

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

Juliana de Oliveira Rosa

DETECÇÃO DO GENE *mecA* EM ESTAFILOCOCOS COAGULASE  
NEGATIVA RESISTENTES A OXACILINA ISOLADOS DA SALIVA DE  
PROFISSIONAIS DA SAÚDE DE UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabiana Cristina Pimenta

Co-orientador: Prof. Dr. Cleômenes Reis

Goiânia

2008

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

Juliana de Oliveira Rosa

DETECÇÃO DO GENE *mecA* EM ESTAFILOCOCOS COAGULASE  
NEGATIVA RESISTENTES A OXACILINA ISOLADOS DA SALIVA DE  
PROFISSIONAIS DA SAÚDE DE UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação  
em Medicina Tropical do Instituto de Patologia Tropical  
e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, como  
requisito parcial para obtenção do título de Mestre na  
área de concentração em Microbiologia

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabiana Cristina Pimenta

Co-orientador: Prof. Dr. Cleômenes Reis

Goiânia

2008

“Porque dele, e por meio dele, e para Ele são todas as coisas. A Ele, pois, a glória eternamente. Amém!”

Rm 11:36

Aos meus amados pais Carlos e Cida,  
a meu querido irmão Danilo e ao meu namorado  
Ademilson pelo amor, carinho, apoio e  
compreensão em todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por me guiar em todas as decisões, por mudar minha história, por ser presença constante na minha vida, por me salvar e me guardar.

Aos meus pais, Prof Ms Benedito Carlos Rosa e Aparecida Maria de Oliveira Rosa, meus exemplos de vida e porto seguro, por todo incentivo, amor, compreensão, a meu irmão Danilo Carlos com quem sempre posso contar, a minha avó Antônia pelo apoio nos momentos mais difíceis e ao meu namorado Ademilson pelo carinho e atenção, por entender minha ausência e sempre me ajudar nas atividades práticas e, principalmente por tornarem meus dias mais felizes.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fabiana Cristina Pimenta, por me adotar como orientanda, pelos ensinamentos que contribuíram para o crescimento da minha vida profissional e pessoal, por ter aceitado a me conduzir nesse grande desafio. Pela paciência, generosidade e sua dedicação ao ideal de ensinar, desempenhando seu papel de maneira extremamente competente e carinhosa. Pessoa que tenho enorme admiração e gratidão.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Cleômenes Reis, por ter acreditado no meu potencial. Pelas sugestões que muito contribuíram para essa dissertação, principalmente as que foram proferidas na qualificação. Por compartilhar seus conhecimentos e experiências. Pela amizade e momentos de risos e descontração, que tornavam meus dias mais leves.

Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia Médica: Diana Christina Gonçalves, Ana Beatriz Mori, Laurine Lacerda, Denise Gonçalves de Oliveira, Juliane A. de Lima, Ana Cláudia Alves de Oliveira, Marina Eidt, Cristyane Gonçalves Oliveira, Josiene Moreira dos Santos, Silvana Santiago, Daniella Vilela Lima, Wesley Rogério Oliveira, Leda Maria Valadão, Luciana Oliveira, pelos conhecimentos compartilhados, auxílio e apoio na realização das atividades práticas, principalmente no momento que mais precisei. Tenho por vocês uma enorme gratidão.

Ao Prof. Dr. André Kipnis por compartilhar seus conhecimentos na área de biologia molecular. Por me orientar e treinar para desenvolver a parte molecular do trabalho, e ceder gentilmente a padronização da caracterização do gene *mecA*. Pessoa que tenho imenso respeito.

Aos professores do mestrado por compartilhar conhecimento e experiências.

A direção do Hospital de Urgências de Aparecida de Goiânia e amigos do Laboratório de Análises Clínicas e Agência Transfusional pelo incentivo, apoio e por entender meus momentos de ausência.

A minha amiga Prof<sup>a</sup> Ms. Aline Garcia Kozlowski pelo apoio e ajuda nas atividades práticas, companheirismo e amizade cultivados desde a graduação.

Ao programa de Pós-graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Goiás pela oportunidade e a Capes pela concessão da bolsa de estudos.

A Prof<sup>a</sup> Elucir Gir, Josely Pinto de Moura e Prof<sup>a</sup> Marinésia Aparecida Prado e Palos pelo projeto colaborativo maior, intitulado: “*Staphylococcus* metilina resistentes em profissionais de saúde em hospitais públicos de três estados brasileiros e as interfaces com as infecções nosocomiais” do qual foram obtidas as amostras para realização do estudo. E a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marinésia Aparecida Prado Palos e a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Megmar Aparecida dos Santos Carneiro pelas importantes sugestões na qualificação.

## SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	ix
Lista de Figuras.....	x
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	xi
Resumo.....	xii
Abstrat.....	xiii
<b>1. Introdução.....</b>	<b>15</b>
1.1. Características dos <i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativa.....	19
1.2. Resistência dos <i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativa.....	22
-1.2.1 Detecção da Resistência à oxacilina em <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa.....	23
-1.2.2 Aspectos epidemiológicos de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa resistentes a oxacilina.....	25
1.3. Identificação de <i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativa.....	26
<b>2.Objetivos .....</b>	<b>30</b>
<b>3. Material e Métodos.....</b>	<b>32</b>
3.1. Área e População de Estudo .....	32
3.2. Procedimentos Laboratoriais .....	33
-3.2.1. Isolamento e Identificação Presuntiva dos Estafilococos .....	33
-3.2.2 Prova da Catalase .....	34
-3.2.3. Prova da Coagulase .....	34
-3.2.4. Endonuclease Termoestável .....	34
-3.2.5. Produção de Lecitinase .....	35
-3.2.6. Produção de Urease .....	35
-3.2.7. Produção de Acetoína – Voges-Proskauer (VP) .....	35

-3.2.8. Fermentação de Carboidratos .....	36
-3.2.9. Teste de Suscetibilidade a Bacitracina, Novobiocina e Polimixina .....	36
-3.2.10. Descarboxilação da Ornitina .....	36
-3.2.11. Teste de Suscetibilidade: Disco de Difusão .....	37
-3.2.12. Teste de Triagem em Agar Oxacilina .....	37
3.3. Detecção do Gene <i>mecA</i> .....	37
-3.3.1. Extração do DNA Cromossomal .....	37
-3.3.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	38
<b>4. Resultados, Discussão e Conclusões .....</b>	<b>40</b>
<b>5. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>42</b>
<b>6. Artigo Científico.....</b>	<b>54</b>
<b>7. Anexos.....</b>	<b>79</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Identificação e suscetibilidade a oxacilina, cefoxitina, vancomicina e mupirocina de 100 ECN isolados da saliva de profissionais da saúde .....	66
Tabela 2- Distribuição da detecção de resistência a oxacilina por diferentes métodos em ECN isolados da saliva de profissionais da saúde.....	67
Tabela 3- Perfil de suscetibilidade e detecção do gene <i>mecA</i> em ECN isolados da saliva de profissionais da saúde .....	68

## LISTA DE FIGURA

Figura 1 – Distribuição das espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa isoladas da saliva de profissionais da saúde de um hospital universitário.....	69
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{L}$  – microlitro

ATCC – *American Type Culture Colection*

CIM – concentração inibitória mínima

CTAB – brometo de cetiltrimetilamônio

CNS - coagulase negative staphylococci

DNA – ácido desoxirribonucléico

DNase – desoxirribonuclease

ECN – *Staphylococcus* coagulase negativa

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

HCl – ácido clorídrico

$\text{MgCl}_2$  – cloreto de magnésio

MRSA- *Staphylococcus aureus* meticilina (oxacilina) resistente

NaCl – cloreto de sódio

PBP – proteína ligadora de penicilina

PCR – reação em cadeia da polimerase

PFGE – eletroforese em gel de campo pulsado

PIA – adesina polissacarídica intercelular

S. – *Staphylococcus*

SDS – dodecil sulfato de sódio

TGase – transglutaminase

TPase – transpeptidase

Tris – trizima base

ufc - unidade formadora de colônia

UTI – unidade de terapia intensiva

## RESUMO

Estafilococos coagulase negativa (ECN) fazem parte da microbiota autóctone humana e animal, embora possam causar infecções. Profissionais da saúde podem ser portadores de inúmeros microrganismos virulentos entre eles os ECN resistentes a oxacilina que podem ser disseminados por esses profissionais. O estudo teve como objetivo identificar espécies de ECN isolados da saliva de profissionais da saúde, de uma instituição de saúde de grande porte em Riberão Preto no estado de São Paulo, determinar o perfil de resistência à oxacilina e detectar o gene *mecA*. Foram avaliados 100 ECN, e através de testes bioquímicos 41 estafilococos foram identificados como *S. epidermidis*, 25 *S. saprophyticus*, 18 *S. haemolyticus*, 8 *S. cohnii*, 4 *S. lugdunenses*, 3 *S. capitis* e um *S. simulans*. Trinta e dois por cento apresentaram resistência “in vitro” a oxacilina, 84,4% a mupirocina, 43,7% a cefoxitina, e todos suscetíveis a vancomicina. Os ECN resistentes a oxacilina, detectados pelo teste de disco difusão, foram cultivados no agar triagem oxacilina (6µg) suplementado com cloreto de sódio e a detecção do gene *mecA* foi realizada pela técnica de PCR. Dos 32 ECN resistentes a oxacilina, 93,7% desenvolveram no agar oxacilina e o gene *mecA* foi detectado em 75,0% das amostras analisadas. Vale ressaltar que este estudo é pioneiro em mostrar a presença do gene *mecA* em ECN isolados da saliva de profissionais da saúde saudáveis. Uma maior atenção deve ser dada na identificação das espécies de ECN, e na caracterização da resistência desse grupo de microrganismos, uma vez que os profissionais da saúde podem representar um reservatório de ECN resistentes.

Palavras-chave: Estafilococos coagulase negativa, profissional da saúde, oxacilina, gene *mecA*

## ABSTRAT

Coagulase negative staphylococci (CNS) is in human and animal microbiota, but may cause with infections with significant morbidity and mortality rates. Healthy care workers may be carriers of many microorganisms and spread resistant ECN in the hospital. This study aimed to identify the CNS species isolated from healthy care workers saliva, establish the oxacillin resistance pattern and detect the *mecA* gene in resistant isolates. We evaluated 100 ECN, isolated from the saliva of an institution of professional health of large Riberão Preto in Sao Paulo state. The ECN identification was based on biochemical tests, and 41 were identified as *S. epidermidis*, 25 *S. saprophyticus*, 18 *S. haemolyticus*, 8 *S. cohnii*, 4 *S. lugdunenses*, 3 *S. capitis*, and 1 *S. simulans*. Thirty-two percent were nonsusceptible to oxacillin, 84.4% to mupirocin, 43.7% to ceftiofur, but all were vancomycin susceptible. The oxacillin nonsusceptible ECN, detected by disk diffusion test were grown in agar screening oxacillin (6 µg) supplemented with sodium chloride (4.0%) and submitted to *mecA* detection by the PCR. Of the 32 nonsusceptible oxacillin CNS, 93.7% developed in the oxacillin agar and the *mecA* gene was detected in 75.0%. This is the first report of *mecA* gene presence in CNS isolated from the saliva of healthy care workers. Attention must be given to CNS species identification, as well as the characterization of the nonsusceptible microorganisms, since healthy care workers may represent a reservoir of CNS.

Keywords: Coagulase negative staphylococci, healthy care workers, oxacillin, *mecA* gene

## **1- INTRODUÇÃO**

## **1- Introdução**

A pele e mucosas como a boca e as vias aéreas superiores, representam ambientes favoráveis para a colonização de diversos microrganismos que constituem a microbiota autóctone. Na saliva encontra-se, no mínimo,  $10^8$  microrganismo/mL (ANVISA 2004). Vários gêneros constituem essa microbiota, tais como *Streptococcus*, *Neisseria*, *Bacteroides*, *Actinomyces*, *Treponema*, *Mycoplasma*, *Corynebacterium*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, etc. Dentre eles estão os *Staphylococcus sp*, que geralmente têm uma relação ecológica ou simbiótica com os seus hospedeiros. Porém, podem algumas vezes desencadear infecções, principalmente os *Staphylococcus aureus*, quando há invasão do tecido do hospedeiro, por trauma na barreira de continuidade cutânea, disseminação pela nasofaringe, inoculação através de agulhas, ou implantação de dispositivos médicos (próteses, cateteres, válvulas cardíacas, marcapassos, etc. O grupo dos *Staphylococcus* coagulase negativa (ECN) se apresenta como patógeno oportunista emergente, e de grande importância na área médica, especialmente em pacientes hospitalizados, imunocomprometidos, prematuros e com biomaterial implantado (Kremer et al. 2001, Heikens et al. 2005).

Os principais sítios colonizados pelos *Staphylococcus* coagulase negativa são a boca, nariz, nasofaringe, orelha, axila, perna, braço, região inguinal, períneo e vagina. Indivíduos sadios são colonizados intermitentemente por *Staphylococcus sp* desde o nascimento. Entretanto, podem provocar infecções letais devido aos seus fatores de virulência ou pela resistência a diversos antimicrobianos (ANVISA 2004). Alguns indivíduos como os diabéticos dependentes de insulina, aqueles submetidos a tratamentos dialíticos, portadores de doenças de pele descamativas, imunossuprimidos, dentre outros, podem apresentar uma maior concentração desses microrganismos, devido alterações nos sistemas de defesa. Como ECN apresenta perfil oportunista, nessas situações provocam infecções nos sítios primários da colonização, mas também podem se disseminar, e estão associados às infecções hospitalares, provocando infecções leves ou moderadas e, às vezes, infecções graves como bacteremias e septicemias (Kremer et al. 2001, Shankar et al. 2001, Huang et al. 2003, Krause et al. 2003, Altoparlak et al. 2004).

Os profissionais da saúde podem ser portadores de inúmeros microrganismos patogênicos, e conseqüentemente ser responsáveis pela disseminação de *Staphylococcus* coagulase negativa resistentes no ambiente hospitalar. Visto que, a permanência no hospital e o contato com os pacientes, associados à falta de adesão às medidas de precaução-padrão fazem com que esses profissionais fiquem vulneráveis à colonização por microrganismos virulentos, colocando-os na condição de portadores e disseminadores desses microrganismos. Desta forma podem colaborar para o risco e para a ocorrência de surtos graves, que muitas vezes, comprometem a saúde do cliente e da própria comunidade hospitalar (Prado-Palos, 2006).

Esses ECN podem ser resistentes aos antimicrobianos de largo espectro e estão presentes especialmente na pele e nasofaringe. São veiculados por contato direto, fômites, gotículas dentre outros. As infecções estafilocócicas poderão ocorrer em sítios com traumas, escoriações, picadas de insetos, etc (Higuchi et al. 2007, Shittu et al. 2006).

Investigações sobre a correlação dos ECN que colonizam sítios anatômicos do paciente com aqueles que estavam causando uma subsequente bacteremia mostraram a identidade dos isolados. Krause et al. (2003) relataram a existência de similaridade dos ECN isolados na cultura de sangue ou de cateter de pacientes hospitalizados, com os recuperados do mesmo paciente em mucosas de orofaringe, orelha, axila, braço e perna. Em pacientes submetidos a transplante de medula óssea, os ECN eram os patógenos mais freqüentes em cultura de sangue (39 de 64 bacteremias), e a maioria dos isolados foram recuperados da sua própria orofaringe antes da bacteremia (Boisson et al. 2002). Análises pela técnica da eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) de ECN que colonizavam a pele, mucosa, e sangue de 20 pacientes com quadro clínico de bacteremia mostraram que 13 isolados da corrente sanguínea se relacionavam com os recuperados da sua mucosa nasal (Costa et al. 2004, Higuchi et al. 2007).

Os *Staphylococcus* coagulase negativa são considerados como uma das principais causas de sepsis neonatal em unidades de cuidado intensivo (de Silva et al. 2001, Frigatto et al. 2005). Aproximadamente um entre seis neonatos nascidos com baixo peso (<1500g) desenvolve um episódio de bacteremia causado por ECN, e esse evento está associado com o aumento significativo da mortalidade e morbidade durante a permanência no hospital (de Silva et al. 2001, Cunha et al. 2002, Huang et al. 2003).

Os ECN podem ainda causar endocardites, osteomielites, infecção em ferida, otite média, infecções oculares, infecções nas vias urinárias, meningites, pneumonia, infecções em válvulas cardíacas, próteses e cateteres, infecções em articulações protéticas, válvulas de desvio do sistema nervoso central e no tecido subcutâneo, além de infecções do trato urinário principalmente em mulheres jovens sexualmente ativas, e uma variedade de infecções pós-operatórias dentre outras enfermidades (von Eiff et al. 2002). ECN apresentam um papel importante devido à emergência das infecções em pacientes debilitados. Sendo considerados agentes causais de infecções associadas à imunossupressão e são responsáveis por bacteremias em pacientes hospitalizados. Mundialmente, bacteremias causadas por ECN representam aproximadamente 7–9% das bacteremias informadas pelo Serviço de Laboratório de Saúde Pública (Livermore et al. 2000).

Pesquisadores preocupados com a disseminação de ECN, principalmente em ambiente hospitalar, realizaram vários estudos avaliando o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos. Verificaram que essas bactérias estão apresentando resistência a vários antimicrobianos, inclusive aos de largo espectro (Boisson et al. 2002, Agvald-Ohman et al. 2004, Chandran and Rennie 2005, Mamishi et al. 2005, Monsen et al. 2005, Novotna et al. 2005, Palazzo et al. 2005, Coia et al. 2006, Nascimento et al. 2006, Nunes et al. 2006, Higuchi et al. 2007). Apesar de pouco freqüente, no Brasil foram descritos casos de infecções causadas por *Staphylococcus* coagulase negativa resistentes a vancomicina. Foram detectados 4 ECN isolados de profissionais da saúde: 2 *S. capitis*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* (Palazzo et al 2005, Nunes et al. 2006).

Com relação às infecções associadas à implantação de dispositivos, a virulência dos ECN resulta principalmente da habilidade de colonizar a superfície dos materiais, formando um biofilme consistente, aumentando assim o seu potencial patogênico (von Eiff et al. 2002, Sakarya et al. 2004).

Biofilmes são formados por um material extracelular amorfo (*slime*) que consiste da complexa mistura de vários açúcares constituintes da parede celular e proteínas extracelulares. Seu principal componente é ácido teicóico. Plasma e proteínas do tecido conectivo como fibronectina, fibrinogênio, vitronectina, trombospondina, laminina,

colágeno e o fator Von Willebrand têm sido descritos por estarem envolvidos nesse processo (von Eiff et al. 1999, von Eiff et al. 2002).

O primeiro passo na formação do biofilme envolve a rápida aderência e persistência da bactéria na superfície do corpo estranho. Um componente polissacarídeo específico presente no *slime* amorfo importante nesta fase ficou conhecido como PSA – *polissacharidade capsular adhesin*, pelo fato deste polissacarídeo fazer parte da cápsula bacteriana e mediar a aderência inicial da bactéria à superfície do polímero (Huebner et al. 1999).

O segundo passo envolve a proliferação e aderência intracelular. Outro polissacarídeo que está envolvido nesse estágio da formação do biofilme é o PIA – *polissacharidae intercelular adhesin*. Alguns pesquisadores acreditam que o PIA está unicamente envolvido no acúmulo de estafilococos coagulase negativa nas superfícies e, é distinto do PSA (Schulin et al. 2001).

Após o estabelecimento da camada de *slime*, células planctônicas não aderentes são capazes de evadir e se disseminar para novos sítios, colonizando e formando novos biofilmes (Christensen et al. 1994).

O biofilme confere proteção aos microrganismos contra os mecanismos de defesa imune do hospedeiro e de agentes antimicrobianos, diretamente pelo bloqueio da penetração desses na célula bacteriana ou indiretamente por mantê-la em um inativo estado de repouso. Por estas razões, a formação do biofilme é considerada o principal fator de virulência dos ECN e as infecções mais importantes causadas por estes microrganismos estão associadas aos dispositivos implantados (Cafisso 2004, Michelim 2005).

Com relação às medidas de controle dos microrganismos resistentes, entre eles os ECN, a literatura faz referência à vigilância prospectiva microbiológica para identificar pacientes colonizados, acrescentando-se aqui os profissionais de saúde, o isolamento dos clientes colonizados ou infectados, bem como o afastamento temporário desse profissional de suas atividades, as precauções-padrão, a higiene das mãos, a limpeza cuidadosa do ambiente, o controle da prescrição dos antimicrobianos de amplo espectro e o tratamento dos pacientes colonizados e dos profissionais de saúde envolvidos nesses episódios (Boyce 2001, CDC 2002b, Coia et al. 2006, Loveday et al. 2006, Prado-Palos 2006).

A implementação dessas medidas se justificam, porque os ECN estão associados a várias infecções com importantes índices de taxas de morbidade, mortalidade e elevado custo. Portanto, estabelecer estratégias para o seu controle, como identificar a fonte, perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e a sua possível via de transmissão é essencial. Caracterizar o fenótipo e genótipo desse grupo microbiano é de importância crítica para estabelecer medidas de prevenção e estratégias no controle das infecções (Costa et al. 2004).

### **1.1 Caracterização dos *Staphylococcus* Coagulase Negativa**

Os estafilococos são cocos Gram positivos, com 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro, membros da família *Micrococcaceae*, que se apresentam isolados, aos pares, em tetrade, pequenas cadeias e cachos irregulares. São imóveis, não esporulados, produtores de catalase e a maioria das espécies é anaeróbia facultativa. Dentre as bactérias não esporuladas, os estafilococos são os mais resistentes ao meio ambiente e podem sobreviver por meses em amostras clínicas secas, são relativamente resistentes ao calor e toleram elevadas concentrações de cloreto de sódio (Kloos and Bannerman 1995).

O gênero *Staphylococcus* é dividido em várias espécies e subespécies e a maioria participa da microbiota endógena de humanos e animais. Essas espécies podem ser divididas em dois grandes grupos de acordo com a produção de coagulase; e nas análises de identificação laboratorial as espécies coagulase positivas são diferenciadas das coagulase negativas pela sua capacidade de coagular plasma de coelho ou humano. O principal representante das espécies produtoras de coagulase é o *Staphylococcus aureus* (Heikens et al. 2005).

O segundo grupo, conhecido como estafilococos coagulase negativa (ECN) estão amplamente distribuídos na natureza, e são encontrados no solo, água, plantas e na microbiota do trato intestinal, pele e nas mucosas de humanos e animais. Entre as infecções causadas por esses microrganismos, destacam-se: infecções de trato respiratório, vias urinárias, sítio cirúrgico, principalmente no ambiente hospitalar (von Eiff et al. 2002). Em infecções de corrente circulatória de origem nosocomial em pacientes debilitados, especialmente em unidades de cuidado intensiva, os ECN podem ser isolados em até 76% das hemoculturas (Huang et al. 2003).

Durante a década de 50, o grupo dos ECN foram classificados como *Staphylococcus albus*, assim nomeados devido à coloração branca de suas colônias nas placas de ágar, em contraste com a cor amarela dos *S. aureus*. Embora fossem considerados microrganismos não patogênicos, bacteremias causadas por esses microrganismos começaram a ser descritas. Posteriormente, relatos utilizaram a denominação de *Staphylococcus epidermidis* de forma genérica, substituindo o termo *S. albus*. *Staphylococcus saprophyticus* também foi usado para designar o único ECN com o status de espécie separada devido à sua freqüente associação com infecções do trato urinário (Patrick et al, 1990).

Em 1975, Kloos e Schleifer ampliaram o esquema de classificação dos ECN pela inclusão de sete novas espécies aos já conhecidos *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*. No entanto, a importância clínica desses microrganismos não parecia justificar o esforço taxonômico necessário para reconhecer as novas espécies, mas nos anos 80 esta situação mudou radicalmente, devido ao abrupto aumento das infecções clinicamente significativas causadas pelos ECN. Diferentes painéis de testes bioquímicos (*kits*) para a rápida identificação dessas bactérias foram desenvolvidos de acordo com o esquema de identificação de Kloos e Schleifer (Christensen et al. 1994).

Trinta e oito espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa são conhecidas, sendo que o principal representante é o *S. epidermidis*, agente de infecções de cateteres e próteses, freqüentemente isolado em hemoculturas e identificado como uma das causas principais de infecções nosocomiais associadas aos biofilmes. Os *S. saprophyticus* apresentam-se como um importante agente de infecção urinária em mulheres jovens, enquanto que vários isolados de *Staphylococcus haemolyticus* são resistentes a diversos antimicrobianos, e podem ser confundidos com o *S. aureus*, pois apresentam hemólise na placa de ágar sangue de carneiro. Além desses são espécies importantes no laboratório clínico: *S. lugdunensis*, *S. schleiferi*, *S. sciuri*, *S. lentus*, *S. caseolyticus*, *S. hycus*, *S. chromogenes*, *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. carnosus*, *S. simulans*, *S. cohnii*, *S. xylosus*, *S. gallinarium*, *S. kloosii*, *S. equorum*, *S. arletta*, *S. capitis*, *S. warnei*, *S. saccharolyticus*, *S. caprae*, *S. auricularis* (ANVISA 2004, Sakai et al. 2004).

Os ECN são freqüentemente isolados de amostras clínicas nos laboratórios de microbiologia, mas um dos grandes desafios para os profissionais é estabelecer a

relevância clínica do isolamento, uma vez que fazem parte da microbiota e podem representar uma contaminação do espécime. Embora os estafilococos coagulase negativos sejam frequentemente isolados em hemoculturas, eles são clinicamente significantes em menos de 15,0% dos casos (Weinstein et al. 1997). A esse respeito, investigadores têm usado uma variedade de critérios clínicos e laboratoriais para distinguir a contaminação de bacteremia. O diagnóstico de bacteremia tem sido feito com base nos dados clínicos dos pacientes e no isolamento de ECN idênticos em duas ou mais hemoculturas. As culturas em que ocorre o desenvolvimento de múltiplas linhagens ou de espécies de ECN, em associação a outras espécies virulentas, eles são classificadas como contaminantes (Cunha et al. 2002). A espécie mais comumente detectada em hemoculturas tem sido o *S. epidermidis*, representando 60 a 93,0% dos isolados, porém, outras espécies têm sido reportadas (Kloos & Bannerman 1994; Ross et al. 2005).

O estabelecimento de uma infecção e a sobrevivência dos ECN no hospedeiro depende da sua habilidade em invadir o tecido e evadir dos sistemas de defesa. Os estafilococos, em particular *S. aureus*, desenvolveram mecanismos múltiplos, inclusive com produção de várias proteínas extracelulares e enzimas como lipases, proteases, esterases, fosfolipases, hemolisinas e toxinas com propriedades de superantígenos como enterotoxinas, toxinas exfoliativas e a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST -1). Os fatores de virulência presentes nos ECN não estão claramente estabelecidos como nos *S. aureus*. Em *S. epidermidis*, uma metaloprotease extracelular com atividade de elastase foi descrita, e o gene foi clonado e seqüenciado. Relataram também a presença de uma elastase em *S. epidermidis* com capacidade de degradar IgA, IgM, albumina e fibrinogênio. Um segundo gene de lipase também foi caracterizado em *S. epidermidis* (von Eiff et al. 2002, Huang et al. 2003).

De forma similar aos *Staphylococcus aureus*, foi verificado em ECN isolados de ovelhas e cabras saudáveis a produção de enterotoxinas estafilocócicas responsáveis por erupções e intoxicação gastrointestinal. Os ECN também foram isolados do nariz, garganta, e feridas de trabalhadores de uma fábrica de carne com capacidade de produzir enterotoxina estafilocócica (Akiyama et al. 2000).

As manifestações clínicas da maioria das infecções por ECN diferem das infecções causadas por *S. aureus*. Normalmente, a clínica é sutil e não específica, e o curso clínico é

lento, subagudo sem sinais típicos da infecção. Entretanto, a sepsis pode levar a morte, principalmente dos indivíduos imunocomprometidos (von Eiff et al. 2002). O padrão clínico da infecção por *Staphylococcus* coagulase negativa indica que a resposta imune do indivíduo é determinante no processo da infecção. O indivíduo saudável pode estar colonizado, mas o desencadeamento da infecção dependerá do seu estado imunológico (de Silva et al. 2001).

Os cateteres intravasculares representam uma porta de entrada para os ECN, pois o colonizam e podem invadir os tecidos e disseminar para a corrente circulatória. Essa contaminação pode ocorrer por ECN do próprio paciente, do ambiente ou por profissionais da saúde portadores desse microrganismo durante a manipulação do dispositivo. Infecções associadas aos cateteres são uma das causas principais de morbidez e perda do dispositivo e os ECN estão em grande quantidade nas narinas e a prevalência de colonização nasal por ECN produtores de biofilme é bem conhecida (Altoparlak et al. 2004).

## **1.2 Resistência dos *Staphylococcus* Coagulase Negativa**

Os *Staphylococcus* coagulase negativa estão entre os principais microrganismos emergentes como patógenos nosocomiais, que desenvolvem resistência para a maioria dos antimicrobianos disponíveis e são comuns em pacientes hospitalizados. A emergência desse microrganismo limitou o arsenal terapêutico, aumentando o risco de fracasso na terapêutica (Monsen et al. 2005).

Em vários isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa foi detectado o gene *mecA*, que determina a resistência para  $\beta$ -lactâmicos, Em estudos de vigilância em diferentes países da Europa, a taxa de resistência dos ECN a oxacilina está em 70 a 80%, semelhante as que são informadas nos Estados Unidos, Canadá e América Latina (Agvald-Ohman et al. 2004).

Salienta que, os mecanismos responsáveis pela resistência deses microrganismo são idênticos aos que ocorrem nos *S. aureus*. Essa resistência já foi descrita para vários antibióticos, entre eles aminoglicosídeos, as quinolonas, os macrolídeos e as tetraciclínas. A maioria dos isolados nosocomiais de ECN são resistentes às penicilinas (Livermore 2000, Boisson et al. 2002).

Como ECN apresentam certa sensibilidade a glicopeptídeos, esse grupo é recomendado para o tratamento empírico de suas infecções. Entretanto, deve-se atentar para a possibilidade de isolados resistentes a glicopeptídeos devido ao uso indiscriminado. A variabilidade nas atividades autolíticas dos ECN indicam que o fenótipo de heteroresistência e resistência a esses antibióticos é dependente de seu perfil genético. Taxa de resistência a essa classe de antimicrobiano é crescente em países europeus como Reino Unido e França, 5% e 25%, respectivamente. Portanto, os laboratórios clínicos precisam monitorar a heteroresistência e resistência a glicopeptídeos nos ECN .

Muitos dos ECN possuem diversos plasmídeos, alguns dos quais podem ser transferidos por conjugação entre espécies diferentes de ECN ou até mesmo entre ECN e *S. aureus*. Este mecanismo representa uma importante via de transmissão de determinantes de resistência antimicrobiana, especialmente para aminoglicosídeos e  $\beta$ -lactâmicos (Huebner et al. 1999). Quando a infecção esta associada à formação de biofilmes, o sucesso clínico depende da remoção do dispositivo colonizado, como os cateteres (Boisson et al. 2002).

O controle da infecção por ECN é difícil devido a sua multiresistência (von Eiff et al. 2002). Portanto, deve-se compreender seus mecanismos de colonização, transmissão e disseminação para prevenir a transmissão cruzada e subsequente controle das infecções nosocomiais associadas a essas bactérias (Agvald-Ohman et al. 2004).

Uma vez identificado um portador de bactérias multirresistentes, é necessário intervir na cadeia de transmissão destes patógenos. Adotar medidas preventivas como o uso de luvas, máscaras e avental, isolamento adequado do cliente e funcionário específico para sua assistência e a higienização das mãos, são recomendações que devem ser implementadas em todas as instituições de saúde.

### **1.2.1 Detecção da Resistência a oxacilina em *Staphylococcus coagulase negativa***

O mecanismo pelo qual a oxacilina inibe o desenvolvimento dos estafilococos está baseado na inibição da síntese da parede celular pela ligação deste antimicrobiano à proteína ligadora de penicilina (PBP). Estas proteínas possuem atividade bioquímica similar à das serina proteases, pois catalisam a reação de transpeptidase que faz a ligação cruzada dos peptídeoglicanos da parede celular. As quatro principais PBPs são 1, 2, 3 e 4 e

são produzidas tanto por isolados de estafilococos sensíveis como resistentes (Hederstierna-Johnsen et al. 2005).

O gene *mecA* codifica a proteína alterada PBP 2a que está presente no cromossomo, em uma porção de aproximadamente 30 a 50 kb, denominado complexo *mec*, não encontrado em isolados sensíveis de estafilococos, mas presente nos isolados oxacilinas resistentes; é sempre detectado próximo ao *cluster pur-nov-his* no cromossomo dos *S. aureus*. Elementos reguladores que controlam a transcrição do gene *mecA* também presentes são *mecI* e *mecR1* e mais 20 a 45 kb de DNA que está associado ao complexo *mec* (Carbon et al. 2000).

Em 2004, Pinho et al. demonstraram que para ocorrer uma completa expressão da resistência à oxacilina, o gene estrutural da PBP 2 possui função essencial como gene auxiliar. Na ausência de antibiótico, ambos os domínios TPase (transpeptidase) e TGase (transglicosilase) da PBP 2 participam da biossíntese do peptídeoglicano nos estafilococos. Ainda não está claro é se o domínio TPase da PBP 2a (presentes nos isolados oxacilina resistentes) também funciona nas ligações cruzadas do peptídeoglicano na ausência de antibiótico. Quando o antibiótico é adicionado, o domínio TPase da PBP 2 é acilado e não é mais capaz de realizar a ligação cruzada dos peptídeos. No entanto, mostraram que o domínio TGase da PBP 2 mantém-se funcional e coopera com atividade da TPase da PBP 2a adquirida e é realmente essencial para a síntese da parede celular e desenvolvimento bacteriano na presença de antimicrobianos beta-lactâmicos no meio.

A produção de PBP 2a, sendo uma proteína ligadora de penicilina com a característica de baixa afinidade aos antimicrobianos beta-lactâmicos, é, sem dúvida, o principal mecanismo responsável pela resistência à oxacilina, embora outros mecanismos tenham sido descritos, como alteração de PBPs e PBP2 e a hiperprodução de beta-lactamases (Shittu et al. 2006).

Estudos enfatizam a necessidade da detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus coagulase negativa* comprovando assim a resistência a oxacilina. Shittu et al. (2006) e Monsen et al. (2005) detectaram o gene *mecA* em ECN oxacilina resistentes.

A resistência a oxacilina pode ser detectada por diferentes metodologias como disco difusão, E-test, eletroforese de campo pulsado (PFGE) e PCR. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método genotípico rápido, sensível e específico utilizado na

pesquisa de genes previamente conhecidos, porém não é um método viável para os laboratórios clínicos de rotina por apresentar custo elevado e necessitar de espaço físico adequado, equipamentos especiais e profissionais habilitados (Jarlov et al. 1997, Horstkotte et al. 2001).

Porém, esse método é considerado o padrão ouro para a detecção do gene *mecA*, confirmando a resistência dos isolados à oxacilina e por isso é utilizada em vários estudos que analisam a sensibilidade e especificidade de diversos métodos fenotípicos (Louie et al. 2001, Zbinden et al. 2001, Alcaráz et al. 2003, Ferreira et al. 2003, Corso et al. 2004, Caierão et al. 2004).

Em 1991, Murakami e colaboradores utilizaram esta metodologia para a detecção de resistência à oxacilina em isolados de *S. aureus* e ECN. Uma região de 533pb (pares de base) contendo o gene *mecA* foi amplificada utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (5' AAAATCGATGGAAAGGTTGGC) correspondente aos nucleotídeos 1282 a 1303, e o outro (5' AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC) complementar aos nucleotídeos 1793 a 1814. Entre os ECN, as espécies que apresentam o gene *mecA* foram *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. sciuri*, *S. saprophyticus* e *S. caprae*. Em conclusão, os autores consideraram a técnica eficaz na detecção de isolados oxacilina resistentes, incluindo aqueles com resistência heterogênea.

### **1.2.1 Aspectos epidemiológicos de *Staphylococcus coagulase negativa* resistentes a oxacilina**

*Staphylococcus coagulase negativa* resistente a oxacilina são um problema de proporção global. Estudos mostram a prevalência desses microrganismos na Europa, África, Américas e Ásia. Na Itália, por exemplo, 80% dos isolados de ECN são resistentes a oxacilina (Witte, 1999). Em um estudo envolvendo 143 hospitais na Espanha, 67% dos ECN isolados eram oxacilina resistentes e destes 56% foram identificados com *S. epidermidis*, sendo considerada a espécie mais prevalente (Cuevas et al.2002). Em outro estudo na Finlândia a incidência de *S. epidermidis* resistentes a oxacilina elevou de 28% em 1983 para 77% em 1994, de 2,4% em 1973 para 35% nos Estados Unidos e de 1,7% em 1990 para 8,4% em 1995 na Alemanha. De todas as bacteremias causadas por ECN nos EUA 65% são por isolados oxacilina resistentes (Witte, 1999).

Em diferentes regiões da Europa 63,7% dos isolados de ECN são oxacilina resistentes em contraste do *S. aureus* que têm prevalência da resistência para esse antibiótico de 40% (Bouza et al 2004). Dados semelhantes foram evidenciados em estudos no Brasil. Verificaram uma maior prevalência de ECN resistentes à oxacilina, quando comparados com os *S. aureus*. Estes estudos foram realizados em hospitais universitários - Hospital das Clínicas de São Paulo e Escola Paulista de Medicina (Wey et al 1990), e Hospital da Universidade Federal de Uberlândia (Leal 1998). Também no Brasil foi publicado o estudo de Cunha et al. 2002, mostrando que 71,8% dos isolados de ECN em recém-nascidos eram resistentes a oxacilina.

### **1.3 Identificação de *Staphylococcus* Coagulase Negativa**

Durante a última década, considerável progresso na classificação sistemática dos estafilococos e o desenvolvimento de métodos para a identificação do gênero, espécies e subespécies, tem permitido caracterizar a variedade de ECN presentes em amostras clínicas e, assim, serem considerados como agentes etiológicos de uma série de processos infecciosos (Cunha et al. 2004).

Os isolados obtidos a partir de espécimes clínicos devem ser semeados em ágar sangue e após crescimento corados pelo método de Gram, objetivando-se sua pureza e a observação de sua morfologia e coloração específica. Após a confirmação destas características, os isolados são submetidas às provas de catalase e coagulase (Cunha et al. 2002).

Para a família Micrococcaceae (estafilococos) a prova da catalase é geralmente positiva, enquanto que para a família Streptococcaceae (estreptococos) é negativa. Esse teste é importante na identificação da família Micrococcaceae, composta de quatro gêneros: *Planococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus* e *Staphylococcus*.

O gênero *Staphylococcus* é diferenciado do gênero *Micrococcus* com base na prova de oxidação e fermentação da glicose e pela resistência a bacitracina (0,04U), indicada pela ausência de halo de inibição ou formação de halo de até 9 mm (Cunha et al. 2002).

Para a identificação dos *Staphylococcus* coagulase negativa, conforme esquema fenotípico simplificado de provas bioquímicas, o protocolo estabelecido segue critérios e padrões propostos (Kloos and Schleifer 1975, Kloos and Bannerman 1994), os quais preconizam a realização de testes de fermentação de açúcares: xilose, arabinose, sacarose, trealose, manitol, maltose, lactose, xilitol, ribose e frutose, bem como caracterização de hemolisinas, redução de nitrato, urease, ornitina decarboxilase e resistência a novobiocina (Cunha et al. 2002).

Técnicas genotípicas podem ser utilizadas para a caracterização molecular dos ECN. Uma técnica frequentemente utilizada é a reação em cadeia da polimerase (PCR), detectando fragmento da subunidade 16S do rRNA, com detecção dos genes *sodA* e *tuf*. Estes genes são constituintes essenciais do genoma bacteriano e são preferidos nas finalidades diagnósticas (Heikens et al. 2005).

Apesar da relevância das infecções causadas pelos ECN, a caracterização das espécies não é realizada de forma rotineira em laboratórios de microbiologia clínica. O esquema proposto por Kloos e Schleifer (1975) e modificado por Bannerman (2003) é o método usado; porém, é relativamente laborioso, pois são necessários inúmeros testes bioquímicos para a identificação. Na maioria dos serviços de rotina, os testes realizados para a identificação dos estafilococos são baseados nos aspectos morfológicos das colônias, coloração de Gram e produção de coagulase, o que permite apenas classificados estafilococos coagulase negativa (ECN) ou *em S. aureus* (Cunha et al. 2004).

A identificação dos ECN é de grande importância para a associação de espécies com infecções específicas, tendo em vista que alguns ECN além de *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*, têm apresentado virulência e resistência intrínseca a diferentes antimicrobianos, como o *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis* e o *S. schleiferi*. Além que, a interpretação do halo de inibição da oxacilina para *S. epidermidis* é diferente das outras espécies segundo recomendações da CLSI (2006) (Arché et al.1995, Cunha et al. 2002).

Apesar da importância de ECN como causa de infecção hospitalar, a informação relativa ao reservatório, distribuição, e modo de transmissão dentro do hospital não está bem definida. Estudos recentes têm empregado métodos moleculares de tipagem para a caracterização de clones para determinar a similaridade entre os isolados. Entretanto,

estudos adicionais devem ser realizados para melhor compreender os mecanismos de disseminação e resistência dessas bactérias (Monsen et al. 2005).

## **2. OBJETIVOS**

## **2. Objetivos**

1. Identificar as espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa isolados da saliva de profissionais da saúde de um hospital universitário;
2. Determinar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos: oxacilina, cefoxitina, vancomicina, mupirocina dos *Staphylococcus* coagulase negativa;
3. Detectar o gene *mecA* nos *Staphylococcus* coagulase negativa isolados resistentes à oxacilina.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1 Área e População de Estudo**

Os *Staphylococcus* coagulase negativa analisados foram isolados a partir da coleta de amostras de saliva de profissionais da saúde, participantes de um estudo transversal realizado nas unidades de terapia intensiva, clínica médica, clínica cirúrgica e gineco-obstétrica de uma instituição de saúde de grande porte, em Ribeirão Preto no Estado de São Paulo. A pesquisa foi desenvolvida neste local por atender clientes graves, com internação prolongada, em uso de antimicrobianos e submetidos a procedimentos invasivos e quebra da solução de continuidade, entre outros agravos à saúde. Este estudo faz parte de um projeto colaborativo maior, intulado: “*Staphylococcus* metilina resistentes em profissionais de saúde em hospitais públicos de três estados brasileiros e as interfaces com as infecções nosocomiais”, coordenado pela Profa. Elucir Gir, da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, financiado pela FAPESP (Processo 05/58463-0). O projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade São Paulo, para análise e posteriormente foi aprovado.

Os profissionais foram selecionados de acordo com critérios de inclusão: pertencerem a uma das seguintes categorias profissionais: enfermeiro, técnico de enfermagem e auxiliar de enfermagem; estar atuando profissionalmente, no período do estudo em uma das unidades de internação selecionadas, não estar em uso de antimicrobiano ou não tê-lo utilizado nos últimos 30 dias, aquiescer em participar do estudo e mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Vale ressaltar que os participantes identificados como colonizados por estafilococos oxacilina resistentes, serão orientados e encaminhados para assistência em serviço especializado.

O material (saliva) foi coletado por auxiliares de pesquisa, recrutados e devidamente capacitados, no respectivo turno de trabalho. A saliva foi transferida para tubos esterilizados acondicionados em caixas de isopor e enviados para o Laboratório de Bacteriologia do Instituto de Patologia e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás

(IPTSP/UFG), em um período de até 48 horas. A identificação do profissional foi por meio de codificação, mantendo em sigilo a sua identidade.

Foram coletadas 678 amostras de saliva no período de janeiro de 2006 a dezembro de 2007, com isolamento de 100 ECN para o prosseguimento da pesquisa. O tamanho da amostra foi definido pela fórmula de cálculo para amostra finita, considerando  $p=0,5$  da proporção por não ter valor de literatura. O nível de confiança foi de 95,0% (valor crítico  $V=1,96$ ) com margem de erro de 2,0% (Monteiro 2004).

No Laboratório de Bacteriologia (IPTSP/UFG) as amostras foram semeadas em agar manitol e a identificação dos ECN foi realizada por meio de provas bioquímicas. Após a identificação era determinada a sensibilidade antimicrobiana (teste de disco difusão - CLSI 2005) e detecção do gene *mecA* por PCR.

## **3.2 Procedimentos Laboratoriais**

### **3.2.1 Isolamento e Identificação Presuntiva dos Estafilococos**

A saliva foi homogeneizada por um minuto, submetida à diluição decimal em solução salina (0,8%) e semeada, de acordo com Westergrem & Krasse (1978), em placas de Petri contendo o meio de cultura seletivo, agar manitol salgado (Oxoid). O período de incubação foi de 24 a 48 horas a 37°C.

As colônias que desenvolveram foram identificadas segundo a observação das características macroscópicas, quais sejam: colônias redondas pequenas ou médias, lisas, cremosas, que variam a coloração de acinzentada a amarelada e fermentando ou não o manitol (Jawetz et al. 1998).

As colônias características de *Staphylococcus* eram contadas para determinação das unidades formadoras de colônia (ufc) e submetidas à coloração de Gram. Aquelas que apresentaram morfologia microscópica de cocos Gram positivos, com predomínio de cocos agrupados, foram repicadas em caldo e agar cérebro e coração (*Brain Heart Infusion Broth* – BHI/Merck) e incubadas a 37°C, durante 24 horas, e armazenadas para posterior realização das provas bioquímicas e de suscetibilidade antimicrobiana (Koneman et al.

2001). A cultura em caldo foi centrifugada em tubo tipo *eppendorf* e o sedimento ressuspenso em caldo tríplice soja (TSB) adicionado de 20% de glicerol, os quais foram armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A identificação dos *Staphylococcus* coagulase negativa foi baseada em provas bioquímicas de acordo com os protocolos sugeridos por Kloos & Schleifer (1975) e Koneman et al (2001). O controle de qualidade foi realizado com cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* 25923 e 29213, *S.epidermidis* 12228, *S. haemolyticus* 29970 e *S. saprophyticus* 15305.

### **3.2.2 Prova da Catalase**

A prova da catalase foi realizada para diferenciar estafilococos de estreptococos. Sobre uma lâmina limpa, depositou-se uma gota de água oxigenada a 3%. Colocou-se sobre a gota um inóculo proveniente de uma alça de cultivo bacteriano em agar tríplice soja de 24 horas e observou-se a formação de bolhas. Para a família Micrococacea (estafilococos) a prova é geralmente positiva, enquanto que para a família Streptococcacea (estreptococos) é negativa.

### **3.2.3 Prova da Coagulase**

Realizou-se a determinação da produção de coagulase em tubo ou coagulase livre. Os estafilococos foram repicados em agar tríplice soja e incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Com o auxílio de uma alça de platina, um inóculo do cultivo foi transferido para um tubo de ensaio contendo plasma de coelho diluído a 1:5 em solução salina. Os tubos foram incubados a  $37^{\circ}\text{C}$ . Leituras após 2, 4, e 18 a 24 horas foram realizadas e o teste foi considerado positivo quando da formação de um coágulo ou presença de fibrina.

### **3.2.4 Prova da DNase**

Este teste consiste na inoculação de colônias de estafilococos em meio contendo DNA (*DNase test Agar* - Merck) Os isolados foram cultivados em agar tríplice soja a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Com uma alça de platina foi inoculado no Agar DNase, na forma de botão, colônias e as placas incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. O desenvolvimento de uma coloração

rósea ao redor das colônias indicou a positividade da prova, ou seja, bactérias produtoras de DNase.

### **3.2.5 Produção da Lecitinase**

Este teste consiste na verificação da produção de lecitinase pelo microrganismo pela inoculação de colônias de estafilococos em meio contendo gema de ovo - Naito (Ito et al. 1969). Os isolados foram cultivados em agar tríplice soja a 37°C por 24 horas. Com uma alça de platina foi inoculado no Agar Naito, na forma de estrias, colônias e as placas incubadas a 37°C por 24 horas. A formação de um halo de desintegração da lecitina ao redor das colônias indicou a positividade da prova, ou seja, bactérias produtoras de lecitinase.

### **3.2.6 Produção de Urease**

Os microrganismos que produzem a enzima urease hidrolisam a uréia, liberando amônia e alcalinizando o meio (pH > 8,1). Com isso, a coloração do meio de cultivo altera de amarelo para rosa *pink*, indicando que a prova é positiva. A manutenção original do meio significa que a bactéria não produz a enzima urease, portanto a prova é negativa. Os isolados foram cultivados em agar tríplice soja de 37°C por 24 horas e inoculados com uma alça de platina no caldo uréia (Ureia/Caldo – Merck), e as placas incubadas a 37°C por 24 horas. A detecção de uma cor rosa foi indicativa de prova positiva.

### **3.2.7 Produção de Acetoína – Voges-Proskauer (VP)**

O ácido pirúvico, composto formado na degradação da glicose, é metabolizado por diferentes vias. Uma dessas vias resulta na formação de acetoína (acetil-metil-carbinol). Os ECN foram cultivados em agar tríplice soja, a 37°C por 24 horas e inoculados com uma alça de platina no caldo VP (Merck). Após 24 horas a 37°C foi adicionado ao tubo teste 0,6 mL de  $\alpha$ -naftol a 5% e 0,2 mL de hidróxido de potássio (KOH) a 40%. Os tubos foram agitados suavemente, para expor o meio ao oxigênio, permanecendo em repouso por 10 a 15 minutos. Em presença de oxigênio atmosférico e hidróxido de potássio a 40%, a

acetoina é convertida em diacetila e o  $\alpha$ -naftol atua como catalisador produzindo um complexo de cor vermelha, indicando prova positiva.

### **3.2.8 Fermentação de Carboidratos**

Os microrganismos são capazes de degradar carboidratos por via fermentativa ou oxidativa. Os produtos finais da fermentação são ácidos mistos relativamente fortes, que podem ser detectados por provas de fermentação convencionais. Os carboidratos foram preparados em caldo base com o corante púrpura de bromocresol e suplementado com 2% do carboidrato (frutose, manose, maltose, trealose, manitol, xilose, lactose e sacarose), e distribuídos separadamente em tubos de ensaios esterilizados. Após cultivo de 24 horas, os isolados foram inoculados nos caldos com auxílio da alça bacteriológica e incubados a 37°C por 24 horas. Alterações na coloração do caldo de cultura, resultantes da fermentação dos carboidratos, foram indicativas da prova positiva.

### **3.2.9 Teste de Suscetibilidade a Bacitracina, Novobiocina e Polimixina**

Foi empregada a prova de suscetibilidade à bacitracina, novobiocina e polimixina para a identificação dos ECN. Para a realização da prova, foi preparada uma suspensão bacteriana a partir de cultivo em agar tríplice soja de 24 horas. O inóculo foi preparado com uma turbidez equivalente a metade da escala 1 de McFarland, semeado sobre a superfície do ágar Mueller-Hinton com auxílio de um swab esterelizado, e em seguida depositado com pinça esterilizada um disco de bacitracina de 0,04U, novobiocina 5  $\mu$ g e polimixina 5  $\mu$ g. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e os halos mensurados e interpretados de acordo com o recomendado pelo CLSI (2005).

### **3.2.10 Descarboxilação da Ornitina**

O teste foi realizado com caldo base de Moeller, suplementado com 0,5 % de ornitina. Após cultivo de 24 horas, os isolados foram inoculados nos caldos com auxílio da alça bacteriológica, adicionado óleo mineral na superfície, na altura de 1cm e incubados a 37°C por 24 horas. A prova foi considerada positiva pela observação de uma coloração púrpura, indicativa de pH alcalino, resultante da descarboxilação da ornitina.

### **3.2.11 Testes de Suscetibilidade: Disco Difusão**

Os *Staphylococcus* coagulase negativa identificados foram submetidos ao teste de disco difusão, conforme preconizado pelo CLSI (2005). Após subcultivos em agar tríplice soja, por 24 horas a 37°C, um inóculo com uma turbidez equivalente a metade da escala 1 de McFarland foi semeado em placas de agar Muller-Hinton suplementado com 2,0% de cloreto de sódio, com o auxílio de um swab esterilizado. Os discos de antimicrobianos (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) foram depositados na superfície do agar inoculado e os antimicrobianos utilizados foram: vancomicina, cefoxitina, oxacilina e mupirocina. O controle de qualidade foi realizado com cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* 25923 e 29213 *S.epidermidis* 12228. A leitura dos halos de inibição foi realizada segundo os critérios do CLSI (2005).

### **3.2.12 Teste de Triagem em Ágar Oxacilina**

A resistência à oxacilina dos ECN pelo teste disco difusão foi confirmada pelo emprego do agar Mueller Hinton suplementado com 4% de NaCl e e oxacilina a 6 µg/ml. O inóculo bacteriano foi preparado, a partir de cultura de 24 horas, em solução salina com uma turbidez equivalente a metade da escala 1 de McFarland e inoculado nas placas com o auxílio do replicador de Steers (Steers et al. 1959). O desenvolvimento de até mesmo uma colônia foi considerada prova positiva.

## **3.3 Detecção do Gene *mecA***

### **3.3.1 Extração do DNA Cromossomal**

Os ECN que apresentaram resistência a oxacilina e se desenvolveram no agar triagem oxacilina foram cultivados em 3 mL de caldo tríplice soja por 24 horas a 37°C. A cultura foi centrifugada por 5 minutos a 6.000 rpm e o sobrenadante descartado. Ao

sedimento foi ressuspensão e homogeneizado em 400  $\mu\text{L}$  de tampão TE (tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0) e 12  $\mu\text{L}$  de lisozima (20mg/mL). A suspensão foi incubada por 1 hora a 37°C. Após esse período adicionou-se ao sistema de digestão 70 $\mu\text{L}$  de SDS a 10% e 12 $\mu\text{L}$  de proteinase K a 10 $\mu\text{g/mL}$ , com incubação a 56°C por 10 minutos. Após a incubação, foram adicionados 100 $\mu\text{L}$  de NaCl a 5M seguidos de 80 $\mu\text{L}$  de solução de CTAB/NaCl (10% CTAB, 0,73M NaCl). A suspensão foi homogeneizada e incubada por 10 minutos a 65°C.

Adicionou-se um volume de 650  $\mu\text{L}$  de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) com agitação por 30 segundos. Foi realizada uma centrifugação por 5 minutos a 18.000g. A fase aquosa foi transferida para outro tubo e adicionado 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol incubado a -20°C por 30 minutos. Realizou-se uma nova centrifugação a 18.000 g por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1 mL de etanol a 70% gelado. Após secagem o DNA foi re-suspensão com 50 $\mu\text{L}$  de tampão água MilliQ esterilizada. O DNA foi analisado em gel de agarose a 1% e armazenado a -20°C.

### 3.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O gene *mecA* foi detectado por PCR, utilizando os primers *mecA* F 5'-TGGCTATCGTGTCAACAATCG-3' e *mecA* R 5'-CTGGAACTTGTTGAGCAGAG-3' Murakami et al (1991).

A reação foi preparada pela adição de dNTPs, Taq DNA polimerase, tampão,  $\text{MgCl}_2$  e os oligonucleotídeos. O volume da reação foi de 25  $\mu\text{L}$  com 2,5 $\mu\text{L}$  do DNA extraído. Os ciclos da reação foram: 1 ciclo de 94°C por 3 minutos (desnaturação do DNA alvo), 35 ciclos de 92°C por 45 segundos, 50°C por 1 minuto (anelamento) e 72°C por 1 minuto (extensão do primer) e 1 ciclo a 72°C por 4 minutos (extensão final).

Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5 % contendo brometo de etídio, e utilizado marcador de massa molecular de 1Kb. Os produtos de amplificação foram visualizados em transiluminador e fotografados.

## **4. RESULTADOS, DISCUSSÃO E CONCLUSÃO**

Os resultados, discussão e conclusão estão apresentados na forma de artigo científico a ser enviado à revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. As normas para a publicação do artigo estão em Anexo.

## **5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## **5. Referências Bibliográficas**<sup>1</sup>

ANVISA 2004. Detecção e identificação de bactérias de importância médica.

Agvald-Ohman C, Lund B, Edlund C 2004. Multiresistant coagulase-negative *staphylococci* disseminate frequently between intubated patients in a multidisciplinary intensive care unit. *Crit Care* 8: R42-47.

Akiyama H, Yamasaki O, Tada J, Arata J 2000. The production of superantigenic exotoxins by coagulase-negative *staphylococci* isolated from human skin lesions. *J Dermatol Sci* 24: 142-145.

Alcaráz L, Talon D, Bertrand X 2003. Species identification, slime production and oxacillin susceptibility in coagulase-negative *staphylococci* isolated from nosocomial specimens. *Brazil J of Microbiol* 34: 45-51.

Altöparlak U, Kadanali A, Celebi S 2004. Slime factor positivity in coagulase negative *staphylococci* isolated from nasal samples of haemodialysis patients. *Int J Clin Pract* 58: 1112-1114.

Andrews WW, Schelonka R, Waites K, Stamm A, Cliver SP, Moser S 2008. Genital Tract methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Risk of vertical transmission in pregnant women. *Obstet Gynecol* 111: 113-118.

Anguera L, Diekema DJ, Doern GV 2005. *Staphylococcus lugdunensis* infective endocarditis: description of 10 cases and analysis of native valve, prosthetic valve, and pacemaker lead endocarditis clinical profiles. *Heart* 91: 1-7.

Archer GL 1995, *Staphylococcus epidermitis* and other coagulase-negative *staphylococci*. In:

---

<sup>1</sup> As referências estão apresentadas de acordo com as normas adotadas pelo periódico Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. Disponível em: <http://www.scielo.br/revistas/mioc/pinstu>

Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editores. Mandell, Douglas and Bennett's, Principles and practice of infectious diseases, New York, p. 1777-1784.

Becker K, Friedrich AW, Lubritz G, Weilert M, Peters G, vonEiff C 2003. Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. *J Clin Microbiol*, 41: 1434-1439.

Ben-David D, Mermel LA, Parenteau S 2003. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission: The possible importance of unrecognized health care worker carriage. *Antimicrob Agents Chemother* 36: 14-17

Boisson K, Thouverez M, Talon D, Bertrand X 2002. Characterisation of coagulase-negative *staphylococci* isolated from blood infections: incidence, susceptibility to glycopeptides, and molecular epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 21: 660-665.

Bouza E, San Juan R, Munoz P, Pascau J, Voss A, Desco M 2004. Cooperative Group of the European Study on Nosocomial Infections (ESGNI). A European perspective on intravascular catheter-related infections: report on the microbiology workload, aetiology and microbial susceptibility (ESGNI-005 Study). *Clin Microbiol Infect* 10: 838-842.

[Boyce, JM](#) 2001. MRSA patients: proven methods to treat colonization and infection. [J Hosp Infect](#) 48 :9-14.

Cafisso V 2004. Presence of the *ica* operon in clinical of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. *Clin Microbiol and Infect* 10: 1081-1088.

Caierão J, Lund B, Edlund C 2004. Evaluation of phenotypic methods for methicillin resistance characterization in coagulase-negative *staphylococci* (CNS). *J Med Microbiol* 6: 17-22

Carbon C 2000. MRSA and MRSE is there an answer. *Clin Microbiol Infect* 6: 17-22.

Carroll KC 2008. Rapid Diagnostics for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Infectious Diseases*. 12: 15-24.

CENTER FOR DISEASE CONTROL 2002b. Guideline for Hand Higiene in Health-Care Settings. *MMW* 51: 16-25. Disponível em: <http://www.cdc.gov>. Acesso em: 22 jun. 2007.

Chandran AU, Rennie R 2005. Routine antimicrobial susceptibility testing of coagulase-negative *staphylococci* isolated from blood cultures: is it necessary? *Clin Microbiol Infect* 11: 1037-1040.

*Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2005. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fifteenth informational supplement, M100-S15.* Wayne, PA.

CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute 2006. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Tests Approved Standards*. M2-A9. 9<sup>th</sup> ed..

Chen TK, Huard RC, Della-Latta P, Saiman L 2006. Prevalence of Methicillin-Sensitive and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in pregnant women. *Obstet Gynecol* 108: 482-487.

Chong SC, Yin CS, Bakar AA, Skewi Z, Naing NN, Jamal F, Othman N 2006. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* among healthy adults. *J Microbiol Immunol Infect* 39: 458-464.

Cristensen GD, Baldassar L, Simpson A. 1994. A colonization of medical devices by coagulase-negative *staphylococci*. In: *Infections Associated with Medical Devices*, 2<sup>nd</sup> ed. 45-78p.

Coia JE, Duckworth GJ, Edwards DI, Farrington M, Fry C, Humphreys H, Mallaghan C, Tucker DR, for the joint working party of the British Society of Antimicrobial chemotherapy, the hospital Infection Society, and the Infection Control Nurses Association

2006. Guidelines for the control and prevention of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in healthcare facilities. *J Hosp Infect* 63: S1-44

Costa SF, Miceli MH, Anaissie EJ 2004. Mucosa or skin as source of coagulase-negative staphylococcal bacteraemia? *Lancet Infect Dis* 4: 278-286.

Corso A, Boogaard LVD, Boelens HAM, Peters J 2004. Improvement of a latex agglutination test for the evaluation of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *Diagnost Microbiol and Infect Disease*. 50: 223-225.

Cuevas O, Cercenado E, Vindel A, Guinea J, Sanchez-Conde M, Sanchez-Somolinos M, Bouza E 1999. Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus spp.* in Spain: Five nationwide prevalence studies, 1986 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 281-290.

Cunha Mde L, Lopes CA, Rugolo LM, Chalita LV 2002. Clinical significance of coagulase-negative staphylococci isolated from neonates. *J Pediatr (Rio J)* 78: 279-288.

Cunha Mde L, Sinzato YK, Silveira LV 2004. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative staphylococci. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 855-860.

Dar JA, Thoker MA, Khan JA, Ali A, Khan MA, Rizwan M, Bhat KH, Dar MJ, Ahmed N, Ahmad S 2006. Molecular epidemiology of clinical and carrier strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the hospital setting of north India. *An of Clinical Microbiol and Antimicrobials* 22: 1-15

de Silva GD, Justice A, Wilkinson AR, Buttery J, Herbert M, Day NP, Peacock SJ 2001. Genetic population structure of coagulase-negative staphylococci associated with carriage and disease in preterm infants. *Clin Infect Dis* 33: 1520-1528.

Ferreira RBR, Garcia P 2003. Coagulase-negative staphylococci: comparison of phenotypic and genotypic oxacillin susceptibility tests and evaluation of the Agar

Screening test by using different concentrations of oxacillin. *J Clin Microbiol* 41: 3609-3614.

Frigatto EA, Machado AM, Pignatari AC, Gales AC 2005. Is the cefoxitin disk test reliable enough to detect oxacillin resistance in coagulase-negative *staphylococci*? *J Clin Microbiol* 43: 2028-2029.

Hederstierna-Johnsen T, Henrik C, Schonheyder P, Kirsten P 2005. Detection of methicillin resistance in coagulase-negative *staphylococci* by cefoxitin disc diffusion and oxacillin Etest. *APMIS* 113: 688-692

Heikens E, Fleer A, Paauw A, Florijn A, Fluit AC 2005. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative *staphylococci*. *J Clin Microbiol* 43: 2286-2290.

Higuchi W, Isobe H, Iwao Y, Dohmae S, Saito K, Takano T, Otsuka T, Baranovish T, Endo C, Suzuki N, Tomiyama Y, Yamamoto T 2007. Extensive multidrug resistance of coagulase-negative *staphylococci* in medical students. *J Infect Chemother* 13: 63-66

Hosrtkotte MA, Pignatari AC, Gales AC 2001. Rapid detection of methicillin resistance in coagulase-negative *staphylococci* by a penicillin-binding protein 2a-specific latex agglutination test. *J Clin Microbiol* 39: 3700-3702.

Huang SY, Tang RB, Chen SJ, Chung RL 2003. Coagulase-negative *staphylococcal* bacteremia in critically ill children: risk factors and antimicrobial susceptibility. *J Microbiol Immunol Infect* 36: 51-55.

Huebner J, Goldmann DA 1999. A coagulase-negative *staphylococci*: role as pathogens. *Annu Ver Med* 50: 223-236.

Hurdle JG, O'Neill AJ, Mody L, Chopra I, Bradley SF 2005. In vivo transfer of high-level mupirocin resistance from *Staphylococcus epidermidis* to methicillin-resistant

*Staphylococcus aureus* associated with failure of mupirocin prophylaxis. *J Antimicrob Chemother* 56: 1166-1168.

Ito IY, Costa A, Baracchini O 1969. Emprego da gema de ovo no isolamento de *Staphylococcus aureus*. *An Microbiol* 16: 189-192.

Jarlov JO, Busch-Sorensen C, Espersen F, Mortensen I, Hougaard DM, Rosdahl VT 1997. Evaluation of different methods for the detection of methicillin resistance in *coagulase-negative staphylococci*. *J Antimicrob Chemotherapy* 40: 241-249.

Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA, Brooks GF, Butel JS, Ornston LN 1998. *Microbiologia Médica*. 20<sup>a</sup> ed. Editora Guanabara Koogan, 354p.

Kampf G, Adena S, Ruden H, Weist K 2003. Inducibility and potencial role *mecA*-gene positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from colonized healthcare workers as a source for nosocomial infections. *J Hosp Infect* 54: 124-129.

Kloos WE, Schleifer KH 1975. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol* 1: 82-88.

Kloos WE, Bannerman TL 1994. Update on clinical significance of coagulase-negative *staphylococci*. *Clin Microbiol Rev* 7: 117-140.

Krause R, Haberl R, Wolfler A, Daxbock F, Auner HW, Krejs GJ, Wenisch C, Reisinger EC 2003. Molecular typing of coagulase-negative *staphylococcal* blood and skin culture isolates to differentiate between bacteremia and contamination. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 22: 760-763.

Kremer B, Jacobs JA, Soudijn ER, van der Ven AJ 2001. Clinical value of bacteriological examinations of nasal and paranasal mucosa in patients with chronic sinusitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 258: 220-225.

Koneman EW, Woods GL, Procop GW, Schreckenberger PC, Allen SD, Janda WM 2005. Konema's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams & Willkins, 1535p.

Livermore DM 2000. Antibiotic resistance in *staphylococci*. *Int J Antimicrob Agents* 16 Suppl 1: S3-10.

Louie L, Karlsson C, Wistrom F 2001. Evaluation of a latex agglutination test (MRSA-screen) for detection of oxacillin resistance in coagulase-negative *staphylococci*. *J Clin Microbiol* 39: 4149-4151.

Loveday HP, Pellowe CM, Jones SRLJ, Pratt RJ 2006. A systematic review of the evidence for interventions for the prevention and control of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (1996-2004): report to the Joint MRSA Working Party (subgroup A). *J Hosp Infect* 63: S45-S70.

Mamishi S, Pourakbari B, Ashtiani MH, Hashemi FB 2005. Frequency of isolation and antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from bloodstream infections at Children's Medical Center, Tehran, Iran, 1996-2000. *Int J Antimicrob Agents* 26: 373-379.

Marjolein FQV, Yzerman EPF, van Belkum A, Boelens HAM, Sijmons M, Verbrugh HA 1999. Follow-UP of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years: Redefining the Persistent Carrier State. *J Clin Microbiol* 37: 3133-3140

Melles DC, Pauw E, Boogaard LVD, Boelens HAM, Peters J, Peeters JK, Witsenboer H, van Leeuwen WB, Verbrugh HA, van Belkum A, Nouwen JL 2007. Host-microbe interplay in persistent *Staphylococcus aureus* nasal carriage in HIV patients. *J Clin Microbiol* 10: 151-158.

Michelin L 2005. Pathogenicity factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus epidermidis* associated with nosocomial infections occurring in intensive care units. *J Brazil of Microbiol.* 36: 17-23.

Monteiro GF 2004. Segredos da Estatística em pesquisa científica. 1ªed. Editora Vieira. Goiânia.

Monsen T, Karlsson C, Wistrom J 2005. Spread of clones of multidrug-resistant, coagulase-negative *staphylococci* within a university hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 26: 76-80.

Murakami K, Espersen F, Mortensen I 1991. Identification of methicillin-resistant strains of *Staphylococci* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 29: 2240-2244.

Nascimento JS, Ceotto H, Nascimento SB, Giambiagi-Demarval M, Santos KR, Bastos MC 2006. Bacteriocins as alternative agents for control of multiresistant *staphylococcal* strains. *Lett Appl Microbiol* 42: 215-221.

Neves JAC, Trabulsi LR, Alterthum F, Gompertz OF 1999. Microbiologia, 3ª ed., Editora Atheneu, p548.

Novotna G, Adamkova V, Janata J, Melter O, Spizek J 2005. Prevalence of resistance mechanisms against macrolides and lincosamides in methicillin-resistant coagulase-negative *staphylococci* in the Czech Republic and occurrence of an undefined mechanism of resistance to lincosamides. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 3586-3589.

Nunes AP, Teixeira LM, Iorio NL, Bastos CC, Sousa Fonseca L, Souto-Padron T, Santos KR 2006. Heterogeneous resistance to vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus warneri* clinical strains: characterisation of glycopeptide susceptibility profiles and cell wall thickening. *Int J Antimicrob Agents* 27: 307-315.

Oliveira ADD, Azevedo PA, Souza LB, Viana-Niero C, Francisco W, Lottenberg G, Martino MDV, Hofling-Lima AL 2007. Laboratory detection for methicillin resistance in

coagulase negative *Staphylococcus* isolated from ophthalmic infections. *Arq Bras Oftalmol* 70: 667-6675

Palazzo ICV, Araujo MLC, Darini ALC 2005. First report of Vancomycin-resistant *Staphylococci* isolated from healthy carriers in Brazil. *J Clin Microbiol* 43: 179-185.

Patrick C.C 1990. Coagulase Negative *staphylococci*: pathogens with increasing clinical significance. *J Pediatr* 116: 497-507.

Prado-Palos, MA 2006. *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* metilina resistentes, (MRSA) em Profissionais de saúde e as interfaces com as infecções nosocomiais. Ribeirão Preto, 2006. 188 f. Tese (Doutorado) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Pinho MG, Lencastre H, Tomaz A 2004. Na acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant *staphylococci*. *J Pediatr* 98: 10886-10891.

Ross TL, Fuss EP, Harrington SM, Cai M, Perl TM, Merz WG 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus caprae* in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* 43: 363–367.

[Sakai H](#), [Procop GW](#), [Kobayashi N](#), [Togawa D](#), [Wilson DA](#), [Borden L](#), [Krebs V](#), [Bauer TW](#) 2004. Simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *staphylococci* in positive blood cultures by real-time PCR with two fluorescence resonance energy transfer probe sets. *J Clin Microbiol* 42: 5739-5744.

Sakarya S, Oncu S, Ozturk B, Tuncer G, Sari C 2004. Neuraminidase produces dose-dependent decrease of slime production and adherence of slime-forming, coagulase-negative *staphylococci*. *Arch Med Res* 35: 275-278.

Schulin T, Voss A 2001. A coagulase-negative *staphylococci* is a cause of infections related to intravascular prosthetic devices: limitations of present therapy. *Clin Microbiol and Infect.* 7: 1-7.

Steers E, Foltz EL, Graaves VS 1959. An inocula replicating apparatus for continue testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antibiot Chemother* 9: 307-311.

Shankar KR, Brown D, Hughes J, Lamont GL, Losty PD, Lloyd DA, van Saene HK 2001. Classification and risk-factor analysis of infections in a surgical neonatal unit. *J Pediatr Surg* 36: 276-281.

Shittu A, Lin J, Morrison D, Kolawole D 2006. Identification and molecular characterization of mannitol salt positive, coagulase-negative *staphylococci* from nasal samples of medical personnel and students. *J Medical Microbiol* 55: 317-324.

Trautmann M, Stecher J, Hemmer w, Luz K, Panknin HT 2006. Intranasal Mupirocin prophylaxis in elective surgery. *Chemotherapy* 54: 9-16

von Eiff C, Heilmann C, Peters G 1999. New aspects in the molecular basis of polymer-associated infections due to *staphylococci*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 18: 843-846.

von Eiff C, Peters G, Heilmann C 2002. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative *staphylococci*. *Lancet Infect Dis* 2: 677-685.

Zbinden R, Hughes J, Lamont GL, Losty PD 2001. Detection of penicillin-binding protein 2a by rapid slide latex agglutination test in coagulase-negative *staphylococci*. *J Clin Microbiol* 39: 412-420.

Zhanel GG, DeCorby M, Laing N, Weshnoweski B, Vashisht R, Tailor F, Nichol KA, Wierzbowski A, Baudry PJ, Karlowsky JA, Lagacé-Wiens P, Walkty A, McCracken M, Mulvey MR, Johnson J 2008. Antimicrobial Resistant Pathogens in Intensive Care Units in

Canada: Results of the Canadian National Intensive Care Unit. *Antimicrob Agents Chemother.* 5: 545-552.

Weinstein MP, Towns ML, Quartey SM, Mirret S, Reimer LG, Parmigiani G, Reller LB 1997. The clinical significance of positive blood cultures in the 1990's: a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology and outcome of bacteremia and fungemia in adults. *Clin Infect Dis* 21: 584-602.

Westergren G, Krasse B 1978. Evaluation of a micromethod for determination of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* infection. *J Clin Microbiol* 7: 82-83.

Wey SB, Cardo DM, Halker E, Carratu FP, Saes AC 1990. Distribution and analysis of 8,268 nosocomial infections at the Hospital São Paulo 1985-1989. *Rev Hosp S. Paulo Esc Paul Med* 1: 169-174.

Witte W 1999. Antibiotic resistance in gram-positive bacteria: epidemiological aspects. *J Microbiol Chemother* 44: 1-9.

World Health Organization 2004. Serious childhood problems in countries with limited resources. In: Management of the child with a serious infections or severe malnutrition. Department of Child and Adolescent Health and Development-Geneva.

World Health Organization 2002a. Acute Respiratory Infections. The World Health Report. Disponível em [http://www.who.int/whr/2002/whr2002\\_annex3.pdf](http://www.who.int/whr/2002/whr2002_annex3.pdf). Acessado em 20/07/07.

Artigo científico a ser enviado para revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. As normas para a publicação do artigo estão em Anexo.

**Deteção do gene *mecA* em estafilococos coagulase negativa resistentes a oxacilina isolados da saliva de profissionais da enfermagem**

Detection of *mecA* gene in coagulase negative staphylococci oxacillin resistant isolated from the saliva of nursing health care workers

Juliana de Oliveira Rosa<sup>1</sup>; Josely Pinto de Moura<sup>2</sup>; Marinésia Aparecida Prado Palos<sup>3</sup>;  
Elucir Gir<sup>4</sup>; Cleômenes Reis<sup>1</sup>; André Kipnis<sup>1</sup>; Sílvia Rita Marin da Silva Canini<sup>4</sup>;  
Fernando Belissimo-Rodrigues<sup>5</sup>; Fabiana Cristina Pimenta<sup>1</sup>

1- Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.

2- Programa Interunidades de Doutorado em Enfermagem da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

3- Faculdade de Enfermagem Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.

4- Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

5- Médico Infectologista. Vice-presidente da Comissão de Controle de Infecção hospitalar do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

Apoio Financeiro: FAPESP (Processo 05/58463-0)

Endereço para correspondência: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, UFG. Rua 235 s/nº, Setor Universitário, Goiânia - Go / Tel: 55 3209-6108

**e-mail:** [gzy7@cdc.gov](mailto:gzy7@cdc.gov)

## Resumo

Estafilococos coagulase negativa estão frequentemente associados às infecções nosocomiais e os profissionais da saúde podem ser reservatório e disseminá-los no hospital e comunidade. O objetivo desse estudo foi identificar espécies de estafilococos coagulase negativa isolados da saliva de profissionais da enfermagem, determinar o perfil de resistência e detectar o gene *mecA*. Foram selecionados 100 estafilococos coagulase negativa, sendo 41 identificados como *Staphylococcus epidermidis*, 25 *Staphylococcus saprophyticus*, 18 *Staphylococcus haemolyticus*, 8 *Staphylococcus cohnii*, 4 *Staphylococcus lugdunenses*, 3 *Staphylococcus capitis*, e 1 *Staphylococcus Simulans*. Desses, 32% apresentaram resistência à oxacilina, 84,4% à mupirocina, 32% à cefoxitina, e todos sensíveis a vancomicina. Dos estafilococos coagulase negativa resistentes à oxacilina, 93,7% desenvolveram-se no agar oxacilina (6µg/ml) e o gene *mecA* foi detectado em 75,0%. Os resultados sinalizam que maiores investimentos devem ser direcionados a identificação das espécies de estafilococos coagulase negativa nas instituições de saúde e na comunidade.

**Descritores:** Estafilococos coagulase negativa, equipe de Enfermagem, saliva, resistência, gene *mecA*

## Abstract

Negative coagulase staphylococci may be associated with nosocomial infections, and health care workers can be reservoirs and spread the bacteria in the hospital and community. This study aimed to identify the negative coagulase staphylococci species isolated in the saliva of nursing professionals, to determine the oxacillin resistance profile and to detect the *mecA* gene through polymerase chain reaction. A total of 100 negative coagulase staphylococci were selected, 41 were identified as *Staphylococcus epidermidis*, 25 *Staphylococcus saprophyticus*, 18 *Staphylococcus haemolyticus*, 8 *Staphylococcus cohnii*, 4 *Staphylococcus lugdunenses*, 3 *Staphylococcus capitis*, and 1 *Staphylococcus simulans*. Of those, 32% presented oxacillin resistance, 84.4% mupirocin resistance, 32% cefoxitin resistance, and all were vancomycin sensitive. Of the oxacillin resistant negative coagulase staphylococci, 93.7% developed in oxacillin agar (6µg/ml), and the *mecA* gene was detected in 75.0% of the isolates. Results indicate that higher investments should be directed to the identification of negative coagulase staphylococci species in health institutions and in the community.

**Descriptors:** Negative coagulase staphylococci, nursing team, saliva, resistance, gene *mecA*

## INTRODUÇÃO

Os indivíduos são colonizados desde o nascimento, em diversos sítios anatômicos, por estafilococos coagulase negativa (ECN). Estes microrganismos podem se apresentar como bactérias oportunistas emergentes, especialmente em pacientes hospitalizados, imunocomprometidos, prematuros e com dispositivos implantados<sup>16 26</sup>. Podem causar infecção no sítio primário de colonização ou disseminarem causando infecções hospitalares graves como bacteremias, septicemias e sepsis neonatal<sup>18 25 38</sup>.

A similaridade dos ECN isolados do sangue e de cateter de clientes hospitalizados, com os recuperados do mesmo paciente em mucosas de orofaringe, orelha, nariz, axila, braço e perna tem sido relatada<sup>17 25</sup>. Estudo que avaliou pacientes submetidos ao transplante de células tronco hematopoéticas, com quadro clínico de bacteremias, constatou similaridade dos ECN isolados do sangue com os recuperados da orofaringe<sup>4</sup>. Os ECN apresentam uma importante habilidade de formar biofilmes e podem estar associados a dispositivos no ambiente hospitalar<sup>36 37 41</sup>.

Outro fator relevante em relação aos ECN é a sua capacidade de apresentar resistência a vários antimicrobianos, principalmente aos utilizados no ambiente hospitalar, aumentando assim o risco de falha terapêutica<sup>10 14 17 29 33</sup>.

A resistência dos ECN à vancomicina apesar de pouco freqüente, já é realidade no Brasil, conforme constatado em estudo<sup>39</sup> que detectou 4 ECN (2 *Staphylococcus capitis*, 1 *Staphylococcus haemolyticus* e 1 *Staphylococcus epidermidis*) resistentes a esse antibiótico em isolados de profissionais da saúde. Casos de infecções causadas por *Staphylococcus sp* resistentes à vancomicina também têm sido descritos<sup>33</sup>.

A prevalência de ECN oxacilina resistente é elevada na maior parte dos hospitais no Brasil e no mundo e a identificação das espécies desse grupo é de extrema importância,

pois a interpretação dos halos de inibição da oxacilina para *S. epidermidis* é diferente das outras espécies. Um fator a ser considerado é que resultados discrepantes entre oxacilina e cefoxitina podem ser encontrados quando os ECN são avaliados pelo teste de disco difusão<sup>14</sup>.

Com relação às medidas de controle dos microrganismos resistentes, entre eles os ECN, a literatura faz referência à vigilância microbiológica prospectiva para identificar pacientes colonizados. Medidas como o isolamento dos clientes colonizados ou infectados, afastamento temporário do profissional colonizado de suas atividades, a adesão às precauções-padrão, higienização das mãos, limpeza cuidadosa do ambiente, controle da prescrição dos antimicrobianos de amplo espectro e tratamento dos pacientes colonizados e dos profissionais de saúde envolvidos nesses episódios devem ser implementadas<sup>10 27 36</sup>. A colonização e transmissão de ECN resistentes relacionadas ao profissional de saúde deve ser investigada<sup>17 39</sup>.

ECN estão associados a diversas infecções, o que requer o estabelecimento de estratégias de controle e prevenção<sup>11</sup>. Desta forma este estudo teve como objetivo identificar as espécies de ECN isolados da saliva de profissionais da enfermagem, determinar o perfil de resistência à oxacilina e detectar o gene *mecA* nos isolados resistentes.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Estafilococos coagulase negativa:** Foram selecionados 100 ECN isolados da saliva de profissionais da enfermagem, que participaram de um estudo maior, participantes de um programa interinstitucional de vigilância de estafilococos resistentes a oxacilina, de um

estudo transversal realizado nas unidades de terapia intensiva, clínica médica, clínica cirúrgica e gineco-obstétrica de um hospital escolas de nível terciário do interior do estado de São Paulo. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Foram incluídos todos os profissionais que aquiesceram participar do estudo mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que estavam em exercício profissional ativo, no hospital, durante o período do estudo e que não estavam em uso de antimicrobiano ou não os tinham utilizado nos últimos 30 dias. As coletas de saliva ocorreram no período de maio de 2007 a maio de 2008, de cada profissional foram coletadas 03 amostras com intervalo médio de três meses.

**Isolamento e identificação:** A saliva foi homogenizada por um minuto, submetida à diluição decimal em solução salina (0,8%) e semeada, em meio de cultura seletivo, agar manitol salgado<sup>42</sup>. O período de incubação foi de 24 a 48 horas a 37°C. A identificação dos estafilococos coagulase negativa foi baseada em provas bioquímicas (catalase, coagulase em tubo e lâmina, DNase, lecitinase, urease, acetoina, fermentação de carboidratos - frutose, manose, maltose, trealose, manitol, xilose, lactose e sacarose, suscetibilidade à bacitracina, novobiocina e polimixina e descarboxilação da ornitina)<sup>23,24</sup>. O controle de qualidade foi realizado com cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* 25923 e 29213 *Staphylococcus epidermidis* 12228, *Staphylococcus haemolyticus* 29970 e *Staphylococcus saprophyticus* 15305. A produção de lecitinase pelos ECN foi verificada pela inoculação em agar contendo gema de ovo – agar Naito<sup>20,26</sup>.

**Teste de suscetibilidade:** Os estafilococos coagulase negativa identificados foram submetidos ao teste de disco-difusão, segundo protocolo CLSI/M2-A9 (2005)<sup>9</sup>. Foram

utilizados discos de vancomicina, cefoxitina, oxacilina e mupirocina (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra).

Agar Mueller Hinton suplementado com 4% de cloreto de sódio e oxacilina (6µg/ml) foi utilizado como triagem para confirmar a resistência à oxacilina. O desenvolvimento de até mesmo uma colônia foi considerada prova positiva.

**Detecção do gene *mecA*:** Os ECN que apresentaram resistência à oxacilina e se desenvolveram no agar triagem oxacilina, foram cultivados em 3mL de caldo triplice soja por 24 horas a 37°C para a extração do DNA segundo Murakami et al (1991).

O gene *mecA* foi detectado pela técnica da polymerase chain reaction (PCR), utilizando os primers *mecA* F5'-TGGCTATCGTGTGTCACAATCG-3' e *mecA* R5'-CTGGAACTTGTTGAGCAGAG-3' de acordo com Murakami cols<sup>31</sup>. Os ciclos da reação foram: 1 ciclo de 94°C por 3 minutos; 35 ciclos de 92°C por 45 segundos; 50°C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto; e 1 ciclo a 72°C por 4 minutos. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídio; foi utilizado marcador de massa molecular de 1 Kb. A presença de fragmentos de 533 pb resultantes dos produtos de amplificação foram visualizados em transiluminador e fotografados.

## RESULTADOS

Os ECN isolados da saliva de profissionais de enfermagem foram identificados nas seguintes espécies: 41 (41%) *Staphylococcus epidermidis*, 25 (25%) *Staphylococcus saprophyticus*, 18 (18%) *Staphylococcus haemolyticus*, 8 (8%) *Staphylococcus cohnii*, 4

(4%) *Staphylococcus lugdunenses*, 3 (3%) *Staphylococcus capitis*, e 1 (1%) *Staphylococcus simulans* (Tabela 1, 2, 3).

Os resultados dos testes de suscetibilidade evidenciaram que 32 (32%) dos ECN isolados exibiram resistência à oxacilina, 84% à mupirocina, 43,7% à cefoxitina, e todos os isolados exibiram suscetibilidade à vancomicina (Tabela 2, 3). Dos 100 isolados de ECN 16% eram produtores de lecitinase, dentre eles 15,6% eram oxacilina resistentes.

Dos 32 ECN detectados pelo teste de disco difusão como resistentes à oxacilina, foram cultivados em agar triagem oxacilina (6µg) suplementado com cloreto de sódio a 4% e também submetidos à detecção do gene *mecA*. Desses, 93,7% desenvolveram-se no agar triagem oxacilina e o gene *mecA* foi detectado em 24 (75%). Ressalta-se que dentre os 20 *Staphylococcus epidermidis*, 15 (62,5%) apresentaram o gene *mecA*. (Tabela 2).

## DISCUSSÃO

No presente estudo, os ECN foram identificados como *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus lugdunenses*, *Staphylococcus capitis* e *Staphylococcus simulans*. A maioria instituições de saúde não identificam as espécies de ECN de rotina, dada a necessidade de execução de inúmeros testes bioquímicos, o que se constitui num trabalho relativamente laborioso e de custo elevado.

Rotineiramente a identificação dos estafilococos é baseada apenas nos aspectos morfológicos das colônias, coloração de Gram, catalase e produção de coagulase, o que permite apenas classificar esses estafilococos em coagulase negativa ou em *Staphylococcus aureus*<sup>12</sup>. No presente estudo foi utilizado um esquema de 18 provas bioquímicas para determinar as espécies dos 100 ECN selecionados, o que permitiu a caracterização das

espécies. Ressalta-se que a identificação das espécies é determinante para a escolha da terapêutica adequada, uma vez que existem variações na interpretação de halos no antibiograma de acordo com a espécie de ECN<sup>23</sup>.

A identificação dos ECN é de grande importância para a associação dessas espécies com casos de infecções específicas, tendo em vista que além dos *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus*, outras espécies de estafilococos têm apresentado virulência e resistência intrínseca a diferentes antimicrobianos, como o *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus lugdunensis* e o *Staphylococcus schleiferi*<sup>2</sup>.

Vale destacar que o *S. epidermidis* foi a espécie mais prevalente (41%) na saliva dos profissionais investigados, o que está de acordo com a literatura, pois esta é a espécie de ECN detectada com maior frequência em espécimes coletadas dos casos de infecções em humanos, em particular naquelas associadas com cateteres intravasculares. Além de ser o principal agente causador de bacteremia, endocardite de válvula protética, infecção relacionada à diálise peritoneal e ferida cirúrgica, no ambiente hospitalar<sup>16 19 34</sup>.

Entretanto, as espécies de *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus haemolyticus* também foram identificadas com frequência na saliva desses profissionais, sendo 25% e 18%, respectivamente. O *Staphylococcus haemolyticus* representa a segunda espécie mais frequente em infecções relacionadas a cateter, septicemia e endocardites, enquanto que o *Staphylococcus saprophyticus* apresenta-se como importante agente causador de infecção do trato urinário em mulheres jovens<sup>16</sup>. As infecções causadas por *Staphylococcus lugdunensis* são pouco frequentes em humanos, não obstante, quando ocorrem são graves e de progressão fulminante. Esse microrganismo tem sido associado a casos de endocardite de válvula nativa, a qual é caracterizada por uma fraca resposta aos tratamentos antimicrobianos convencionais, com importante destruição valvular, formação

de abscesso miocárdial, altas taxas de embolia periférica e aumento na mortalidade, incluindo os casos com tratamento cirúrgico<sup>3 28</sup>.

Dos 100 ECN identificados, 32% apresentaram resistência à oxacilina nos testes de difusão em disco, 84,4% à mupirocina e 43,7% à cefoxitina, porém, todos os isolados apresentaram suscetibilidade à vancomicina. A resistência elevada dos ECN à mupirocina tem sido evidenciada, provavelmente devido ao uso dessa substância para a descolonização de indivíduos portadores de *Staphylococcus aureus* oxacilina resistentes<sup>9 10 19</sup>. Esse resultado sinaliza para, a importância de se repensar as políticas de controle de microrganismos multirresistentes nos serviços de saúde.

Salienta-se ainda que, dos 32% ECN com resistência a oxacilina, detectada pelo teste de difusão de disco, 93,7% desenvolveram no agar com oxacilina, confirmando o perfil de resistência desses isolados. Estudo<sup>12</sup> realizado com recém-nascidos, evidenciou que 50% dos ECN isolados eram resistentes à oxacilina. Investigação que avaliou *Staphylococcus aureus* e ECN isolados da mucosa nasal de estudantes de medicina revelou que 23,5% dos ECN foram resistentes à oxacilina, enquanto que todos os *Staphylococcus aureus* foram sensíveis a esse antibiótico, ressaltando que os ECN podem funcionar como um reservatório de resistência em seus portadores<sup>17</sup>.

Outro ponto relevante diz respeito à capacidade desses microrganismos em sintetizar a enzima lecitinase, capaz de degradar a bainha de mielina, sendo esse mecanismo, um fator de virulência de grande importância para os estafilococos, tanto para os *Staphylococcus aureus*, como para os ECN<sup>20</sup>. Nesse estudo foram identificados 16% de ECN produtores de lecitinase, dentre eles 15,6% eram oxacilina resistentes, sinalizando o potencial de virulência desses ECN nos indivíduos colonizados.

O gene *mecA* codifica a proteína alterada denominada PBP 2a da parede bacteriana, presente nos isolados de estafilococos oxacilina resistentes. Com relação à detecção desse gene em estafilococos, a maioria dos estudos enfoca os *Staphylococcus aureus*, cuja frequência de detecção tem variado de 14% a 35,5%<sup>1 7 13 22</sup>. Apesar das investigações sobre a presença do gene *mecA* em isolados de ECN resistentes à oxacilina serem escassas, destaca-se que o percentual de resistência à oxacilina tem variado de 68,2% a 71%<sup>15 34</sup>. No presente estudo, em 75% do ECN oxacilina resistentes detectou-se o gene *mecA* dos isolados da saliva de profissionais de enfermagem.

Os ECN estão entre os principais microrganismos emergentes, nosocomiais e com resistência a vários antimicrobianos, sendo que os ECN multirresistentes são comuns em pacientes hospitalizados. A emergência deste microrganismo tem limitado o arsenal terapêutico o que contribui para um risco aumentado de fracasso no tratamento<sup>17 29 32</sup>.

Vale ressaltar que este estudo é pioneiro no que se refere à presença do gene *mecA* em ECN isolados da saliva de profissionais da saúde saudáveis. Estes achados sinalizam que maiores investimentos devem ser direcionados a identificação das espécies de ECN tanto nas instituições de saúde quanto na comunidade, bem como o perfil de resistência desse grupo de microrganismos, uma vez que os profissionais de saúde podem se constituir num importante reservatório desses estafilococos resistentes.

**\* REFERÊNCIAS:**

1- Andrews WW, Schelonka R, Waites K, Stamm A, Cliver SP, Moser. Genital tract methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Risk of vertical transmission in pregnant women. *Obstetrics & Gynecology* 111:113-118, 2008.

2- Arché GL. *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, Mandell, Douglas, Bennett's, Principles and practice of infectious diseases, New York, p.1777-1784, 1995

3- Anguera L, Diekema DJ, Doern GV. *Staphylococcus lugdunensis* infective endocarditis: description of 10 cases and analysis of native valve, prosthetic valve, and pacemaker lead endocarditis clinical profiles. *Heart* 91:1-7, 2005.

4- Boisson K, Thouverez M, Talon D, Bertrand X. Characterisation of coagulase-negative staphylococci isolated from blood infections: incidence, susceptibility to glycopeptides, and molecular epidemiology. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 21:660-665, 2002.

5- [Boyce, JM](#). MRSA patients: proven methods to treat colonization and infection. *Journal Hospital Infection* 48:9-14, 2001.

- 6- Centers for disease control and prevention. Guideline for Hand Higiene in Health-Care Settings. Morbidity Mortality Weekly Report 51: 16-25, 2002b. Disponível em: <http://www.cdc.gov>. Acesso em: 22 jun. 2007.
- 7- Chen TK, Huard RC, Della-Latta P, Saiman L. Prevalence of Methicillin-Sensitive and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in pregnant women. Obstetrics & Gynecology 108: 482-487, 2006.
- 8- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Tests Approved Standards. M2-A9. 9<sup>th</sup> ed, Wayne, PA USA, 2005.
- 9- Chong SC, Yin CS, Bakar AA, Skewi Z, Naing NN, Jamal F, Othman N. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* among healthy adults. Journal of Microbiology, Immunology and Infection 39:458-464, 2006
- 10- Coia JE, Duckworth GJ, Edwards DI, Farrington M, Fry C, Humphreys H, Mallaghan C, Tucker DR. For the joint working party of the British Society of Antimicrobial chemotherapy, the Hospital Infection Society, and the Infection Control Nurses Association Guidelines for the control and prevention of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in healthcare facilities. Journal of Hospital Infection 63:S1-44, 2006.
- 11- Costa SF, Miceli MH, Anaissie EJ. Mucosa or skin as source of coagulase-negative staphylococcal bacteraemia? Lancet Infectious Diseases 4:278-286, 2004.

- 12- Cunha L, Lopes CA, Rugolo LM, Chalita LV. Clinical significance of coagulase-negative *staphylococci* isolated from neonates. *Journal de Pediatria* 78:279-288, 2002.
- 13- Dar JA, Thoker MA, Khan JA, Ali A, Khan MA, Rizwan M, Bhat KH, Dar MJ, Ahmed N, Ahmad S. Molecular epidemiology of clinical and carrier strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the hospital setting of north India. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 22:1-15, 2006.
- 14- Frigatto EA, Machado AM, Pignatari AC, Gales AC. Is the cefoxitin disk test reliable enough to detect oxacillin resistance in coagulase negative staphylococci? *J Clin Microbiol* 2005;43:2028-9.
- 15- Hederstierna-Johnsen T, Henrik C, Schonheyder P, Kirsten P. Detection of methicillin resistance in coagulase-negative *staphylococci* by cefoxitin disk diffusion and oxacillin Etest. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica* 113:688-692, 2005.
- 16- Heikens E, Fleer A, Paauw A, Florijn A, Fluit AC. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative *staphylococci*. *Journal of Clinical Microbiology* 43:2286-2290, 2005.
- 17- Higuchi W, Isobe H, Iwao Y, Dohmae S, Saito K, Takano T, Otsuka T, Baranovish T, Endo C, Suzuki N, Tomiyama Y, Yamamoto T. Extensive multidrug resistance of coagulase-negative *staphylococci* in medical students. *Journal of Infection and Chemotherapy* 13:63-66, 2007.

- 18- Huang SY, Tang RB, Chen SJ, Chung RL. Coagulase-negative *staphylococcal* bacteremia in critically ill children: risk factors and antimicrobial susceptibility. *The Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 36:51-55, 2003.
- 19- Hurdle JG, O'Neill AJ, Mody L, Chopra I, Bradley SF. In vivo transfer of high-level mupirocin resistance from *Staphylococcus epidermidis* to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with failure of mupirocin prophylaxis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56:1166-1168, 2005
- 20- Ito IY, Costa A, Baracchini O. Emprego da gema de ovo no isolamento de *Staphylococcus aureus*. *The annals of Microbiology* 16:189-192, 1969.
- 21- Jarlov JO, Busch-Sorensen C, Espersen F, Mortensen I, Hougaard DM, Rosdahl VT. Evaluation of different methods for the detection of methicillin resistance in coagulase-negative *staphylococci*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 40:241-249, 1997.
- 22- Kampf G, Adena S, Ruden H, Weist K . Inducibility and potencial role *mecA*-gene positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from colonized healthcare workers as a source for nosocomial infections. *Journal Hospital Infection* 54:124-129, 2003.
- 23- Kloos WE, Schleifer KH. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology* 1:82-88, 1975.

24- Koneman EW, Woods GL, Procop GW, Schreckenberger PC, Allen SD, Janda WM. Konema's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6<sup>nd</sup> edition, Lippincott, Williams & Willkins, p.1535, 2005.

25- Krause R, Haberl R, Wolfler A, Daxbock F, Auner HW, Krejs GJ, Wenisch C, Reisinger EC. Molecular typing of coagulase-negative *staphylococcal* blood and skin culture isolates to differentiate between bacteremia and contamination. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 22:760-763, 2003.

26- Kremer B, Jacobs JA, Soudijn ER, van der Ven AJ. Clinical value of bacteriological examinations of nasal and paranasal mucosa in patients with chronic sinusitis. European Archives of Otorhinolaryngology 258:220-225, 2001.

27- Loveday HP, Pellowe CM, Jones SRLJ, Pratt RJ. A systematic review of the evidence for interventions for the prevention and control of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (1996-2004): report to the Joint MRSA Working Party (subgroup A). Journal Hospital Infection 635:S45-S70, 2006.

28- Mamishi S, Pourakbari B, Ashtiani MH, Hashemi FB. Frequency of isolation and antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from bloodstream infections at Children's Medical Center, Tehran, Iran, 1996-2000. International Journal of Antimicrobial Agents 26:373-379, 2005.

29- Monsen T, Karlsson C, Wistrom J. Spread of clones of multidrug-resistant, coagulase-negative *staphylococci* within a university hospital. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 26:76-80, 2005.

30- Monteiro GF. Segredos da Estatística em pesquisas científicas. 1ª Edição, Editora Vieira. Goiânia, 2004.

31- Murakami K, Espersen F, Mortensen I. Identification of methicillin-resistant strains of *Staphylococci* by polymerase chain reaction. *Journal Clinical Microbiology* 29:2240-2244, 1991.

32- Nascimento JS, Ceotto H, Nascimento SB, Giambiagi-Demarval M, Santos KR, Bastos MC. Bacteriocins as alternative agents for control of multiresistant *staphylococcal* strains. *Letters in Applied Microbiology* 42:215-221, 2006.

33- Nunes AP, Teixeira LM, Iorio NL, Bastos CC, Fonseca LS, Souto-Padron T, dos Santos KR. Heterogeneous resistance to vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus warneri* clinical strains: characterisation of glycopeptide susceptibility profiles and cell wall thickening. *International Journal of Antimicrobial Agents* 27:307-315, 2006.

34- Oliveira ADD, Azevedo PA, Souza LB, Viana-Niero C, Francisco W, Lottenberg G, Martino MDV, Hofling-Lima AL. Laboratory detection for methicillin resistance in

coagulase negative *Staphylococcus* isolated from ophthalmic infections. Arquivos Brasileiros de Oftalmologia 70:667-6675, 2007.

35- Palazzo ICV, Araujo MLC, Darini ALC. First report of Vancomycin-resistant *Staphylococci* isolated from healthy carriers in Brazil. Journal of Clinical Microbiology 43:179-185, 2005.

36- Prado-Palos, MA. *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* metilina resistentes, (MRSA) em Profissionais de saúde e as interfaces com as infecções nosocomiais. Tese de Doutorado. Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

37- Sakarya S, Oncu S, Ozturk B, Tuncer G, Sari C. Neuraminidase produces dose-dependent decrease of slime production and adherence of slime-forming, coagulase-negative *staphylococci*. Archives of Medical Research 35:275-278, 2004.

38- Shankar KR, Brown D, Hughes J, Lamont GL, Losty PD, Lloyd DA, van Saene HK. Classification and risk-factor analysis of infections in a surgical neonatal unit. Journal of Pediatric Surgery 36:276-281, 2001.

39- Shittu A, Lin J, Morrison D, Kolawole D. Identification and molecular characterization of mannitol salt positive, coagulase-negative *staphylococci* from nasal samples of medical personnel and students. Journal of Medical Microbiology 55:317-324, 2006.

40- Steers E, Foltz EL, Graaves VS. An inocula replicating apparatus for continue testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antibiotics and Chemotherapy* 9:307-311, 1959.

41- von Eiff C, Peters G, Heilmann C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative *staphylococci*. *Lancet Infectious Diseases* 2:677-685, 2002.

42- Westergren G, Krasse B. Evaluation of a micromethod for determination of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* infection. *Journal Clinical Microbiology* 7:82-83,1978.

**Tabela 1** Identificação, padrão de suscetibilidade à oxacilina, cefoxitina, vancomicina e mupirocina de 100 estafilococos coagulase negativa isolados da saliva de profissionais da enfermagem. Ribeirão Preto. SP, 2008.

Identificação	Número	Oxacilina				Cefoxitina				Vancomicina				Mupirocina			
		R		S		R		S		R		S		R		S	
		n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	41	20	48,8	21	51,2	17	41,5	24	58,5	0	0,0	41	100,0	36	87,8	5	12,2
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	25	5	20,0	20	80,0	2	8,0	23	92,0	0	0,0	25	100,0	23	92,0	2	8,0
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	18	5	27,8	13	72,2	7	38,9	11	61,1	0	0,0	18	100,0	12	66,7	6	33,3
<i>Staphylococcus cohnii</i>	8	0	0,0	8	100,0	3	37,5	5	62,5	0	0,0	8	100,0	6	75,0	2	25,0
<i>Staphylococcus lugdunenses</i>	4	2	50,0	2	50,0	1	25,0	3	75,0	0	0,0	4	100,0	4	100	0	0,0
<i>Staphylococcus capitis</i>	3	0	0,0	3	100,0	1	33,3	2	66,7	0	0,0	3	100,0	2	66,7	1	33,3
<i>Staphylococcus simulans</i>	1	0	0,0	1	100,0	1	100,0	0	0,0	0	0,0	1	100,0	1	100,0	0	0,0
<b>TOTAL</b>	<b>100</b>	<b>32</b>		<b>68</b>		<b>32</b>		<b>68</b>		<b>0</b>		<b>100</b>		<b>84</b>		<b>16</b>	

R: resistente, S: sensível

**Tabela 2 Padrão de resistência à oxacilina por diferentes métodos em espécies de estafilococos coagulase negativa isolados de saliva de profissionais da saúde da enfermagem. Ribeirão Preto -SP, 2008.**

Espécie	Número	Disco Difusão		Oxacilina 6µg		Gene <i>mecA</i>	
		n °	%	n °	%	n °	%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	41	20	48,8	19	46,3	15	36,6
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	25	5	20	4	16	4	16
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	18	5	27,8	5	27,8	4	22,2
<i>Staphylococcus lugdunenses</i>	4	2	50	2	50	1	50

Tabela 3 Características de espécies de estafilococos coagulase negativa (N-32) isolados da saliva de profissionais da enfermagem, de acordo com o perfil de suscetibilidade e detecção do gene *mecA*. Ribeirão Preto, 2008

N	Espécie	Oxacilina	Cefoxitina	Mupirocina	Vancomicina	Oxacilina 6µg	Gene <i>mecA</i>
15	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	R	R	R	S	+	+
21	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	R	R	R	S	+	-
29	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	R	S	R	S	-	+
41	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	R	R	R	S	+	+
57	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	R	R	R	S	+	+
60	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	R	R	R	S	+	-
63	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	R	R	R	S	+	-
64	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	R	S	R	S	+	-
85	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	R	S	R	S	+	+
87	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	R	S	R	S	+	+
90	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	R	S	R	S	+	+
107	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	R	R	R	S	+	+
121	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	R	S	R	S	+	+
136	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	R	S	R	S	+	+
138	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	R	S	R	S	+	-
179	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	R	S	R	S	+	+
209	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	R	R	R	S	+	+
271	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	R	S	S	S	+	+
277	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	R	S	S	S	+	+
288	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	R	R	R	S	+	+
67	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	R	R	R	S	+	-
157	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	R	R	R	S	+	+
164	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	R	R	R	S	+	+
216	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	R	R	R	S	+	+
277	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	R	S	S	S	+	+
63	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	R	S	R	S	+	-
188	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	R	S	R	S	+	+
205	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	R	R	S	S	+	+
210	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	R	S	S	S	-	+
224	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	R	S	R	S	+	+
125	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	R	S	R	S	+	-
303	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	R	R	R	S	+	+
R%		100,0	43,7	84,4	0,0	93,7	75,0

R: resistente, S: sensível

## **7. ANEXOS**

## INSTRUCTIONS TO AUTHORS

### Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

#### Aim and editorial policy

The Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical publishes scientific papers related to infectious and parasitic diseases, preventive medicine, public health and related subjects.

The journal appears six times a year and accepts papers from Brazilian or foreign workers which conform with these regulations and are approved by referees selected by the Editors.

1. As well as full papers the journal publishes short communications indicating the results of therapeutic trials, preliminary studies, new techniques, case reports, letters to the editor, historical events, bibliographic abstracts and summaries of these. Literature reviews and editorials will be published only when requested by the [Editorial Board](#).

2. The papers must be original and unedited, typed on A4 paper, in double spacing with a margin of 3 cm on the left side of the page. Three copies must be sent to the address given below, one of which must be the original.

#### Presentation of originals

3. The articles should be sent through diskettes together with three printed copies of the reviewed version, once observed the following requirements:

a) compatible 3 1/2" or 5 1/4" MS-DOS diskettes can be used. Macintosh diskettes in the format 3 1/2" will also be accepted. Eliminate from the diskettes any file not related to the paper which is being sent, including previous versions, back-ups and temporary files. The diskette label should contain: title of the article, author's name, file name, text editor utilized, and the accessory files names (style, sheets, graphics, tables, etc.);

b) the author is asked to send works compatible with the following text processings: Word for Windows (6.0 or prior version), Word for Macintosh (6.0 or prior version). Other

formats can be accepted but under previously agreement. Articles in ASCII (text only) format should never be sent;

c) when editing the text, the "enter" command may exclusively be used in the end of the paragraphs. Do not add extra spaces of "tabs" to the text in order to get first line backing nor title centralization in the page. Neither use additional backspacers ("enters") to space the paragraphs. To obtain these results, just use the paragraph format commands available in all the above mentioned text editors;

d) tables can be included since they are set up in the text editor itself. Notes and footnotes should preferably appear after the end of the article duely numbered and referenced as well;

e) illustrations, tables and graphs produced in other programs and "imported" for inclusion in the text should be sent in attached files, in easily compatible universal formats (TIFF, BMP, PICT, GIF, etc.). Avoid not-standardized formats (EPS, WMF, etc.) and files that only can be opened by specific programs. Anyway, always send a well printed copy of the graph, table or illustration for reproduction if necessary.

4. Although Portuguese is the preferred language, papers in English and Spanish are also accepted. Written in a clear precise manner, the text should be sufficiently concise to normally not exceed twelve type-written pages for papers and six for short communications.

5. The following sequence should be observed:

a) title of the paper (the original and translated one) and name of the authors in small letters. In the bottom of the page, the title of the institution where the work was done, affiliation of the authors, source of financial support (if any) and complete address for correspondence, including telephone and fax numbers, and e-mail;

b) abstract: 150 words long for articles and 50 for communications and case reports. This should summarise the objective of the work presented, how it was carried out, the results achieved and the conclusion reached. Abbreviations or bibliographic citations should not be included. Cite four or five key-words for indexing;

c) resumo: just after the summary in the language of the paper must be a faithful translation of the abstract, followed by the key-words;

d) introduction: clearly and objectively the purpose of the research, with information justifying the work, relating to previous paper in this field; reducing the citations to a minimum;

e) material and methods: in a precise manner the techniques necessary to understand and reproduce the works should be cited. Established methods should be referenced;

f) results: always when necessary should be accompanied by tables, figures or illustrations which present the data in such a clear manner so that only commentary and not duplication is necessary in the text, which should complement this data organization. When indicated, the data must be subjected to statistical analysis. This section should be informative, and not an interpretation;

g) discussion: the results are interpreted in the light of present understanding of the problem with the necessary references. Caution should be exercised with reference to hypotheses and speculations include only those that clarify the thinking behind the line of discussion;

h) acknowledgements: limited to those considered essential;

i) references: typed in small letters, without full stop between the abbreviations, in double spacing, numbered in alphabetical order using the last surname of the author; all authors must be cited. When there is more than one citation from the same author, a chronological order is followed. The citations, whose numbers come above the corresponding word without neither comma nor parenthesis, in the text must refer to the numeration in the reference list which has the following style and punctuation:

Articles in periodicals (the titles of the periodicals must appear in full as below):

Coura JR, Conceição MJ. Estudo comparativo dos métodos de Lutz, Kato e Simões Barbosa no diagnóstico da esquistossomose mansoni. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 8:153-158, 1974.

Books:

Chandra RK, Newberne PM. *Nutrition, immunity and infection: mechanisms of interactions*. Plenum, New York, 1977.

Book chapters:

Fulton JD. Diagnosis of protozoal diseases. In: Gell PGH, Coombs RRA (ed) Clinical aspects of immunology, 2nd edition, Blackwell, Oxford, p.133-136, 1968.

Abstract from meeting:

Brener Z. Variações intra-específicas do *Trypanosoma cruzi* e patogenia da doença de Chagas. In: Resumos do XIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília p.371, 1977.

Theses:

Tavares W. Contaminação do solo do Estado do Rio de Janeiro pelo *Clostridium tetani*. Contribuição ao conhecimento da distribuição natural do bacilo tetânico. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 1975.

Only published papers or papers in press can be cited in the reference list. Unpublished data or personal communications should be mentioned in the text as (AB Figueiredo: personal communication, 1980) or (CD Dinis, EF Oliveira: unpublished data).

6. Tables: should be numbered in Arabic numerals with a short descriptive title. Try to keep tables to a minimum, and remember that large tables are difficult to understand. They must be typed on separate sheets, with no vertical lines, with units referred to at the head of each column. Tables' data, including the title, must be written in small letters, except the abbreviations.

7. Illustrations: should be of good quality and consecutively numbered in Arabic numerals. Beside the photographs, graphics, pictures, etc. must be referred in the text as Figures. Note on the reverse in pencil the number of the figure and the name of the author and paper. The titles should be listed on a separate sheet using the reference numbers. The minimum number of illustrations should be submitted.

8. Ethics committee: research work on human beings must present the name of the Ethics Committee that had approved it.

9. Authors agreement: a written statement of all authors giving permission for publication of the paper is required.

**\* Preparação das soluções para genotipagem do gene *mecA*:**

**- Tampão TE**

Tris-HCl pH 7.5	10mM ( $10^{-3}$ mol/L)
EDTA	1mM
Água tipo I	

Ex: Tem-se no laboratório Tris-HCl pH 7.5 1M (100 vezes concentrado) e EDTA 10mM (10 vezes concentrado). Então deve-se usar a proporção Tris-HCl pH 7.5:EDTA 1:10.

Assim, para 200 mL de tampão TE, utiliza-se 2 mL de Tris-HCl pH 7.5 e 20 mL de EDTA e completa-se, em balão volumétrico, o volume para 200 mL com água tipo I.

**- Tris HCl 1M, pH 7,5 (1 litro)**

Tris (trizima base)	121,1g
HCl concentrado (solução 6N)	
HCl diluído (solução 1N)	
Água tipo I qsp	1L

Pesar a quantidade de sal e transferir quantitativamente para um béquer com aproximadamente 700 mL de água tipo I. Dissolver completamente. Introduzir com cuidado o pHmetro na solução. Adicionar aos poucos HCl 6N. Quando o pH estiver próximo de 8, deixar agitando por alguns minutos até o pH estabilizar. Adicionar HCl 1N para terminar de ajustar o pH. Completar o volume para 1L em balão volumétrico. Autoclavar a solução e armazenar na geladeira.

**- Solução NaCl 5M**

NaCl	292.2
Água tipo I qsp	1L

Pesar a quantidade de sal, dissolver em um béquer com um pouco de água tipo I e transferir quantitativamente para um balão volumétrico, completando o volume.

### - EDTA 1M pH 8,0

EDTA	186,1g
NaOH concentrado	
NaOH diluído (1N)	
Água tipo I qsp	500mL

Adicionar o sal, previamente pesado, em um béquer com aprox. 350mL de água tipo I. Colocar a solução sob agitação (obs.: o sal não se solubilizará por completo enquanto não estiver perto do pH 8,0) e introduzir com cuidado o pHmetro na solução. Adicionar aos poucos gotas de NaOH concentrado. Quando o pH estiver próximo de 8,0 deixar agitando sem adicionar a base até a dissolução completa do sal. Adicionar NaOH diluído (solução 1N) para terminar de ajustar o pH. Completar o volume para 500mL de água tipo I (de preferência em balão volumétrico). Autoclavar e armazenar a solução em geladeira.

### - Clorofil

Clorofórmio	24/25 (v/v)
Álcool isoamílico	1/25 (v/v)
TE	10% volume final

Ex. de solução: 10mL de álcool isoamílico + 240mL de clorofórmio (=250mL) + 25mL de TE(10%).

Misturar as quantidades necessárias de clorofórmio e álcool isoamílico, transferir para o recipiente de armazenamento e adicionar em torno de 10% do volume de solução preparada de solução TE. Agitar a solução por uns 30 segundos e deixar repousar. SEMPRE USAR A FASE INFERIOR DA SOLUÇÃO. NÃO AUTOCLAVAR. Armazenar em um frasco com tampa de rosca.

Obs.: composto muito volátil. O tampão TE cobre a solução e evita a evaporação.

**- Solução de SDS 10%**

SDS (Dodecil Sulfato de Sódio)	10g
Água tipo I qsp	100mL

**- Solução CTAB/NaCl (10%CTAB, 0,73M NaCl)**

CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio)	10g
NaCl	4,27g
Água tipo I qsp	100mL

Pesar o CTAB e colocar em um béquer com aprox. 50mL de água. Diluir em banho-maria, mexendo lentamente para não formar muitas bolhas (muito viscoso). Dissolver o sal em outro béquer com um pouco de água e misturar ao CTAB no banho-maria. Quando completamente homogêneo, completar o volume para 100mL e transferir para o frasco de armazenamento. NÃO AUTOCLAVAR. A solução final se apresentará translúcida e viscosa.

**- Solução de Lisozima 20mg/mL**

Lisozima	20mg
Água miliQ esterilizada	1mL (1000µL)

Rotular um microtubo de 1,5mL com nome, concentração e data. Pesar a lisozima diretamente no microtubo com o auxílio de uma espátula pequena. Pipetar a água e homogeneizar utilizando-se de uma micropipeta de 1000µL. Armazenar no freezer (-20°C).

**- Proteinase K 20mg/mL**

Proteinase K	20mg
Água miliQ esterilizada	1mL (1000 $\mu$ L)

Rotular um microtubo de 1,5mL com nome, concentração e data. Pesar a proteinase K diretamente no microtubo com o auxílio de uma espátula pequena. Pipetar a água e homogeneizar utilizando-se de uma micropipeta de 1000 $\mu$ L. Armazenar no freezer(-20°C).

**- Etanol 70%**

Etanol PA	70mL
Água tipo I qsp	100mL