórios, e a infecção cruzada acontece mediada pelos médicos, enfermeiros e outros profissionais da saúde

que entram em contato com os pacientes (PFALLER et al., 1999; ENRIGHT et al., 2002; SOLA et al., 2002).

1.3. Características microbiológicas do *S. aureus*

S. aureus é uma bactéria pertencente à família Micrococcaceae, apresentando suas características morfológicas e tintoriais como cocos Gram positivos e agrupados em tétrades ou cachos de uva. São anaeróbios facultativos, não possuem motilidade, não formam esporos e incluem-se entre os de catalase positiva (KLOOS e SAMBRE, 1991; BOYD, 1995; DA SILVA et al., 2000; BACK, 2002; KONEMAM et al., 2002).

O diagnóstico laboratorial dos *S. aureus* é realizado através da bacterioscopia, e da análise das características culturais das colônias e da hemólise em meio de cultura como o ágar sangue. Vários meios seletivo-indicadores, entre os quais se inclui o Agar manitol-salgado, podem ser empregados com a finalidade de isolamento. Para diferenciá-los das outras espécies, é necessário o teste de produção de coagulase (BOYD, 1995; KONEMAM et al., 2002; BLACK, 2002).

O *S. aureus* está associado a doenças em humanos, é a espécie mais virulenta e mais conhecida do gênero e hoje atua como o principal patógeno causador de infecções tanto na comunidade como no ambiente hospitalar (BLACK, 2002; KONEMAM et al., 2002). As técnicas fenotípicas e moleculares são importantes para estudar a epidemiologia das infecções estafilocócicas (TAMBIC et al., 1999; ENRIGHT et al., 2002; WANG et al., 2002; FISHBAN et al., 2003; MCDOUGAL et al., 2003).

Os *S. aureus* apresentam alguns componentes de superfície na parede celular, como a proteína A, que atua localmente na resistência à fagocitose assim como também produzem várias substâncias extracelulares, que contribuem para a sua virulência. Entre as substâncias extracelulares destacam-se as enzimas, as toxinas e as adesinas que

participam na patogênese das infecções causadas por esse microrganismo. As adesinas têm sido bastante investigadas no que diz respeito ao mecanismo de sua adesão a células do organismo, tornando ao *S. aureus* mais adaptáveis ao ambiente (TESS et al., 1993; BLACK, 2002; GRUNDMANN et al., 2002; AIRES et al., 2003; LOWY, 2003).

Staphylococcus aureus resistentes à penicilina foram detectados a partir de 1950 e atualmente cerca de 90% das cepas são resistentes a este antibiótico. Um dos mecanismos considerados para resistência à penicilina é mediado por um plasmídeo de alta transferência que confere a capacidade de produção de uma β lactamase, a enzima penicilinase, capaz de hidrolisar a penicilina (WALKER et al., 1999; WITTE, 1999; BLACK, 2002; LOWY, 2003).

As penicilinas semi-sintéticas resistentes à penicilinase (oxacilina, meticilina, nafcilina, dicloxacilina) e cefalosporinas possuem radicais químicos que as protegem da ação das β lactamases (CHAMBERS et al., 1994; LOWY, 2003). Estes agentes β lactâmicos atuam na inibição da síntese da parede celular bacteriana através da ligação com proteínas específicas associadas com a síntese de peptoglicano (*Penicillin Binding Proteins* – *PBPs*). Uma vez que estas PBPs são responsáveis por atividades que envolvem a fixação de subunidades ao peptidoglicano durante a síntese da parede celular, sua ligação aos β lactâmicos forma um complexo estável, porém inerte. Os SAROs produzem uma PBP2 alterada (chamada PBP2a), a qual se liga aos β lactâmicos. Este tipo de resistência é codificado por um gene cromossômico (*mec A*) e é denominada de resistência intrínseca (BOYCE, 1992; CHAMBERS, 1997; BLACK, 2002; LOWY, 2003).

1.4. Métodos moleculares para tipagem de SARO com fins epidemiológicos.

Levando-se em consideração a importância da disseminação de infecção estafilocócica, em especial o *S aureus* com resistente à oxacilina, tanto na comunidade

e principalmente no ambiente hospitalar, torna-se necessário o controle rigoroso e a identificação rápida das cepas de SARO (SADER et al., 1995; VANDENBROUCHE-GRAULS, 1996; SOARES et al., 1997; TAMBIC et al., 1997; TURNIDGE et al., 2000; ALFIZAH et al., 2002; FEY et al., 2002; FISHBAN et al., 2003).

Surtos intra-hospitalares de infecções nosocomiais acontecem continuamente entre os pacientes hospitalizados nas diversas unidades de internação e as bactérias são, de longe, os agentes causadores mais comuns de infecções e epidemias hospitalares (MORETTI-BRANCHINI, 1998).

Sempre que existir a possibilidade de epidemia o laboratório de microbiologia deverá estocar as cepas de microrganismos, pois será essencial o estudo de tipagem dos mesmos na determinação dos pacientes envolvidos. A contribuição da microbiologia e a da genética no que concerne a microrganismos no controle das infecções hospitalares não se restringe ao diagnóstico e a orientação terapêutica de infecções, mas também serve como suporte fundamental para investigação epidemiológica e de surtos de infecções hospitalares (EISENSTEIN, 1990a; EISENSTEIN, 1990b; DARINI, 1996; EDMOND et al., 1999; DEPLANO et al., 2000; ENRIGHT et al., 2002).

O isolamento repetido de microrganismos de uma mesma espécie, obtidos de espécimens clínicos de diferentes pacientes, pode representar transmissão de paciente para paciente, partindo-se de uma fonte comum ou mesmo através dos profissionais da saúde (TURNIDGE et al., 2000; WANG et al., 2002; SOLA et al., 2002; FISHBAN et al., 2003).

Por algum tempo, a diferenciação de cepas para fins epidemiológicos só era possível através de métodos clássicos como reações bioquímicas, sorológicas, de fagotipagem ou pelo padrão de sensibilidade e resistência a agentes antimicrobianos. Porém estas técnicas são interpretadas como características não tipáveis e podem mostrar baixa reprodutibilidade (VESSALIC et al., 1993; ALFIZAH et al., 2002).

Com o desenvolvimento da biologia molecular, os clínicos e os epidemiologistas tiveram novas ferramentas capazes de discriminar diferenças entre microrganismos de uma mesma espécie. As novas técnicas de biologia molecular são altamente promissoras e adquiriram ampla aceitação como métodos altamente discriminatórios e relativamente econômicos para tipificação e caracterização epidemiológica de cepas SARO (TENOVER et al., 1994; TENOVER et al., 1995; WEBER et al., 1997; MULVEY et al., 2001; HUANG et al., 2004).

Dadas as limitações dos métodos de tipagem convencionais, os clínicos, microbiologistas e epidemiologistas hospitalares têm preferido utilizar as técnicas moleculares para o melhor conhecimento e caracterização dos patógenos hospitalares (POWER, 1996; BLANC et al., 2001; MCDOUGAL et al., 2003; MELTER et al., 2003).

O processo de tipagem é importante para reconhecer surto de infecção, detectar a transmissão cruzada de patógenos nosocomiais, determinar a fonte da infecção, reconhecendo principalmente cepas virulentas de microrganismos e monitorar programas de controle de infecção (GOETZ et al., 1992; SADER et al., 1994b; TAMBIC et al., 1997; OLIVE e BEAN, 1999; FUJINO et al., 2003; HUANG et al., 2004).

Os métodos fenotípicos são aqueles que caracterizam os produtos da expressão gênica de forma a diferenciar as cepas. Os métodos genotípicos são aqueles que se baseiam na análise de uma estrutura genética de um microrganismo e são caracterizados pela fragmentação do cromossomo, por enzimas apropriadas, ou pelo estudo de DNA extracromossômico. Os métodos genotípicos apresentam menor variação natural, no entanto, podem ser afetados por inserções ou deleções do DNA, por ganho ou perda de DNA extracromossômico ou por mutações aleatórias que criam ou eliminam sítios de reconhecimento, alterando a ação das endonucleases de restrição (TENOVER et al.,

1995; TENOVER et al., 1997; TAMBIC et al., 1997; TAMBIC, et al., 1999; FUJINO et al., 2003).

1.5. Métodos moleculares aplicados para o estudo de patógenos hospitalares

Entre os vários métodos para o estudo de tipagem molecular de patógenos hospitalares incluem-se:

A. Métodos com base no estudo do DNA genômico:

- Análise do perfil plasmidial.
- Análise do polimorfismo dos fragmentos de DNA genômico, após a digestão com enzimas de restrição, pela eletroforese convencional (*Restriction endonuclease analysis* - REA).
- Hibridização utilizando sondas de DNA específicos (*Southern hybridization*).
- Perfil do DNA genômico utilizando eletroforese em gel de campo pulsado- (*Pulsed field gel electrophoresis*)- PFGE.
- Polimorfismo amplificado aleatoriamente por reação em cadeia da polimerase - (*Arbitrarily primed polymerase chain reaction*) - PCR-RAPD.
- *Elementos palindrômicos repetitivos extragênicos* - REP-PCR.
- (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) - ERIC-PCR.

B. Métodos com base no estudo das proteínas:

- Immunoblot fingerprint.
- Análise de proteínas celulares por eletroforese em gel de poliacrilamida.
- Perfil eletroforético de enzimas (*Multilocus enzyme electrophoresis*).

A diversidade genética do SARO tem sido estudada em diversos hospitais do mundo e do Brasil. A análise de perfil plasmidial foi o primeiro método usado em

estudos epidemiológicos para *S. aureus* (TAMBIC et al., 1997). Hoje as técnicas de tipagem molecular empregadas na maioria das publicações têm sido a análise do DNA genômico digerido com enzimas de restrição de endonuclease seguida de eletroforese em campo pulsado (PFGE) (TAMBIC et al., 1997; KUBOYANA, et al., 2003). Entretanto, alguns estudos têm indicado a utilidade de tipagem do DNA cromossomal por RAPD em muitos surtos intra-hospitalares (TAMBIC et al., 1999; WANG et al., 2002).

A técnica de PFGE foi desenvolvida por SCHAWARTZ e CANTOR (1984) como um instrumento para investigação de DNA cromossômico de células eucariontes e posteriormente descrita como um eficiente método para tipagem de muitas cepas bacterianas (BRANCHINI et al., 1993; TENOVER et al., 1995; TENOVER et al., 1997). É uma variação da eletroforese convencional em gel de agarose (WEBER et al., 1997). A orientação do campo elétrico é alterada ou pulsada periodicamente, e as moléculas de DNA respondem orientando-se continuamente mudando a direção de migração através do gel de agarose (TENOVER et al., 1997; GOERING, 1998; PADOVEZE, 1998). Esta técnica pode ser utilizada tanto para bactérias Gram positivas quanto para Gram negativas e é considerada altamente discriminatória e reprodutível para cepas endêmicas e epidêmicas (MORETTI-BRANCHINI et al., 1993; TENOVER et al., 1995; MORETTI-BRANCHINI, 1998).

Devido a diversidade e estabilidade de perfis de DNA genômico, a técnica de PFGE tem sido muito precisa para tipagem epidemiológica de cepas SARO (ALFIZAH et al., 2002; MONTESINOS et al., 2002), e é considerada padrão ouro devido ao seu alto poder discriminatório entre cepas SARO (OLIVE e BEAN, 1999; MONTESINOS et al., 2003).

A utilização da análise pela enzima de restrição, que corta o DNA em inúmeros fragmentos através da técnica de PFGE tem sido muito recomendada para tipagem de SARO. A técnica de PFGE tem sido amplamente utilizada para estudo de vários

microrganismos envolvidos em surtos de infecções. Para cada espécie, deve ser aplicada a enzima de restrição que melhor aponte as variações entre cepas e, no caso de *S.aureus*, há um consenso entre os pesquisadores de que a enzima *SmaI* é a mais indicada (STRUELENS et al., 1993; VAN-BELKUM et al., 1998). Essas enzimas de restrição podem reconhecer seqüências de nucleotídeos curtas (quatro nucleotídeos) ou longas (seis nucleotídeos) no cromossoma bacteriano. Quando se reconhece seqüências de nucleotídeos longas produzirá um número menor de bandas, reduzindo a complexidade na análise dos perfis ou padrões cromossômicos. No entanto, estas enzimas geram fragmentos grandes de DNA ($\geq 50\text{Kb}$), que podem ser separados num sistema de eletroforese com campos elétricos alternados e um pulso fixo devem ser aplicados (SADER et al., 1994; TENOVER et al., 1997; TAMBIC et al., 1999).

Para a interpretação dos resultados obtidos por PFGE, STRUELENS et al. (1993) propuseram os termos variantes subclonais para aquelas cepas que apresentaram entre 80 a 100% de similaridade em seus perfis de macrorestrição, e diversidade clonal para cepas com menos de 80% de similaridade.

TENOVER et al. (1995) determinaram os seguintes critérios de interpretação para as categorias de relação genética e epidemiológica: isolados iguais, muito relacionados, possivelmente relacionados e isolados não relacionados.

O critério de interpretação para a tipagem de bactérias utilizando o método de PFGE permitiu as definições de padrões de similaridade entre cepas bacterianas (TENOVER et al., 1995; GOERING, 1998; BLANC et al., 2001b). O PFGE apresenta importantes vantagens quando comparado com outras técnicas de tipagem molecular (GOERING, 1998; TENOVER et al., 1997).

Todos os métodos podem ser caracterizados em termos de tipabilidade, reprodutibilidade, poder discriminatório, facilidade de realização e de interpretação,

porém com diferentes custos (BINGEN, 1994; TENOVER, et al., 1997; TAMBIC et al., 1997; WANG et al., 2002; FUJINO et al., 2003).

O grau de discriminação oferecido pela tipagem do DNA de bactérias depende da divergência genética evolucionária, seguida de mutações não letais, aquisição ou deleção de fragmento de DNA durante os anos (HARTSTEIN, 1999; GHANG e CHUI, 1998; KUBOYANA, et al., 2003). A habilidade dos métodos moleculares de tipagem em distinguir isolados epidemiologicamente não relacionados é reflexo da variação genética observada no DNA cromossômico das espécies bacterianas, sendo geralmente esta variabilidade alta.

A tipabilidade refere-se à habilidade da técnica em produzir um resultado de tipagem para cada isolado. Isolados não tipáveis são aqueles que não produzem resultado. Um método para ser considerado reprodutível deve gerar os mesmos resultados, quando uma mesma cepa for testada em repetidos ensaios laboratoriais.

O poder discriminatório refere-se à capacidade da técnica em diferenciar isolados não relacionados epidemiologicamente. Idealmente, o método de tipagem deve ser capaz de reconhecer os isolados não relacionados, fornecendo resultados que nos permitam classificá-los como pertencentes a um único perfil ou não (MASLOW et al., 1993; SADER et al., 1994; TENOVER et al., 1995; TENOVER et al., 1997; ALFIZAH et al., 2002; HUANG et al., 2004).

A facilidade de realização reflete o custo dos reagentes apropriados, do equipamento, da complexidade do método e do esforço requerido para o aprendizado e a realização prática da técnica (TAMBIC et al., 1999; TENOVER et al., 1995; TENOVER et al., 1997; TENOVER e GAYNES, 2000).

A facilidade de interpretação envolve a obtenção de um resultado, prevendo a

clareza, a objetividade e a fácil compreensão (SAULNIER et al., 1993; VAN BELKUM et al., 1998; MCDOUGAL et al., 2003).

A tecnologia da reação de polimerase em cadeia (PCR), uma técnica que envolve a síntese enzimática específica de DNA ou RNA, através de um sistema semi-automático *in vitro* de milhões de cópias de um segmento, também tem sido utilizada para o diagnóstico de doenças infecciosas e, mais recentemente, vem sendo empregada como ferramenta na investigação epidemiológica de vários microrganismos (TAMBIC et al., 1999; FUNG et al., 2001). A técnica PCR baseia-se na amplificação de uma sequência específica do cromossoma.

O grande avanço na área de marcadores moleculares baseados em PCR ocorreu em 1990, com a idéia de se utilizar iniciadores mais curtos e de sequência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, eliminando assim a necessidade do conhecimento prévio de sequência. WELSH e MCCLELLAND (1990), por sua vez, propuseram a denominação mais apropriada para AP-PCR (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction), uma vez que os iniciadores possuem sequência arbitrária e a amplificação não ocorre ao acaso, mas sim em lugares específicos no genoma. A distinção entre cepas bacterianas altamente relacionadas dificilmente é revelada quando se usam iniciadores específicos.

Uma variante do PCR convencional muito aplicada e que tem sido utilizada com sucesso nos estudos de SARO envolvidos em epidemias ou surtos hospitalares é o “Random Amplified Polymorphic DNA” – RAPD (MULLIS, 1990; TAMBIC et al., 1999). Ensaio de RAPD envolve a amplificação simultânea de vários locos anônimos no genoma utilizando iniciadores de sequência arbitrária, que foi descrito e desenvolvido primeiramente por WILLIAMS et al. (1990) e WELSH e MCCLELLAND (1990). A técnica RAPD é baseada no uso de iniciadores com sequências curtas de 9 a 10 bases de comprimento que hibridizam com uma afinidade suficiente a sequência de DNA

cromossômico em baixa temperatura de anelamento, esses iniciadores podem ser usados para amplificação inicial na região do genoma da bactéria (OLIVE e BEAN, 1999).

Porém, usando-se iniciadores aleatórios ou inespecíficos, torna-se possível o estudo epidemiológico por não ser necessário o conhecimento preliminar das seqüências genéticas a serem amplificadas. O RAPD permite a análise das amplificações do rDNA das bactérias quando não se têm informações de suas bases (FANG et al., 1993; MASLOW e MULLIGAN, 1996; TAMBIC et al., 1999).

Muitos estudos reportaram sucesso no uso de RAPD para distinguir cepas bacterianas inclusive cepas de SARO (SAULNIER et al., 1993; ARBEIT, 1999; FACKLAN et al., 1999). A caracterização de SARO por RAPD-PCR é mais simples, mais rápida na investigação epidemiológica, além de consumir um tempo menor do que a análise por PFGE (TAMBIC et al., 1997).

Em estudos de epidemiologia molecular, o RAPD se rivaliza com a PFGE na preferência dos especialistas, contribuído para a sua popularidade, o poder discriminatório, a facilidade de execução da técnica e a rápida disponibilidade dos resultados (WELSH e MCCLELLAND, 1990; TAMBIC et al., 1997; WANG et al., 2002).

No entanto, quando se estudam surtos epidemiológicos, por este método, se faz necessário o emprego em conjunto a outras técnicas de tipagem molecular (DEPLANO et al., 1997; TAMBIC et al., 1999; BLANC et al., 2001), pois o RAPD tem mostrado baixa reprodutibilidade (FANG et al., 1993; ARBEIT, 1999; FACKLAM et al., 1999).

Dessa forma as técnicas de tipagem molecular de microrganismos baseados na análise do DNA representam atualmente um recurso fundamental e valioso no estudo das epidemias hospitalares causadas por SARO, permitindo uma diferenciação maior

entre isolados bacterianos (MASLOW et al., 1993; BINGEN, 1994; OLIVE e BEAN, 1999; MONTESINOS et al., 2002).

Entretanto, são poucos os estudos da evolução do comportamento do perfil genômico dos SARO ao longo dos anos, em especial, em uma mesma instituição hospitalar (FISHBAN et al., 2003; LANDMAN et al., 2003).

Portanto, o presente estudo se propôs a analisar, por métodos de tipagem molecular, os padrões genômicos de cepas hospitalares de SARO, isoladas de pacientes internados no HC-UNICAMP de 1995 a 2001, e comparar os resultados com os perfis genômicos encontrados no período de 1991 a 1993, por PFGE, totalizando 10 anos de seguimento do perfil molecular dos SARO.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O estudo teve como objetivos:

1. Analisar a diversidade genômica de cepas de SARO, isoladas de pacientes hospitalizados no HC-UNICAMP durante o período de maio de 1995 a agosto de 2001 utilizando tipagem molecular por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e a análise por polimorfismo amplificado aleatoriamente (RAPD), através da reação em cadeia da polimerase (PCR).
2. Comparar os resultados da tipagem molecular por PFGE de cepas de SARO isoladas de pacientes hospitalizados no HC-UNICAMP durante o período de maio de 1995 a agosto de 2001 e de abril de 1991 a fevereiro de 1993.
3. Estudar a capacidade discriminatória dos métodos aplicados.

3. CASUÍSTICAS e MÉTODOS

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Desenho do estudo

Trata-se de um estudo retrospectivo de vigilância microbiológica da ocorrência de SARO nos pacientes internados no Hospital de Clínicas da Unicamp no período compreendido entre maio de 1995 a agosto de 2001. As cepas obtidas foram testadas quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos e, em seguida, tipadas através de dois métodos de biologia molecular, PFGE e RAPD. Posteriormente, os perfis genômicos das cepas estudadas foram comparados àqueles obtidos entre abril de 1991 a fevereiro de 1993.

Os pacientes eram procedentes de diversas unidades de internação do HC-UNICAMP, a saber: Pronto Socorro, Enfermaria de Moléstias Infecciosas e Doenças Transmissíveis, Enfermarias Clínicas e Cirúrgicas, UTI entre outras.

A definição de IH por SARO foi feita pelos profissionais da CCIH, segundo critérios estabelecidos para o diagnóstico de IH, com base nas definições do CDC (1988)-(Anexo 1). As cepas de SARO isoladas dos pacientes que não preencheram os critérios de IH foram consideradas como cepas responsáveis por colonização hospitalar.

3.2. Descrição do Hospital das Clínicas – UNICAMP

Trata-se de um hospital universitário geral e de referência terciária (BRASIL MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1985) para a região de Campinas. Possui 403 leitos ativos, onde são atendidos pacientes de diferentes especialidades médicas, à exceção dos pertencentes ao Departamento de Tocoginecologia (Obstetrícia, Ginecologia e Oncologia Ginecológica e Mamária) e Berçário de Alto Risco. Tais especialidades são atendidas no Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM), localizado ao

lado do HC. Dos 403 leitos, 28 são de UTI de adultos (10 na UTI médico-cirúrgica; 5 na UTI pós-operatória; 4 na enfermaria de emergência clínica; 4 na cirurgia de trauma e 5 na unidade coronariana) e 10 de UTI pediátrica.

3.3. Banco de bactérias

O laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Infecciosas (LEMDI) da Disciplina de Infectologia da FCM-UNICAMP, em conjunto com o Laboratório de Microbiologia Clínica do Departamento de Patologia Clínica, a partir de 1995, passou a selecionar e estocar isolados de microrganismos identificados pelas culturas de rotina, entre eles os SARO, com o objetivo de estudar a epidemiologia dos microrganismos responsáveis por IH.

3.4. Isolados Bacterianos de SARO

Para o estudo foram utilizadas um total de 190 cepas de SARO, identificadas pelo Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Clínica e estocadas no Laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Infecciosas (LEMDI) da Disciplina de Infectologia da FCM-UNICAMP.

Das 190 cepas SARO hospitalares, 117 foram isoladas de 94 pacientes com internados no HC-UNICAMP no período de maio de 1995 a agosto de 2001 (117 cepas/ 94 pacientes). Estas 117 cepas foram comparadas com as 73 cepas estudadas e tipadas por PFGE no período compreendido entre abril de 1991 a fevereiro de 1993 (73 cepas/ 58 pacientes).

3.5. Processamento dos isolados de SARO

As 117 cepas de SARO hospitalares do período de 1995-2001 foram inicialmente cultivadas em placas de ágar sangue-azida 5%, identificadas pelo método convencional, inoculados em leite desnatado esterilizado a 10% e congelados a -70°C. Os isolados foram retestados para as provas coagulase e *Staph test* e confirmada a resistência para oxacilina. O método utilizado para o teste de sensibilidade à oxacilina foi o de difusão em disco (BAUER et al., 1996), em placa de cultura Müller Hinton + NaCl 4% e contendo discos de oxacilina 6 µg/ml, sendo consideradas como resistentes as cepas que apresentaram crescimento bacteriano ao redor do disco contendo antibiótico, ou seja não apresentaram o halo de inibição em volta do disco.

Além da oxacilina (6µg), outros antimicrobianos também foram testados: ampicilina (10µg), penicilina G(10UI), cefalotina (30µg), gentamicina (10µg), amicacina (30µg), netilmicina (30µg), tetraciclina (30µg), cloranfenicol (30µg), clindamicina (2µg), sulfametoxazol-trimetropin (23,75µg+25µg), imipenen (20µg), eritromicina (15µg), tobramicina (10µg) e vancomicina (30µg). A leitura das placas era realizada entre 20 a 24 horas e os isolados SAROS classificados em sensíveis, intermediários ou resistentes aos antimicrobianos de acordo com as recomendações do (*National Committee For Clinical Laboratory Standards*) – (NCCLS, 1999), (Anexo 2).

Posteriormente, todos os 117 isolados foram semeados em placas contendo agar-sangue azida e, a seguir, as colônias foram transferidas em tubos contendo meio Brain Heart Infusion (BHI) mantidos à temperatura ambiente para tipagem por PFGE e em Luria Bertani (LB) para tipagem por PCR.

3.6. Métodos de tipagem epidemiológica molecular

Os métodos moleculares utilizados neste estudo foram realizados no Laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Infecciosas (LEMDI) da Disciplina de Infectologia da FCM-UNICAMP.

Os 117 isolados SARO (1995-2001) foram armazenados a -70°C para futura realização de tipagem molecular, utilizando análise do padrão de perfil do DNA após a realização da eletroforese em campo pulsado (PFGE) e a análise do perfil genômico através da reação em cadeia da polimerase (PCR-RAPD).

3.6.1. Obtenção do DNA genômico para a técnica PFGE

A obtenção do DNA genômico dos 117 isolados clínicos de SARO foi realizada de acordo com o método de GOERING e DUENSING (1990) modificado. Oito a dez colônias de SARO foram cultivadas em 8,0 ml de caldo BHI, a partir de culturas em placas de ágar - sangue e incubadas a 37° C por 18 horas, sob agitação. As células depois de centrifugadas e lavadas foram estandardizadas por peso e diluídas igualmente (peso/volume) em tampão EC (TRIS 0,006M, pH 7,5; NaCl 1M; EDTA 0,1; Brij 58 a 0,5%; Sodium desoxycholate 0,2%; Sarkosyl 0,5%). Cinquenta e cinco microlitros do tampão EC foram adicionados em cada 20µl de suspensão bacteriana, seguida da adição de 675 µl de agarose de baixo ponto de fusão a 1% (Low Melt Agarose 1%, Bio Rad Labs. Richmond, Ca, EUA) que foi dispensada em moldes acrílicos (Bio Rad Labs.). Esses moldes de gel de agarose foram incubados a 35°C por 24 horas, contendo 2,0 ml do tampão EC, com a adição de 25 µl de lisostafina (Sigma Chemical, Ca, EUA) e de 10 µl de RNase (Sigma Chemical, Ca, EUA).

A solução tampão foi aspirada e os blocos foram lavados várias vezes com tampão (TE: 1M EDTA; 1 M Tris pH 7,5), com intervalos de lavagem de 1 hora, sempre mantidos sob leve agitação mecânica, à temperatura de 22°C. Em seguida, o tampão TE High Molarity foi aspirado dos blocos e substituído por 2 ml solução ESP (EDTA 0,4 M pH 9,3; Sarcosyl 1%; Proteinase K 1 mg/ml) e foi reincubado a 50°C por 24 horas. Após esse período os blocos foram lavados 4 vezes com 2 ml do tampão TE (Tris 0,1M, pH7,5) com intervalos de 1 hora em cada lavagem à temperatura de 22°C. Ao final das lavagens os blocos de agarose foram estocados, a 4 °C em 2 ml de TE.

A digestão do DNA genômico foi realizada por enzima de restrição *Sma*I (CCC↓GGG) (Gibco BRL, Life Technologies, EUA), que reconhece e cliva seqüências de nucleotídeos que aparecem poucas vezes no DNA. Metade de cada bloco de agarose foi incubada por 24 horas à temperatura ambiente com 20U de *Sma*I de acordo com orientações do fabricante. Após esse período, os blocos foram lavados com solução TE de baixa molaridade (TE: 1 mM Tris pH7,5; 10 mM EDTA pH 7,5). Os blocos de agarose foram inseridos em géis de agarose a 1% , em solução tampão 0,5x TBE (Tris base; ácido bórico; EDTA 0,5M, pH 8,0). Os fragmentos após serem digeridos pela enzima de restrição *Sma*I foram separados pela eletroforese em campo pulsado, usando o sistema CHEF-DRII (*contour-clamped homogeneous electric field*; Bio Rad Labs. Richmond, Ca, EUA).

A eletroforese foi executada em campo elétrico de 6 volts / cm, temperatura de 13,5°C por 19 h e pulsos intercalados de tempo de 5 e 35 segundos. Um marcador de peso molecular (DNA Lambda Concatemer, Bio Rad Labs. Richmond, Ca, EUA) foi inserido no primeiro poço de cada gel para a estimativa do tamanho dos fragmentos formados. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídio e fotografado sob transiluminação sob luz ultravioleta.

3.6.1.1 Análise comparativa dos perfis determinados por PFGE

Os padrões de bandas por PFGE foram analisados através do Software após as imagens auto-radiográficas terem sido capturadas por um sistema de imagens digital IS-1000 (Bio-capt MW, version 99, M&S Instruments Trading Inc), e foram comparados usando o programa para análise computacional Biogene (Vilbert-Loumart, França) e os dendrogramas foram construídos com base no coeficiente de Dice com um intervalo de confiança de 95%.

A relação de similaridade entre dois isolados foi estimada com base nos critérios de interpretação para os padrões de fragmentos de bandas, produzidos pela digestão do DNA cromossômico com a enzima *SmaI* segundo TENOVER et al. (1995).

Isolados iguais: dois isolados são considerados geneticamente idênticos quando os padrões de fragmentos de restrição presentes em ambos os isolados apresentem o mesmo número de bandas com o mesmo peso molecular. A interpretação epidemiológica desses resultados é que os isolados são considerados derivados de uma mesma cepa.

Isolados intimamente relacionados: um isolado é considerado intimamente relacionado à cepa do surto quando seu padrão de bandas, obtido pela PFGE, diferiu do padrão da cepa do surto em duas a três bandas.

Isolados possivelmente relacionados: um isolado é considerado possivelmente relacionado à cepa do surto quando as modificações consistiram em até dois eventos genéticos independentes, ou seja, observou-se 4 a 6 bandas diferentes, diferenças estas explicáveis por simples inserções ou deleções de DNA ou por ganho ou de perda de sítios de restrição.

Isolados não relacionados: um isolado é considerado não relacionado à cepa do surto quando o perfil do DNA cromossômico, obtido pela PFGE, difere do perfil da cepa do surto em 3 ou mais eventos genéticos independentes, o que correspondeu geralmente a diferenças de 7 ou mais bandas discordantes.

A análise comparativa dos perfis de SARO obtidos por PFGE entre os períodos de 1991 a 1993 e 1995 a 2001 foi realizada aplicando o teste Qui-quadrado MANTEL-HAENSZEL com limite de significância de ($p < 0,05$).

3.6.2. Obtenção do DNA genômico para a técnica RAPD-PCR

O DNA genômico das 117 cepas SARO foi obtido segundo AUSUBEL et al., (1987), partindo-se de 8 ml de crescimento das amostras em meio LB e incubadas por 18-24 h a 37°C, em duplicatas. A suspensão celular foi centrifugada (12.000 rpm por 2 minutos), o sobrenadante descartado e o sedimento suspenso em 500 µl de Tampão TE 1x (10mM Tris-HCl pH8,0 e 1mM de EDTA), 49µl de lisozima e 1µl de RNase. (10mg/ml). A suspensão foi homogeneizada em vortex e incubada a 37°C por 24 horas. Após esse período, foi adicionada uma mistura de 70 µl de SDS (Sodium Duodecyl Sulfate) a 10% e 5 µl de Proteinase k (10 mg/ml). A suspensão foi homogeneizada e incubada à 65°C por 10 minutos. A seguir, foi adicionado 100 µl NaCl (5M) e a mesma quantidade pré-aquecida a 65°C de CTAB/NaCl (8g de brometo de cetrimônio (Sigma Chemical ,Ca, EUA) e 4,1g de NaCl dissolvidos em água MiliQ estéril, e o volume foi completado para 100ml com água MiliQ estéril). A solução assim obtida foi agitada até a formação de um líquido de aspecto leitoso e incubada a 65°C por mais 10 minutos. Após esse procedimento, foram adicionados 750 µl da solução de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) (v/v) e essa mistura foi agitada por 10 segundos. O material foi centrifugado a 12000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante aquoso formado (600 µl) foi

cuidadosamente transferido para outro tubo de reação e o DNA genômico precipitado com 0,6 x volumes de isopropanol (PA) (-20°C) e a mistura foi mantida à temperatura de -20°C por 1 hora. Após este período, a solução foi centrifugada a 12000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado. O sedimento foi, por centrifugação, lavado 2 vezes com solução de etanol 70% à -20°C . Após esse procedimento, o DNA foi secado à temperatura ambiente e ressuspenso com movimentos cuidadosos e circulares em 50 ml de tampão TE pH 8,0. O ácido nucléico extraído foi conservado à temperatura de -20°C até o momento de ser usado para a técnica RAPD-PCR.

3.6.2.1. Determinação da concentração de DNA genômico

O DNA extraído das cepas de SARO isoladas de pacientes internados no HC-UNICAMP foi diluído 1:20 e 1:100 e a concentração do DNA genômico foi determinada através de leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda $\lambda=260$ e $\lambda=280$.

3.6.2.2. Amplificação do DNA genômico de cepas hospitalares de SARO por “Random Amplification of Polymorphic DNA” (RAPD) através da “Reação em Cadeia da Polimerase” (PCR).

O método RAPD para este estudo foi realizado através do PCR utilizando iniciador OPR 8: 5'-CCCGTTGCCT-3' (Operon Technologies), (quadro 1), que em um experimento-piloto mostrou uma boa habilidade para discriminar os isolados clínicos de SARO, em um volume final de 25 μl , como descrito por AUSUBEL et al., (1987). O iniciador OPR 8 foi diluído para 20 pmol e utilizou o Kit Ready-To-GoTM PCR Beads (amersham pharmacia biotech), de acordo com protocolo (quadro 2).

A reação foi realizada no termociclador que foi programado nas seguintes condições de amplificação: 94°C (5 minutos-denaturação inicial), 35 ciclos de: 94°C (1 minuto)-denaturação, 35°C (2 minutos) anelamento do iniciador, 72°C (1 minuto) extensão pela Taq polimerase e incorporação de nucleotídeos e 72°C (10 minutos-extensão final), conforme quadro 3. Após o término dos 35 ciclos, as reações de PCR - RAPD foram mantidas a 4°C e os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% e em tampão TBE 5x (0,1M Tris; 0,1M ácido bórico; 1mM EDTA (pH: 8,4) a 80V por 1 h 30.

Aproximadamente 25 µl do produto da reação de PCR-RAPD foram aplicados na canaleta juntamente com 5µl do tampão de ressuspensão 5X (sacarose 50%; azul de bromofenol 0,25%; xileno cianol FF 0,25%).

Posteriormente o gel foi corado em 0,5µg de brometo de etídio por ml de água destilada durante 30 minutos e lavado em água destilada. A visualização das bandas foi feita sob luz ultra-violeta (UV) e o gel fotografado utilizando-se filme Polaroid 667 31/4 x 4 ¼, como descrito por SAMBROOK et al. (1989).

O iniciador arbitrário utilizado dirigiu a síntese de vários segmentos de DNA simultaneamente em diversos pontos do genoma, resultando assim em várias bandas no gel. O tamanho dos fragmentos foi determinado com base no de peso molecular do marcador 1 Kb plus DNA-Ladder (Gibco-BRL) (Life Technologies).

3.6.2.3. Oligonucleotídeo iniciador utilizado nas amplificações do DNA genômico

O iniciador OPR-8 utilizado na técnica de RAPD-PCR foi selecionado e sintetizado a partir do fabricante (Operon Technologies, Inc).

O oligonucleotídeo foi ressuspenso em 1,0 ml de água ultrapurificada pelo sistema Mili-Q esterilizado e mantido a 4°C até completa dissolução (cerca de 1 hora). A suspensão foi distribuída em alíquotas de 100 µl e mantidas a -20°C.

3.6.2.4. Análise comparativa dos isolados hospitalares de SARO pela técnica de tipagem RAPD-PCR

Os padrões de bandas por RAPD foram analisados através do Software após as imagens auto-radiográficas terem sido capturadas por um sistema de imagens digital IS-1000 (Bio-capt MW, version 99, M&S Instruments Trading Inc).

Os padrões de RAPD foram comparados usando o programa para análise computacional Biogene (Vilbert-Loumart, França) e os dendrogramas foram construídos com base no coeficiente de Dice com um intervalo de confiança de 95%.

O método analisou os fragmentos polimerizados de cepas SARO, detectando o polimorfismo pela reação de amplificação, usando o iniciador aleatório OPR-8. Os isolados foram considerados similares quando apresentaram mais de 80% de similaridade entre as cepas de SARO pelo coeficiente de Dice.

Quadro 1. Iniciador utilizado na técnica de RAPD-PCR para a caracterização molecular dos isolados de SARO de pacientes hospitalizados (1995-2001).

Nome do Inicializador	Seqüência (5' ^ 3')	Concentração µg/ml	Tamanho pb	Técnica em que o iniciador foi utilizado
OPR 8	CCC GTT GCC T	19,0	10	RAPD

Quadro 2. Protocolo da reação de RAPD-PCR para a caracterização molecular dos isolados de SARO de pacientes hospitalizados.

Técnica	PCR- Beads	DNA 200ng/µl 50ng/µl	Inicializador (50µM) OPR-8	Inicializador 2 (50µM)	H ₂ O ^{qsp}
RAPD	01	2,5 µL	2,5µL	—	25,0 µL

(A) H₂O Destilada pelo Sistema Mili-Q esterilizada

Quadro 3. Ciclos de amplificação padronizados e utilizados na técnica molecular RAPD-PCR.

Técnica	Denaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final	Estoque
RAPD	94°C	94°C	35°C	72°C	72°C
	5 min	1 min	1 min	2 min	10 min
	35 ciclos	35 ciclos	35 ciclos		

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Surto intra-hospitalar por SARO

A distribuição das cepas hospitalares de SARO, segundo as especialidades médicas e a localização topográfica das infecções hospitalares: 37 isolados de ferida cirúrgica; 38 de secreção respiratórias baixas (secreção brônquica, lavado bronco-alveolar e escarro); 28 de cateter vascular central; 49 de hemoculturas; 14 de urina e 24 de outros diversos sítios de infecção. (Representada na tabela 1).

Tabela 1. Distribuição dos sítios de isolamento das 117 cepas de SARO isoladas de 94 pacientes no período de 1995-2001 e das 73 cepas de SARO isoladas de 58 pacientes no período de 1991-1993 no HC-UNICAMP-Campinas

Sítio de isolamento	Nº de isolados (%)	*Nº de isolados (%)
	1995-2001	1991-1993
Sangue	45 (38,5)	04 (5,4)
Ferida cirúrgica	14 (11,9)	23 (31,5)
Secreções-respiratórias-baixas (brônquica/lavado brônquico e escarro)	18 (15,9)	20 (27,4)
Cateter vascular central	15 (12,9)	13 (17,8)
Urina	14 (11,9)	-
Outros diversos sítios	11 (9,4)	13 (17,8)
TOTAL	117 (100%)	73 (100%)

*Dados referentes ao estudo de Moretti-Branchini (1998)

4.2. Padrão de suscetibilidade a antimicrobianos

A realização dos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos foi feita pelo método de difusão em disco de acordo com BAUER et al (1996), representados na tabela 2. Todas as cepas analisadas exibiram alto nível de resistência aos seguintes antibióticos: ampicilina, cefalotina, eritromicina, penicilina, tobramicina e oxacilina. A sensibilidade à vancomicina ocorreu em todos os isolados de SARO.

Os padrões de susceptibilidade para interpretação de halo de inibição das 190 cepas de SARO estudadas no período de 1991-2001 encontram-se no anexo 2.

Tabela 2. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das cepas de SARO isoladas de pacientes hospitalizados no período de 1991-2001 no HC-UNICAMP.

Antibióticos	Isolados sensíveis no período de 1995-2001	Isolados sensíveis no período 1991-1993
*Vancomicina	117	73
Pefloxacina	-	10
Ciprofloxacina	-	05
Netilmicina	56	23
Amicacina	02	02
Cloranfenicol	32	03
Clindamicina	08	02
Gentamicina	08	-
Tetraciclina	04	-
Tobramicina	05	-
Sulfametoxazol + Trimetropina	02	-

* Todas as cepas apresentaram resistência à oxacilina.

* todas as cepas apresentaram sensibilidade à vancomicina

4.3. Análise do DNA genômico por PFGE

A técnica de PFGE é uma variação da eletroforese convencional, onde a corrente elétrica varia alternadamente de direção e o uso de enzimas de restrição *SmaI* com sítios de reconhecimento permitem a digestão do cromossomo em fragmentos de diferentes pesos moleculares (SADER et al., 1994).

O estudo comparou o perfil genômico das 117 cepas estudadas no período de 1995 a 2001 com o perfil das 73 cepas estudadas por MORETTI-BRANCHINI et al. (1993) no período de 1991 a 1993.

O estudo do DNA genômico por PFGE permitiu a caracterização de acordo com TENOVER et al. (1995) de 03 diferentes grupos de perfis cromossômicos de SARO: o perfil da cepa endêmica, denominado de A, o grupo do perfil AM ou muito relacionado e o grupo do perfil AP ou possivelmente relacionado representado na tabela 3 e na figura 1.

A digestão com a enzima de restrição *SmaI* mostrou um padrão de DNA digerido contendo mais de 15 bandas com peso molecular variado. Isolados com padrão idêntico em tamanho e nº de bandas foram considerados como idênticos e foi denominado A ou cepa endêmica. Isolados com padrão de bandas que diferiam da cepa endêmica de 2 a 3 bandas foram considerados como do grupo AM ou perfil muito relacionado ao A e, isolados com padrão de bandas que diferiam de 4 a 6 fragmentos diferentes comparados com a cepa endêmica foram denominados de AP ou perfil possivelmente relacionado ao perfil A.

O padrão A presente em 80 isolados clínicos, foi o mais freqüentemente encontrado e apresentou 4 bandas bem definidas aproximadamente entre 436,5 Kb e 291,0 Kb. Próximo a 194,0 Kb forma-se um conjunto pouco definido de mais 4 bandas,

sendo que em eletroforeses repetidas as cepas apresentavam este conjunto de bandas ora juntas, ora separadas em grupos de duas. Ainda com peso semelhante ou menor de 97,0 Kb apresenta-se um aglomerado de bandas pouco definido. Entre as cepas hospitalares analisadas por PFGE, algumas representaram isolados sequenciais de um mesmo paciente, porém em datas diferentes e de espécimens diferentes.

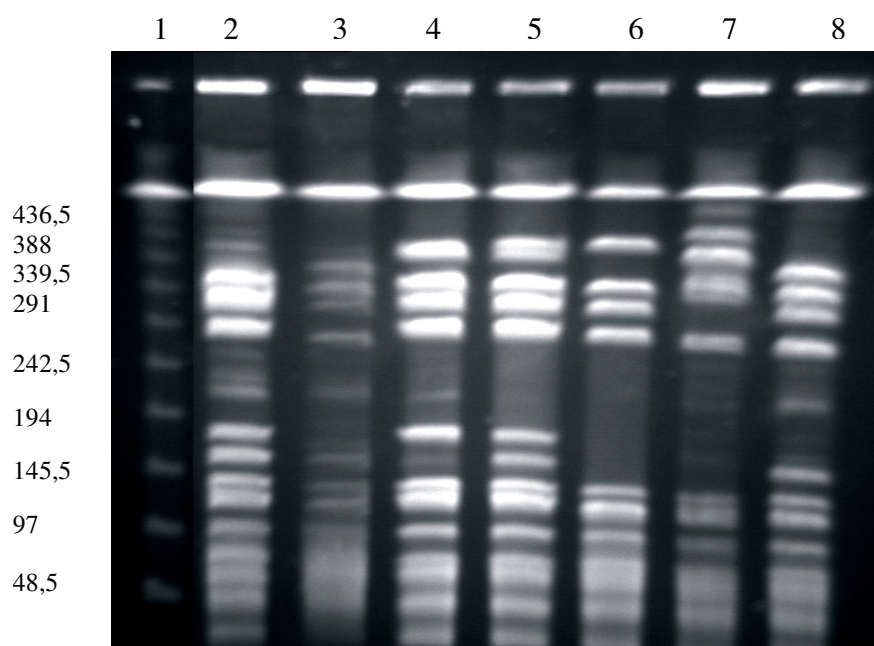
4.3.1. Estudo molecular de cepas hospitalares de SARO no período de 1995-2001

O estudo molecular do DNA genômico dos 117 isolados SARO, mostrou que 80 (68,4%) apresentaram o perfil A; 18 (15,4%) perfis do grupo AM 18 (15,4%) apresentaram perfis do grupo AP. O perfil A foi identificado neste estudo como a cepa epidêmica. Houve a ocorrência de uma cepa com perfil diferente do endêmico, representado pelo perfil B. O perfil A também predominou como cepa endêmica no estudo do período de 1991-1993. O resultado do período 1995-2001 está representado nas figuras 1 e 2. O coeficiente de similaridade encontra-se nas figuras 4 e 5.

Analizando o período de 1991-2001, o estudo detectou por PFGE o mesmo perfil genômico endêmico A em 135 (71%) das cepas de SARO durante os 10 anos de seguimento epidemiológico molecular dos isolados clínicos de SARO no HC-UNICAMP. Não houve uma diferença significativa em relação aos dois períodos estudados.

O perfil AM detectado em 21(17,8%) cepas e AP em 22 (19,5%) por PFGE durante o período estudado podem representar novos clones que se encontram na instituição.

Figura 1. Perfis de DNA genômico digerido com enzima de restrição *Sma*I por PFGE de cepas de SARO isoladas de pacientes hospitalizados no período de maio de 1995 a agosto de 2001.



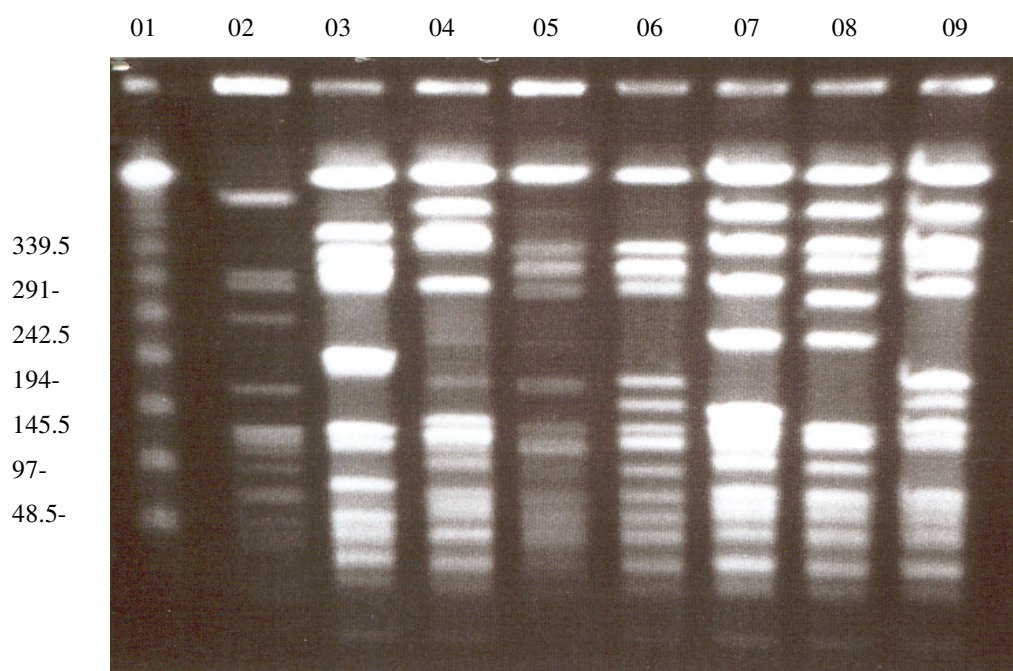
Canaleta 1: marcador de peso molecular (λ Ladder-Bio Rad).

Canaletas 2, 7 e 8: perfis SARO possivelmente relacionados (AP).

Canaletas 3, 4 e 5: perfis SARO muito relacionados (AM).

Canaleta 6: perfil A (cepa endêmica).

Figura 2. Perfis de DNA genômico muito relacionados, possivelmente relacionados ao perfil endêmico A e perfil B de cepas hospitalares de SARO por PFGE presentes no período de maio de 1995 a agosto de 2001.



Canaleta 1: marcador de peso molecular (λ Ladder-Bio Rad).

Canaleta 2: perfil B.

Canaletas: 4, 5 e 6 perfil muito relacionada (AM).

Canaletas: 3,7,8 e 9: perfil possivelmente relacionada (AP).

Tabela 3. Distribuição dos perfis de DNA genômico de cepas hospitalares de SARO no período de maio de 1995 a agosto de 2001, segundo o critério de interpretação de TENOVER et al. (1995) referente à figura 1.

Canaleta	Nº de fragmentos diferentes comparados com a cepa endêmica		Nº cepas	Perfil
02	04	possivelmente relacionada	18	AP
03	03	muito relacionada		AM
04	01	muito relacionada	18	AM
05	01	muito relacionada		AM
06		cepa endêmica	80	A
07	04	possivelmente relacionada		AP
08	01	possivelmente relacionada		AP

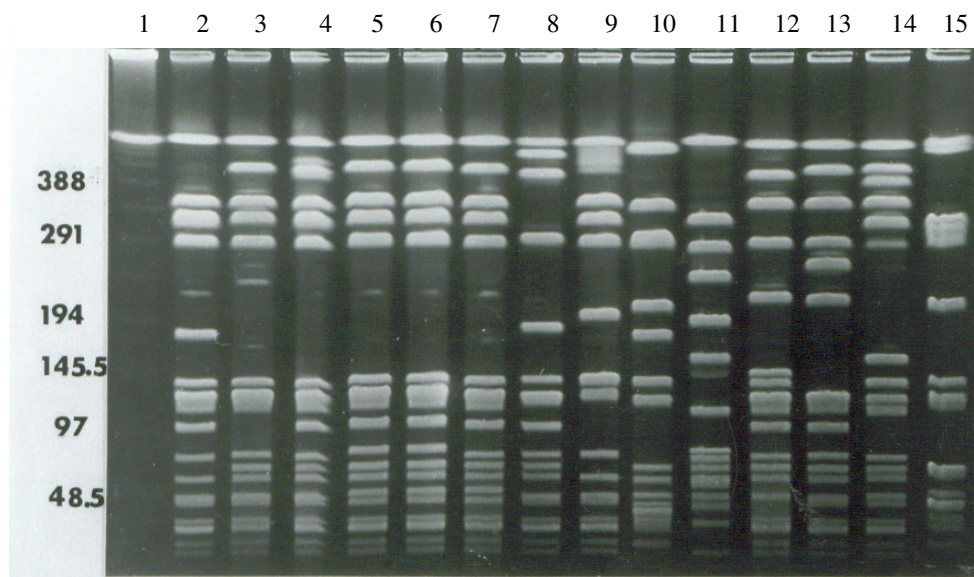
4.3.1.1. Estudo molecular de cepas hospitalares SARO do período de 1991-1993

O estudo molecular das 73 cepas de SARO após digestão com enzima de restrição *SmaI* mostrou cinco perfis de DNA genômico: A, B, C, D e E. O perfil A foi identificado, neste estudo, como a cepa endêmica e 55 cepas (75,3%) foram incluídas. A cepa endêmica está representada pelas canaletas 05, 06, 07 na figura 3. O perfil A teve duas categorias geneticamente relacionadas: o perfil muito relacionado AM representado por 3 cepas (4,1%) e 4 cepas (5,8%) o perfil AP.

Na tabela 4, é possível observar os perfis encontrados no período de 91-93 segundo critério de interpretação de TENOVER et al. (1995) e a figura 6 mostra o dendrograma o coeficiente de similaridade.

O dendrograma mostrando o coeficiente de similaridade entre os 10 anos de estudo molecular de cepas de SARO de pacientes com IH se encontra na figura 7. A distribuição dos perfis de SARO identificados por PFGE nos dois períodos se encontra na tabela 5.

Figura 3. Perfis de DNA genômico digerido com enzima de restrição *Sma*I seguido de PFGE das cepas de SARO de pacientes hospitalizados entre o período de abril de 1991 a fevereiro de 1993, responsáveis por surto no HC-UNICAMP.



Canaleta 1: Marcador de peso molecular (λ Ladder, Biorad).

Canaletas 2, 9, 12 e 13: perfis SARO possivelmente relacionados (AP).

Canaletas 3, 4 e 14: perfis SARO muito relacionados (AM) .

Canaletas 5, 6 e 7: perfil A (cepa endêmica).

Canaletas 8, 10, 11 e 15: respectivamente perfis E, D, C e B.

Tabela 4. Distribuição dos perfis de DNA genômico das cepas de SARO de pacientes hospitalizados no período de abril de 1991 a fevereiro de 1993 segundo o critério de interpretação de TENOVER et al. (1995) referente à figura 3.

Canaleta	Nº de fragmentos diferentes comparados com a cepa endêmica		Nºde Cepas	Perfil
02	3	Possível	1	AP
03	1	Muito relacionada	1	AM
04	2	Muito relacionada	1	AM
05	Cepa endêmica	-	55	A
06	Cepa endêmica	-	-	A
07	Cepa endêmica	-	-	A
08	7	Diferente	4	E
09	6	Possível	1	AP
10	7	Diferente	3	D
11	>7	Diferente	3	C
12	4	Possível	1	AP
13	6	Possível	1	AP
14	1	Muito relacionada	1	AM
15	>7	Diferente	1	B

* Referente ao estudo de Moretti-Branchini (1998)

Figura 4. Dendrograma construído com base no coeficiente de similaridade de Dice ilustrando a relação das cepas de SARO de pacientes hospitalizados no período de maio de 1995 a agosto de 2001 por PFGE referente à figura 1.

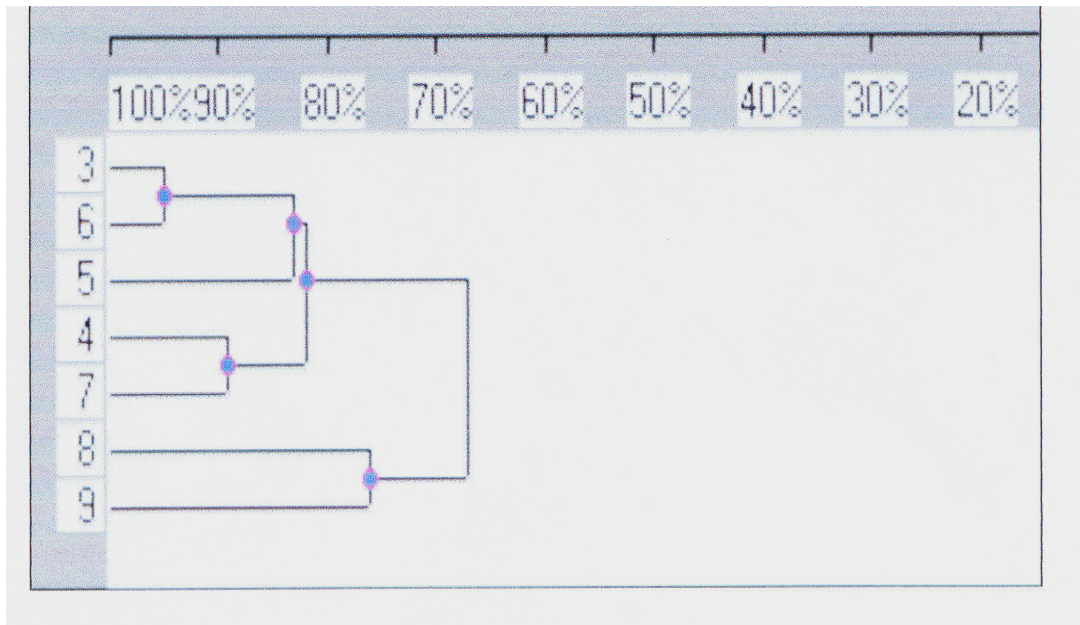


Figura 5. Dendrograma construído com base no coeficiente de similaridade de Dice ilustrando a relação das cepas de SARO de pacientes hospitalizados no período de maio de 1995 a agosto de 2001 por PFGE referente à figura 2.

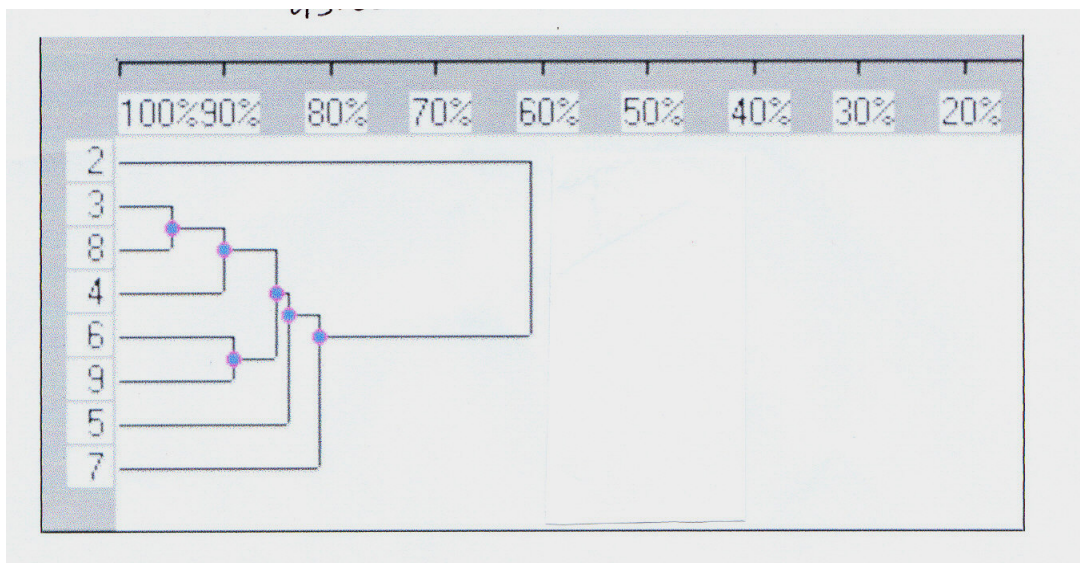


Figura 6. Dendrograma construído com base no coeficiente de similaridade de Dice ilustrando a relação das cepas de SARO de pacientes hospitalizados no período de abril de 1991 a fevereiro de 1993 por PFGE referente à figura 3.

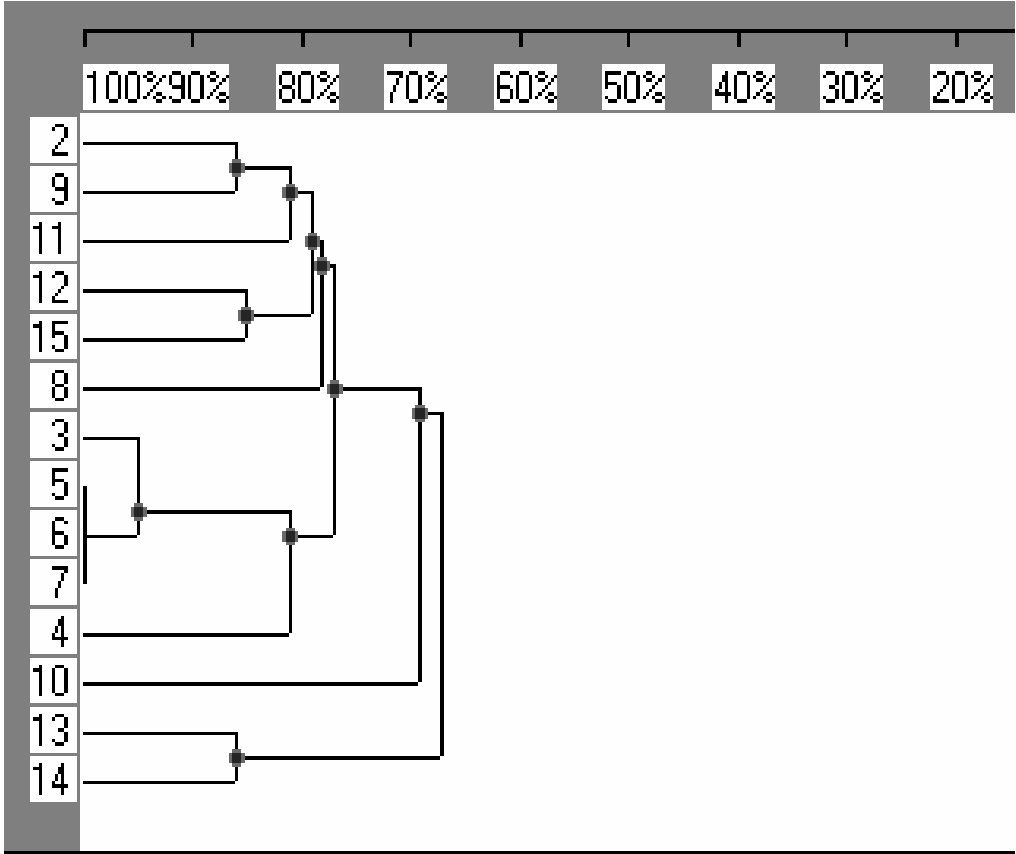


Figura 7. Dendrograma construído com base no coeficiente de similaridade de Dice ilustrando a relação das cepas SARO de pacientes hospitalizados no período de abril de 1991 a fevereiro de 1993 e maio de 1995 a agosto de 2001.

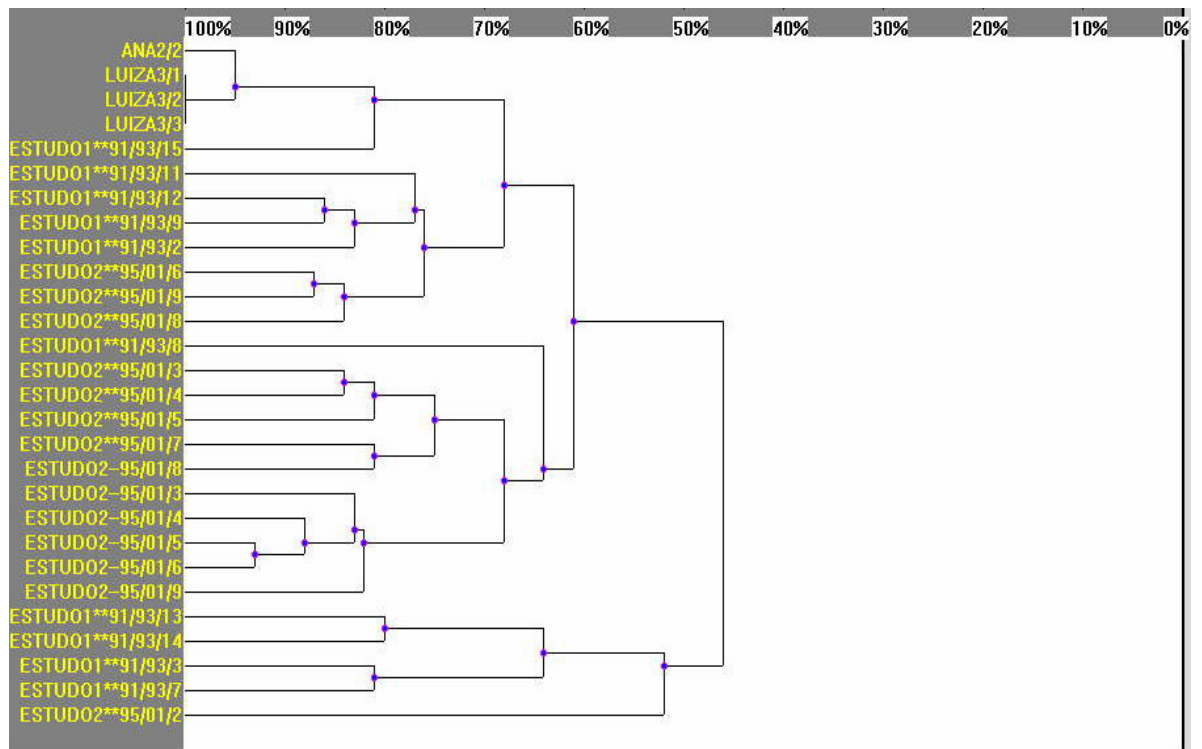


Tabela 5. Distribuição dos perfis identificados por PFGE dos isolados SARO em pacientes hospitalizados no período de abril de 1991 a fevereiro de 1993 e maio de 1995 a agosto de 2001 do HC-UNICAMP.

Perfil PFGE	nº cepas período 1995-2001(%)	nº cepas período 1991-1993(%)	Total de cepas 1991-2001 (%)	(valor de p)
A	80 (68,4)	55 (75,3)	135 (71,0)	0,30
AM	18 (15,4)	03 (4,1)	21 (11,0)	0,03
AP	18 (15,4)	04 (5,8)	22 (11,6)	0,03
B	01 (0,85)	01 (0,73)	02 (1,4)	
C	-	03	-	
D	-	03	-	
E	-	04	-	
Total de perfis diferentes	01	11	-	<0,05
Total de cepas estudadas	117 (100)	73 (100)	-	-

4.4. Análise do DNA genômico por RAPD-PCR

A tipagem do DNA genômico por RAPD-PCR dos 117 isolados clínicos de SARO do período de 1995 a 2001 mostrou 2 padrões diferentes de agrupamento de alto grau de similaridade. Após a amplificação do DNA com iniciador OPR 8: 5'-CCCGTTGCCT-3', os padrões foram denominados de a e b.

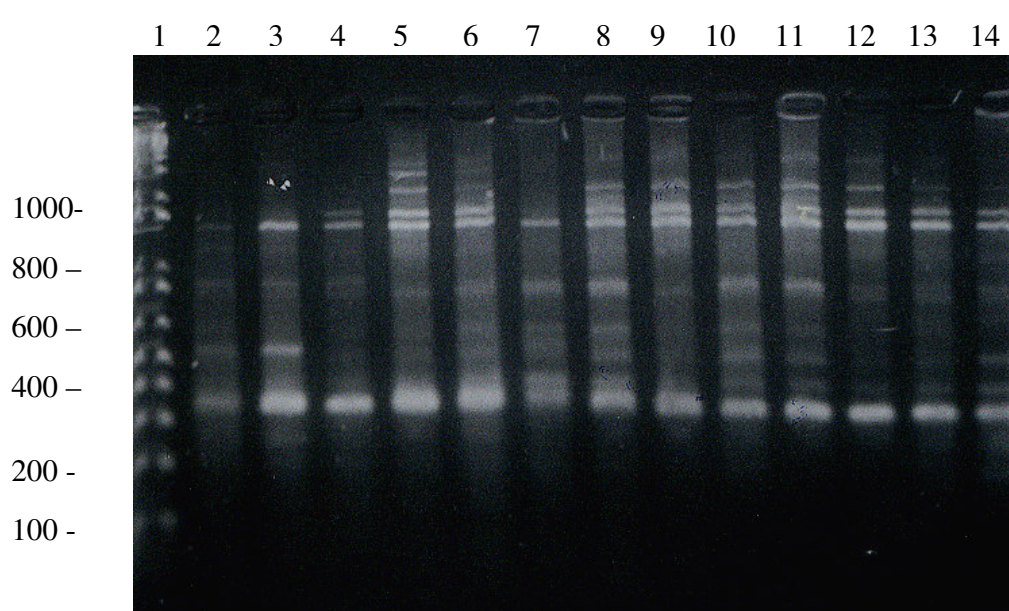
Foi designado padrão a quando as cepas apresentaram 08 a 10 fragmentos amplificados e o padrão b por apresentar de 05 a 07 fragmentos amplificados. Não houve relação entre os perfis obtidos por RAPD com qualquer dos perfis observados por PFGE do perfil endêmico, ou nos grupos de perfis AM e AP. No entanto, foram observadas variações pequenas em relação ao nº de bandas, alguns perfis apresentaram um número maior de fragmentos, porém, a maioria teve o mesmo peso molecular.

A figura 8 mostra o resultado dos fragmentos polimerizados ao acaso. Com o resultado obtido, foi construído um dendrograma de similaridade que permitiu o agrupamento das cepas em dois grupos apresentando um elevado grau de relacionamento genético, representado na figura 9. A distribuição dos perfis encontrados por RAPD-PCR no período de maio de 1995 a agosto de 2001 está ilustrada na tabela 06.

4.5. Análise comparativa dos métodos moleculares aplicados

A comparação quanto ao percentual de concordância entre os perfis identificados por PFGE e RAPD-PCR de DNA cromossômico de cepas SARO isoladas de pacientes hospitalizados no período de maio de 1995 a agosto de 2001 está representada na tabela 07.

Figura 8. Gel de agarose a 1,5% demonstrando o resultado dos fragmentos polimerizados ao acaso (RAPD-PCR) de DNA cromossômico das cepas de SARO isoladas de pacientes hospitalizados no período de maio de 1995 a agosto de 2001, utilizando o iniciador OPR 8.

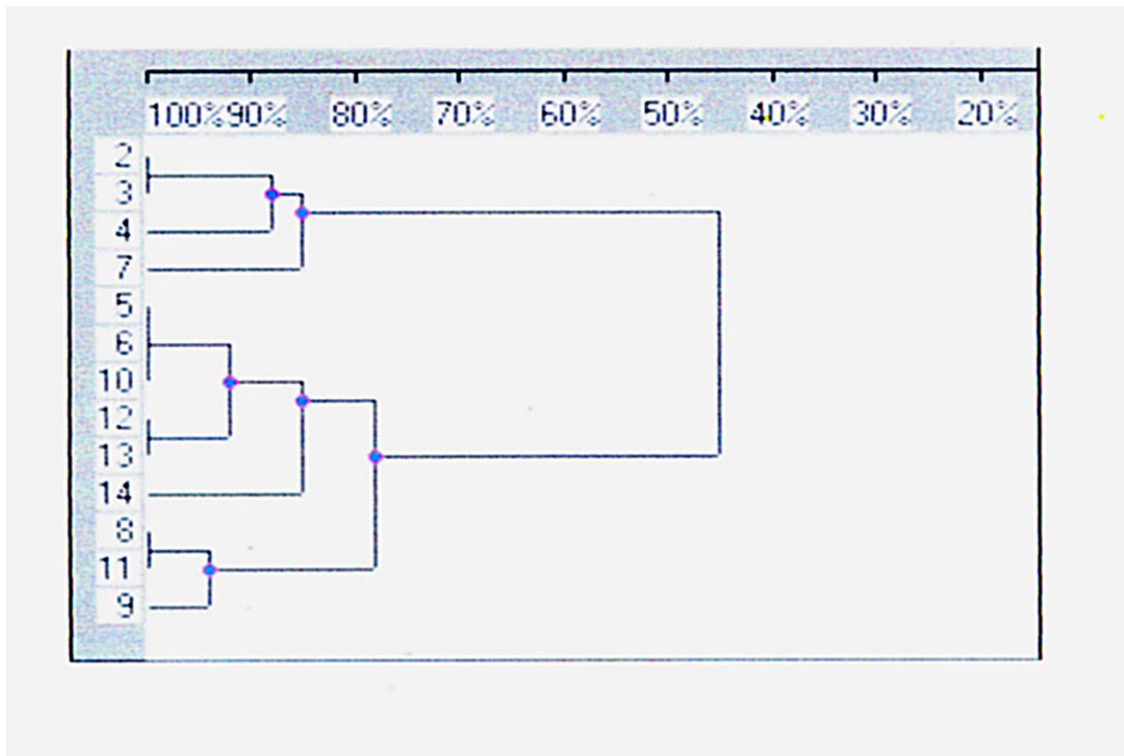


Canaleta 1: peso molecular em pares de base.

Canaleta 2, 3, 4, 7, 12 e 13: Perfil b.

Canaleta 5, 6, 8, 9, 10, 11 e 14: Perfil a.

Figura 9. Dendrograma construído com base no coeficiente de similaridade de Dice ilustrando a relação das cepas de SARO isoladas de pacientes hospitalizados no período de maio de 1995 a agosto de 2001, por RAPD-PCR.



	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14
L2	1.00												
L3	1.00	1.00											
L4	0.89	0.89	1.00										
L5	0.55	0.55	0.67	1.00									
L6	0.55	0.55	0.67	1.00	1.00								
L7	0.86	0.86	0.75	0.60	0.60	1.00							
L8	0.43	0.43	0.53	0.82	0.82	0.46	1.00						
L9	0.31	0.31	0.43	0.75	0.75	0.33	0.95	1.00					
L10	0.55	0.55	0.67	1.00	1.00	0.60	0.82	0.75	1.00				
L11	0.43	0.43	0.53	0.82	0.82	0.46	1.00	0.95	0.82	1.00			
L12	0.60	0.60	0.55	0.92	0.92	0.67	0.75	0.67	0.92	0.75	1.00		
L13	0.60	0.60	0.55	0.92	0.92	0.67	0.75	0.67	0.92	0.75	1.00	1.00	
L14	0.55	0.55	0.50	0.86	0.86	0.60	0.82	0.75	0.86	0.82	0.92	0.92	1.00

Tabela 6. Distribuição dos perfis identificados por PCR-RAPD de DNA cromossômico de cepas de SARO isoladas de pacientes com infecção hospitalar no período de maio de 1995 a agosto de 2001, utilizando o iniciador OPR8.

Perfil PCR-RAPD	Nº de isolados (%)
a	43 (35,5)
b	74 (74,5)
TOTAL	117 (100)

Tabela 7. Comparação dos perfis identificados por PFGE e PCR-RAPD de DNA cromossômico de cepas de SARO isoladas de pacientes hospitalizados no período de maio de 1995 a agosto de 2001.

Perfil PFGE	Perfil RAPD-PCR	Nº de Cepas PFGE	Nº de Cepas RAPD-PCR	(%) de concordância
A	a	80	39	48,8
	b		41	51,2
B	b	01	-	-
	a		01	100
AM	a	18	-	-
	b		18	100
AP	a	18	03	16,6
	b		15	83,3
TOTAL		117	117	

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Durante a última década, um grande número de novas técnicas de tipagem têm sido desenvolvidas para serem aplicadas em estudos epidemiológicos de uma grande variedade de microrganismos hospitalares. Os métodos de tipagem de patógenos, quando usados de modo racional e apropriado e em conjuntos com dados epidemiológicos têm facilitado o trabalho dos clínicos e dos epidemiologistas hospitalares.

Os estudos de tipagem das cepas coletadas durante períodos variáveis como semanas, meses ou anos, podem apresentar pequenas variações nos padrões de DNA genômico quando analisados pelas técnicas moleculares tais como: análise plasmidial, PFGE, PCR entre outras (MASLOW et al., 1995; VAN BELKUM et al., 1998; TAMBIC et al., 1999; AFIZAH et al., 2002).

A observação do aumento do número de casos de IH por SARO no HC-UNICAMP, levou a uma investigação mais detalhada da epidemiologia dos SARO nessa instituição, fazendo-se necessária à aplicação de métodos de tipagem molecular para definir a relação epidemiológica entre as cepas de SARO estudadas no período de 1991-2001.

As técnicas moleculares com o propósito de analisar o DNA genômico estão sendo utilizadas na diferenciação de cepas SARO (NAWAS e LANE, 1998; MCDOUGAL et al., 2003). Entretanto, a aplicação de métodos moleculares para SARO tem sido difícil, pois a maioria das cepas é derivada de poucos clones (TENONER et al., 1997; OLIVE e BEAN, 1999; HUANG et al., 2004). A alta incidência e a longa permanência das cepas de SARO no HC-UNICAMP, levou a investigação mais detalhada da epidemiologia desta bactéria utilizando métodos de tipagem molecular para estudar sua relação epidemiológica.

A técnica de PFGE tem sido considerada como confiável para a tipagem de SARO em diversos estudos na literatura nacional e internacional, sendo capaz de produzir padrões de fragmentos diferentes para cepas não relacionadas epidemiologicamente (MONTESINOS et al., 2002). A habilidade da técnica de PFGE em diferenciar cepas de SARO faz com que o método seja o escolhido na investigação de surtos e na transmissão de infecção nosocomial de SARO (ALFIZAH et al., 2002; STRUDÉN et al., 2003).

Estudos epidemiológicos necessitam de vários métodos moleculares, e a caracterização pela endonuclease restrição, *Sma*I, tem alto poder discriminatório na identificação de subtipos dentro de cepas isoladas em hospitais, para melhor delinear o controle da infecção de cepas de SARO dentro do hospital.

Por outro lado, para as técnicas que utilizam o método de PCR, embora técnicas mais fáceis e rápidas do que PFGE depara-se com o problema da falta de critérios estabelecidos na literatura para a interpretação comparativa entre as cepas bacterianas (YOUNG et al., 1994; POWER, 1996; TAMBIC et al., 1997; MONTESINOS et al., 2002). Deste modo, o PFGE é considerado a técnica padrão ouro para a tipagem dos SARO na investigação epidemiológica (ALFIZAH et al., 2002; MONTESINOS et al., 2002; AIRES et al., 2003; STRUDÉN et al., 2003).

Os trabalhos da literatura sobre métodos de tipagem com fins epidemiológicos têm dado preferência por mais de uma técnica. Porém a correlação entre diferentes métodos de tipagem tem demonstrado que a utilização de outros métodos mais recentes de tipagem molecular, como RAPD-PCR, ERIC-PCR, REP-PCR não tem aumentado a capacidade discriminatória da técnica PFGE (MONTESINOS et al., 2002; STRUDÉN et al., 2003).

No presente estudo, empregou-se o PFGE para a caracterização do seguimento molecular das cepas de SARO de pacientes hospitalizados no HC-UNICAMP, por um

período sequencial de 10 anos. Durante o período de 1995-2001, prevaleceu a mesma cepa endêmica encontrada no estudo comparativo do período de 1991-1993, perfil A, e foi representada por 68,4% dos 117 isolados.

O estudo de 1991-1993 mostrou a distribuição clonal desta cepa endêmica, perfil A (75,3%), disseminada nos diferentes setores do hospital. Durante este período ainda foi possível detectar cepas muito relacionadas, cepas possivelmente relacionadas e outros perfis diferentes do A, com base nos critérios de TENOVER et al. (1995). No entanto, houve aumento do número de cepas muito relacionadas e possivelmente relacionadas quando comparadas ao estudo no período de 1991-1993, e somente uma cepa não relacionada foi detectada no período de 1995-2001.

Com base nos estudos de TENOVER et al. (1995) e BLANC et al. (2001), sobre a relação genética das cepas, os nossos dados sugerem que os perfis AM e AP são parte do mesmo clone A que se disseminou pelo HC e persistiu durante os 10 anos que compreenderam este estudo. Os perfis considerados como não relacionados que foram encontrados no período 1991-1993, não mais foram detectados no período compreendido em 1995-2001, porém neste período, uma única cepa apresentou perfil não relacionado, reconhecido como perfil B, que também foi identificado entre cepas estudadas em 1991-1993.

O estudo mostrou a importância de técnicas de tipagem molecular em surtos hospitalares de cepas SARO, uma vez que o resultado revelou perfil molecular A nos dois períodos, em mais de 50 % das cepas e perfis muito e possivelmente relacionados nas demais cepas. O encontro de isolados SARO com perfil idêntico ou semelhante durante um surto sugere fortemente transmissão da cepa endêmica entre pacientes e indica a necessidade enérgica de implementação de medidas de controle (SADER et al., 1995).

O emprego de uma outra técnica de tipagem como o RAPD-PCR buscou uma

ajuda para o estudo por PFGE. No entanto, quando foi analisado o resultado da tipagem, por RAPD-PCR, foram identificados dois diferentes padrões de agrupamento; o agrupamento a que foi representado por 43 (36,7%) cepas com o número de bandas variando de 8 a 10 enquanto e o agrupamento b foi representado por 74 (53,3%) cepas e o número de fragmentos variou de 5 a 7. O coeficiente de similaridade entre o grupo a e b, obtido através desta técnica foi de 86%, também sugerindo a distribuição clonal de uma mesma cepa hospitalar.

Os resultados encontrados neste estudo sugerem estar claro que o PFGE apresentou melhor poder discriminatório.

Sabe-se que, esta mesma cepa endêmica A, analisada por PFGE encontrada em nosso hospital, foi identificada em outros estudos em diversos hospitais brasileiros, configurando sua distribuição geográfica no território nacional (TEIXEIRA, 1995; SADER et al., 1994). Pode tratar-se de uma possível disseminação entre os hospitais ou estar relacionado ao limitado número de clones originários de SARO, fazendo com que cepas com mesmo perfil genômico de PFGE sejam encontradas em diversos hospitais.

SADER et al. (1994) quando estudaram 30 amostras de SARO e observaram a disseminação de um perfil SP em 8 de 9 hospitais da cidade de São Paulo, que se trata do mesmo perfil endêmico A em nosso hospital, confirmado por estudos posteriores do mesmo autor (informação pessoal do autor). TEIXEIRA (1995) também descreveram a disseminação de uma mesma cepa SARO em diversos hospitais no Brasil. PADOVEZE (1998) no seu estudo da epidemiologia molecular dos SARO em pacientes com SIDA, no HC-UNICAMP, descreveu a predominância de um único padrão A detectado por PFGE, sugerindo maciça disseminação intra-hospitalar deste agente, com o mesmo perfil caracterizado como a cepa endêmica do nosso estudo.

Em nosso estudo não foi possível determinar por que o clone endêmico A e os clones geneticamente relacionados AM e AP estiveram presentes por 10 anos no mesmo

hospital universitário. Isolados possivelmente relacionados têm sido relatados entre isolados coletados em intervalos de tempo longo (>6 meses) ou coletados de um grande número de pacientes envolvidos em surtos prolongados. Mas a presença maciça de um mesmo perfil genômico em nosso hospital sugere a aquisição, a permanência e a transmissão nosocomial da cepa endêmica.

Considerando-se que das 190 cepas de SARO deste estudo 21 foram representadas pelo perfil AM, e 22 pelo perfil AP, conclui-se que as cepas AM e AP são derivadas do clone A, restando apenas 12 cepas (6,3%), não relacionadas. Este resultado sugere que os isolados de SARO com perfil A do HC-UNICAMP estão presentes como cepas endêmicas desde o início deste estudo, e os outros perfis AM e AP encontrados podem estar se comportando como novos clones disseminando em nosso hospital. As cepas de perfil A já deviam estar no hospital há anos antes e por longa permanência e adaptabilidade sofrendo eventos genéticos tais como deleção e inserção de DNA cromossômico e originando aos clones AM e AP.

O estudo de tipagem molecular referente aos isolados de SARO do período de 1995 a 2001 mostrou um aumento de perfis AM e AP, sugerindo que há também uma boa adaptabilidade das cepas em nosso hospital.

Apesar da presença de clones AM e AP durante todo o período de estudo com um aumento durante o período 1995-2001 quando comparado ao período de 1991-1993, o perfil A esteve em 68,4% das cepas do período 1995-2001, e em 75,3% das cepas do período de 1991-1993, sugerindo também sua adaptação ao ambiente hospitalar como os clones de cepas relacionadas.

Perfis possivelmente relacionados são encontrados geralmente em coleções de cepas quando estudadas em longos períodos de tempo ou mesmo em grande número de pacientes que estiveram envolvidos em epidemias ou surtos muito prolongados. Deste modo, os perfis possivelmente relacionados podem se originar como novos clones que

se encontram disseminados em nosso hospital (SADER et al., 1994).

A redução de cepas relacionadas com cepas não relacionadas foi observada quando se aplicou o teste Qui-quadrado MANTEL-HAENSZEL e somente 11 cepas apresentaram padrões diferentes nos dois períodos com limite de significância de valor ($p < 0,05$) interpretado como um resultado significativo.

O mecanismo de transmissão das cepas de SARO intra-hospitalar não foi devidamente esclarecido neste estudo. No entanto, um fator que pode estar relacionado é o fato do HC-UNICAMP ser um hospital universitário, com alta rotatividade do pessoal da área da saúde, onde um maior número de pessoas circulam e entram em contato com pacientes como: alunos, residentes e pós-graduandos, contribuindo para o aumento da disseminação de uma cepa endêmica e na manutenção do surto (MORETTI-BRANCHINI, 1998). Estes fenômenos enfatizam a importância do conhecimento da situação epidemiológica, da prevenção e do controle das infecções por SARO, pois conforme já foi observado por vários autores, a resistência à oxacilina vem sempre acompanhada da resistência por diversos outros antibióticos (LEE et al., 1996; JORGENSEN et al., 1996).

Quando analisou o período de 1995 a 2001 pela técnica de PFGE foi possível verificar que apresentou melhores resultados discriminatórios entre os isolados quando comparada ao RAPD-PCR, como também um melhor entendimento da epidemiologia molecular destas cepas hospitalares.

Estudos com diferentes bactérias comparando o poder discriminatório de RAPD com outras técnicas, chegaram a conclusões diferentes (TAMBIC et al., 1997; OLMOS et al., 1998; FUNG et al., 2001). SAULNIER et al. (1993) reportaram em seus estudos que a análise da tipagem molecular por RAPD de cepas SARO foi menos discriminatória que por PFGE, mas HOJO et al. (1995), mostraram em seus estudos que o resultado da tipagem por RAPD correlacionaram bem com o resultado por PFGE.

Outros estudos utilizando um número maior de diferentes iniciadores reportaram sucesso quando utilizado ensaios RAPD-PCR para distinguir diversas cepas de bactérias incluindo SARO, apresentando uma diversidade maior entre as cepas estudadas (SAULNIER et al., 1993; OLIVE e BEAN, 1999; FUNG et al., 2001),

Em nosso estudo, a técnica de PFGE apresentou resultados excelentes em poder discriminatório e a literatura mostra que é altamente confiável nas investigações de entidade genômica entre cepas SARO envolvidas em surtos hospitalares, embora exija equipamentos mais sofisticados e caros (MCDOUGAL et al., 2003).

O RAPD-PCR é mais rápido, menos oneroso, e interpreta minuciosamente uma região correspondente a 1% de todo material genético. Porém, seu poder discriminatório tem sido considerado na literatura inferior ao PFGE (TAMBIC et al., 1999; DEPLANO et al., 2000; BLANC et al., 2001; MONTESINOS et al., 2002). O RAPD-PCR por ser uma técnica de fácil execução e rápida, pode ser utilizado como método complementar de outra técnica, inclusive para o PFGE, nas investigações de surto em nosso país.

A versatilidade do RAPD é responsável por um amplo registro de sua aplicação na literatura, que inclui a tipagem de grande parte das bactérias de maior interesse na clínica médica. Entretanto, estudo multicêntrico coordenado por VAN BELKUM (1995) demonstrou variabilidade dos resultados entre diferentes laboratórios na tipagem de isolados *S. aureus*.

Quando comparando as duas técnicas, o grande número de estudos na literatura que utiliza o RAPD-PCR como método de tipagem molecular refere-se a variabilidade ou a não padronização de iniciadores aleatórios nestes estudos. Já no PFGE, tanto a técnica como a enzima de restrição são padronizadas nos diferentes estudos. Deste modo há dificuldade de se estudar comparativamente os nossos dados com os dados da literatura.

Entretanto não foi possível elucidar porque somente a cepa endêmica e seus clones permaneceram por todo esse tempo no hospital, mas a tipagem epidemiológica de SARO pelos dois métodos utilizados, foi particularmente útil mostrando que a maioria das cepas foram derivadas de clones relacionados.

A análise dos padrões identificou o perfil endêmico A no estudo de 1991-2001 por PFGE e mostrou um coeficiente de similaridade de 96% entre os perfis estudados e foi considerado ser o mesmo perfil A.

A análise de similaridade entre os perfis encontrados por RAPD-PCR, onde foi observado um coeficiente de similaridade de 86% entre os isolados, permitiu o agrupamento das cepas em dois grupos apresentando um elevado grau de relacionamento genético entre todas as cepas.

Vários estudos mostram a disseminação clonal de cepas SARO inter hospitalar e relatam também que uma vez cepa endêmica introduzida no hospital, é difícil ser erradicada resultando no aumento da incidência de infecções nosocomiais por SARO (BOYCE, 1996; SALMENLINA et al., 2001; WANG et al., 2002; SAMY et al., 2003; MCDOUGAL et al., 2003; HUANG et al., 2004).

É importante a definição do comportamento epidemiológico dos microrganismos de transmissão hospitalar no que se refere à disseminação de um mesmo clone, sendo que essa informação pode direcionar medidas de controle da disseminação destes microrganismos nas diferentes unidades de um hospital.

Nosso estudo demonstrou a contribuição da aplicação dos métodos de tipagem molecular na epidemiologia hospitalar das cepas SARO no período de 10 anos, embora não tenha sido possível esclarecer porque somente a cepa endêmica A e seus clones permaneceram no hospital.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Os métodos de tipagem molecular, análise do DNA genômico por PFGE e RAPD-PCR, aplicados neste estudo, permitiram demonstrar a presença de uma cepa endêmica distribuída nas diversas áreas do HC-UNICAMP.

O perfil composto por PFGE no período de 1991-1993 e 1995-2001, foi predominante nos isolados de SARO e sugeriu a disseminação intra-hospitalar desta bactéria.

A análise do polimorfismo do DNA genômico por PFGE mostrou ter capacidade superior de discriminação entre as cepas SARO quando comparado ao método de RAPD-PCR. O PFGE identificou um maior número de perfis de polimorfismo genômico.

A presença de poucos perfis genômicos sugere que estes clones de SARO estão presentes há um longo período de tempo no HC-UNICAMP e tem mostrado uma baixa diversidade clonal.

Uma vez que o mesmo perfil genômico endêmico foi encontrado durante os 10 anos de seguimento da epidemiologia molecular dos SARO no HC-UNICAMP pode-se concluir que esse clone tem uma adaptabilidade às condições presentes neste hospital.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES de SOUZA, M.; LENCASTRE, H.; SANTO, S. I.; KIKUCHI, K.; TOTSUDA, K.; TOMASZ, A. - Similarity of antibiotic resistance patterns and molecular typing properties of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates widely spread in hospitals in New York City and hospital in Tokyo, Jpn. *Microb. Drug Resist*, 6:253-258, 2000.

AIRES DE SOUSA, M.; CRISOSTOMO, M.I.; SANTOS SANCHES, I.; WU, J.S.; FUZHONG, J.; TOMASZ, A. et al. - Frequent Recovery of a Single Clonal Type of Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* from Patients in Two Hospitals in Taiwan and China. *Journal of Clinical Microbiology*, 41:159-163, 2003.

ALFIZAH, H.; NORAZAH, A.; NORDIAH, A.J.; LIM, V.K. DNA fingerprinting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in a teaching hospital in Malaysia. *Med J Malaysia*, 57(3):319-328, 2002.

ARBEIT, R. D. - Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In Murray, P. R.; Baron, E. J.; Pfaller, M. A.; Tenover, F. C. and Tenover, R. H., eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 6^a ed., Washington, DC: American Society for Microbiology, 23:190-208, 1999.

ARCHER, G. L.; NIEMEYER, D. M. - Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in *Staphylococci*. *Trends Microbiol*, 2: 343-347, 1998.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; STRUHL, K.; MOORE, D. D.; SMITH, J. A. & SEIDMAN, J. G. - *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates, Brooklyn, N.Y., 1987.

AYLIFFE, G.A.Y.; BUCKLES, A.; CASEWEL, M.W. - Revised guidelines for the control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in hospitals. *J Hosp Infect*, 39: 253-290, 1998.

BARBER, M. - Methicillin-resistant *Staphylococci*. *J Clin Pathol*, 14: 385-393, 1961.

BARG, N.L. - Environmental Contamination with *Staphylococcus aureus* and Outbreaks: the Cause or the Effect? *Infect Control Hosp Epidemiol*, 14(7): 367-368, 1993.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. - Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am Clin Pathol*, 45: 493-496, 1996.

BINGEN, E. - Applications of molecular methods to epidemiologic investigations of nosocomial infections in a pediatric hospital. *Infect. Control Hosp Epidemiol*, 15: 488-493, 1994.

BLACK, J. G. - *Microbiologia: Fundamentos e Perspectivas*. 4ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.370-419.

BLANC, D. S.; FRANCIOLI, P.; COUSTUMIER, A. LE.; GAZAGNE, L.; LECAILLON, E.; GUEUDET, P. et al. - Reemergence of gentamicin-susceptible strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in France: a phylogenetic approach. *J Clin Microbiol*, 95: 2287-2290, 2001a.

BLANC, D. S.; STRUELENS, M. J.; DEPLANO, A. HAUSER, P. M.; PETIGNAT, C.; FRANCIOLI, P. - Epidemiological Validation of Pulsed Field Gel Electrophoresis Patterns for Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, 39: 3442-3445, 2001b.

BOYCE, J.M.; JACKSON, M.M.; PUGLIESE, G.; BATT, M.D.; FLEMING, D.; GARNERNER.J.S. et al. - Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a Briefing for Acute Care Hospitals and Nursing Facilities. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 15(2): 105-115, 1994.

BOYCE, J.M. Treatment and Control of Colonization in the Prevention of Nosocomial Infections. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 17(4): 256-261, 1996.

BOYD, R.F. - *The Gram-positive Cocci. Basic Med Microbiol*, 5^a ed. Boston, Little, Brow and Company, cap. 17. p. 246-262. 1995.

BRACHMAN, P. S. - Epidemiology of Nosocomial Infections. In: Bennet, J. V.; Brachman, P. S. Hospital Infections. *Lippincot-Raven. Philadelphia*, 1998. p. 3-17.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. - *Terminologia Básica em Saúde*. 2^a. ed. Brasilia, 1985.

CENTERS for DISEASE CONTROL and PREVENTION (CDC). - Surveillance summaries. *Mortality and morbidity weekly report- MMWR*, 44(SS-1), 1995.

CENTERS for DISEASE CONTROL and PREVENTION (CDC). - Interim Guidelines for Prevention and Control of *Staphylococcal* Infection Associated with reduced Susceptibility to vancomycin. *Mortality and morbidity weekly report -MMWR*, 46(27): 626-635, 1997.

CHAMBERS, H.F., SACHDEVA, M.J., HACKBARTH, C.J. - Kinetica of penicillin binding to penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus*. *Biochem- J*. 301: 139-44, 1994.

CHAMBERS, H.F. - Methicillin Resistance *Staphylococci*: Molecular and Biochemical Basis and clinical Implications. *Clin Microbiol Rev*, 10(4): 781-791, 1997.

CHANG, N.; CHUI, L. A. - Standardized protocol for the rapid preparation of bacterial DNA for pulsed field gel electrophoresis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 31: 275-279, 1998.

CONTERNO, L.O.; WEY, S.B.; CASTELO, A. - Risk factors, for mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 19: 32-37, 1998.

COOKSON, B.D. - Inter-Centre Comparison of Pulsed Field Gel Electrophoresis for the Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol*, 44: 179-184, 1996.

CORBELLA, X.; DOMÍNGUEZ, M.A.; PUJOL, M.; AYATS, J.; SENDRA, M.; PALLARES, R. et al.- *Staphylococcus aureus* nasal carriage as a marker for subsequent staphylococcal infections in intensive care unit patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 16: 351-357, 1997.

CORSO, A.; SANTOS, S. I.; AIRES DE SOUZA, M.; ROSSI, A.; LENCASTRE, H. - Spread of a Methicillin-Resistant and multiresistant epidemic clone of *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol.*, 4: 179-184, 1998.

COSSERON-ZERBIB, M.; ROQUE AFONSO, A.M.; NAAS, T.; DURAND, P.; MEYER, L.; COSTA, Y. et al. - A control program for MRSA (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*) containment in a pediatric intensive care unit: evaluation and impact on infections caused by others microorganisms. *J. Hosp. Infect.*, 40(3): 225-235, 1998.

DA SILVA-COIMBRA, M. V.; TEIXEIRA, L. M.; RAMOS, R.L.; PREDARI, S. C.; CASTELLO, L.; FAMIGLIETTI, A. et al. - Spread of the Brazilian epidemic clone of a multiresistant MRSA in two cities in Argentina. *J. Med. Microbiol.* 49:187-192, 2000.

DARINI, A.L. - A genetic study of a *Staphylococcus aureus* plasmid involving cure and tranference. *Rev. Paul. Med.*, 114:1068-1072, 1996.

DEPLANO, A.; WITTE, W.; VAN LEEUWEN, W. J.; BRUN, Y.; STRUELENS, M. J. - Clonal dissemination of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Belgium and neighboring countries. *Clin Microbiol Infect*, 6:239-245, 2000.

DURMAZ, B.; DURMAZ, R.; SAHIN, K. - Methicillin-resistance among Turkish isolates the *Staphylococcus aureus* strains from nosocomial and community infections and their resistance patterns using various antimicrobial agents. *J Hosp Infect*, 37: 325-329, 1997.

EDMOND, M. B.; WALLACE, S. E.; MCCLISH, D. K.; PFALLER, M. A.; JONES, R. N.; WENZEL, R. P. - Nosocomial bloodstream infections in United States Hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis*, 29: 239-244, 1999.

EISENSTEIN, B. I. - New molecular techniques for microbial epidemiology and the diagnosis of infectious diseases. *J Infect Dis*, 161: 595-602, 1990 a.

EISENSTEIN, B. I. - The polymerase chain reaction: a new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *N Engl J Med*, 322: 178-183, 1990 b.

ENRIGHT, M. C.; ROBINSON, D. A.; RANDLE, D. A.; FEIL, E. J.; GRUNDMANN, H.; SPRATT, G. B. - The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) *PNAS*, 99(11):7687 -7692, 2002.

FACKLAM, R; SAHM, D.A.; TEIXEIRA, L.M. - *Enterococcus*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFLALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. – *Manual of Clinical Microbiology*. 7 th ed. Washington, American Society for Microbiology, 1999. p. 297-305.

FANG, F. C.; MCCLELLAND, M.; GUINEY, D. G. - Value of molecular epidemiologic analysis a nosocomial Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* outbreak. *JAMA*, 270: 1323-1328, 1993.

FEY, P.D.; SAÏD-SALIM, B.; RUPP, M.E.; HINRICHS, S. H.; BOXRUD, D. J.; DAVIS, C.C et al. - Comparative Molecular Analysis of Community- or Hospital-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47 (1):196-203, 2003.

FISHBAN, J.T.; LEE, J.C.; NGUYEN, H.D.; MIKITA, J.A.; MIKITA, C.P.; UYEHARA, C.F. et al. - Nosocomial transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a blinded study to establish base line acquisition rates. *Infect Control Hosp Epidemiol.*, 24 (6):415-421, 2003.

FUJINO, T.; SEKIGUCHI, J. I.; KAWANA, A.; KONOSAKI, H.; NISHIMURA, H.; SARUTA, K. et al. - Molecular epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a Tokyo in 2002. *J Infect Dis*, 55:210-213, 2003.

FUNG, C. P.; HO, M.W.; WANG, F.D.; TSAI, K.; LIU, C.E.; LIU, C.Y. et al. - Investigation of outbreak caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a cardiovascular surgery unit by ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA and pulsed field gel electrophoresis. *APMIS*, 109:474-480, 2001.

GOERING, R. V.; DUESING, T.D. – Rapid field inversion gel electrophoresis in combination with an rRNA gene probe in the epidemiological evaluation of *staphylococci*. *J Clin Microbial*, 28: 426-429, 1990.

GOERING, R. V. - Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of chromosomal restriction fragment patterns by pulsed-field gel electrophoresis. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 14:595-600, 1998.

GOETZ, A. M.; MURDER, R. R. - The Problem of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: a Critical Appraisal of the Efficacy of Infection Control Procedures with a Suggested Approach for Infection Control Programs. *Am J Infect Control*, 22(6):80-84, 1992.

GORAK, E. J.; YAMADA, S. M.; BROWN, J. D. - Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitalized adults and children without known risk factors. *Clin Infect Dis*, 29:797-800, 1999.

GRANZOW, J.W.; SMITH, J.W.; NICHOLS, R. L.; WATERMAN, R. S.; MUZIK, A. C. - Evaluation of the protective value of hospital gowns against blood strike-through and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* penetration. *Amer Journ of Infect Cont*, 26(2):85-93, 1998.

GRUNDMANN, H.; HORI, S.; WINTER, B.; TAMI, A.; AUSTIN, D. J. - Risk factors for the transmission of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in adult intensive care unit: Fitting a model to the data. *J Infect Dis*, 185(4):481-488, 2002.

HARTSTEIN, A. L.; CHETCHOTISAKD, P.; PHELPS, C. L.; Le MONTE, A.M. - Typing of sequential bacterial isolates by pulsed-field gel electrophoresis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 22:309-314, 1999.

HENRY, J. B. - *Diagnósticos Clínicos & Tratamento por Métodos Laboratoriais*. 18ª ed., São Paulo: Manole, 1995, p. 1513-1524.

HERWALDT, L. A.; PERL, T. M.; POTTINGER, J. M. - Basics of surveillance: an overview. *Infect Control Hosp Epidemiol*, (18):513-527, 1999.

HOJO, S.; FUJICA, J.; NEGAYANA, K.; OHNISHI, T.; XU, G.; YAMAJI, Y. et al. - DNA fingerprinting by arbitrary primed polymerase chain reaction (AP-PCR) for

methicillin-resistant in *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol*, 69:506-510, 1995.

HOWARD, W.; CASEWELL, M.W. - Epidemiology and control of the modern methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect*, 7:1-11, 1996.

HUANG, A. H.; YAN, J. J.; WU, J. J. - Rapid dissemination of *Staphylococcus aureus* with classic oxacillin resistance phenotype at a new university hospital. *J Hosp Infect*, 44(4):309-315, 2000.

HUANG, Y.C.; SU, L.H.; WU, T.L.; LIU, C.E.; YOUNG, T.G.; CHEN, P.Y. et al. - Molecular epidemiology of clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.*, 42(1): 307-310, 2004.

JARVIS, W.R., MARTONE, W.J. - Predominant Pathogens in Hospital Infections. *J Antimicrobial Chem*, 29(A):19-24, 1992.

JARVIS, W. R. - Usefulness of molecular epidemiology for outbreak investigations. *Infect. Control Hosp Epidemiol*, 15:500-503, 1998.

JONH, J.F.Jr.; RIBNER, B.S. - Antibiotic resistance in long-term care facilities. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 12:245-250, 1991.

JORGENSEN, M.; GIVNEY, R.; PEGLER, M.; VICHERY, A.; FUNNELL, G. - Typing Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus*: Conflicting Epidemiological Data Produced by Genotypic and Phenotypic Methods Clarified by Phylogenetic Analysis. *J Clin Microbiol*, 34 (2):398-403, 1996.

KLOOS, W.; SAMBRE, Jr. D. - *Staphylococcus*. In: BALOWS, A.; HANSLER, JR. W.J.; HERMANN, K.L. Manual of clinical microbiology. 5^a ed. Washington, D.C., American Society for Microbiology, 28: 222-227, 1991.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR, W. C. - *Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido*. 5. ed. Guanabara Koogan : Rio de Janeiro, 2002.

KUBOYAMA, R.H.; OLIVEIRA, H.B.; MORETTI-BRANCHINI, M.L. – Molecular epidemiology of systemic infection caused by *Enterobacter cloacal* in a high risk neonatal with care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 24:490-494, 2003.

LAFORCE, F. M. - Infection Control Hospital Epidemiology. *Infect Control*, 18: 831-849, 1997.

LANDMAN, D.; BRATU, S.; FLORES, C.; SATHE, S.; MACCARIO, E.; RAVISHANKAR, J. et al. - Molecular Epidemiology of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Brooklyn, New York. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 22(1):58-61, 2003.

LEE, Y. L.; GUPTA, G.; CESARIO, T.; LEE, R.; NOTHVOGEL, S.; NASSAR, J.; FLIONIS, L. et al. - Colonization by *Staphylococcus aureus* resistant to Methicillin and Ciprofloxacin during 20 month's surveillance in a private skilled nursing facility. *Infect. Control Hosp Epidemiol*, 17(10):649-653, 1996.

LOUREIRO, B. A.; DE MORAES, B. A.; QUADRA, M.R.R.; PINHEIRO, G. S.; SUFFYS, P. N.; ASENSI, M.D. - Molecular Epidemiology of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from newborns in a Hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 95(6):777-782, 2000.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest*, 111: 1265-1273, 2003.

McDOUGAL, L. K.; STEWARD, C. D.; KILLGORE, G. E.; CHAITRAM, J. M.; MCALLISTER, S. K.; TENOVER, F. C. - Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of

Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the United States: Establishing a National Database. *J Clin Microbiol*, 41:5113-5120; 2003.

MASLOW, J. N.; MULLIGAN, M. E., ARBEIT, R. D. - Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Infect Dis*, 17:153-164, 1993.

MASLOW, J. N.; BRECHER, S.; GUNN, J.; DURBIN, A.; ARBEIT, R. D. - Variation and persistence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains among individual patients over extended periods of time. *Eur. J Clin Microbiol Infect, Dis.*, 14:282-290, 1995.

MASLOW, J.; MULLIGAN, M. E. - Epidemiologic typing systems. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 17:595-604, 1996.

MELTER, O.; AIRES DE SOUSA, M.; URBASKOVA, P.; JAKUBU, V.; ZEMLICKOVA, H.; DE LENCASTRE, H. - Update on the Major Clonal Types of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the Czech Republic. *J Clin Microbiol*, 41: 4998-5005, 2003.

MIMS, C.A.; PLAYFAIR, J.H.L.; ROIT, I. M.; WAKILIN, D.; WILLIAMS, R. - *Microbiologia Médica*. 1ª ed. São Paulo: Manole, 1995. cap.39.

MIRAGAIA, M.; COUTO, I.; PEREIRA, S. F. F.; KRISTINSSON, K. G.; WESTH, H.; JARLOV, J. O. et al. - Molecular Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones: Evidence of Geographic Dissemination. *J Clin. Microbiol*, 40:430-438 2003.

MIRANDA, G.; KELLY, C.; SOLORZANO, F.; LEANOS, B.; CORIA, R.; PATTERSON, J.E. - Use of pulsed-field gel electrophoresis typing to study an outbreak

of infection in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol*, 34:3138-3141, 1996.

MONTESINOS, I.; SALIDO, E.; DELGADO, T.; CUERVO, M.; SIERRA, A. - Epidemiologic Genotyping of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis at a University Hospital and Comparison with Antibiotyping and Protein A and Coagulase Gene Polymorphisms. *J Clin Microbiol*, 40(6):2119-2125, 2002.

MONTESINOS, I.; SALIDO, E.; DELGADO, T.; LECUONA, M.; SIERRA, A. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a university hospital in the Canary Islands. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 24(9): 667-772 2003.

MOREIRA, M.; MEDEIROS, E. A. S.; PIGNATARI, A. C. C.; WEY, S. B.; CARDO, D. M. - Efeito da infecção hospitalar da corrente sanguínea por *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina sobre a letalidade e o tempo de hospitalização. *Rev Assoc Med Bras*, 44 (4):263-268, 1998.

MORETTI-BRANCHINI, M. L.; MORTHLAND, V.H.; TRESOLDI, A.T.; NOWAKONSKY, A.V.; DIAS, M.B. et al. - Application of Genomic DNA Subtyping by Pulsed Field Gel Eletrophoresis and Restriction Enzyme Analysis of Plasmid DNA to Characterize Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Two Nosocomial Outbreaks. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 17: 275-281 1993.

MORETTI-BRANCHINI, L. M. - Aplicação de Métodos de Tipagem Molecular na Investigação de Surtos Intra-Hospitalares. *Tese de livre-docência apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP*. 1998.

MULLIGAN, M. E.; MURRAY-LEISURE, K. A.; RIBNER, B. S.; STANDFORD, H. C.; JOHN, J. F.; KORVICK, J. A. et al. - Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: a

consensus review of the microbiology, pathogenesis and epidemiology with implications for prevention and management. *Am J med*, 94:313-328, 1993.

MULLIS, K. B. - The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Sci Am*, 262:36-43, 1990.

MULVEY, M. R.; CHUI, L.; ISMAIL, J. - Development of a Canadian Standardized Protocol for Subtyping Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Using Pulsed Field Gel Electrophoresis. *J Clin Microbiol*, 39: 3481-3485, 2001.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). - Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, *Ninth Informational Supplement M100-S9*, 1999.

NAWAS, T.; LANE, W.R. - Phenotypic and genotypic characterization of nosocomial *Staphylococcus aureus* isolates from trauma patients. *J Clin Microbiol*, 36: 305-307, 1998.

NICOLE, L. E.; STRAUSBAUGH, L. F.; GARIBALDI, R. A. - Infections and Antibiotic Resistance in Nursing Homes. *Clin Microbiol Rev*, 9:1-17, 1996.

OLIVE, M.; BEAN, P. - Principles and application of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol*, 37: 1661-1669, 1999.

OLMOS, A.; CAMARENA, J. J.; NOGUEIRA, J. M.; NAVARO, J.C.; RISEN, J.; SÁNCHEZ, R. - Application of an Optimized and Highly Discriminatory Primed PCR for Epidemiologic Analysis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Nosocomial Infections. *J Clin Microbiol*, 36: 1128-1134, 1998.

PADOVEZE, M. C. - Estudo da Epidemiologia Molecular dos *Staphylococcus aureus*

Resistentes à Oxacilina em Portadores de Síndrome de Imunodeficiência Adquirida. *Tese de Mestrado apresentada ao Departamento de Microbiologia e Imunologia / UNICAMP. Junho, 1998.*

PANNUTI, C.S.; GRINBAUM, R. - Na overview of nosocomial infection control in Brazil. *Infect Control Epidemiol*, 16: 170-174, 1995.

PFALLER, M. A.; JONES, R. N.; DOERN, G. V.; SADER, H. S.; KUGLER, K. C.; BEACH, M. L. - Survey of blood stream infections attributable to gram-positive cocci: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and Latin America from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program *Diagn Microbiol Infect, Dis.* 33: 283-297, 1999.

POWER, E .G. M. - RAPD typing in microbiology-a technical review. *J Hosp Infect*, 34: 247-265, 1996.

PUJOL, M.; PENÃ, C.; PALLARES, R.; AYATS, J.; ARISA, J.; GUDIOL, F. - Risk factors for nosocomial bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur. J Clin Microbiol Infect Dis*, 13: 96-102, 1996.

SADER, H.S., PIGNATARI, A.C., HOLLIS, R.J., JONES, R.N. – Evaluation of interhospital spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in São Paulo using pulsed-field gel eletrophoresis of chromosomal DNA. *Infect Hosp Epidemiol*, 15: 320-23, 1994.

SADER, H. S.; PIGNATARI, A. C.; HOLLIS, R. J.; JONES, R. N. - Evaluation of Interhospital Spread of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in São Paulo, Brasil, using Pulsed-Field Gel electrophoresis of Chromosomal DNA. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 15(5):320-323, 1995.

SALMENLINNA, S.; VUOPIO-VARKILA, J.; JONES, R.N. - Recognition of Two Groups of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Based on Epidemiology, Antimicrobial Susceptibility, Hypervariable-Region Type, and Ribotype in Finland. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 2243-2247, 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning - *A Laboratory Manual*. 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989.

SAMY, A.; SHEHAB, EL-DIN.; EL-SAYED, I.; EL-SHAFEY.; MAMAD, R ; AHMAD MODATHER, M. et al. - Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Problem in the Burns Unit. *Egyptian of Journal Plastic and Reconstructive Surgery*, 27: 1-10, 2003.

SANTOS FILHO, L.; SADER H.; BORTOLOTTTO V.I.; GONTIJO FILHO, P.P.; PIGNATARI, A.C. - Analysis of the Clonal Diversity of *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant Strains Isolated at João Pessoa, State of Paraíba, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91: 101-105, 1996.

SAULNIER, P.; BOURNIEUX, C.; PREVOST, G.; ANDREMONT, A. - Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminate than pulsed gel electrophoresis for typing strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, 31: 982-985, 1993.

SCHWARTZ, D.C.; CANTOR, C.R. - Separation of yeast chromossome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electroforesis. *Cell*, 37:67-75 1984.

SCHIMITZ, F.J.M.; STEIERT, H.V.; TICHY, B.; HOFMANN, J.;VERHOEF, H.P.; HEINZ, K. et al. - Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Düsseldorf by six genotypic methods. *Journal of Medical Microbiology*, 47:341-351, 1998.

SIMOR, A. E.; OFNER-AGOSTINI, M.; BRYCE, E.; GREEN, K.; McGEER, A.; MULVEY, M. et al. - The Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program. The evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Canadian Hospitals: the results of five years of national surveillance. *Can. Med. Assoc. J.* 165:21-26, 2001.

SOARES, M.J.S.; TOKUMARU-MIYAZAKI, N.H.; NOLETO, A.L.S.; FIGUEIREDO, A.M.S. - Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* clones and detection of Brazilian epidemic MRSA clone (III:B:A) among isolates from food handlers. *J Med Microbiol*, 46: 214-221, 1997.

SOLA, C., GRIBAUDO, G., VINDEL, A., PATRITO, L., BOCCO, J. L. Identification of a Novel Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Epidemic Clone in Cordoba, Argentina, Involved in Nosocomial Infections. *J Clin Microbiol*, 40: 1427-1435, 2002.

SOUSA, M. A.; MIRAGAIA, M.; SANCHES, I. S.; ÁVILA, S.; ADAMSON, I.; CASAGRANDE, S. T. et al.. - Three-year assessment of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America from 1996 to 1998. *J Clin Microbiol*, 39:2197-2205, 2001.

SPELLER, D. C.; STEPHENS, M.; RAGUNATH, D.; VIANI, A. C. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* of Brazilian epidemic. *Epidemic infection*, 158:28-32, 1998.

STARLING, C.E.F.; SILVA, E. - Controle de Infecções Hospitalares: Isolamento, Precauções e Controle de Bactérias Multi-Resistentes. *Belo Horizonte: IEA*, 1998.

STRANDEN, A., FREI, R.; WIDMER, A. F. - Molecular Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Can PCR Replace Pulsed-Field Gel Electrophoresis? *J Clin Microbiol*, 41: 3181-3186, 2003.

STRÜELEN, M.J.; SCHWAM, V.; DEPLANO, A.; BARAN, D. - Genome macrorestriction analysis of diversity and variability of *Pseudomonas aeruginosa* strains infecting cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*, 31: 2320-2326, 1993.

TAMBIC, A.; POWER, E.G.M.; TALSANIA, H.; ANTHONY, R.M.; FRENCH, G.L. - Analysis of an outbreak of non phage-typeable Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by using a randomly amplified polymorphic DNA assay. *J Clin Microbiol*, 35: 3092-3097, 1997.

TAMBIC, A.; POWER, E. G. M.; TAMBIC, T.; SNUR, I.; FRENCH, G. L. - Epidemiological analysis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a Zagreb Trauma Hospital using a randomly Amplified Polymorphic DNA- typing method. *J Clin Microbiol*, 18: 335-340, 1999.

TEIXEIRA, L. A. - Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone Brazil. *J Clin Microbiol*, 33: 2400-2404, 1995.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.; GOERING, R.V. - Comparison of Traditional and Molecular Methods of Typing Isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, 32: 407-415, 1994.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.; GOERING, R.V. - Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*, 33: 2233-2239, 1995.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V. - How to Select and Interpret Molecular Strain Typing Methods for Epidemiological Studies of Bacterial Infections: A Review for Healthcare Epidemiologists. *Infect. Control Hosp Epidemiol*, 18(6): 426-439, 1997.

TENOVER, F.C.; GAYNES, R.P. - The epidemiology of *Staphylococcus* infection. In V. A. Fischetti, R. P. Novick, J. J. Ferretti, D. A. Portnoy, and J. I. Rood (ed.), Gram-positive pathogens. *American Society for Microbiology, Washington, D.C.*, 2000.

TESS, B. H.; GLENISTER, H. M.; RORIGUES, L. C. - Incidence of hospital-acquired infection and length of hospital stay. *J Clin Microbiol Dis*, 12(2): 81-96, 1993.

TRESOLDI, A.T.; BRANCHINI, M.L.M.; MOREIRA FILHO, D. C.; PADOVEZE, M.C.; DANTAS, S.P.E.; REGINATO, L. et al. - Relative Frequency of Nosocomial Microorganisms at UNICAMP University Hospital from 1987 to 1994. *Rev. Inst Med. Trop S. Paulo*, 39(6): 333-336, 1997.

TURNIDGE, J. D.; Bell, L.T. - Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* evolution in Australia over 35 years. *Microb Drug Resist.*, 6:223-229, 2000.

Van BELKUM, A.; Van LEEUWEN, W.; KLUYTMANS, J.; VERBRUGH, H. - Molecular Nosocomial Epidemiology: High Speed Typing of Microbial Pathogens by Arbitrary Primed Polymerase Chain Reaction assays. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 16(11): 658-666, 1995.

Van BELKUM, A., LEEUWEN, W. VAN; KAUFMANN, M. E.; COOKSON, B.; FOREY, F.; ETIENNE, J. et al. - Assessment of resolution and intercenter reproducibility of results of genotyping *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis of *Sma*I macrorestriction fragments: a multicenter study. *J Clin Microbiol*, 36:1653-1659, 1998.

VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M. J. E. - Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Control in Hospital: the Dutch Experience. *Infect. Control Hosp Epidemiol*, 7(8): 512-13, 1996.

Van der ZEE, A.; VERBAKEL, H.; Van ZON, J. C.; FRENAY, I.; Van BELKUM, A.; BUITING, A. et al. - Molecular Genotyping of *Staphylococcus aureus* Strains: Comparison of Repetitive Element Sequence-Based PCR with Various Typing Methods and Isolation of a Novel Epidemicity Marker. *J Clin Microb*, 37(2): 342-349, 1999.

VESSALIC, J.; WOODS, C. R. Jr.; GEORGHIOU, P. R.; HAMILL, R. J.; LUPSKI, J. R. - DNA-based identification and epidemiologic typing of bacterial pathogens. *Arch Pathol Lab Med*, 117: 1088-1098, 1993.

WALKER, J.; BORROW, R.; GOERING, R.V.; EGERTON, S.; FOX, A.; OPPENHEIN, B.A. - Subtyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the North-West of England: a comparison of standardized pulsed-field gel electrophoresis with bacteriophage typing including an inter-laboratory reproducibility study. *Journal of Medical Microbiology*, 48: 297-301, 1999.

WANG, J. T.; CHEN-CHUN, Y.; YANG, T. L.; CHANG, C. S. - Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan. *Diag Microbiol and Infec, Dis.*, 42: 199-203, 2002.

WEBER, S.; PFALLER, M.A.; HERWALDT, L.A. - Role the Molecular Epidemiology in Infection Control. *Infect Dis Clin North Am*, 11: 257-278, 1997.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. - Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl Acids Res*, v. 18, p. 7213-7218, 1990.

WENZEL, R.P.; THOMPSON, R.L.; LANDRY, S.M. - Hospital-acquired infections in intensive care unit patients: an overview wlt h emphasis on epidemics. *Infect Control*, 4: 371-375, 1983.

WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V.

-DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 18 (22): 6531- 6535, 1990.

WITTE, W.; KRESKEN. M.; BRAULKE, C.; CUNY, C. - Increasing incidence and widespread dissemination of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitals in central Europe, with special reference to German hospitals. *Clin Microbiol. Infect*, 3(40): 414-422, 1999.

YOUNG, K. A.; POWER, M.; DRYDEN, M. S.; PHILLIPS, L. RAPD typing of clinical isolates of *Staphylococcus haemolyticus*. *Lett. Appl Microbiol*, 18: 86-89, 1994.

8. ANEXOS

8.1. Anexo 1. Definição de infecção nosocomial

O Centro de Controle de Doenças e Prevenção (CDC) desenvolveu uma série de definições para a verificação de infecções nosocomiais. As definições são baseadas em vários princípios importantes:

1. A informação usada para determinar a presença e a classificação de uma infecção envolve a combinação de várias informações: dados clínicos, resultados laboratoriais e outras provas diagnósticas. A evidência clínica provém da observação direta do paciente ou da revisão das informações contidas nas fichas do paciente ou de outros registros. A evidência laboratorial compreende os resultados de culturas realizadas, teste para detecção de antígenos e/ou anticorpos e métodos de visualização microscópica. Dados de apoio são derivados de outros estudos diagnósticos, como resultados de raios-X, exame de ultra-som, tomografia computadorizada, ressonância magnética, procedimentos endoscópicos, biópsias e aspirações. Encontram-se incluídos critérios específicos para as infecções nas quais as manifestações clínicas são diferentes para neonatos ou crianças;

2. Para que uma infecção seja considerada nosocomial, não deve haver evidências de que a infecção estava presente ou sob incubação no momento da admissão do paciente ao hospital. Uma infecção que ocorrer nas seguintes condições especiais será considerada nosocomial: (a) infecção adquirida no hospital e evidenciada após a alta hospitalar; (b) infecção em neonatos, resultante da passagem através do cordão umbilical e (c) infecção resultante da transmissão de patógenos veiculados por hemoderivados, administrados após o nascimento. As infecções cujo modo de transmissão não pode ser esclarecido deverão ser consideradas hospitalares, por exemplo, listeriose e infecção pelo *Streptococcus* do grupo B;

3. A infecção que ocorrer como resultado das seguintes situações especiais **não** será considerada nosocomial: (a) infecção associada à complicação ou extensão de infecção

já presente no momento da admissão, salvo uma mudança do patógeno ou quando os sintomas fortemente indicarem a aquisição de uma nova infecção e (b) em criança, infecção sabidamente ou comprovadamente adquirida por via transplacentária (como por exemplo, herpes simplex, toxoplasmose, rubéola, sarampo, varicela, citomegalovírus, sífilis, tuberculose congênita, doença de Chagas, malária, hepatite B, hepatite C, infecção pelo HIV e pelo parvovírus B19) e evidenciada rapidamente após o nascimento;

4. Exceto para algumas situações, não há uma duração específica de tempo ou hospitalização para determinar se uma infecção é nosocomial ou adquirida na comunidade. Assim, cada infecção deve ser avaliada pela evidência que a une à hospitalização.

8.2. Anexo 2. Tabela padrão para interpretação de halos de inibição de antibacterianos para *Staphylococcus aureus*.

Antibacterianos		Teste Qualitativo dos Discos	Padrão Interpretativo		
		Zonas limites em mm	Zonas de inibição em mm		
		<i>S.aureus</i> ATCC 25923	Resistente	Intermed.	Sensível
Amicacina	30µg	20 - 25	≤ 14	15 - 16	≥ 17
Ampicilina	10µg	27 - 29	≤ 28	-	≥ 29
Cefalotina	30µg	27 - 37	≤ 14	15 - 17	≥ 18
Clindamicina	02µg	24 - 30	≤ 14	15 - 20	≥ 21
Cloranfenicol	30µg	19 - 26	≤ 12	13 - 17	≥ 18
Sulfametoxazol	23,75µg +	24 - 32	≤ 10	11 - 15	≥ 16
Trimetropin	5µg = 25µg				
Eritromicina	15µg	22 - 30	≤ 13	14 - 22	≥ 23
Gentamicina	10µg	19 - 27	≤ 12	13 - 14	≥ 15
Netilmicina	30µg	22 - 31	≤ 12	13 - 14	≥ 15
Oxacilina	06 µg	18 - 24	≤ 10	11 - 12	≥ 13
Penicilina G	10 UI	26 - 37	≤ 28	-	≥ 29
Tetraciclina	30µg	19 - 28	≤ 14	15 - 18	≥ 19
Tobramicina	10µg	19 - 29	≤ 12	13 - 14	≥ 15
Vancomicina	30µg	15 - 19	≤ 19	10 - 11	≥ 12

Fonte: NCCLS, 1999.

8.3. Anexo 3.

Cepas de SARO utilizadas na análise da epidemiologia molecular no período de 1995 a 2001

Nº do isolado	Nome do paciente	NumLab	Unidade/ Especialidade	Espécimen	Data de coleta	Padrão PFGE	Padrão RAPD-PCR
01	ACP	0327	CIVAS	CAT	12-05-95	A	B
02	HNB	O609	CIVAS	SFCI	10-06-95	A	B
03	ADR	0497-A	PEDIAT	SECR	05-09-95	A	B
04	MSS	0970	EECIR	CAT	24-10-95	A	B
05	ERP	0137	MI	CAT	06-11-95	A	A
06	JSP	0101	LEITO	SFCI	12-09-95	A	B
07	MAS	0870	MI	SFCI	20-05-95	A	B
08	JRE	0092	LEITO	URI	12-09-95	A	B
09	CNSR	0918	MI	SECR	17-05-95	A	A
10	JRE	0931-C	LEITO	SECR	22-05-95	A	A
11	ALJ	0827-B	MI	URI	10-10-95	A	A
12	AFM	0806-A	LEITO	SECR	28-12-95	A	B
13	EMF	0720-A	MI	SFCI	31-12-95	A	A
14	PG	0067-B	MI	SFCI	25-07-95	A	B
15	AAP	0944-B	MI	SFCI	29-05-95	A	A
16	RAS	0939	LEITO	SECR	25-05-95	A	B
17	GXG	0999-A	LEITO	SECR	18-07-95	A	B
18	MAS	0209-A	PEDIAT	SECR	31-01-96	A	B
19	MAS	0657-C	PEDIAT	SECR	22-02-96	A	B
20	FSDB	0674-A	NEURO	SFCI	23-03-96	A	B
21	FSDB	0634-A	NEURO	SECR	19-02-96	A	B
22	JAG	0646-A	GASCI	SFCI	20-02-96	A	B
23	LFS	0971-B	UTI	SFCI	23-05-96	A	B
24	JRS	1239-A	UTI	SECR	25-06-96	A	B
25	FPS	1172-A	TRAUMA	SECR	18-06-96	A	A
26	FPS	0519-H	TRAUMA	SECR	13-06-96	A	B
27	AAL	1084-A	GASCI	SECR	10-06-96	A	B
28	AAL	0780	GASCI	SAN	22-02-96	A	B
29	JE	0048-A	MI	URI	03-06-96	A	A
30	MARC	0875-A	NEFRO	SECR	10-05-96	A	A
31	MARC	0834-A	NEFRO	SECR	02-05-96	A	B
32	MARC	1283	NEFRO	SECR	03-05-96	A	B
33	AFS	1891	TRAUMA	SECR	10-06-96	A	A
34	MSM	1666-A	PEDIAT	SECR	22-08-96	A	B
35	RSS	0287-C	MI	URI	13-02-97	AP	B
36	CAC	0178-B	MI	URI	30-01-97	AP	B
37	AMM	0958-A	CIVAS	SFCI	24-04-97	AP	B
38	JC	0976-A	MI	CAT	27-04-97	AP	B
39	DVCM	1063-A	NEFRO	URI	13-04-97	A	B
40	EP	1138-A	TRAUMA	URI	18-05-97	A	B
41	EP	1123-A	TRAUMA	SAN	14-05-97	AM	B
42	EP	1208-A	TRAUMA	SAN	25-05-97	AP	B
43	AB	1606-A	MI	SAN	10-07-97	A	B
44	AB	1045-A	MI	URI	23-06-97	A	B
45	AB	0943	MI	SAN	26-06-97	A	B
46	GOM	1786-D	TRAUMA	SFCI	29-09-97	A	B
47	MTVM	2172-A	MI	URI	04-11-97	AM	B
48	AF	2318-A	TRAUMA	SFCI	20-11-97	A	A
49	AF	1441-A	TRAUMA	SFCI	18-08-97	A	B
50	AF	1654-A	TRAUMA	OUT	16-09-97	AM	B

Cepas de SARO utilizadas na análise da epidemiologia molecular no período de 1995 a 2001

Nº do isolado	Nome do paciente	NumLab	Unidade/ Especialidade	Espécimen	Data de coleta	Padrão PFGE	Padrão RAPD-PCR
51	CO	2963-A	LEITO	SAN	02-12-97	A	B
52	MSP	2962-A	NEUCI	CAT	02-12-97	A	B
53	TCX	1921	MI	SFCI	18-08-97	A	B
54	AF	2456-A	MI	OUT	03-12-97	A	B
55	AMF	1648-A	MI	SFCI	15-09-97	A	A
56	MPFM	2148	LEITO	URI	03-11-97	A	B
57	OG	1323-D	TRAUMA	SECR	10-06-97	AM	B
58	LCM	3064-A	TRAUMA	SAN	18-06-98	A	A
59	RRS	3742	TRAUMA	SAN	01-08-98	AP	B
60	IAM	2145	UTI	SAN	29-04-98	AP	B
61	OBG	2047	TRAUMA	SFCI	23-04-98	A	A
62	NS	2005	NEFRO	URI	21-04-98	A	A
63	RRS	3736	GASCI	SAN	01-08-98	AP	A
64	ECLM	2085	MI	OUT	25-04-98	A	A
65	OBG	1045	URO	CAT	29-03-98	A	A
66	MN	0346	UTI	SAN	17-06-99	A	A
67	MCP	0369	GASCI	SAN	29-06-99	A	B
68	WMM	3366	MI	SAN	27-12-99	AP	B
69	MAC	1015	NEUCI	SAN	12-08-99	A	A
70	VBM	0561	GASCI	SAN	11-07-99	A	A
71	JCP	1028	GASCI	SAN	12-08-99	AP	A
72	NJR	1158	MI	SAN	21-05-99	A	A
73	CD	0206	MI	SAN	17-06-99	A	A
74	OS	1107	NEUCI	SAN	18-06-99	A	A
75	RABS	0265	GASCI	OUT	02-07-99	A	A
76	PSBM	0268	MI	CAT	27-09-99	A	B
77	ERF	0278	NEUCI	OUT	15-07-99	AP	B
78	AP	0471	TRAUMA	SAN	31-01-00	A	A
79	CSN	0717	HEMATO	SAN	13-02-00	A	B
80	JCM	1526	MI	SAN	25-03-00	AP	B
81	LN	1376	MI	SAN	18-03-00	AP	B
82	MJT	0151	GASCI	CAT	12-03-00	AP	B
83	IVJ	0782	PEDIAT	SAN	20-01-00	AP	B
84	LRF	0305	HEMATO	SAN	17-03-00	AP	A
85	AS	0723	UROCI	SAN	14-02-00	AP	B
86	RJS	1362	MI	SAN	17-03-00	AP	B
87	AGB	3435	HEMATO	SAN	30-12-99	A	A
88	BB	0278	NEONA	CAT	25-08-00	A	A
89	MAO	0222	HEMATO	SAN	21-08-00	A	A
90	ALS	0083	NEFRO	CAT	09-08-00	A	A
91	MCS	0072	GASCI	CAT	29-08-00	A	B
92	MAO	4505	HEMATO	SAN	24-08-00	A	A
93	MCS	4676	GASCI	SAN	30-08-00	A	A
94	DJBC	4624	HEMATO	SAN	28-08-00	A	A
95	BB	4709	MI	SAN	01-09-00	A	A
96	JO	4414	NEFRO	SAN	17-08-00	A	A
97	ALS	4279	NEONA	SAN	10-08-00	A	B
98	JAC	4254	MI	SAN	09-08-00	A	A
99	MAO	4326	HEMATO	SAN	11-08-00	A	A
100	ERM	4192-A	GASCI	SAN	05-08-00	A	A

Cepas de SARO utilizadas na análise da epidemiologia molecular no período de 1995 a 2001

Nº do isolado	Nome do paciente	NumLab	Unidade/ Especialidade	Espécimen	Data de coleta	Padrão PFGE	Padrão RAPD-PCR
101	AO	0138	GASCI	CAT	15-06-01	A	A
102	AHGS	1607	MI	SAN	23-03-01	A	A
103	AP	1388	HEMATO	SAN	10-03-01	AM	B
104	GTBC	0235	HEMATO	SAN	21-03-01	AM	B
105	AAS	3658	NEFRO	SAN	06-03-01	AM	B
106	MNS	0068	NEUCI	OUT	15-06-01	AM	B
107	AAC	1770	TRAUMA	CAT	14-03-01	AM	B
108	RLMN	1134	HEMATO	SAN	23-02-01	AM	B
109	GTB	0026-A	HEMATO	SAN	27-04-01	AM	B
110	MNSM	0026	NEUCI	OUT	10-06-01	AM	B
111	JCB	0250	MI	CAT	28-07-01	AM	B
112	JAP	0051	MI	CAT	05-04-01	AM	B
113	NLS	0266	URO	URI	04-08-01	AM	B
114	AAFC	4104	HEMATO	SAN	29-07-01	B	A
115	BS	0262	CIVAS	CAT	04-08-01	AM	B
116	RAP	0127	NEUCI	CAT	08-06-01	AM	B
117	GTB	3990	HEMATO	SAN	28-07-01	AM	B

NumLab: número de laboratório
CAT: cateter vascular e central
SAN: sangue
SFCI: secreção de ferida cirurgica incisional
SECR: secreção respiratória baixa
OUT: outros
CIVAS: cirurgia vascular
PEDIAT: pediatria
MI: moléstias infecciosas
NEUCI: neurocirurgia
GASCI: gastrocirurgia
HEMATO: hematologia
NEFRO: nefrologia
NEON: neonatal
URO: urologia

8.4. Anexo 4. Soluções utilizadas para o estudo molecular (dispostas em ordem alfabética)

Agarose de baixo ponto de fusão (*Low Melt Agarose*)

Low melt agarose.....	0,5 g
dH ₂ O.....	25,0 ml
Aquecer em microondas e dispensar um volume de 5,0 mL em tubos cônicos de 10,0 mL. Armazenar a 4°C.	

ATAB 0,5 %

ATAB.....	2,5 g
dH ₂ O (qsp).....	500,0 mL

ATAB (0,5 %); Triton X-100 (0,25%)

ATAB.....	2,5 g
Triton X-100.....	1,25 mL
dH ₂ O (qsp).....	500,0 mL

Brometo de Etídio 10mg/mL

Brometo de Etídio.....	10mg/mL
Brometo de Etídio (Pharmacia).....	0,2g
Água destilada.....	19,8mL

O brometo de etídio foi dissolvido em água destilada e estocado à temperatura ambiente em frasco escuro à temperatura ambiente.

CTAB/NaCl

Brometo de cetramonio (Sigma-H5882).....	8 g
NaCl.....	4,1 g
Água mili Q.....	80,0 mL
Dissolver as substancias em água	

EDTA (0,5 M; pH 7,5-8,0)

EDTA.....	186,1 g
dH ₂ O.....	800,0 mL
Ajustar o pH com pérolas de NaOH	
Completar a solução, usando dH ₂ O, para.....	500,0 mL

Etanol 70 %

Etanol absoluto (Merck).....	70,0 mL
Água destilada q.s.p.....	30,0 mL

As substâncias foram homogeneizadas e a solução foi mantida a 4-8°C.

ESP (Volume suficiente para 10 cepas)		Concentração final
EDTA (0,625 M; pH 9,3).....	16,0 mL	0,5 M
Sarkosyl (5,0 %).....	4,0 mL	1,0 %
Proteinase K (20,0 mg/mL).....	100,0 µL	0,1 mg/mL
Volume total.....		20,0 mL

Gel de Agarose para RAPD (1,5%)	
Agarose NA (Pharmacia).....	1,5
TEB1x.....	100,0 mL
Dissolver a agarose em 100,0 mL de TBE. Aquecer em microondas até tornar-se completamente límpida.	

Gel de agarose para PFGE (1%)	
Agarose ultra-pure (Gibco BRL).....	1,2 g
Água destilada.....	100,0 mL
TBE 5x.....	11,6 mL
Dissolver a agarose em 100,0 mL de TBE 5x concentrado. Aquecer em microondas até tornar-se completamente límpida. A temperatura foi estabilizada a 58°C em banho-maria até o preparo do gel.	

Lisozima (20 mg/mL)	
Lisozima.....	20,0 mg
Água destilada estéril.....	1,0 mL

Meio Agar sangue de carneiro 5%	
Infusão de cérebro.....	15,0g
Infusão de coração.....	5,0g
Protease-peptona.....	10,0g
Cloreto de sódio.....	5,0g
Glicose (D+).....	2,0g
Agar.....	15,0g
Água destilada.....	1000,0 mL
Adicionar 5% de sangue de carneiro desfibrinado ao Agar cérebro-coração, fundido, esterilizado e mantido a 45-50°C. Homogeneizar e distribuir em placa de Petri.	

Meio leite desnatado	
Leite mólico.....	10 g
Água destilada q.s.p.....	1000 mL
Esterilizar em eppendorf com 2 mL de meio.	

Meio leite desnatado para conservação de cultura em -70°C

Leite desnatado molico.....	100,0 mL
Glicerina	15 %
Estocar a -20°C no freezer.	

Meio Luria Bertani (LB)

Triptona.....	10 g
Extrato de levedura.....	5 g
Cloreto de Sódio.....	10 g
Água destilada q.s.p.....	1000 mL

Suspender os ingredientes em água destilada e, aquecer em banho-maria. Autoclavar a 121°C por 15 minutos, esperar esfriar e distribuir em placas de Petri esterilizadas. Preparar o meio em pH: 7,0-7,2.

Meio Mueller-Hinton

Infusão de carne.....	300g
Hidrolisado ácido de caseína.....	17,5g
Amido.....	1,5g
Agar.....	17,0g
dH ₂ O (qsp).....	1000,0 mL

Suspender os ingredientes em água destilada e, aquecer em banho-maria. Autoclavar a 121°C por 15 minutos, esperar esfriar e distribuir em placas de Petri esterilizadas. pH_{final}= 7,4

NaCl (2,5M); EDTA (10 mM; pH 7,9-8,0)

NaCl (5,0 M).....	250,0 mL
EDTA (0,5 M; pH 8,0).....	10,0 mL
dH ₂ O.....	240,0 mL

NaCl (5,0 M)

NaCl.....	292,2 g
dH ₂ O.....	800,0 mL
Completar o volume para.....	1000,0 mL

RNAse

RNAse I “A” – “Bovine Pâncreas” (Pharmacia).....	50,0mg
Solução diluente de RNAse.....	5,0mL

A RNAse foi dissolvida na solução diluente e aquecida a 100°C por 15 minutos, esfriada lentamente à temperatura ambiente, dividida em alíquotas de 500µL em tubos de microcentrifugação e estocada a -20°C.

Sodium dodecyl sulfate (SDS) 10%

SDS(Pharmacia)	100,0g
Águadestilada q.s.p.....	1000,0mL

O SDS foi dissolvido em 800 mL de água destilada. A solução foi aquecida a 50°C ou 68°C. O pH foi aferido para 7,0 com HCl concentrado e o volume final foi completado para 1000mL. A solução foi estocada à temperatura ambiente.

Solução de brometo de etídio para corar o gel de RAPD (5µL/100mL)

Brometo de etídio (10mg/mL).....	20,0µL
TBE 1X.....	400,0 mL

As substâncias foram homogeneizadas e dispensadas em cuba para corar o gel.

Solução de brometo de etídio para corar o gel de PFGE (6µL/100mL)

Brometo de etídio (10mg/mL).....	15,0 µL
TBE 1X.....	250,0 mL

As substâncias foram homogeneizadas e dispensadas em cuba para corar o gel de eletroforese.

Solução diluente de RNase

NaCl 1M.....	75,0µL
Tris-HCl 1M pH 7,4.....	50,0µL
Água milli-Q.....	4,87mL

As substâncias foram homogeneizadas e a solução foi utilizada imediatamente após o preparo.

Solução estoque – Proteinase K

Proteinase K (Sigma).....	100,0mg
Água destilada.....	5,0mL

A proteinase K foi diluída em água destilada (20mg/mL), estocada em alíquotas de 0,5mL e mantida a -20°C.

Tampão *Dummy No Salt*

Solução estoque		Concentração final
TRIS (1,0 M; pH 8,0).....	5,0 mL	0,1 M
Cloreto de Magnésio (1,0 M).....	250,0 µL	0,005 M
dH ₂ O (qsp).....		50,0 mL

Tampão de ressuspensão de DNA

Usar a solução de sacarose a 50% na qual adicionou-se o azul de bromofenol e xileno cianol na concentração final de 0,25%.

TBE 0,5 X	
TBE 5X.....	100,0 mL
dH ₂ O.....	900,0 mL
Volume total.....	1000,0 mL
TBE 1X	
TBE 5X.....	200,0 mL
dH ₂ O.....	800,0 mL
Volume total.....	1000,0 mL
TBE 5X	
Trizma base.....	54,0 g
Ácido Bórico.....	27,5 g
EDTA (0,5 M; pH 8,0).....	20,0 mL
dH ₂ O (qsp).....	1000,0 mL
TE (TRIS 0,1 M; pH 7,5); EDTA (0,1 M; pH 7,5)	
TRIS (1,0 M; pH 7,5).....	5,0 mL
EDTA (0,5 M; pH 7,5).....	10,0 mL
dH ₂ O (qsp).....	50,0 mL
TE High Molarity [(TRIS 0,1 M; pH 7,5); EDTA (0,1 M; pH 7,5)]	
TRIS (1,0 M; pH 7,5).....	50,0 mL
EDTA (0,5 M; pH 7,5).....	100,0 mL
dH ₂ O (qsp).....	500,0 mL
TRIS (1,0 M; pH 7,5 – 8,0)	
TRIS.....	60,6 g
dH ₂ O (qsp).....	500,0 mL
TRIS (0,02 M); EDTA (0,01 M)	
TRIS (1,0 M; pH 7,5).....	1,0 mL
EDTA (0,5 M; pH 7,5).....	1,0 mL
dH ₂ O (qsp).....	50,0 mL

Manuscript – 5408 – Text and Figures

Use of molecular epidemiology to monitor the nosocomial dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a University Hospital from 1991-2001.

A.L.R.Z. Beretta,
P. Trabasso,
R.B. Stucchi and
M.L. Moretti

Laboratório de Epidemiologia Molecular e Moléstias Infecciosas,
Divisão de Moléstias Infecciosas, Faculdade de Ciências Médicas,
Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

Correspondence

M.L. Moretti
Disciplina de Infectologia
Departamento de Clínica Médica
FCM, Unicamp
Rua Alexandre Fleming, 40
13081-970 Campinas, SP
Brasil
Fax: 55-19-3289-4107
E-mail: moretti@hc.unicamp.br
Research supported by FAPESP
(No. 00/10886-6).

Received October 29, 2003

Accepted

Authors: A.L.R.Z. Beretta et al.

Running title: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Key words: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA; Molecular epidemiology;
hospital infection; PFGE.

Abstract

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has been the cause of major outbreaks and epidemics among hospitalized patients, with high mortality and morbidity rates. We studied the genomic diversity of MRSA strains isolated from patients with nosocomial infection in a university hospital from 1991 to 2001. The study consisted of two periods: period I, from 1991 to 1993 and period II from 1995 to 2001. DNA was typed by pulsed field gel electrophoresis and the similarity among the MRSA strains was determined by cluster analysis. During period I, 73 strains presented five distinctive DNA profiles: A, B, C, D and E. Profile A was the most frequent DNA pattern and was identified in 55 (75.3%) strains; three closely-related and four possibly-related profiles were also identified. During period II, 80 (68.8%) of 117 strains showed the same endemic profile A identified during period I, 18 (13.7%) closely related profiles and 18 (13.7%) possibly related profiles and, only one strain presented an unrelated profile. Cluster analysis showed a 96% coefficient of similarity between profile A from period I and profile A from period II, which were considered to be from the same clone. The molecular monitoring of MRSA strains permitted the determination of the clonal dissemination and the maintenance of a dominant endemic strain during a 10-year period and the presence of closely and possibly related patterns for endemic profile A. However, further studies are necessary to improve the understanding of the dissemination of the endemic profile in this hospital.

Key words

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Molecular epidemiology

Hospital infection / Pulsed field gel electrophoresis

Introduction

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is one of the most important nosocomial pathogens. It causes major outbreaks and represents a severe clinical threat to patients worldwide (1-3), and its frequency has increased in the past 20 years (4). The high mortality and morbidity rates of MRSA infections associated with the potential for intra-hospital dissemination are of great concern to the medical staff and to the infection control team (5,6).

MRSA is highly transmissible among hospitalized patients and the infected or colonized patients are the main reservoir of the bacteria in hospitals worldwide (5). The hospital epidemiology of nosocomial MRSA infections has particular characteristics in each institution and varies according to the complexity and size of the hospitals (7).

MRSA has been one of the major causes of hospital infections in American hospitals, with an increase in percentage from 2.4 to 29% between 1975 and 1991, and currently reaching about 40%. In England, the percentage increased from 1.5 to 13.2% between 1989 and 1995 (8-13). In Brazil, the prevalence of MRSA is high, especially in large and teaching hospitals, ranging from 26.6 to 70%, and MRSA is considered to be the main pathogen causing hospital outbreaks (14-18).

The use of molecular techniques is a valuable resource for the understanding of the hospital epidemiology of these infections and is of help in the application of efficient control measures (19,20). Monitoring the hospital distribution of MRSA by application of DNA-based molecular typing methods has significantly increased the resolution of epidemiological analysis (21,22). Restriction fragment length polymorphism analysis of genomic DNA using pulsed field gel electrophoresis has been considered to be a reliable DNA-based method for

differentiating MRSA strains and has proved to be superior to most of all other molecular typing methods due to its high discriminatory power and reproducibility (23-27).

The purpose of the present investigation was to study the molecular epidemiology of MRSA strains isolated from patients with nosocomial infection hospitalized at the University Hospital of Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) over a period of ten years.

Patients and Methods

Study design

The University Hospital of Unicamp is located in the state of Sao Paulo and is a public, tertiary care teaching hospital with 403 beds, and is the reference center for a population of about 4 million inhabitants.

The ten-year study consisted of two periods: period I from April 1991 to February 1993, and period II from May 1995 to August 2001. The bacterial strains were obtained from patients with hospital infections defined by an infection control practitioner using the CDC definitions for hospital infections (28). All bacterial isolates were first identified by the clinical microbiology laboratory and were stored at -70°C in 8.0 ml of 10% skim milk. All isolates were obtained from patients hospitalized by different medical specialties of the University Hospital and were randomly included in the study.

Processing of bacterial isolates and susceptibility test

The MRSA isolates included in the study were cultivated on a 5% blood agar plate and identified and tested for susceptibility to antimicrobial agents by the disk diffusion method (29).

Readings were obtained within 20 to 24 h and the isolates were classified as susceptible or resistant according to National Committee for Clinical Laboratory Standards (30) recommendations. The antimicrobial agents evaluated were as follows: oxacillin, ampicillin, penicillin G, cephalothin, gentamicin, amikacin, netilmycin, tetracycline, chloramphenicol, clindamycin), sulfamethoxazole-trimethoprim, imipenem, erythromycin, tobramycin, and vancomycin. All isolates were resistant to oxacillin and susceptible to vancomycin.

Genomic DNA typing

MRSA isolates were grown overnight in brain heart infusion and DNA extraction was performed in agarose plugs as described by **Goering and Duesing (16)**, with modifications. DNA was digested with 20 U of *Sma*I (CCC↓GGG) (Gibco Life Technologies) and two-thirds of each digested agarose plug was inserted into slots in a 1% agarose gel and run in 0.5X TBE buffer (45 mM Tris, pH 8.0, 45 mM boric acid, and 1 mM EDTA) for 18 h at 6 V/cm. The pulse time ranged from 5 to 35 s. A DNA ladder was used as a molecular weight marker. The gels were stained with ethidium bromide and photographed under UV light. The genetic relatedness among the strains was interpreted by the method of Tenover et al. (14) for bacterial strain typing by pulsed-field gel electrophoresis. Isolates with identical or related patterns were considered to derive from a common clone.

The genetic relationship among the patterns was also analyzed by computer software after capturing the autoradiographic images with an IS-1000 digital imaging system (**Bio-Capt MW**, version 99; M&S Instruments Trading Inc). The dendrogram of the patterns was generated using a Dice coefficient

(Biogene software; Vilbert-Loumart, France). The dendrogram does not represent the genetic relatedness among the strains according to Tenover et al.(14), but was a graphic representation of the similarity.

Results

Bacterial isolates

Seventy-three MRSA strains isolated from 58 patients during period I and 117 strains isolated from 94 patients during period II were studied. The sources of bacterial isolates are shown in Table 1.

Table 1. Sites of isolation of MRSA infection in patients hospitalized in a University Hospital.

Source of isolation	Infection (N° and % of cases)	
	Period I	Period II
Blood	04 (5.4)	45 (38.5)
Lower respiratory tract secretion	20 (27.4)	18 (15.9)
Surgical wound	23 (31.5)	14 (11.9)
Central venous catheter	13 (17.8)	15 (12.9)
Urine	-	14 (11.9)
Other	13 (17.8)	11 (9.4)

* Some patients had more than one site of MRSA infection. Period I = 1991-1993; Period II = 1998-2001. MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

Genomic DNA analysis

Period I: The molecular study by pulsed-field gel electrophoresis after restriction enzyme hydrolysis of the 73 outbreak strains with *Sma*I showed 5 genomic profiles: A, B, C, D and E. Profile A was identified in this study as the endemic strain and included 55 (75.3%) isolates. Profile A included two categories of genetic relatedness profiles: a closely related subtype (CRA) represented by 3 strains (4.1%; Figure 1: lanes 3, 4 and 14) and a possibly related subtype (PRA) represented by 4 strains (5.8%; Figure 1: lanes 2, 9, 12, 13). The endemic profile A is shown in lanes 5, 6 and 7 of Figure 1. *Period II:* The molecular study of genomic DNA showed that 80 (68.8%) of the 117 MRSA isolates presented profile A, 18 (13.7%) presented PRA profiles and 18 (13.7%) CRA profiles and 1 strain showed profile B which was recognized during period I. Profile A was also the predominant genomic DNA pattern that was identified during period I as the endemic strain (Figure 2). Figure 3 describes the genetic relationship among the strains from period I and II.

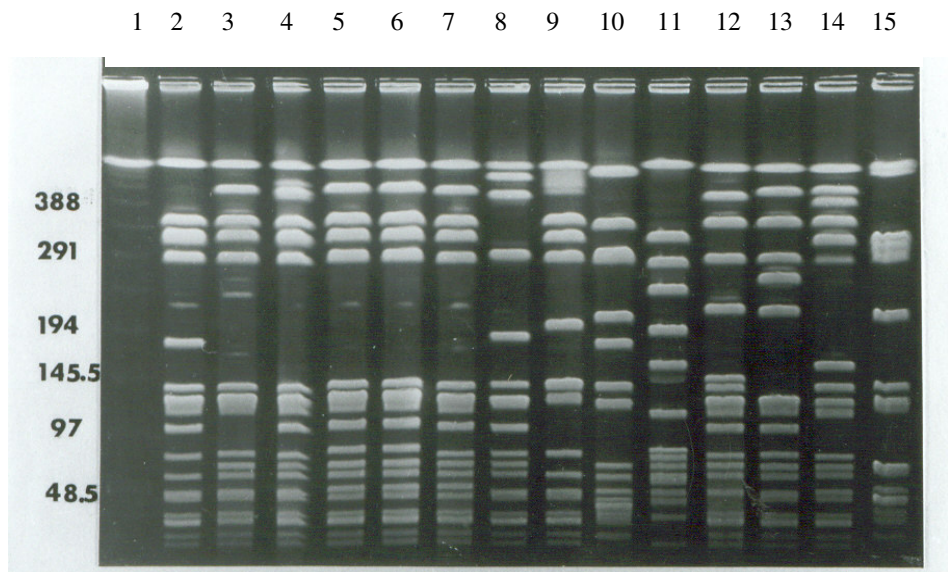


Figure 1. Pulsed-field gel electrophoresis profiles of genomic DNA from MRSA strains isolated from patients with hospital infection from April 1991 to February 1993 (Period I). Lane 1, molecular weight marker (λ Ladder); lanes 2, 9, 12 and 13: MRSA profile possibly related to the endemic profile A strain; lanes 3, 4 and 14: MRSA profile closely related to the endemic strain; lanes 5, 6 and 7 are profile A (endemic strain) and lanes 8, 10, 11 and 15, profiles E, D, C and B, respectively. MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; PFGE = pulsed-field gel electrophoresis.

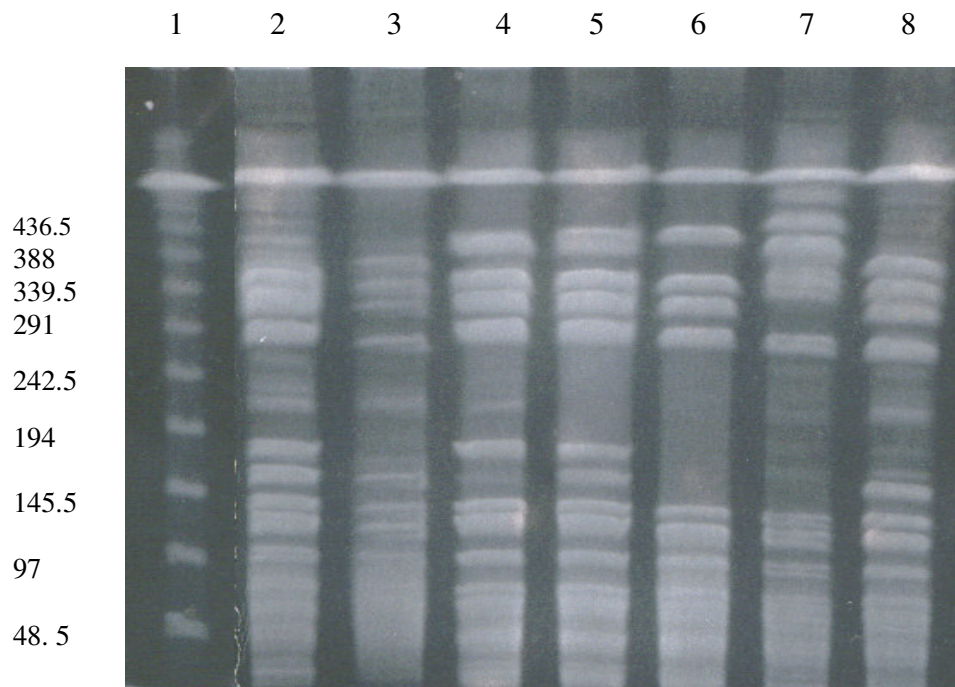


Figure 2. PFGE profiles of genomic DNA from MRSA strains isolated from patients with hospital infection from May 1995 to August 2001 (period II). Lane 2, molecular weight marker (λ Ladder); lanes 3, 4 and 5, MRSA profile closely related to the endemic strain; lanes 2, 7 and 8 MRSA profile possibly related to the endemic strain; lane 6, profile A, endemic strain. MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; PFGE = pulsed-field gel electrophoresis.

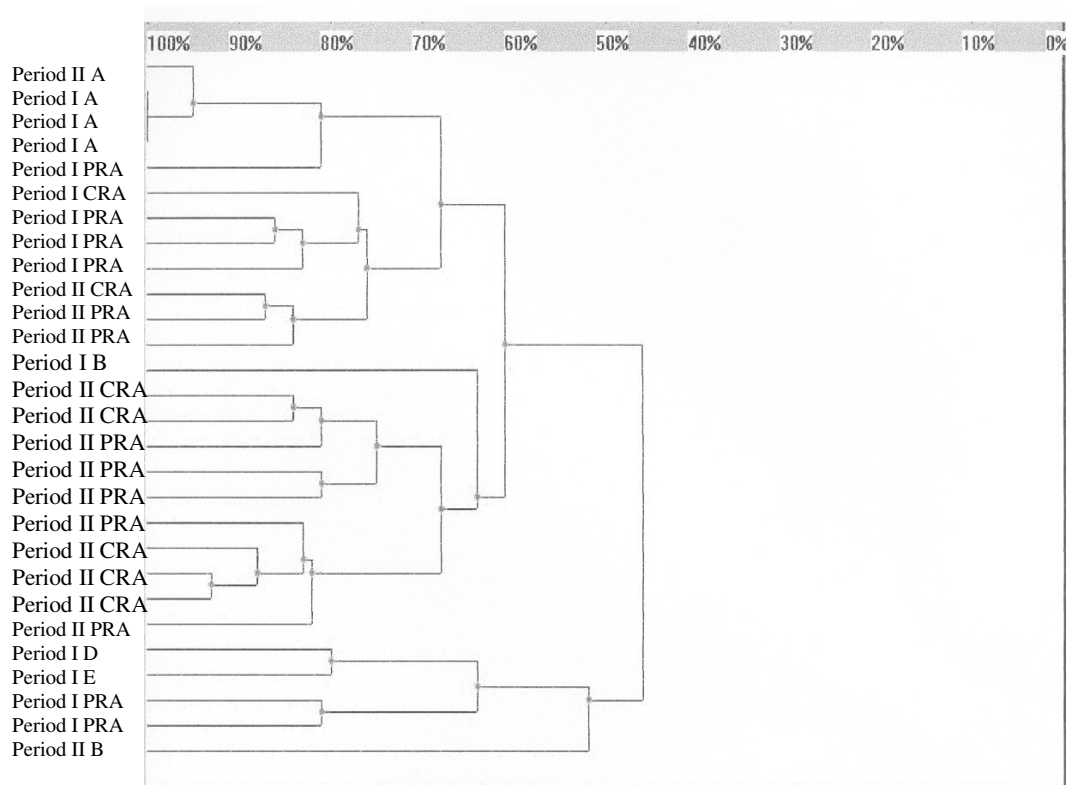


Figure 3. Dendrogram of the MRSA strains detected by PFGE during periods I and II, and profiles A, B, D and E. The values were generated from the Dice coefficient showing the similarity of MRSA strains isolated from April 1991 to February 1993 (period I) and from May 1995 to August 2001 (period II). CRA = closely-related to profile A; MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; PFGE = pulsed-field gel electrophoresis; PRA = possibly-related to profile A.

Discussion

MRSA is recognized as a highly transmissible pathogen causing infection or colonization in hospitalized patients which persists over time in the hospital setting (31). In the present study, the molecular epidemiology of hospital infection caused by MRSA showed that an endemic strain, profile A, was present in a university hospital for 10 years. During period I (1991–1993), 73% of the MRSA were derived from the same clone. However, closely similar and possibly related strains were also recognized and four unrelated profiles were detected during period I. During period II (1995–2001), the same endemic profile A strain accounted for 68.8% of the isolates genotyped. However, the number of similar strains probably related to the MRSA endemic profile A increased and only one unrelated strain was detected during period II.

These results suggest that the adaptability of endemic profile A in our hospital was high and prolonged. Endemic profile A was first detected in 1993 and Sader et al. (14) soon demonstrated the dissemination of this strain among hospitals in the city of São Paulo. Texeira et al. (32) analyzed MRSA strains from different geographic areas in Brazil and identified the clonal dissemination of this endemic profile A in hospital from different parts of the country. All of these studies were performed with MRSA strains obtained during a limited period of time. Our study consisted of two periods within a 10-year survey and showed the ability of this endemic strain to persist for long periods of time in our hospital and the disappearance of some clones that were present during period I. Only closely similar and possibly related strains were detected during period II, even though the endemic strain was still the most prevalent strain causing hospital infections.

However, it has not been possible to determine why only the endemic strain and its derived clones remained in the hospital. The epidemiologic typing of MRSA strains was particularly helpful, showing that most strains were derived from relatively few clones (15,31,33).

Computer analysis of the endemic profile A identified in period I and profile A from period II showed 96% of similarity and they were considered to be the same profile A originating from the common MRSA clone widely recognized in Sao Paulo and other Brazilian hospitals (14,18,34).

A recent study demonstrated a low mutation rate among MRSA strains during a hospital outbreak (1995-2001), leading to a better understanding of the significance and spreading of MRSA in the hospitals. The study suggested the persistence of some MRSA strains as well as the rapid turnover of MRSA in large teaching hospitals and in a general University Hospital of tertiary reference (5).

Previous studies have shown the inter-hospital clonal dissemination of MRSA strains (4,35-37) and have demonstrated that once an endemic MRSA strain is introduced into a hospital, it is very difficult to eradicate it, with a consequent increased incidence of nosocomial MRSA infections (36).

Pulsed-field gel electrophoresis is a good method of high reproducibility and resolving power for epidemiologic differentiation of MRSA isolates (38). The present results demonstrate the potential utility of pulsed-field gel electrophoresis in the epidemiological analysis of the strains. However, it is a slow and time-consuming procedure that requires specifically trained personnel and sophisticated equipment (39,40). The ability of pulsed-field gel electrophoresis to differentiate MRSA strains makes it one of the most appropriate

typing methods for investigating the molecular epidemiology of nosocomial MRSA infection (3,4,19,40.

Although it has not been possible to elucidate why only the endemic profile A strain and its derived clones remained in our hospital, we suggest that low adherence to infection control, such as hand hygiene and environmental cleaning might play an important role. Further studies on the virulence and adherence factors of MRSA profile A in addition to controlled epidemiology studies involving infection control practices can lead to a better understanding of the molecular epidemiology of MRSA infections in our hospital.

Acknowledgments

We are grateful to Mr. Guaracy Ribeiro da Silva for collaboration with the microbiology studies.

References

1. Fluckiger U & Widmer AF (1999). Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Chemotherapy*, 45: 121-134.
2. Deplano A, Schuermans A, Van Eldere J et al. (2000). Multicenter evaluation of epidemiological typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains by repetitive-element PCR analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 3527-3533.
3. Stranden A, Frei R & Widmer AF (2003). Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Can PCR replace pulsed-field gel electrophoresis? *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 3181-3186.
4. Wang JT, Chen-Chun Y, Yang TL & Chang CS (2002). Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of methicillin-

resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 42: 199-203.

5. Tambic A, Power EGM, Talsania H, Anthony RM & French GL (1997). Analysis of an outbreak of non phage-typeable methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by using a randomly amplified polymorphic DNA assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 3092-3097.

6. Conterno LO, Wey SB & Castello A (1998). Risk factors for mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 19: 32-37.

7. Pujol M, Penã C, Pallares R, Ayats J, Arisa J & Gudiol F (1996). Risk factors for nosocomial bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 13: 96-102.

8. Archer GL & Niemeyer DM (1998). Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in *Staphylococci*. *Trends in Microbiology*, 2: 343-347.

9. Witte W, Kresken M, Braulke C & Cuny C (1997). Increasing incidence and widespread dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitals in central Europe, with special reference to German hospitals. *Clinical Microbiology and Infection*, 3: 414-422.

10. Corso A, Santos SI, Aires de Souza M, Rossi A & Lencastre H (1998). Spread of a methicillin-resistant and multiresistant epidemic clone of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, 4: 179-184.

11. Alfizah H, Norazah A, Nordiah AJ & Lim VK (2002). DNA fingerprinting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in a teaching hospital in Malaysia. *Medical Journal of Malaysia*, 57: 319-328.

12. Sola C, Gribaudo G, Vindel A, Patrino L & Bocco JL (2002). Identification of a novel methicillin-resistant *Staphylococcus*

aureus epidemic clone in Cordoba, Argentina, involved in nosocomial infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 1427-1435.

13. Melter O, Aires de Sousa M, Urbaskova P, Jakubu V, Zemlickova H & Lencastre H (2003). Update on the major clonal types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Czech Republic. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 4998-5005.

14. Sader HS, Pignatari AC, Hollis RJ & Jones RN (1994). Evaluation of inter-hospital spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in São Paulo using pulsed-field gel electrophoresis of chromosomal DNA. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 15: 320-323.

15. Santos Filho L, Sader H, Bortolotto VI, Gontijo Filho PP & Pignatari AC (1996). Analysis of the clonal diversity of *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant strains isolated at João Pessoa, State of Paraíba, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91: 101-105.

16. Moretti-Branchini ML (1998). Aplicação de métodos de tipagem molecular na investigação de surtos intra-hospitalares. "Livre-docência" Thesis, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

17. Pottinger JM, Herwaldt LA & Peri TM (1999). Basics of surveillance: an overview. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 18: 513-527.

18. Loureiro BA, De Moraes BA, Quadra MRR, Pinheiro GS, Suffys PN & Asensi MD (2000). Molecular epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from newborns in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95: 777-782.

19. Blanc DS, Struelens MJ, Deplano A, Hauser PM, Petgnat C & Francioli P (2001). Epidemiological validation of pulsed field gel electrophoresis patterns for Methicillin-resistant

Staphylococcus aureus. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 3442-3445.

20. Tenover FC & Gaynes RP (2000). The epidemiology of *Staphylococcus* infection. In: Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA & Rood JL (Editors), *Gram-Positive Pathogens*. American Society for Microbiology, Washington, DC.

21. Schmitz FJM, Steiert HV, Tichy B, Hofmann J, Verhoef HP, Heinz K, Köhrer T & Jones ME (1998). Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Düsseldorf by six genotypic methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 47: 341-351.

22. Montesianos I, Salido E, Delgado T, Cuervo M & Sierra A (2002). Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis at a university hospital and comparison with antibiotyping and protein A and coagulase gene polymorphisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 921-925.

23. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH & Swaminathan B (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 2233-2239.

24. Barbier N, Saulnier P, Chachaty E, Dumontier S & Remont A (1996). Random amplified polymorphic DNA typing versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of vancomycin-resistant enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 34: 1096-1099.

25. Olive M & Bean P (1999). Principles and application of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 1661-1669.

26. Fujino T, Sekiguchi JI, Kawana A et al. (2003). Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a

Tokyo hospital in 2002. *Journal of Infectious Diseases*, 55: 210-213.

27. Tenover FC, Arbeit RD & Goering RV (1997). How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 18: 426-439.

28. Garner JS, Jarvis W, Emori TG, Horan, TC & Hughes JM (1988). CDC definitions for nosocomial infections. *American Journal of Infection Control*, 16: 128-140.

29. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC & Turck M (1996). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45: 493-496.

30. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (1999). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Ninth Informational Supplement M100-S9.

31. Aires De Sousa M, Crisostomo MI, Santos Sanches I, Wu JS, Fuzhong J, Tomasz A & De Lencastre H (2003). Frequent recovery of a single clonal type of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* from patients in two hospitals in Taiwan and China. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 159-163.

32. Teixeira L, Resende CA, Ormonde LR, Rosenbaum R, Figueiredo AMS, Lencastre H & Tomasz A (1995). Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 2400-2404.

33. Tambic A, Power EGM, Tambic T, Snur I & French GL (1999). Epidemiological analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Zagreb trauma hospital using a randomly amplified polymorphic DNA-typing method. *Journal of Clinical Microbiology*, 18: 335-340.

34. Miragaia M, Couto I, Pereira Sandro FF, Sandro FF, Kristinsson KG, Westh H, Jens O, Carriço J, Almeida J, Santos-

- Sanches I & Lencastre H (2003). Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*: evidence of geographic dissemination (2002). *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 430-438.
35. Boyce JM (1996). Treatment and control of colonization in the prevention of nosocomial infections. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 17: 256-261.
36. Salmenlinna S & Vuopio-Varkila J (2001). Recognition of two groups of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains based on epidemiology, antimicrobial susceptibility, hypervariable-region type, and ribotype in Finland. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 2243-2247.
37. El-Din SAS, El-Shafey EI, Mohamad R, El-Hadidy MR, El-Din AB, El-Hadidy MM & ZAGHLOUL HA (2003). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a problem in the burns unit. *Egyptian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery*, 27: 1-10.
38. Walker J, Borrow R, Goering RV, Egerton S, Fox A & Oppenheim BA (1999). Subtyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the North-West of England: a comparison of standardized pulsed-field gel electrophoresis with bacteriophage typing including an inter-laboratory reproducibility study. *Journal of Medical Microbiology*, 48: 297-301.
39. Waller TMA (2000). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* typing methods: which should be international standard? *Journal of Hospital Infection*, 44: 160-172.
40. McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK & Tenover FC (2003). Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 5113-5120.