



Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Campus de Botucatu

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

Programa de Pós – Graduação em Doenças Tropicais

Taisa Trevizani Rocchetti

Deteção do operon *ica* da produção de biofilme, gene *mecA* de resistência à oxacilina e identificação de espécies de *Staphylococcus* spp. diretamente dos frascos de hemoculturas pela técnica de PCR multiplex

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (FMB/UNESP), para obtenção do Título de Mestre em Doenças Tropicais

Orientador: Prof^ª. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Co-orientador: Prof^º. Alessandro Lia Mondelli

Botucatu – São Paulo

2014

Taisa Trevizani Rocchetti

Detecção do operon *ica* da produção de biofilme, gene *mecA* de resistência à oxacilina e identificação de espécies de *Staphylococcus* spp. diretamente dos frascos de hemoculturas pela técnica de PCR multiplex

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (FMB/UNESP), para obtenção do Título de Mestre em Doenças Tropicais

Orientador: Prof^ª. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Co-orientador: Prof^º. Alessandro Lia Mondelli

Botucatu – São Paulo

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Rocchetti, Taisa Trevizani.

Detecção do operon *ica* da produção de biofilme, gene *mecA* de resistência à oxacilina e identificação de espécies de *Staphylococcus* spp. diretamente dos frascos de hemoculturas pela técnica de PCR multiplex / Taisa Trevizani Rocchetti. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Coorientador: Alessandro Lia Mondelli

Capes: 21202010

1. Biofilme. 2. Microorganismos - Efeito dos antibióticos. 3. Estafilococos. 4. Reação em cadeia de polimerase. 5. Identificação.

Palavras-chave: Hemocultura; Identificação; PCR multiplex; *Staphylococcus* spp.

Epígrafe



*“O êxito da vida não se mede pelo
caminho que você conquistou, mas sim
pelas dificuldades que superou no
caminho”*

Abraham Lincoln

Dedicatória



*Dedico a minha família que
sempre me apoiou e acreditou em
mim.*

Agradecimientos

Primeiramente a Deus por ter me protegido e me dado força na minha caminhada, fazendo com que tudo desse certo;

Ao meu pai Vanderlei Rocchetti e minha mãe Maria Regina Trevizani, pela educação e carinho, me ensinando a nunca desistir dos meus sonhos;

Ao meu irmão Thiago Trevizani Rocchetti e a minha irmã Talita Trevizani Rocchetti por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos;

A Rosalina Fernandes, que sempre esteve presente em todos os momentos e conquistas, me proporcionando carinho e apoio;

A Professora Dr^a Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha, minha orientadora, por ter me aceitado como sua aluna de mestrado, me ensinando e orientando na elaboração deste trabalho;

Ao Professor Dr^o Alessandro Lia Mondelli pela orientação e principalmente por ter aberto as portas do Laboratório de Microbiologia da Seção Técnica de Laboratórios Clínicos do Hospital da Clínicas para que eu pudesse realizar o meu trabalho;

A Professora Dr^a Terue Sadatsune por sempre ter me apoiado, me orientado, ter sido mais que uma professora, desde a minha chegada a Botucatu;

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia da Seção Técnica de Laboratórios Clínicos do Hospital da Clínicas, Adriano, Marcos, Reonice, Jackson, Ana e Roque pelo aprendizado e paciência;

Aos Meus colegas do Laboratório de Bacteriologia do Instituto de Biociências, Mariana, Lígia, Pamela, Ayrir, Eliane, Valéria, Danilo, Priscila, Luiza, Carla, Carlos, Adilson, Ariane pelo companheirismo e ensinamentos;

A minha amiga e colega de mestrado Katheryne Benine, pelo companheirismo, força, e principalmente pela ajuda na realização do trabalho e pela amizade;

Aos meus grandes amigos, Berenice Simões, Flávia Palombarini, Patricia Phidichino, Gabriel Vitor, pela força, amizade, carinho, companheirismo e paciência;

Ao meu namorado Rafael Dellevedove pelo companheirismo e carinho e principalmente pela paciência e a sua família por todo o carinho para comigo;

A Flávia, Pamela, Aline e Melissa pelo companheirismo, amizade e paciência;

Aos meus colegas de trabalho do Laboratório Clínico do Hospital Misericórdia por toda atenção, aprendizado e paciência;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro, processo 2010/14250-0;

E a Todos que de alguma forma contribuíram para a minha caminhada e a realização desse trabalho.

Muito obrigada!!!!!!

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2.OBJETIVO.....	28
2.1 Objetivo Geral	28
2.2 Objetivos Específicos	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	3030
3.1 Coleta das amostras	3030
3.2 Identificação fenotípica de <i>Staphylococcus aureus</i> e Estafilococos coagulase negativa	3131
3.3 Extração do DNA diretamente dos frascos de hemocultura	3333
3.4 Testes de susceptibilidade à antimicrobianos	355
3.5 Padronização do multiplex 1 para detecção do gênero <i>Staphylococcus</i> spp., <i>S. aureus</i> e do gene <i>mecA</i>	366
3.6 Teste de sensibilidade	388
3.7 Teste de especificidade	388
3.8 Padronização do multiplex 2 para detecção do operon <i>ica</i>	388
3.9 Padronização do multiplex 3 para identificação de espécies de ECN	4444
3.10 Internal Transcribed Spacer PCR (ITS-PCR) para confirmação do resultado da identificação genotípica	4646
3.11 Análise estatística.....	48

4. RESULTADOS	
.....	4950
4.1 Amostragem.....	5050
4.2 Identificação Fenotípica	5151
4.3 Detecção de suscetibilidade à oxacilina pelo teste de Disco difusão	5252
4.4 Multiplex 1.....	5353
4.5 Teste de sensibilidade do PCR multiplex 1	566
4.6 Teste de especificidade do PCR multiplex 1	577
4.7 Multiplex 2.....	588
4.8 Multiplex 3.....	6060
4.9 Identificação Genotípica ITS-PCR.....	6262
4.10 Identificação Genotípica.....	6363
4.11 Custos.....	64
5. DISCUSSÃO	67
6.CONCLUSÃO.....	78
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
8. ANEXO.....	
9797	
8.1 Anexo 1: Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).....	97

Índice de Figuras

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Microscopia eletrônica de células de <i>Staphylococcus</i> spp.....	17
Figura 2: Organização estrutural do operon <i>ica</i>	19
Figura 3: Etapas da formação do biofilme.....	20
Figura 4: Microscopia eletrônica de biofilme em superfície de cateter.....	21
Figura 5: Diagrama do mecanismo de resistência à oxacilina e presença da PBP2a que confere menor afinidade para β -lactâmicos em geral.....	23
Figura 6: Frascos de hemocultivos.....	24
Figura 7: Aparelho Bactec 9120 utilizado para a detecção de culturas positivas nos frascos de hemoculturas.....	31
Figura 8: Placa de Ágar sangue com crescimento de colônias de <i>Staphylococcus</i> spp.....	31
Figura 9: Provas bioquímicas para identificação de espécies de ECN.....	32
Figura 10: Tratamento com álcool Benzílico.....	34
Figura 11: Kit Illustra GE Healthcare utilizado na extração do DNA diretamente do frasco de Hemocultura.....	35
Figura 12: Gel de eletroforese com o produto da padronização do PCR multiplex 1 para a detecção do gênero <i>Staphylococcus</i> spp., <i>S. aureus</i> e gene <i>mecA</i>	37
Figura 13: Gel de eletroforese com o produto da primeira padronização do multiplex 2 para detecção dos genes do operon <i>ica</i>	39
Figura 14: Gel de eletroforese com o produto do multiplex 2 para detecção do operon <i>ica</i> em ECN.....	42

Figura 15: Gel de eletroforese do produto da reação do multiplex 2 para detecção do operon <i>ica</i> em <i>S. aureus</i>	43
Figura 16: Gel de eletroforese do produto da reação do PCR multiplex 3 para a detecção de espécies de ECN.....	45
Figura 17: Gel de eletroforese do produto da reação do ITS-PCR para a confirmação da identificação das espécies de ECN pelo PCR multiplex 3.....	47
Figura 18: Identificação fenotípica de <i>S. aureus</i> e Estafilococos coagulase-negativa (ECN).....	51
Figura 19: Identificação fenotípica de ECN.....	52
Figura 20: Resistência à oxacilina em amostras de <i>Staphylococcus</i> spp. pelo método de disco difusão.....	53
Figura 21: Gel de eletroforese do produto da amplificação do multiplex 1 em amostras de hemocultura para a detecção do gênero <i>Staphylococcus</i> e do gene <i>mecA</i>	54
Figura 22: Gel de eletroforese do produto da amplificação do teste de sensibilidade para ECN e <i>S. aureus</i> do PCR multiplex 1.....	56
Figura 23: Gel de eletroforese do produto da amplificação do teste de especificidade do PCR multiplex.....	57
Figura 24: Gel de eletroforese do produto da amplificação do multiplex 2 para detecção do operon <i>ica</i> em amostras de ECN.....	58
Figura 25: Gel de eletroforese do produto da amplificação do multiplex 2 para detecção do operon <i>ica</i> para amostras de <i>S. aureus</i>	59
Figura 26: Gel de eletroforese do produto da amplificação do multiplex 3 para a	

identificação de espécies de ECN diretamente dos frasco de hemoculturas.....	61
Figura 27: Gel de eletroforese do produto do ITS-PCR para a identificação das amostras em que ocorreu discrepância com o resultado da identificação fenotípica....	63
Figura 28: Identificação genotípica do multiplex 3 para identificação de espécies de ECN diretamente de hemoculturas.....	64

Índice de Tabelas

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. <i>Primers</i> utilizados na reação de PCR multiplex 1 para detecção do gênero <i>Staphylococcus</i> spp.e do gene <i>mecA</i>	36
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados na reação de PCR multiplex 2 para a detecção do operon <i>ica</i> em <i>S.aureus</i> e ECN.....	40
Tabela 3: <i>Primers</i> utilizados na reação do PCR multiplex 3 para detecção de espécies de ECN diretamente do frasco de hemocultura.....	44
Tabela 4. Valores para o teste de concordância Kappa.....	48
Tabela 5: Distribuição das amostras isoladas de pacientes por enfermarias do Hospital das Clínicas da FMB, UNESP.....	50
Tabela 6: Relação entre os resultados da detecção do gene <i>mecA</i> e o teste de Disco difusão com oxacilina (1 µg) e cefoxitina (30 µg), e os testes complementares para confirmação da resistência a oxacilina.....	55
Tabela 7: Distribuição dos genes do operon <i>ica</i> encontrados nas amostras de ECN e <i>S.aureus</i> pelo multiplex 2.....	60
Tabela 8: Discordância entre identificação fenotípica e genotípica no PCR multiplex 3.	62
Tabela 9: Custos da identificação realizada pelo aparelho Vitek e pela técnica de PCR multiplex.....	65

Resumo

RESUMO

Na última década houve uma clara mudança na etiologia da sepse. Dados recentes do *National Healthcare Safety Network* (NHSN) mostram que os cocos Gram-positivos têm ultrapassado os bacilos Gram-negativos como os principais agentes etiológicos e os *Estafilococos* coagulase negativa (ECN) se tornaram os agentes mais frequentes. Entretanto a maioria dos laboratórios clínicos não identifica esses microrganismos a nível de espécies devido à necessidade de realização de uma série de provas bioquímicas. A aplicação de técnicas de biologia molecular, entre elas a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a identificação de bactérias se mostrou uma técnica promissora devido a sua rapidez, acurácia e sensibilidade. Assim, este trabalho objetivou avaliar a eficiência, acurácia e sensibilidade da técnica de PCR multiplex para a detecção do gênero e de espécies de *Staphylococcus* spp. mais encontradas em hemoculturas, do operon *ica* de produção de biofilme e da presença do gene *mecA* de resistência à oxacilina diretamente dos frascos de hemocultivo. Foram analisadas 371 amostras de hemoculturas, positivas para o gênero *Staphylococcus* obtidas de pacientes atendidos no HC da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB). As amostras foram isoladas e identificadas por testes bioquímicos convencionais e simultaneamente o DNA bacteriano foi extraído diretamente das hemoculturas e destes realizou-se o PCR multiplex. Das 371 amostras estudadas 85 (23,0%) foram de *S. aureus* e 286 (77,0%) ECN. Dos ECN 152 (53,1%) foram identificados como *S. epidermidis*, 36 (12,6%) *S. haemolyticus*, 36 (12,6%) *S. hominis*, 23 (8,0%) *S. capitis*, 18 (6,3%) *S. warneri*, 7 *S. caprae*, 5 *S. simulans*, dois *S. lugdunensis*, dois *S. cohnii*, um *S. saprophyticus*, um *S. schleiferi*, um *S. xylosus* e concomitantemente um *S. haemolyticus* e *S. hominis*, e um *S. haemolyticus* e *S. epidermidis*. Das 85 amostras de *S. aureus*, 43 (50,6%) se mostraram resistentes à oxacilina pelo teste de Disco difusão e destes 42 (97,7%) apresentaram o gene *mecA*, e das 286 amostras de ECN 236 (82,5%) foram resistentes à oxacilina no teste

fenotípico e destes 218 (92,4%) foram positivas para o gene *mecA*. A identificação fenotípica e a genotípica (PCR multiplex 1) mostrou 100% de concordância nas amostras de hemoculturas onde foram isolados *S. aureus* e ECN. Nas 286 amostras de ECN foi realizado o multiplex 2 para a detecção dos genes presentes no operon *ica*. Em 96 (33,5%) amostras não ocorreu a amplificação de nenhum gene, enquanto que em 88 (30,7%) amostras ocorreu a amplificação do operon completo. Das 85 amostras de *S. aureus*, somente três (3,5%) apresentaram o operon completo. Dentre as 286 amostras positivas para ECN pelo multiplex 1, quando submetidas ao multiplex para identificação das espécies (multiplex 3) revelaram 162 (56,6%) *S. epidermidis*, 44 (15,7%) *S. haemolyticus*, 36 (12,6%) *S. hominis*, 22 (7,7%) *S. capitis*, um *S. warneri*, um *S. lugdunensis*, e concomitantemente um *S. epidermidis* e *S. lugdunensis*, um *S. haemolyticus* e *S. hominis* e 18 amostras não foram identificadas. A comparação dos resultados obtidos na identificação fenotípica e multiplex 3 mostrou concordância de 93,0% (266 amostras).

Palavras-chaves: Identificação, *Staphylococcus* spp., Hemocultura, PCR multiplex.

Abstract

ABSTRACT

A clear shift in the etiology of sepsis has occurred in the last decade. Recent data from the National Healthcare Safety Network (NHSN) show that Gram-positive cocci have exceeded Gram-negative bacilli as the major etiological agents. In this respect, coagulase-negative staphylococci (CoNS) have become the most frequent. However, most clinical laboratories do not identify these microorganisms to species level due to the need for a series of biochemical tests. The application of molecular biology techniques, including the polymerase chain reaction (PCR), for bacterial identification proved to be promising due to their speed, accuracy and sensitivity. The aim of this study was to evaluate the efficiency, accuracy and sensitivity of multiplex PCR for the detection of *Staphylococcus* spp. frequently found in blood cultures, investigation of the *ica* operon involved in biofilm formation and the *mecA* gene encoding oxacillin resistance, and direct detection of major CoNS species in blood culture flasks. A total of 371 blood culture samples positive for *Staphylococcus* spp. obtained from patients seen at the Hospital of the Botucatu School of Medicine (FMB) were analyzed. The strains were isolated and identified by conventional biochemical tests. Simultaneously, bacterial DNA was extracted directly from the blood cultures for multiplex PCR. *S. aureus* was isolated from 85 (23%) of the 371 samples studied and CoNS from 286 (77%). Among the latter, 152 (53.1%) isolates were identified as *S. epidermidis*, 36 (12.6%) as *S. haemolyticus*, 36 (12.6%) as *S. hominis*, 23 (8%) as *S. capitis*, 18 (6.3%) as *S. warneri*, 7 as *S. caprae*, 5 as *S. simulans*, two as *S. lugdunensis*, two as *S. cohnii*, one as *S. saprophyticus*, one as *S. schleiferi*, and one as *S. xylosus*. *S. haemolyticus* and *S. hominis* were concomitantly identified in one sample and *S. haemolyticus* and *S. epidermidis* in another. Forty-three (50.6%) of the 85 *S. aureus* strains were resistant to oxacillin in the Disk diffusion test and 42 (97.7%) carried the *mecA* gene. Of the 286 CoNS strains, 236 (82.5%) were resistant to oxacillin in the phenotypic test and 218 (92.4%) were positive for the *mecA* gene. Phenotypic and genotypic (multiplex 1)

identification showed 100% agreement in samples of blood culture from which *S. aureus* and CoNS were isolated. The 286 CoNS isolates were submitted to multiplex 2 for the detection of genes of the *ica* operon. None of the genes was amplified in 96 (33.5%) isolates, whereas amplification of the complete operon was observed in 88 (30.7%). Only three (3.5%) of the 85 *S. aureus* strains carried the complete operon. Multiplex 3 for species identification in the 286 samples positive for CoNS revealed *S. epidermidis* in 162 (56.6%), *S. haemolyticus* in 44 (15.7%), *S. hominis* in 36 (12.6%), *S. capitis* in 22 (7.7%), *S. warneri* in one, *S. lugdunensis* in one, *S. epidermidis* and *S. lugdunensis* concomitantly in one, and *S. haemolyticus* and *S. hominis* in one. Eighteen isolates could not be identified by multiplex PCR. Comparison of the results obtained by phenotypic and genotypic identification of CoNS species showed 93% agreement (266 strains).

Keywords: Identification, *Staphylococcus* spp., Blood culture, Multiplex PCR.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Infecções da Corrente sanguínea constitui um problema de saúde pública, pois eleva o tempo de hospitalização, morbidade e mortalidade dos pacientes além dos custos no tratamento¹. Pode ser causada tanto pela microbiota do paciente ou pela contaminação pelo manuseio deste pelos profissionais da saúde, aumentando sua probabilidade em internações mais longas ou em procedimentos mais complicados².

A sepse refere-se ao sistema circulatório, sendo resultado da complexa interação entre o sistema imune com o microrganismo infectante³. Ela pode ser causada por bactérias, fungos ou vírus, ocorrendo quando os agentes se multiplicam a uma taxa que excede sua remoção. É uma síndrome clínica caracterizada por febres, calafrios, mal-estar, taquicardia, hiperventilação, e toxidade ou prostração. Os seus sintomas são produzidos por toxinas microbianas e/ou citocinas produzidas por células inflamatórias⁴.

A sepse pode indicar a disseminação de uma infecção em um órgão ou tecido, podendo manifestar quadros leves até ao óbito⁵. Pode ser classificada como adquirida na comunidade ou nosocomial, podendo ocorrer em pacientes imunocompetentes ou imunossuprimidos, onde o tipo de microrganismo e o prognóstico da infecção resultante variam muito dependendo desses fatores, bem como da idade do paciente⁶.

Inúmeras bactérias são isoladas da corrente sanguínea, tanto Gram-positivas como Gram-negativas. Dados do *National Healthcare Safety Network*⁷ mostram que na última década houve uma clara mudança na natureza da microbiota infecciosa, onde os cocos Gram-positivos têm ultrapassado os bacilos Gram-negativos como os principais agentes etiológicos das sepses, e os *Estafilococos coagulase negativa* (ECN) se tornaram os agentes mais prevalentes.

Em um levantamento realizado no Laboratório de Microbiologia da Seção Técnica de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu em 2011, 55% das hemoculturas positivas foram por cocos Gram-positivos, e destes, 94% eram *Staphylococcus* spp.

Os Estafilococos são cocos Gram-positivos, que se dispõem em cachos quando visualizados no microscópio (Figura 1). O gênero *Staphylococcus* é composto por 48 espécies⁸, 17 das quais podem ser isoladas de amostras biológicas humanas, sendo dividido em dois grandes grupos: os Estafilococos coagulase positiva, onde o principal representante é o *S. aureus* e os Estafilococos coagulase negativa (ECN). Os ECN foram anteriormente considerados não patogênicos ou somente parte da microbiota normal da pele humana. Porém recentemente eles têm sido implicados em uma enorme variedade de infecções tanto em hospedeiros imunodebilitados quanto em pessoas saudáveis⁹.



Figura 1: Microscopia eletrônica de células de *Staphylococcus* spp.

Fonte: http://www.redorbit.com/education/reference_library/health_1/bacteria/2584196/staphylococcus_aureus/.

S. aureus pode causar uma grande variedade de infecções, muitas delas adquiridas no ambiente hospitalar. De 20% a 30 % da população humana é colonizada por essa bactéria sendo a mucosa nasal o principal nicho¹⁰.

S. aureus apresenta uma grande variedade de fatores de virulência, podendo produzir enzimas, moléculas de adesão, peptidoglicano e ácido teicóico, e quatro classes de citotoxinas¹¹, as quais compreendem: quatro hemolisinas (alfa, beta, gama e delta); a leucocidina de Panton-Valentine (genes *pvl*, *LukE-lukD*), designada como PVL, sendo a principal função dessas exoproteínas a conversão do tecido local do hospedeiro em nutrientes necessários para o crescimento bacteriano¹², toxina da síndrome do choque tóxico (gene *tst*), enterotoxinas estafilocócicas (genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh* e *sei*) e toxinas esfoliativas (genes *eta* e *etb*). Esses fatores possuem potente efeito no sistema imune, possibilitando a disseminação desses microrganismos pelo tecido do hospedeiro, causando uma série de infecções¹³.

Entre os ECN, as espécies que mais frequentemente causam doenças em humanos são: *S. epidermidis*, sendo o mais isolado, podendo causar sepse, infecções por implante de cateteres e próteses, peritonites entre outras¹⁴. *S. haemolyticus* que também faz parte da microbiota normal da pele, representa o segundo mais isolado de infecções, podendo causar infecções graves, como meningites, endocardites, peritonites, sepse¹⁵, sendo frequentemente resistentes a um grande número de antimicrobianos, incluindo resistência aos Glicopeptídeos¹⁶. *S. saprophyticus*, sendo o mais comum dos estafilococos causador de infecção urinária em mulheres jovens e sadias¹⁷; *S. warneri*, constitui 1% dos *Staphylococcus* encontrados na pele humana, e é peculiar por produzir uma enzima extracelular que possui atividade tanto de lipase quanto de fosfolipase¹⁸; *S. lugdunensis* que em termos de virulência e destruição tecidual tem o mesmo curso clínico que infecções causadas por *S. aureus*¹⁹, podendo causar endocardites, peritonite, osteomielite entre outras²⁰ e *S. hominis*, também encontrado na pele de humanos, é

um patógeno de baixo grau de virulência, podendo causar endocardite e infecções relacionadas a cateteres²¹. Dentre os *Staphylococcus* spp. as espécies mais frequentemente isoladas em hemoculturas são *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. hominis*.

O principal fator de virulência dos *Staphylococcus* spp. está associado à formação do biofilme que propicia a adesão destes as superfícies plásticas. A aderência é mediada por uma adesina intracelular polissacarídica (PIA) composto por N-acetilglucosamina β -1,6-glicosídeo, e sintetizado pela enzima N-acetilglucosaminiltransferase^{22,23}.

O PIA é codificada pelo operon *ica*ADBC (Figura 2), composto de quatro genes *icaA*, *icaD*, *icaC*, *icaB*, e uma região promotora denominada *icaR*. O *icaD* sozinho não induz atividade enzimática de transferase, enquanto que o *icaA* isolado induz pouca atividade. Entretanto, quando *icaA* e *icaD* são expressos conjuntamente, a atividade enzimática é aumentada, formando oligômeros de até 20 resíduos, sintetizando maior quantidade de PIA. Também se constatou que o gene *icaC* é necessário para a síntese de oligômeros de N-acetilglucosamina, por aumentar o tamanho destes para 130 resíduos. Ainda se conhece pouco da função do *icaB*, mas o que se sabe é que este participa como um catalizador da diacetilação da molécula de PIA. Assim, os genes *icaA*, *icaD* são essenciais para a produção do PIA, mas quando presentes o *icaC* e *icaB* auxiliam na síntese de longos oligômeros, estando envolvidos na biossíntese do PIA completo^{24,25,26}.



Figura 2: Organização estrutural do operon *ica*.

O desenvolvimento do biofilme ocorre em duas etapas (Figura 3), a primeira é a rápida adesão das bactérias à superfície, e a segunda é a acumulação, onde esta é mais prolongada e envolve a proliferação e adesão intracelular formando várias camadas de bactérias²⁷.

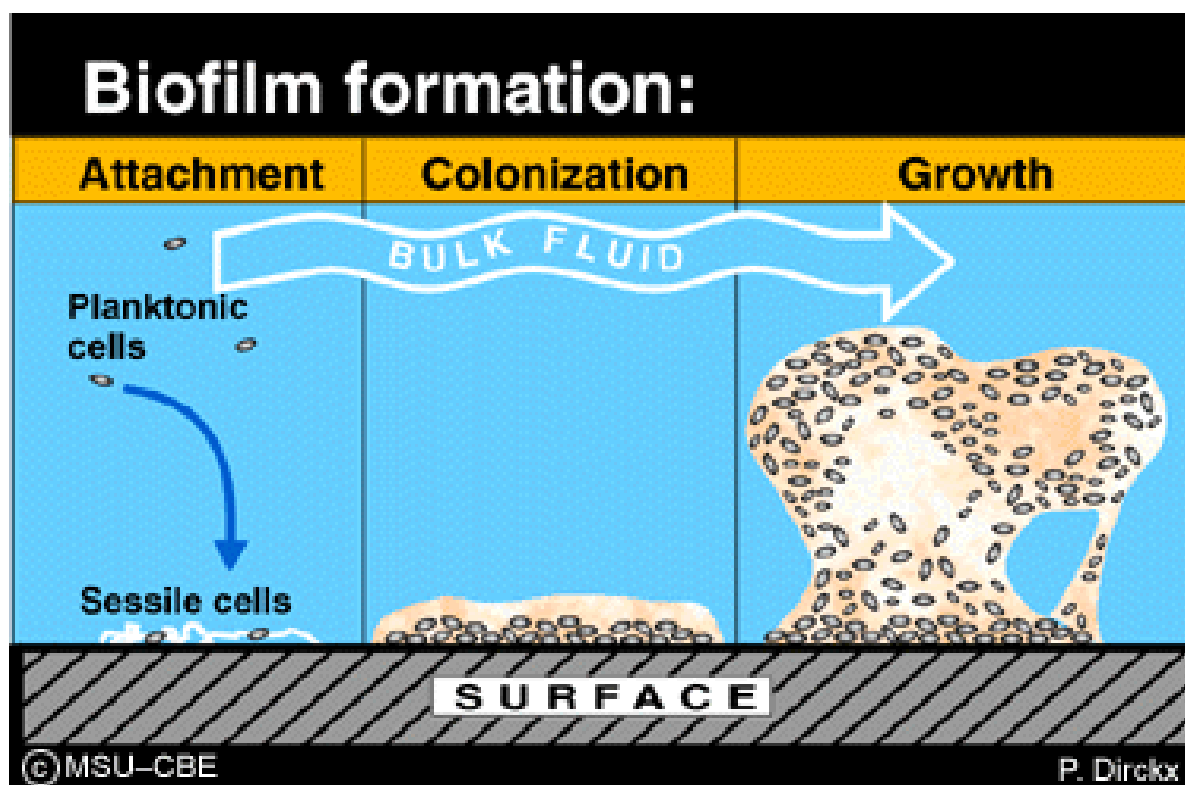


Figura 3: Etapas da formação biofilme. Fonte: <http://www.biofilm.montana.edu/image>.

O biofilme completamente formado é constituído por várias camadas de bactéria embebidas em um material extracelular amorfo-slime (Figura 4) que consiste da complexa mistura de vários açúcares constituintes da parede celular, proteínas extracelulares e ácido teicóico²⁸. Essa matriz extracelular pode atuar protegendo os microrganismos de agentes antimicrobianos, o que torna necessária a remoção do corpo estranho para que seja alcançada a cura do paciente^{29,30}.

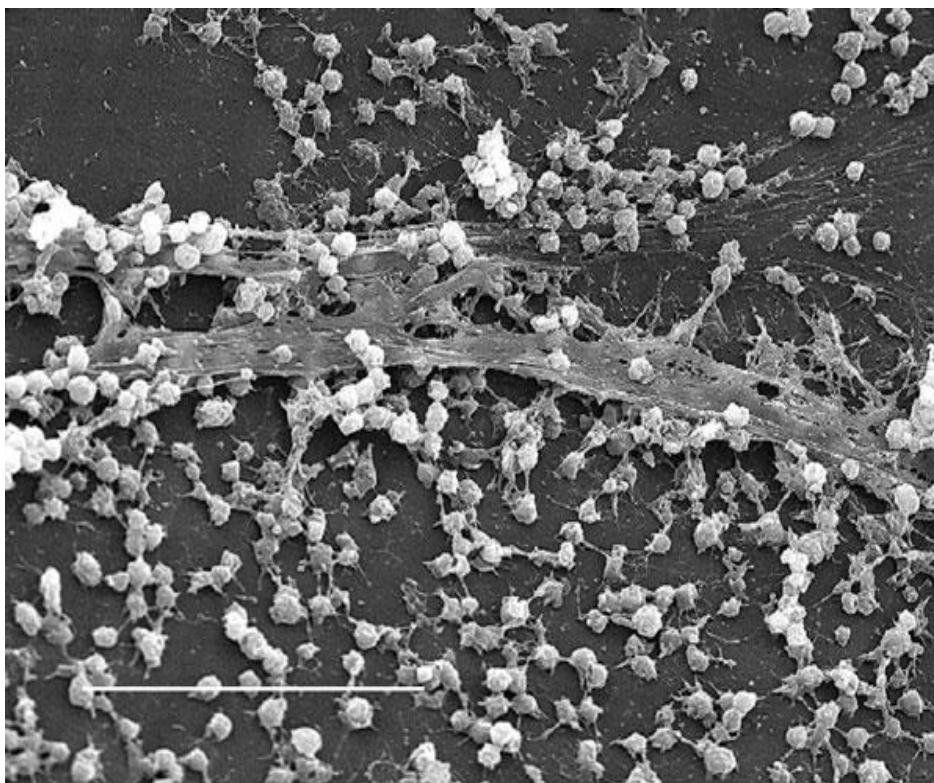


Figura 4: Fotomicrografia de varredura de biofilme em superfície de cateter.

Fonte: <http://alerafasamlu.blogspot.com.br>.

Assim com a formação do biofilme, ocorre a possibilidade dessas bactérias colonizarem a superfície de cateteres e terem acesso à corrente sanguínea do paciente podendo causar infecção, tornando importante a retirada do material para que ocorra a cura do quadro infeccioso.

Outro fator relevante que torna difícil o tratamento é a alta taxa de resistência desenvolvida pelos estafilococos, fazendo com que ocorra o uso em grande escala de antimicrobianos mais caros ou tóxicos como a Vancomicina³¹. Segundo levantamento do SENTRY entre 1997 e 2001 em Hospitais brasileiros e da América Latina a resistência à metilina em *Staphylococcus* spp. isolados de hemoculturas já se apresentava alta, com uma taxa de 76% a 80% de amostras resistentes³².

A parede celular das bactérias Gram-positivas tem como função a proteção contra lise osmótica e confere forma, rigidez e funciona como uma barreira em relação ao meio externo. O principal componente químico da parede celular dos estafilococos é formado pelo peptideoglicano, um polímero que consiste em longas cadeias de glicídeos com ligações cruzadas flexíveis de peptídeos que forma uma estrutura forte, mas elástica³³. O processo da ligação cruzada é catalisada por enzimas transpeptidases, as proteínas ligadoras de penicilina-PBPs³⁴. Os antibióticos β -lactâmicos produzem um efeito bactericida pela inibição das PBPs na síntese dos peptideoglicanos³⁵. Esta inibição é o resultado de uma ligação covalente formando um complexo estável do antibiótico com uma ou mais PBPs³⁶. Quando o peptideoglicano não pode ser formado, ocorre um distúrbio do mecanismo de controle das hidrolases (autolisinas), assim a bactéria entra em ciclo lítico e este processo leva à morte celular³⁵.

A resistência dos *Staphylococcus* spp. aos antibióticos β -lactâmicos deve-se principalmente a dois mecanismos distintos, porém ambos podem interagir. O primeiro mecanismo é a produção da enzima β -lactamase que hidrolisa o antibiótico, e o segundo está associado à alteração do sítio de ação dos β -lactâmicos pela produção de uma nova proteína ligadora de penicilina, a PBP2a (Figura 5), que tem baixa afinidade pelos antibióticos, ausente nos estafilococos sensíveis³⁷.

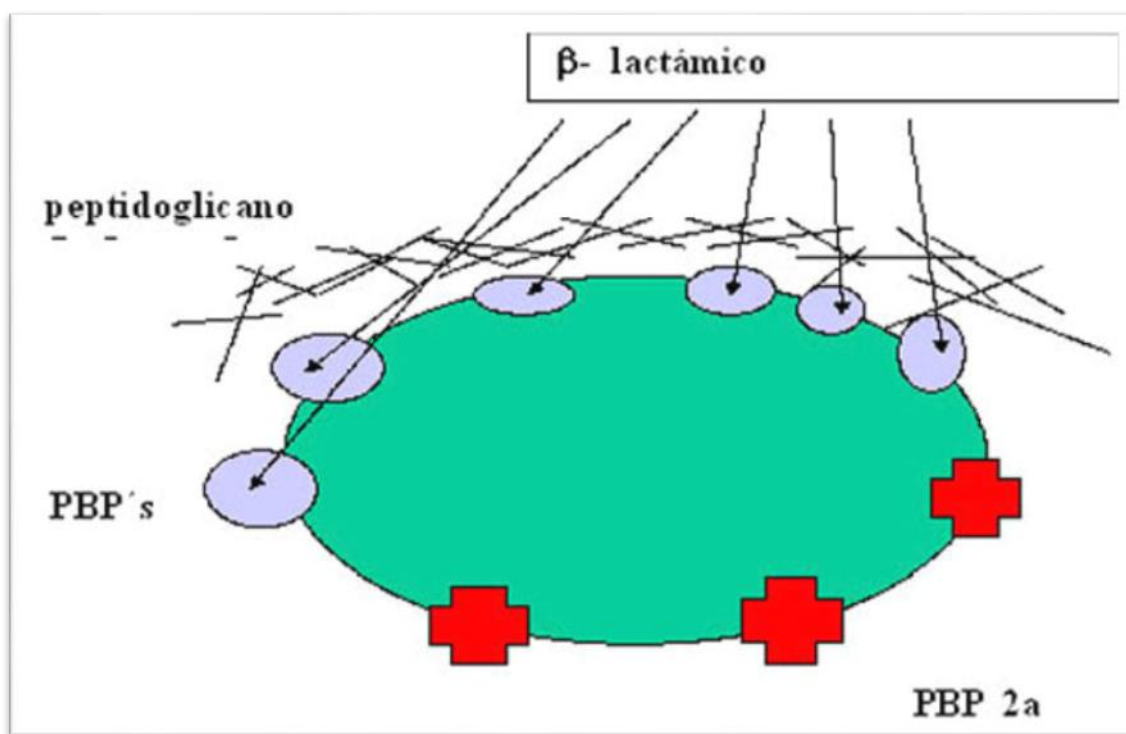


Figura 5: Diagrama do mecanismo de resistência à oxacilina e presença da PBP2a que confere menor afinidade para beta-lactâmicos em geral. Fonte: Rev. chil. infectol. v.19 supl.3 Santiago, 2002.

As β -lactamases são enzimas extracelulares, codificadas por plasmídeos, e baseado em testes sorológicos e cinéticos, podem ser divididas em 4 tipos (A a D), onde com exceção da D, são expressas em altos níveis somente na presença dos indutores, como a penicilina e seus análogos^{36,38}.

A PBP2a é codificada pelo gene *mecA*, contido no elemento cromossômico móvel denominado SCC*mec* (Staphylococcal Chromosome Cassete *mec*), amplamente distribuído entre os *Staphylococcus*³⁹. A PBP2a atua como uma transpeptidase retomando as funções da síntese de parede celular quando as outras PBPs estão inibidas, garantindo a integridade da célula bacteriana na presença de β -lactâmicos³¹.

Assim, devido aos fatores de patogenicidade descritos, a rápida detecção da bacteremia, seguida da rápida identificação das bactérias e determinação da sensibilidade a agentes antimicrobianos, pode ter uma grande importância diagnóstica e prognóstica⁴⁰, pois o pronto início da terapia antimicrobiana apropriada é comprovadamente importante para evitar o agravamento e mortalidade do paciente⁴¹.

Os laboratórios de rotina normalmente detectam microrganismos no sangue usando aparelhos automatizados. A introdução desses sistemas de leitura contínua representou um importante avanço na microbiologia clínica. Esses aparelhos, como exemplo o Bactec, possuem um dispositivo que detecta o crescimento do microrganismo nos frascos de hemocultivo (Figura 6) pela liberação de CO₂, onde cada um contém uma mistura de sangue e caldo. Cada frasco é colocado no aparelho, incubado a 37° C, onde a intervalos de 10 minutos um feixe de luz emitido por diodos, sendo projetado através de um filtro de excitação para refletir o sensor sensível a CO₂ no fundo de cada frasco. Assim se ocorrer acúmulo de CO₂ no frasco, ocorrerá à alteração do sensor, que gerará um alerta⁴². Se positivo sua identificação ocorrerá levando mais 48 a 72 horas.



Figura 6: Frascos de hemocultivos. Fonte: www.bd.com.

Muitos laboratórios não identificam as espécies de ECN, só os *S. aureus* e ECN pelos testes de catalase e coagulase, pois a identificação dos ECN consiste em uma série de testes bioquímicos⁴³. Esses testes necessitam de longo período de incubação tornando-o de pouca aplicabilidade prática nos laboratórios de microbiologia clínica de rotina. Este método consiste em uma série de testes bioquímicos como a utilização de xilose, arabinose, sacarose, trealose, maltose, lactose, manitol, ribose, frutose, tioglicolato, urease, ornitina entre outros^{9,43}.

Mesmo com a automação da detecção de microrganismo no sangue, a identificação e a determinação da sensibilidade aos antimicrobianos ainda são demoradas, necessitando de métodos eficientes e mais rápidos, principalmente se tratando da urgência nos casos de bacteremia. A aplicação de técnicas de biologia molecular, entre elas a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a identificação de bactérias se mostrou uma técnica promissora devido a sua rapidez, acurácia e sensibilidade na obtenção dos resultados⁴⁴.

O PCR constitui uma técnica que visa à replicação do DNA com o objetivo final de amplificar uma porção específica de DNA, que contenha informações diagnósticas úteis⁴⁵. As técnicas de PCR foram aprimoradas. Atualmente com a técnica de PCR multiplex consegue-se amplificar genes de múltiplos patógenos e mais de uma sequência de DNA específica para cada patógeno, utilizando-se múltiplos conjuntos de *primers* numa única reação⁴⁶. Com a utilização de PCR multiplex essa detecção pode ocorrer mais rapidamente, mostrando-se uma técnica eficiente para a identificação dos microrganismos patogênicos em amostras clínicas, principalmente naquelas em que ocorre grande emergência para o início do tratamento.

Os argumentos apresentados acima mostram a necessidade e a importância da utilização de técnicas de biologia molecular para auxiliar o diagnóstico de *Staphylococcus* spp. diretamente de hemoculturas, diminuindo o tempo da identificação, favorecendo rápido início de um tratamento específico, auxiliando o médico na conduta a ser tomada e consequentemente na diminuição do agravamento desses pacientes.

Assim, este trabalho objetivou avaliar a eficiência, acurácia e sensibilidade da técnica de PCR multiplex para a detecção de espécies de *Staphylococcus* spp. mais encontradas em hemoculturas, a presença do gene *mecA* de resistência a oxacilina e o operon *ica* responsável pela produção do biofilme nas amostras estudadas.

Objetivo

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a eficiência, acurácia e sensibilidade da técnica de PCR multiplex para a detecção de espécies de *Staphylococcus* spp. mais encontradas em hemoculturas, da presença do gene *mecA* de resistência à oxacilina e do operon *ica* responsável pela produção do biofilme nas amostras estudadas.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar *S. aureus* e as espécies de Estafilococos coagulase negativa (ECN) pela técnica de PCR multiplex direto dos frascos de hemoculturas;
- Identificar as espécies de *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. hominis* e *S. lugdunensis* pela técnica de PCR multiplex direto dos frascos de hemoculturas;
- Identificar *S. aureus* e as espécies de ECN pelo método convencional com testes bioquímicos;
- Comparar a identificação de espécies de *Staphylococcus* spp. pelo método convencional com a detecção genotípica pela técnica de PCR multiplex;
- Detectar o gene *mecA* nas espécies de *Staphylococcus* spp. pela técnica de PCR multiplex direto do frasco de hemocultivo.
- Comparar o resultado do teste de Disco difusão e o resultado da detecção do gene *mecA* pela técnica de PCR multiplex;
- Detectar os genes *icaA*, *icaD*, *icaB*, *icaC* e *icaR* do operon *ica* nas amostras de *Staphylococcus* spp. pela técnica de PCR multiplex direto do frasco de hemocultivo.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas 371 amostras de hemoculturas positivas para o gênero *Staphylococcus* cedidas pelo no Laboratório de Microbiologia da Seção Técnica de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu, isoladas de maio de 2011 a maio de 2012.

3.1 Coleta das amostras

As amostras incluídas no estudo foram obtidas no dia seguinte em que foram positivadas após incubação no aparelho Bactec 9120 (Figura 7) e após a confirmação pela coloração de Gram, de serem cocos Gram-positivos e positivos para o teste da catalase, comprovando que seriam prováveis amostras contendo *Staphylococcus* spp.

Antes da coleta foi realizada a desinfecção dos frascos de hemocultura com álcool 70% e com o auxílio de uma seringa de 5 ml e uma agulha calibre 70X25 mm foram retirados 3 ml da amostra e colocados em 2 microtubos (1,5ml em cada tubo). Um dos microtubos foi utilizado para a semeadura em Ágar sangue, para posterior identificação fenotípica e o outro microtubo foi utilizado para a extração do DNA das bactérias para a realização do PCR multiplex.

Todos os pacientes incluídos no estudo assinaram o Termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1).



Figura 7: Aparelho Bactec 9120 utilizado para a detecção de culturas positivas nos frascos de hemoculturas.

3.2 Identificação fenotípica de *Staphylococcus aureus* e *Estafilococos* coagulase negativa

A identificação fenotípica foi realizada no Laboratório de Bacterioscopia do departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências-IB da UNESP de Botucatu. As amostras foram semeadas em Ágar sangue e incubadas a 37C° por 24 horas (Figura 8).



Figura 8: Placa de Ágar sangue com crescimento de colônias de *Staphylococcus* spp.

Após isolamento em Ágar sangue as bactérias foram submetidas à coloração de Gram para confirmar características morfológicas tintoriais, teste da catalase para a caracterização do gênero *Staphylococcus* e teste da coagulase para a diferenciação de *S. aureus* e ECN. Estes últimos foram identificados por provas bioquímicas simplificadas conforme proposto por Cunha⁴³, com provas de utilização de açúcares: xilose, sacarose, trealose, maltose, manitol e crescimento em anaerobiose em tioglicolato de sódio (Figura 9). Para a identificação de algumas espécies de ECN foram realizadas provas adicionais, incluindo a produção de urease, descarboxilação da ornitina, redução do nitrato e teste de sensibilidade ao antimicrobiano Novobiocina. Após a identificação dessas amostras, os *Staphylococcus* spp. identificados foram congelados a - 20C° e - 80C°.

Xilose Sacarose Trealose Maltose Manitol Tioglicolato

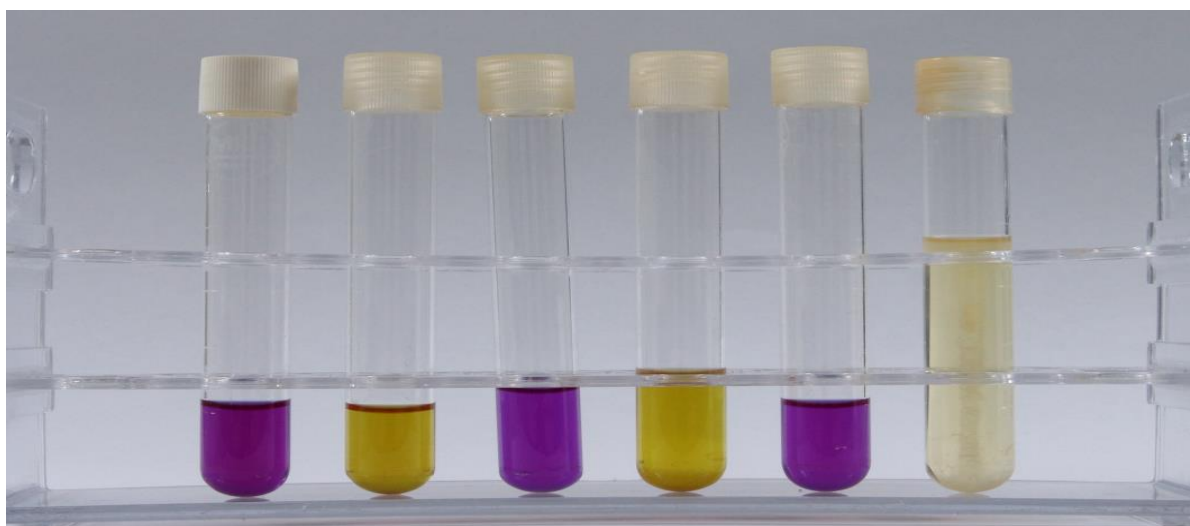


Figura 9: Provas bioquímicas para identificação de espécies de ECN.

3.3 Extração do DNA diretamente dos frascos de hemocultura

Os frascos de hemocultivo do sistema Bactec utilizados nesse estudo contém meio de cultura, anticoagulante polianetolesulfonato de sódio-SPS, substâncias que inibem a cascata do complemento do sistema imune do paciente, micropartículas que auxiliam na detecção da presença da bactéria pelo aparelho Bactec. Estes elementos podem comprometer o processo da extração do DNA bacteriano^{47,48} principalmente na técnica de extração utilizada neste trabalho, no qual a amostra é capturada em uma coluna de sílica e os elementos interferentes não permitem que o DNA se desprenda para eluição. Muitos protocolos foram testados para a extração do DNA, onde o mais eficaz foi o descrito a seguir.

Previamente à extração do DNA foi realizado um tratamento da amostra de sangue para a retirada de elementos presentes na hemocultura. A amostra de hemocultura foi centrifugada a 850g por 2 minutos⁴⁹. O sobrenadante foi colocado em outro microtubo e novamente centrifugado a 11.000g por 1 minuto. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente deixando somente no microtubo o pellet. Foram adicionados a esse pellet 500µl de tampão de lisozima (1 M de EDTA, 0,1 ml de NaCl, 10 mM Tris pH 8,0 e 5% Triton X-100) e homogeneizado no Vortex. Foram adicionados 800µl de álcool Benzílico (Sigma), homogeneizado no Vortex e o microtubo foi centrifugado a 7.000g por 5 minutos⁵⁰. Após esta etapa formou-se duas fases no microtubo, a inferior que continha o álcool com as substâncias interferentes (inibidores) e na fase superior estavam presentes as bactérias (Figura 10).

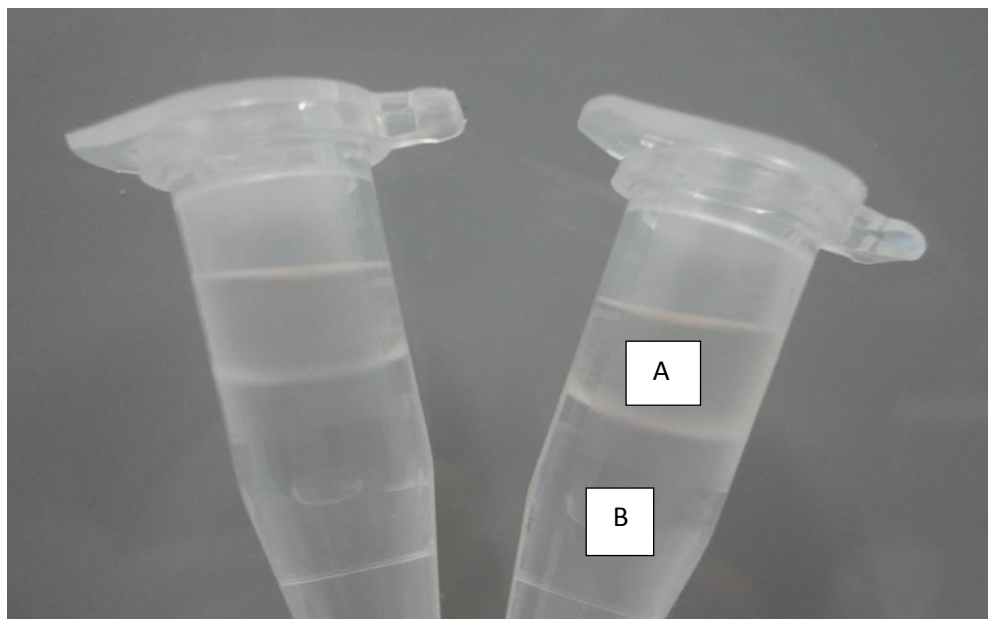


Figura 10: Tratamento com álcool Benzílico. A- Fase superior com bactérias;
B- Fase inferior com álcool Benzílico mais interferentes.

Foram retirados 320µl do líquido da fase superior e colocados em outro microtubo, onde foram adicionados 10µl da enzima lisozima (10mg lisozima em 1 ml de Tris-HCl 10 mM), sendo então homogeneizado no Vortex e colocado para incubação à temperatura ambiente por 15 minutos, onde foi realizada uma homogeneização a cada 5 minutos. Após essa etapa foram adicionados 10µl de proteinase K e incubação por 15 minutos a 56°C sendo homogeneizado a cada 5 minutos no Vortex. Após esse período o líquido (330µl) foi transferido para a coluna de sílica fornecido pelo Kit de extração Illustra (GE Healthcare) (Figura 11). Essa coluna foi colocada dentro de um tubo e centrifugado a 11.000g por 1 minuto. Após essa etapa adicionou-se 500µl de solução de lise à coluna e centrifugou-se a 11.000g por 1 minuto.

Foram adicionados 500µl de solução de lavagem na coluna, sendo novamente centrifugada a 11.000g por 3 minutos. O tubo foi descartado e a coluna foi transferida para um microtubo. Dentro da coluna foram adicionados 200µl de solução de eluição, previamente

aquecida a 70C° em banho Maria, e após incubação a temperatura ambiente por 1 minuto foi centrifugado a 11.000g por 1 minuto e o DNA obtido foi mantido em Freezer a -20C °.



Figura 11: Kit Illustra (GE Healthcare) utilizado na extração do DNA diretamente do frasco de hemocultura.

3.4 Testes de susceptibilidade a antimicrobianos

Os isolados foram submetidos aos testes de susceptibilidade *in vitro*, a partir da técnica de difusão em disco em placas de Ágar Mueller-Hinton, realizado pelo Laboratório de Microbiologia da Seção Técnica de Laboratórios Clínicos do Hospital das Clínicas da UNESP, Campus de Botucatu conforme critérios recomendados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI*⁵¹.

3.5 Padronização do multiplex 1 para detecção do gênero *Staphylococcus* spp., *S. aureus* e do gene *mecA*

Inicialmente à padronização do PCR, foi realizado um gradiente de anelamento para se estabelecer uma temperatura de anelamento adequada para todos os *primers*.

Tabela 1: *Primers* utilizados na reação de PCR multiplex 1 para detecção do gênero *Staphylococcus* spp. e do gene *mecA*.

<i>Gene</i>	<i>Primer</i>	<i>Fragmento Amplificado pb</i>
<i>S. aureus</i> ⁵²	SAU 327- 5' GGA CGA CAT TAG ACG AAT CA 3' SAU 1645- 3' CGG GCA CCT ATT TTC TAT CT 5'	1250
<i>16S</i> ⁵³ (<i>RNAr</i>)	16S ₁ - 5' CCTATAAGACTGGGATAACTTCGGG 3' 16S ₂ - 3' CTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCG 5'	791
<i>coa</i> ⁵⁴	COA ₁ - 5' GTA GAT TGG GCA ATT ACATTT TGG AGG 3' COA ₂ - 5' CGC ATCAGC TTT GTT ATC CCA TGT A 3'	117
<i>mecA</i> ⁵⁵	MRS ₁ - 5' AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC 3' MRS ₂ - 3' AGTTCTGCAGTACCGGATTTC 5'	533

A amplificação foi realizada no aparelho termociclador da marca Eppendorf. As condições de amplificação foram: 92°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos da etapa de desnaturação do DNA a 92°C por 1 minuto, etapa de anelamento a 56°C por 1 minuto e etapa de extensão a 72°C por 3 minutos. O volume final da reação foi de 35µl, sendo 10,2 µl água milli Q autoclavada, 3,5µl de desoxirribonucleotídeos trifosfatado-dNTP (Life Technologies), 0,8µl de Taq DNApolimerase (Biotools), 2,5µl de Buffer MgCl Free (Biotools), 2,5µl MgCl₂ (Biotools), 0,14 µM de cada primer 16S, 0,86 µM de cada primer MRS, 0,35 µM de cada primer SAU, 0,57µM de cada primer COA e 3,5µl de DNA bacteriano. O produto das

amplificações foi analisado por eletroforese (3,0% de gel agarose) a 70 V. Todas as reações de amplificação foram realizadas com controles: ATCC 33591 (*S. aureus mecA* positivo), ATCC 25923 (*S. aureus mecA* negativo), ATCC 12228 (*S. epidermidis mecA* negativo) e Controle negativo (água).

O gel de eletroforese com o resultado da amplificação da padronização do PCR multiplex 1 está presente na Figura 12. Foi utilizado Ladder de 2.000 pb como marcador de corrida.



Figura 12: Gel de eletroforese (agarose 3%) com o produto da padronização do PCR multiplex 1 para a detecção do gênero *Staphylococcus* spp., *S. aureus* e gene *mecA*. Coluna 1: Ladder de 2.000pb; Coluna 2: amostra de ECN *mecA* positiva (16S-791pb e MRS-533pb); Coluna 3: amostra negativa; Coluna 4 e 5: *S. aureus mecA* negativo (SAU-1250pb, 16S-791pb, COA-117pb); Coluna 6: ECN *mecA* negativo (16S-791pb); Coluna 7: amostra negativa; Coluna 8: ECN *mecA* positiva (16S-791pb e MRS-533pb); Coluna 9: *S. aureus mecA* positivo (SAU-1250pb, 16S-791pb, MRS-533pb e COA-117pb); Coluna 10: *S. aureus mecA* negativo (SAU-1250pb, 16S-791pb, COA-117pb) e Coluna 11: ECN *mecA* negativo (16S-791pb).

3.6 Teste de sensibilidade

Para a detecção da sensibilidade do PCR multiplex 1 foi realizada a amplificação de várias diluições seriadas de uma amostra controle de *S. aureus* e ECN, iniciando a partir da diluição 10^{-1} (correspondente a 10^7 UFC/ml) a 10^{-7} (10 UFC/ml) a partir do tubo da escala 0,5 de Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml).

3.7 Teste de especificidade

Para a detecção da especificidade do PCR multiplex 1 foi realizado PCR com amostras de outras espécies de microrganismos, diretamente da cultura isolada, e dos frascos de hemoculturas positivas com outras espécies de bactérias. As espécies analisadas foram: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus* Grupo *viridans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Candida* spp., Bacilos Gram-positivos (BGP), *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella* spp., *Morganella morganii* e *Proteus mirabilis*.

3.8 Padronização do multiplex 2 para detecção do operon *ica*

Inicialmente tentou-se colocar os 5 *primers* para a detecção do operon *ica* completo na mesma reação. Porém, a visualização ficou difícil devido à proximidade das bandas formadas pelos genes *icaA* e *icaR*, e outro problema encontrado foi o fato do *primer* do gene *icaD* não ser um bom competidor para dNTP (Figura 13). Assim, foram padronizadas duas reações multiplex, sendo uma para detecção dos genes *icaA*, *icaB* e *icaC* e outra reação para a detecção

dos genes *icaD* e *icaR*. Outra mudança realizada foi a substituição do *primer* do gene *icaA* utilizado para ECN por um específico para a espécie *S. aureus*.

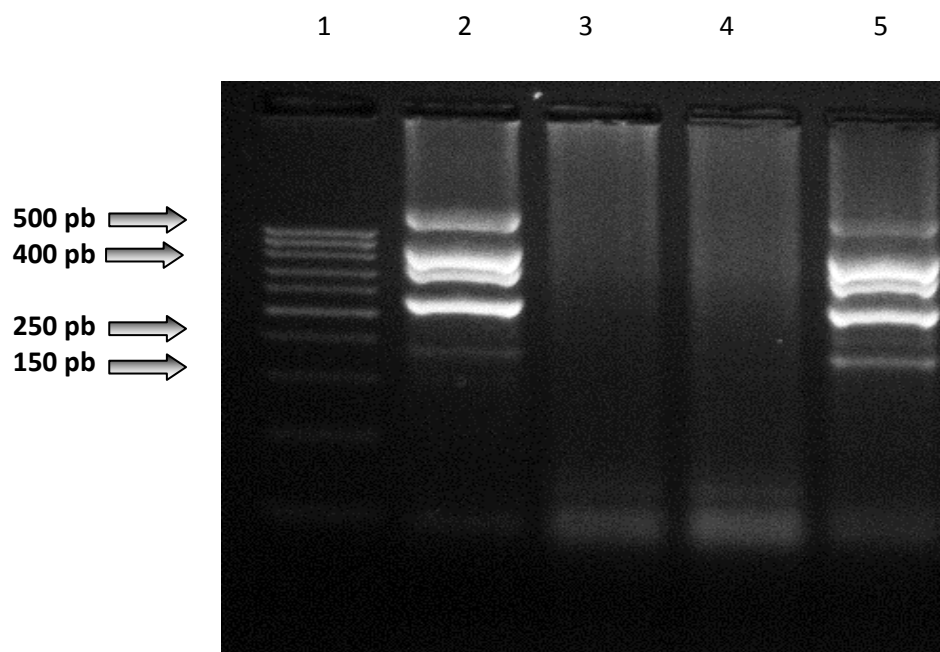


Figura 13: Gel de eletroforese (agarose 3%) com o produto da primeira padronização do multiplex 2 para detecção dos genes do operon *ica*. Coluna 1: Ladder de 2.000pb; Coluna 2: ECN operon *ica* completo (*icaA*-502pb, *icaR*-469pb, *icaC*-400pb, *icaB*302pb e *icaD*-198pb); Coluna 3 e 4: Controle negativo para o operon *ica* e Coluna 5: ECN operon *ica* completo (*icaA*-502pb, *icaR*-469pb, *icaC*-400pb, *icaB*302pb e *icaD*-198pb).

Tabela 2: *Primers* utilizados na reação de PCR multiplex 2 para a detecção do operon *ica* em *S. aureus* e ECN.

<i>Gene</i>	<i>Primer</i>	<i>Fragmento amplificado em pb</i>
<i>icaA</i> (ECN) ⁵⁶	ICA A ₁ - 5' CACGTGCTCTATGCTGGATG 3' ICA A ₂ - 5' CCGTTGGATATTGCCTCTGT 3'	502
<i>icaA</i> (<i>S. aureus</i>) ⁵⁷	ICA SA ₁ - 5' TGG CTG TAT TAA GCG AAG TC-3' ICA SA ₂ -5' CCT CTG TCT GGG CTT GAC C 3'	669
<i>icaB</i> ⁵⁸	ICA B ₁ - 5' AAA GTC CCA TAA GCC TGT TT 3' ICAB2- 5' AAA GTC CCA TAA GCC TGT TT 3'	302
<i>icaC</i> ⁵⁸	ICA C ₁ - 5' TAA CTT TAG GCG CAT ATG TTT T 3' ICA C ₂ - 5' TTC CAG TTA GGC TGG TAT TG 3'	400
<i>icaD</i> ⁵⁸	ICA D ₁ - 5' CCT CTG TCT GGG CTT GAC C 3 ICA D ₂ - 5' TAA TCC CGA ATT TTT GTG AA 3'	198
<i>icaR</i> ⁵⁸	ICA R ₁ - 5' TAA TCC CGA ATT TTT GTG AA 3' ICA R ₂ - 5' AAC GCA ATA ACC TTA TTT TCC 3'	469

As condições de amplificação foram: 92°C por 3 minutos, seguindo de 30 ciclos da etapa de desnaturação do DNA a 92°C por 1 minuto, etapa de anelamento a 56°C por 1 minuto e etapa de extensão a 72°C por 3 minutos. Reação 1 (*icaA*, *icaB* e *icaC*) para ECN: o volume final da reação foi de 35 µl sendo 13,9 µl água milli Q autoclavada, 2,0 µl de desoxirribonucleotídeos trifosfatados-dNTP (Life Technologies), 0,6 µl de Taq DNApolimerase (Biotools), 2,0 µl de Buffer MgCl Free (Biotools), 2,5 µl de MgCl₂ (Biotools), 0,57 µM de cada primer *icaA*, 0,43 µM de cada primer *icaB*, 0,29 µM de cada primer *icaC* e 5,0 µl de DNA bacteriano. Reação 1 (*icaA*, *icaB* e *icaC*) para *S. aureus*: o volume final da reação foi de 35 µl sendo 6,9 µl água milli Q autoclavada, 2,0 µl de desoxirribonucleotídeos trifosfatados-dNTP (Life Technologies), 0,6 µl de Taq DNApolimerase (Biotools), 2,0 µl de Buffer MgCl Free (Biotools), 2,5 µl de MgCl₂ (Biotools), 0,14 µM de cada primer *icaA*, 1,14 µM de cada primer *icaB*, 0,86 µM de cada primer *icaC* e 5,0 µl de DNA bacteriano. Reação 2 (*icaD* e *icaR*): o volume final da reação foi de 35 µl sendo 14,9 µl água milli Q autoclavada,

2,0 µl de desoxinucleotídeos trifosfatado-dNTP (Life Technologies), 0,6 µl de Taq DNApolimerase (Biotools), 2,0 µl de Buffer MgCl Free (Biotools), 2,5 µl de MgCl₂ (Biotools), 0,29 µM de cada primer *icaR*, 0,86 µM de cada primer *icaD* e 5,0 µl de DNA bacteriano. O produto das amplificações foi analisado por eletroforese (3,0% de gel agarose) a 70 V. Todas as reações de amplificação foram realizadas com controles: amostra conhecida de *S.epidermidis icaADBC* positivo e Controle negativo (água).

O gel de eletroforese com o resultado da amplificação da padronização do PCR multiplex 2 para o operon *ica* está presente na Figura 14 (ECN) e 15 (*S. aureus*). Foi utilizado Ladder de 500 pb para o gel do operon *ica* em ECN e de 2.000 pb para o gel da amplificação desses genes em *S. aureus*.

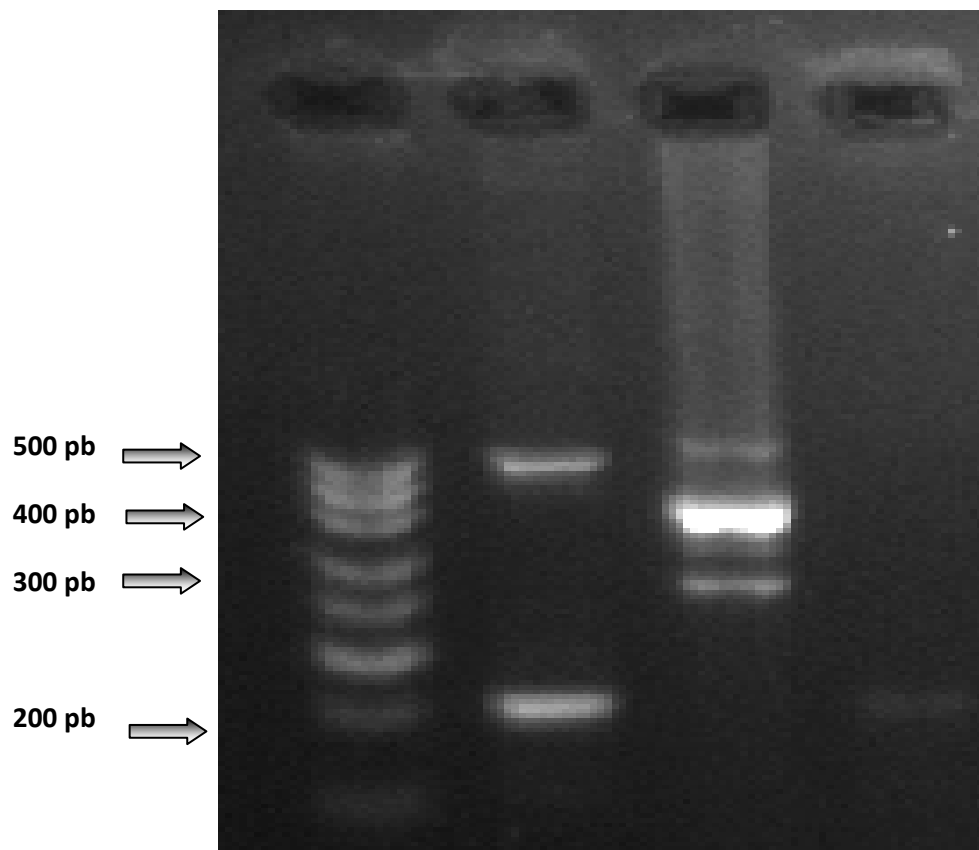


Figura 14: Gel de eletroforese (agarose 3%) do produto da reação do PCR multiplex 2 para detecção do operon *ica* em ECN. Coluna 1: Ladder de 500pb; Coluna 2: reação 2 (*icaR*-469pb e *icaD*-198pb); Coluna 3: reação 1 (*icaA*-502pb, *icaC*-400pb e *icaB*-302pb) e Coluna 4: Controle negativo para o operon *ica*.

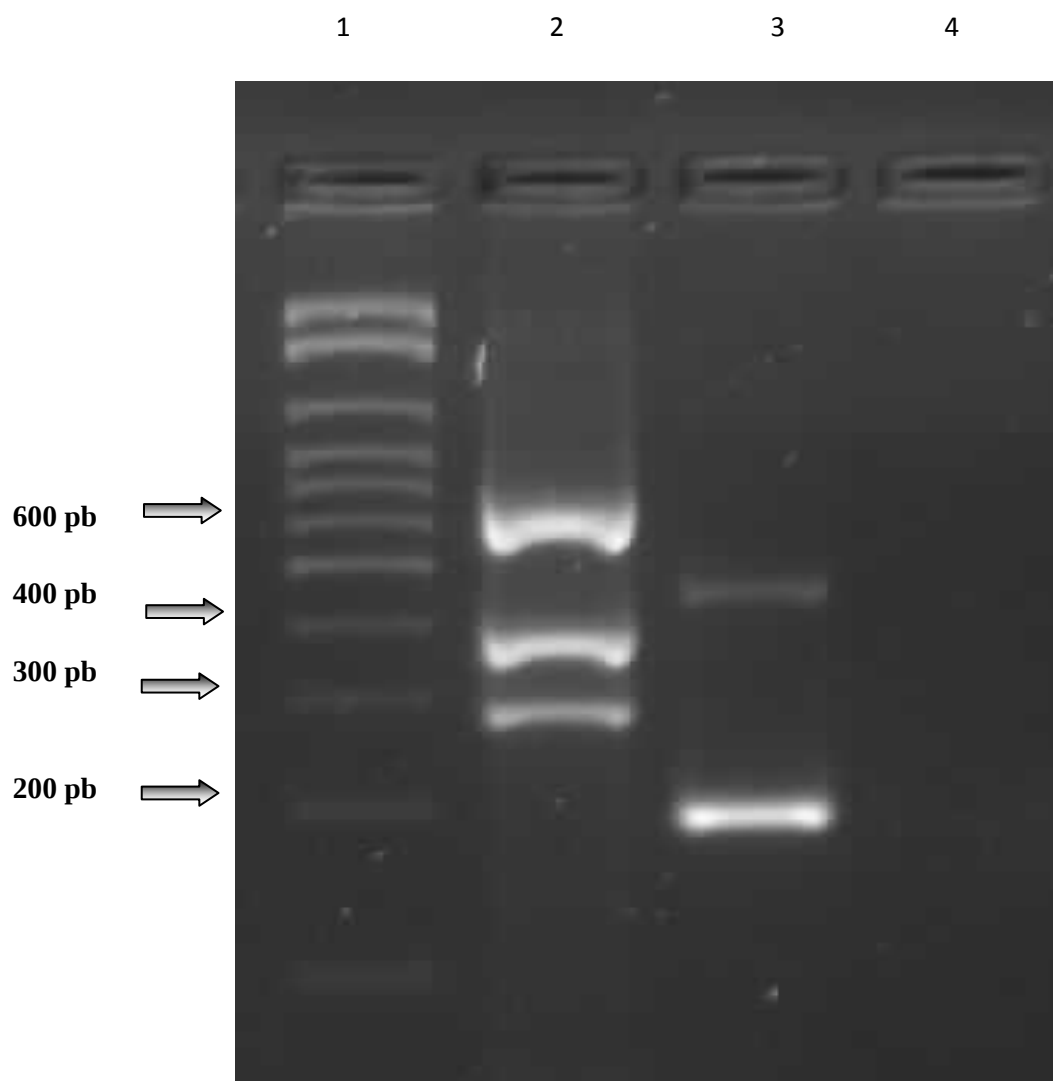


Figura 15: Gel de eletroforese (agarose 3%) do produto da reação do multiplex 2 para detecção do operon *ica* em *S. aureus*. Coluna 1: Ladder de 2.000pb; Coluna 2: reação 1 (*icaA*-669pb, *icaC*-400pb e *icaB*-303pb); Coluna 3: reação 2 (*icaR*-469pb e *icaD*-198pb) e Coluna 4: Controle negativo para operon *ica*.

3.9 Padronização do multiplex 3 para identificação de espécies de ECN

O multiplex 3 foi elaborado para identificar as espécies *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. capitis* e *S. lugdunensis*.

Tabela 3: *Primers* utilizados na reação de PCR multiplex 3 para detecção de espécies de ECN diretamente do frasco de hemocultura.

<i>Gene</i>	<i>Primer</i>	<i>Fragmento amplificado pb</i>
<i>S. epidermidis</i> ⁵⁹	SE ₁ -5' ATCAAAAAGTTGGCGAACCTTTTC A 3' SE ₂ -5' CAAAAGAGCGTGGAGAAAAGT ATCA 3'	124
<i>S. haemolyticus</i> ¹⁵	SHa ₁ - 5'GGT CGC TTA GTC GGA ACA AT 3' SHa ₂ - 3'CACGAGCAATCTCATCACCT 5'	271
<i>S. hominis</i> ⁶⁰	SHo ₁ - 5'TACAGGGCCATTTAAAGACG 3' SHo ₂ - 3'GTTTCTGGTGTATCAACACC 5'	177
<i>S. warneri</i> ⁶⁰	SWa ₁ - 5'CGTTTGTAGCAAAACAGGGC 3' SWa ₂ - 3' GCAACGAGTAACCTTGCCAC 5'	999
<i>S. capitis</i> ⁶⁰	SCap ₁ - 5' ACTACGCCTATGATTATTGC3' SCap ₂ - - 3'GAGCTTCTTTACCATAGGG 5'	525
<i>S. lugdunensis</i> ⁶⁰	SLu ₁ - 5'TCCAATGATGGTAACGAGGC 3' SLu ₂ - - 3' TTTTGCGCCTCGTTTTGTGC 5'	695

As condições de amplificação foram: 92°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos da etapa de desnaturação a 92°C por 1 minuto, etapa de anelamento a 56°C por 1 minuto e etapa de extensão a 72°C por 3 minutos. O volume final da reação foi de 45 µl sendo 6,5 µl água milli Q autoclavada, 2,0 µl de desoxirribonucleotídeos trifosfatados-dNTP (Life Technologies), 0,5 µl de Taq DNAPolimerase (Biotools), 5,0 µl de Buffer MgCl Free (Biotools), 2,0 µl de MgCl₂ (Biotools), 0,89 µM de cada *primer* de cada espécie de ECN (SE, SHo, SHa, SCap, SLu e SWa) e 5,0 µl de DNA bacteriano. O produto das amplificações foi analisado por eletroforese

(2,0% de gel agarose) a 110V. Todas as reações de amplificação foram realizadas com controles: ATCC 12228 (*S. epidermidis*), ATCC 29970 (*S. haemolyticus*), ATCC 00243 (*S. warneri*), ATCC 700237 (*S. hominis*), ATCC 700328 (*S. lugdunensis*), ATCC 49325 (*S. capitis*) e Controle negativo (água).

O gel de eletroforese com o resultado da amplificação da padronização do PCR multiplex 3 para identificação das espécies de ECN está presente na Figura 16. Foi utilizado Ladder de 2.000 pb.

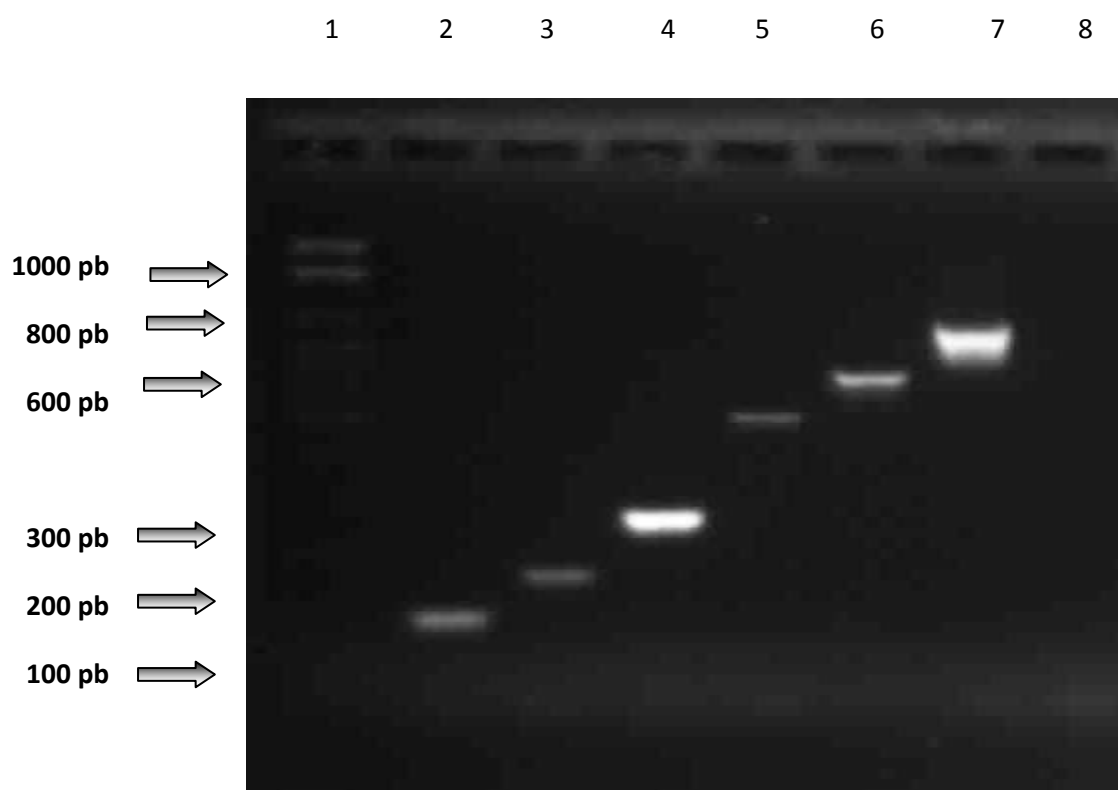


Figura 16: Gel de eletroforese (agarose 2%) do produto da reação do PCR multiplex 3 para a detecção de espécies de ECN. Coluna 1: Ladder de 2.000pb; Coluna 2: *S. epidermidis* (SE-124pb); Coluna 3: *S. hominis* (SHo-177pb); Coluna 4: *S. haemolyticus* (SHa-271pb); Coluna 5: *S. capitis* (SCap-525pb); Coluna 6: *S. lugdunensis* (SLu-695pb); Coluna 7: *S. warneri* (SWa-999pb) e Coluna 8: Controle negativo.

3.10 Internal Transcribed Spacer PCR (ITS-PCR) para confirmação do resultado da identificação genotípica

Após a realização do PCR multiplex 3 para a identificação das espécies de ECN, foi realizado o ITS-PCR (Internal Transcribed Spacer PCR)⁶¹ para a confirmação dos resultados. As condições de amplificação foram: etapa de desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguido de 25 ciclos com 94°C por 1 minuto, etapa de anelamento a 55°C por 2 minutos e 55°C por 7 minutos, etapa de extensão a 72°C por 2 minutos e 72°C por 7 minutos. O volume final da reação foi de 25µl, sendo 15,8µl água milli Q autoclavada, 0,5µl de desoxinucleotídeos trifosfatado-dNTP (Life Technologies), 0,2µl de Taq DNApolimerase (Biotools), 2,5µl de Buffer MgCl Free (Biotools), 1,0µl de MgCl₂ (Biotools), 1,0 µl de cada *primer* G1(5'-GAAGTCGTAACAAGG-3') e L1(5'-CAAGGCATCCACCGT-3') e 3,0µl de DNA bacteriano. O produto das amplificações foi analisado por eletroforese (3,6% de gel agarose) a 80V. O gel ficou secando por 2 horas e a corrida por 5 horas (Couto et al., 2001). Todas as reações de amplificação foram realizadas com controles: ATCC 12228 (*S. epidermidis*), ATCC 29970 (*S. haemolyticus*), ATCC 00243 (*S. warneri*), ATCC 700237 (*S. hominis*), ATCC 700328 (*S. lugdunensis*), ATCC 49325 (*S. capitis*) e Controle negativo (água).

O gel de eletroforese com o resultado da amplificação do ITS-PCR está presente na figura 17. Foi utilizado Ladder de 2.000 pb.

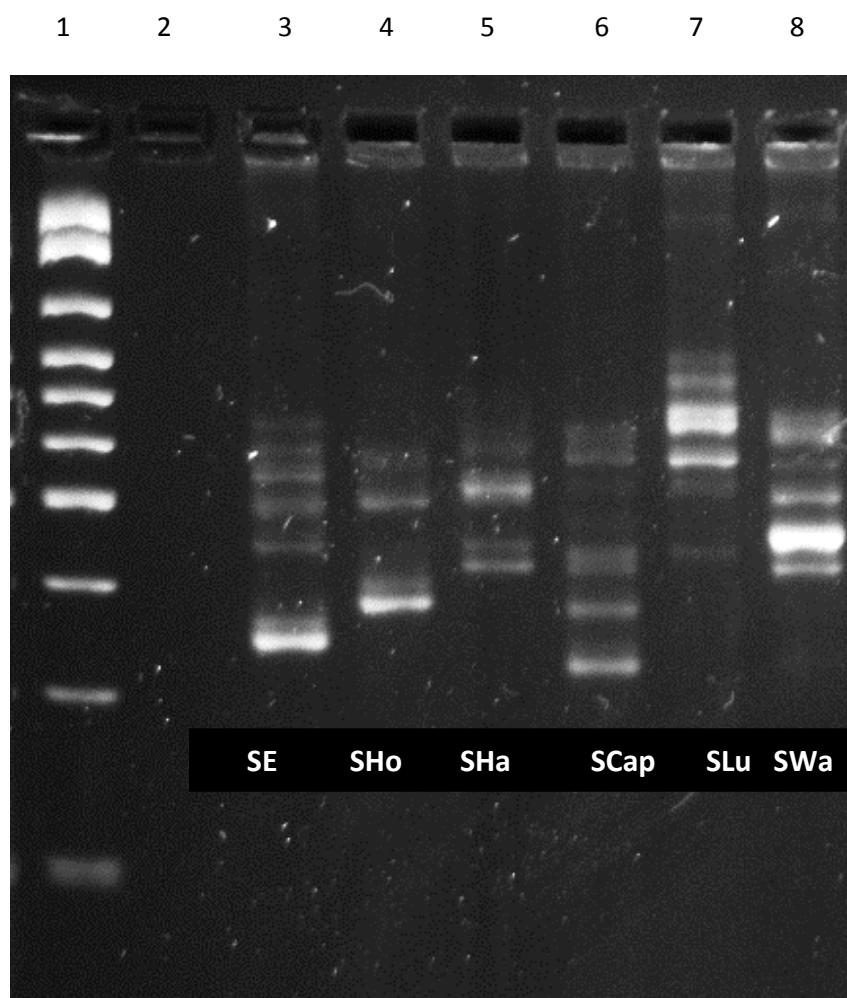


Figura 17: Gel de eletroforese (agarose 3,6%) do produto da reação do ITS-PCR para a confirmação da identificação das espécies de ECN pelo PCR multiplex 3. Coluna 1: Ladder de 2.000 pb; Coluna 2: Controle negativo; Coluna 3: ATCC 12228 (*S. epidermidis*); Coluna 4: ATCC 700237 (*S. hominis*); Coluna 5: ATCC 29970 (*S. haemolyticus*), Coluna 6: ATCC 49325 (*S. capitis*); Coluna 7: ATCC 700328 (*S. lugdunensis*) e Coluna 8: ATCC 00243 (*S. warneri*).

3.11 Análise estatística

Para avaliar a concordância dos métodos utilizados para identificação de *Staphylococcus* spp. foi utilizado o teste de análise de concordância – Kappa⁶², conforme Tabela 4. Todos os testes foram feitos considerando o nível de significância de 5%.

Tabela 4:Valores para o teste de concordância Kappa

Valores de Kappa	Interpretação
<0	Não concordância
0-0.19	Pouca concordância
0.20-0.39	Satisfatória concordância
0.40-0.59	Moderada concordância
0.60-0.79	Boa concordância
0.80-1.00	Concordância quase perfeita

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Amostragem

Foram estudadas 371 amostras de hemoculturas positivas para o gênero *Staphylococcus* no período de maio de 2011 à maio de 2012 e todas foram provenientes de pacientes internados nas diferentes enfermarias do Hospital das Clínicas da FMB, UNESP (Tabela 5).

Tabela 5: Distribuição das amostras isoladas de pacientes por enfermarias do Hospital das Clínicas da FMB, UNESP.

Complexos de enfermarias Nº de amostras	Enfermarias
Enfermarias cirúrgicas N=22	Cirurgia Cirurgia cardíaca Cirurgia Torácica Gastrocirurgia Ortopedia Urologia
Clínica Médica N=114	Dermatologia Gastroclínica Clínica Médica Centro de terapia Intensiva Cardiologia, Cardioclínica Hematologia Pneumologia
Pronto Socorro N=68	Pronto Socorro Pronto Socorro-Unidade de Tratamento Intensivo
Enfermarias Pediátricas N=76	Berçário Pediatria Unidade de Tratamento Intensivo Pediatria Unidades de Tratamento Intensivo Neonatal
Ginecologia e Obstetrícia N=3	Ginecologia Obstetrícia
Unidade de Tratamento Intensivo N=55	Unidade de Tratamento Intensivo Unidade de Tratamento Intensivo- Central Unidade de Tratamento Intensivo- Coronariano
Outras Enfermarias N=33	Quimioterapia Oncologia Moléstias Infecciosas e Parasitárias Neurologia Diálise

4.2 Identificação Fenotípica

A identificação por métodos bioquímicos das 371 amostras revelou 85 (23,0%) amostras de *S. aureus*, 286 (77,0%) amostras de ECN (Figura 18). Dentre os ECN identificados foram encontrados 152 (53,1%) *S. epidermidis*, 36 (12,6%) *S. haemolyticus*, 36 (12,6%) *S. hominis*, 23 (8,0%) *S. capitis*, 18 (6,3%) *S. warneri*, 7 (2,4%) *S. caprae*, 5 *S. simulans*, duas *S. lugdunensis*, duas *S. cohnii*, uma *S. saprophyticus*, uma *S. schleiferi*, uma *S. xylosus* e concomitantemente uma *S. haemolyticus* e *S. hominis*, e uma *S. haemolyticus* e *S. epidermidis* (Figura 19).

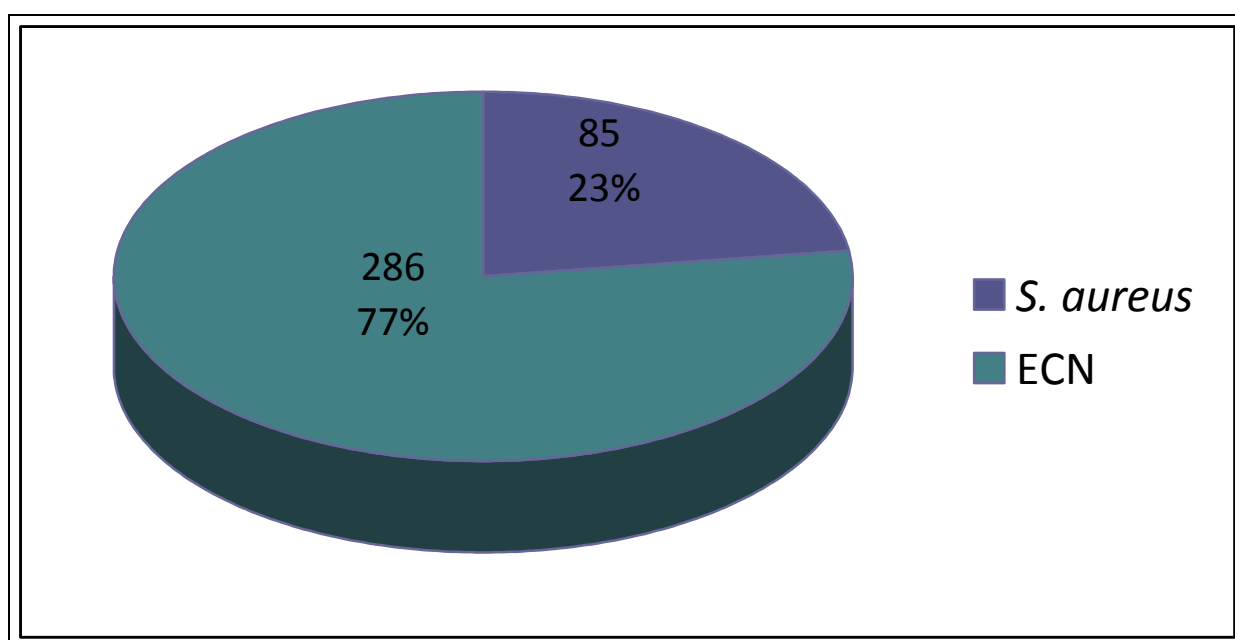


Figura 18: Identificação fenotípica de *S. aureus* e Estafilococos coagulase-negativa (ECN).

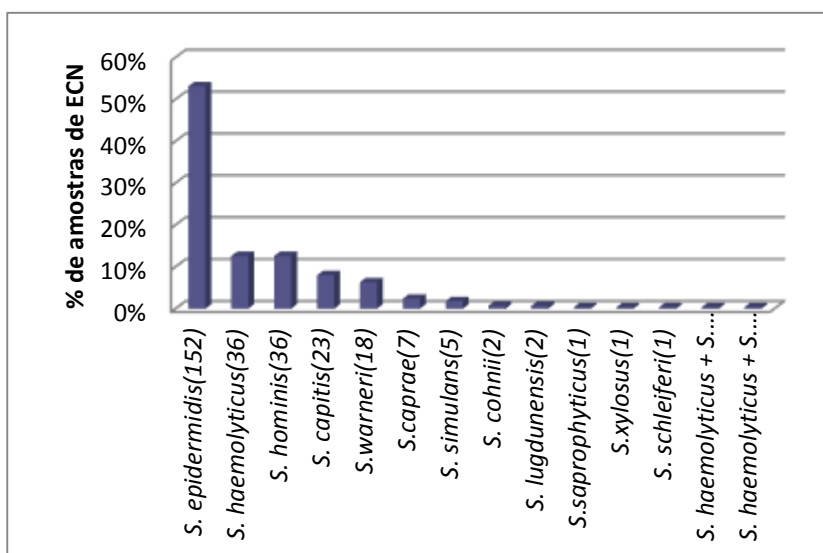


Figura 19: Identificação fenotípica de ECN.

4.3 Detecção de suscetibilidade à oxacilina pelo teste de Disco difusão

Pelo teste de Disco difusão 43 (50,6%) das amostras de *S. aureus* se mostraram resistentes. Das 286 amostras de ECN, 236 (82,5%) foram resistentes (Figura 20), com 132 (86,8%) das amostras de *S. epidermidis* resistentes, 33 (91,6%) *S. haemolyticus*, 30 (83,3%) *S. hominis*, 15 (65,2%) *S. capitis*, 13 (72,2%) *S. warneri*, 4 *S. caprae*, 3 *S. simulans*, uma *S. cohnii*, uma *S. lugdunensis*, uma *S. saprophyticus* e uma *S. xylosus*.

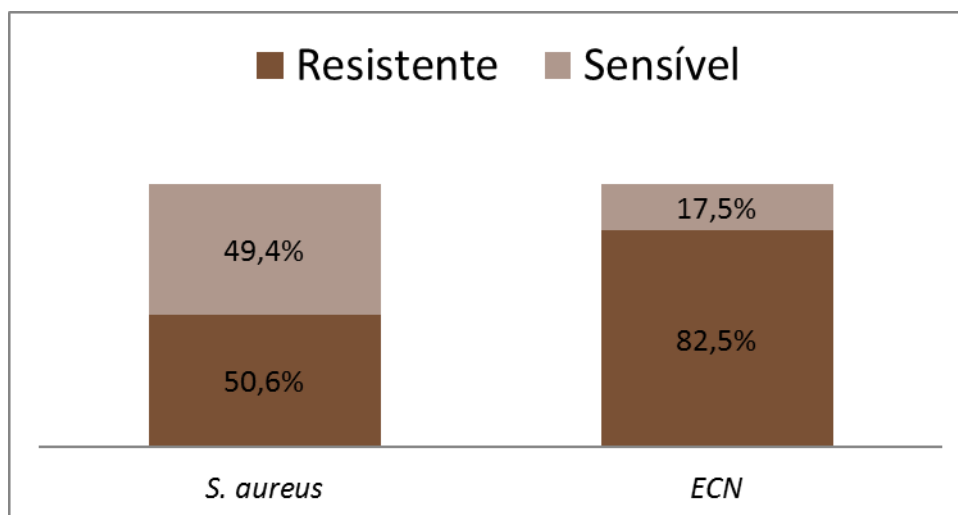


Figura 20: Resistência à oxacilina em amostras de *Staphylococcus* spp. pelo método de Disco difusão.

4.4 Multiplex 1

O PCR multiplex 1 foi padronizado para identificar genotipicamente o gênero *Staphylococcus* (gene do RNAr 16S), diferenciar Estafilococos coagulase positiva ou negativa (gene *coa*), identificar *S. aureus* (gene específico para *S. aureus*) e a detecção de resistência à oxacilina (gene *mecA*) diretamente do frasco de hemocultura (Figura 21).

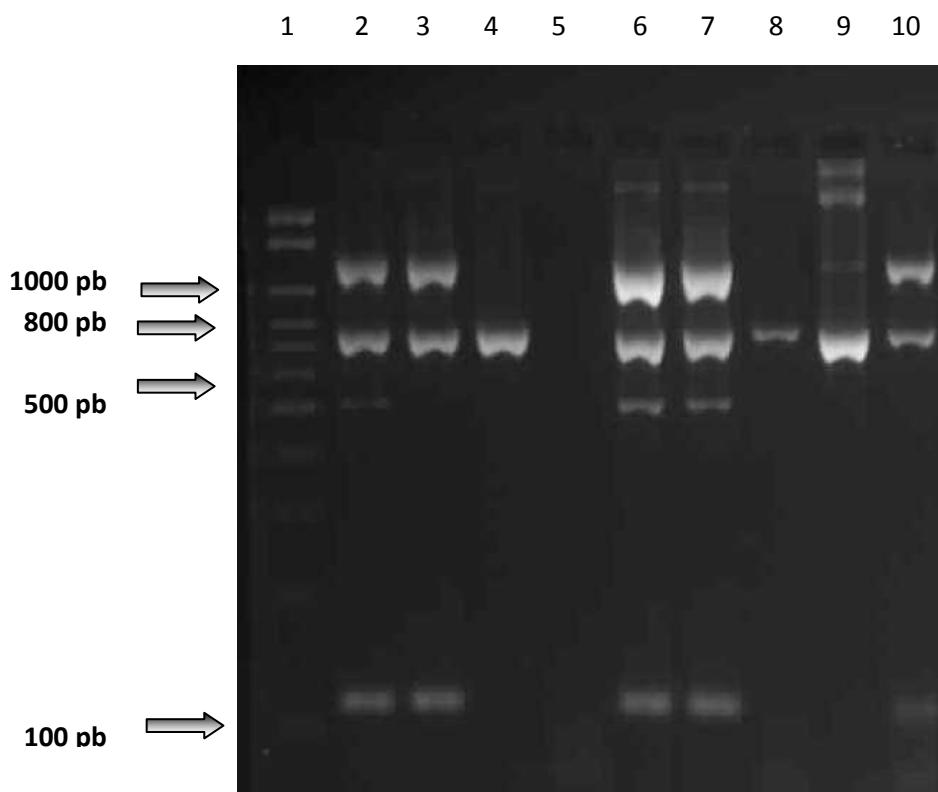


Figura 21: Gel de eletroforese (agarose 3%) do produto da amplificação do multiplex 1 em amostras de hemocultura para a detecção do gênero *Staphylococcus* e do gene *mecA*. Coluna 1: Ladder de 2.000pb; Coluna 2: ATCC 33591 (*S. aureus mecA* negativo); Coluna 3: ATCC 25923 (*S. aureus mecA* negativo); Coluna 4: ATCC 12228 (*S. epidermidis mecA* negativo); Coluna 5: Controle negativo; Coluna 6 e 7: amostra de *S. aureus mecA* positivo; Coluna 8 e 9: amostra de ECN *mecA* negativo e Coluna 10: amostra de *S. aureus mecA* negativo.

Foi realizada a amplificação das 371 amostras incluídas no trabalho. Nas 85 amostras com *S. aureus* identificadas fenotipicamente houve 100% de concordância com o resultado do PCR multiplex 1, com amplificação dos genes *RNAr16S*, *S. aureus* e *coa*. Nas 286 amostras de ECN ocorreu 100% de concordância onde ocorreu a amplificação apenas do fragmento do gene *RNAr16S*.

Das 85 amostras de *S. aureus* ocorreu amplificação do fragmento do gene *mecA* em 43 (50,6%), com 42 resistentes pelo teste de Disco difusão e 1 amostra sensível. Das 42 (49,4%)

negativas na amplificação do gene *mecA*, 41 se mostraram sensíveis pelo método de Disco difusão e 1 amostra se mostrou resistente. Das 286 amostras de ECN, o gene *mecA* foi amplificado em 225 (78,7%) e destes 218 foram resistentes pelo teste do Disco difusão e 7 sensíveis. Das 61 (21,3%) amostras de ECN negativas para o gene *mecA*, 43 foram consideradas sensíveis pelo teste do Disco difusão e 18 resistentes. A concordância Kappa entre os resultados obtidos na detecção de resistência por PCR e Disco difusão foi de 92%. Nas amostras que não apresentou gene *mecA*, mas que se mostraram resistentes no teste do Disco difusão foi realizado o PCR simplex para o gene *mecA*, teste com o disco de Nitrocefim para a detecção da hiperprodução de β -lactamase e o teste com o disco de Ácido clavulânico + Amoxicilina para a confirmação da resistência (Tabela 6).

Tabela 6: Relação entre os resultados da detecção do gene *mecA* e o teste de Disco difusão com oxacilina (1 μ g) e cefoxitina (30 μ g), e os testes complementares para confirmação da resistência a oxacilina.

Espécie	Disco difusão*	<i>mecA</i> positivo	<i>mecA</i> negativo	Nitrocefim positivo	Ácido clavulânico + Amoxicilina
<i>S. aureus</i>	43 R	42	1	1	1 S
	42 S	1	41		
ECN	236 R	218	18	18	12 S
	50 S	7	43		6 R

* Teste de Disco difusão com oxacilina (1 μ g) e cefoxitina (30 μ g).

R: Resistente; S: Sensível

4.5 Teste de sensibilidade do PCR multiplex 1

No teste de sensibilidade ocorreu amplificação dos fragmentos até a diluição 10^{-5} (10^3 UFC/ml) para ECN e para *S. aureus* até a diluição 10^{-2} (10^6 UFC/ml) como mostrado na Figura 22.

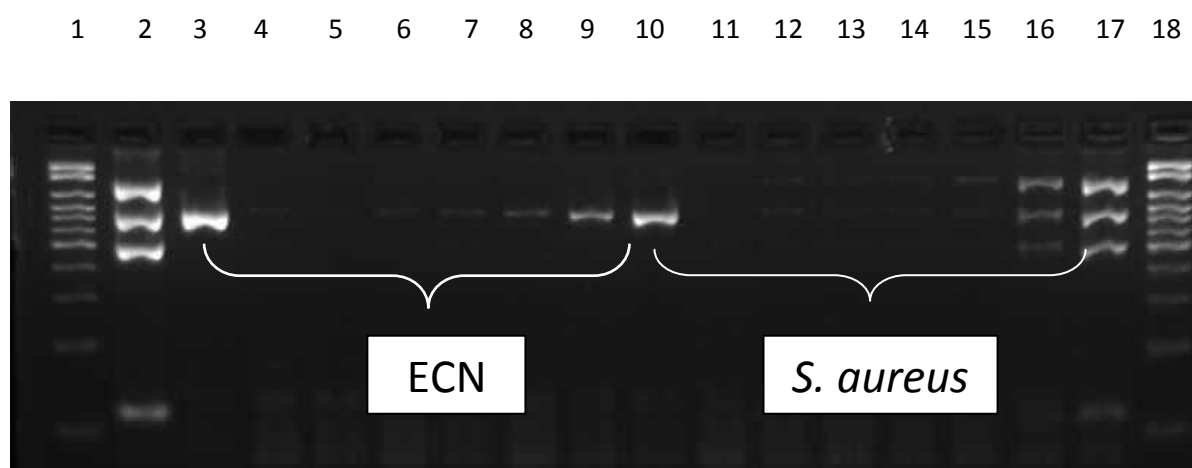


Figura 22: Gel de eletroforese da amplificação do teste de sensibilidade para ECN e *S. aureus* do PCR multiplex 1. Linhas 1: Marcador de peso molecular: 2.000 bp; 2: ATCC *S. aureus mecA* positivo; 3: ATCC *S. epidermidis*; 4: ECN (10^8 UFC/ml) diluído a 10^{-7} (10 UFC/ml); 5: 10^{-6} (10^2 UFC/ml); 6: 10^{-5} (10^3 UFC/ml); 7: 10^{-4} (10^4 UFC/ml); 8: 10^{-3} (10^5 UFC/ml); 9: 10^{-2} (10^6 UFC/ml); 10: 10^{-1} (10^7 UFC/ml); 11: *S. aureus* diluído 10^{-7} (10 UFC/ml); 12: 10^{-6} (10^2 UFC/ml); 13: 10^{-5} (10^3 UFC/ml); 14: 10^{-4} (10^4 UFC/ml); 15: 10^{-3} (10^5 UFC/ml); 16: 10^{-2} (10^6 UFC/ml); 17: 10^{-1} (10^7 UFC/ml); 18: Marcador de peso molecular 2.000 bp.

4.6 Teste de especificidade do PCR multiplex 1

No teste de especificidade realizada com amostras de outras espécies não ocorreu a amplificação de nenhum dos fragmentos dos genes pesquisados no PCR multiplex em amostras de outras espécies (Figura 23).

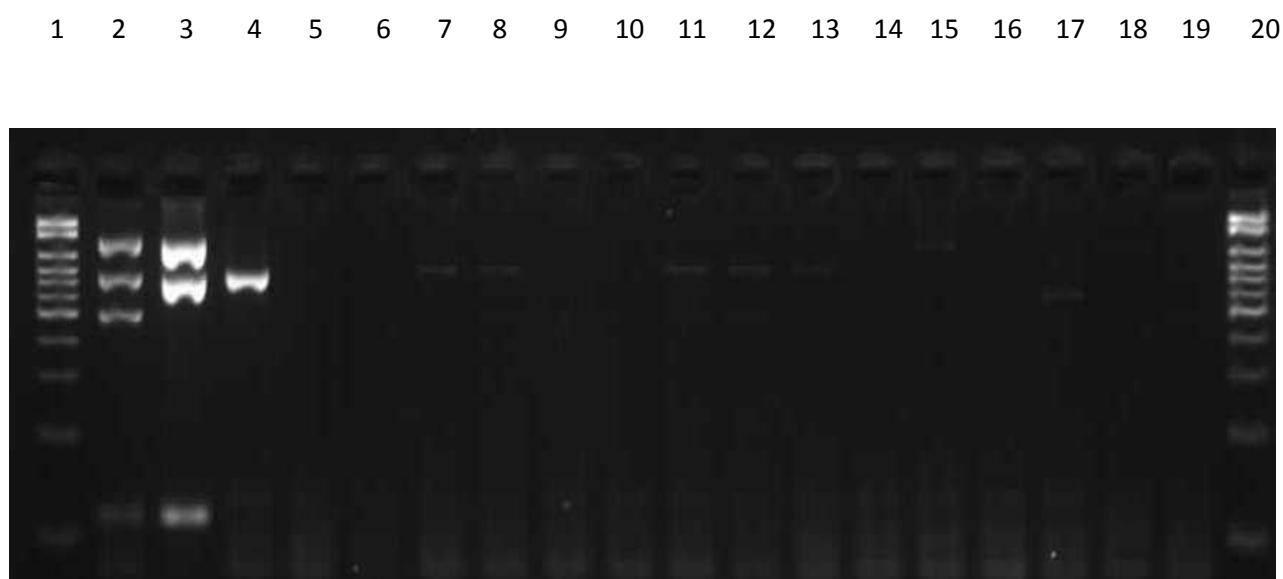


Figura 23: Gel de eletroforese da amplificação do teste de especificidade do PCR multiplex. Coluna 1: Ladder de 2.000 pb; 2: ATCC *S. aureus mecA* positivo; 3: ATCC *S. aureus mecA* negativo; 4: ATCC ECN; 5: *Salmonella* spp.; 6: *Proteus mirabilis*; 7: *Morganella morganii*; 8: *Klebsiella pneumoniae*; 9: *Pseudomonas aeruginosa*; 10: *Acinetobacter baumannii*; 11: *Enterobacter cloacae*; 12: *Enterobacter aerogenes*; 13: *E. coli*; 14: *E. faecalis*; 15: *E. faecium*; 16: *S. Grupo viridans*; 17: *S. pneumoniae*; 18: *Candida* spp. e 19: BGP.

4.7 Multiplex 2

O PCR multiplex 2 foi padronizado para detectar os 5 genes presentes no operon *ica*: *icaA*, *icaB* e *icaC* na reação 1 e *icaD* e *icaR* na reação 2, em espécies de *Staphylococcus* spp. diretamente dos frascos de hemoculturas. Os resultados estão descritos na Tabela 7.

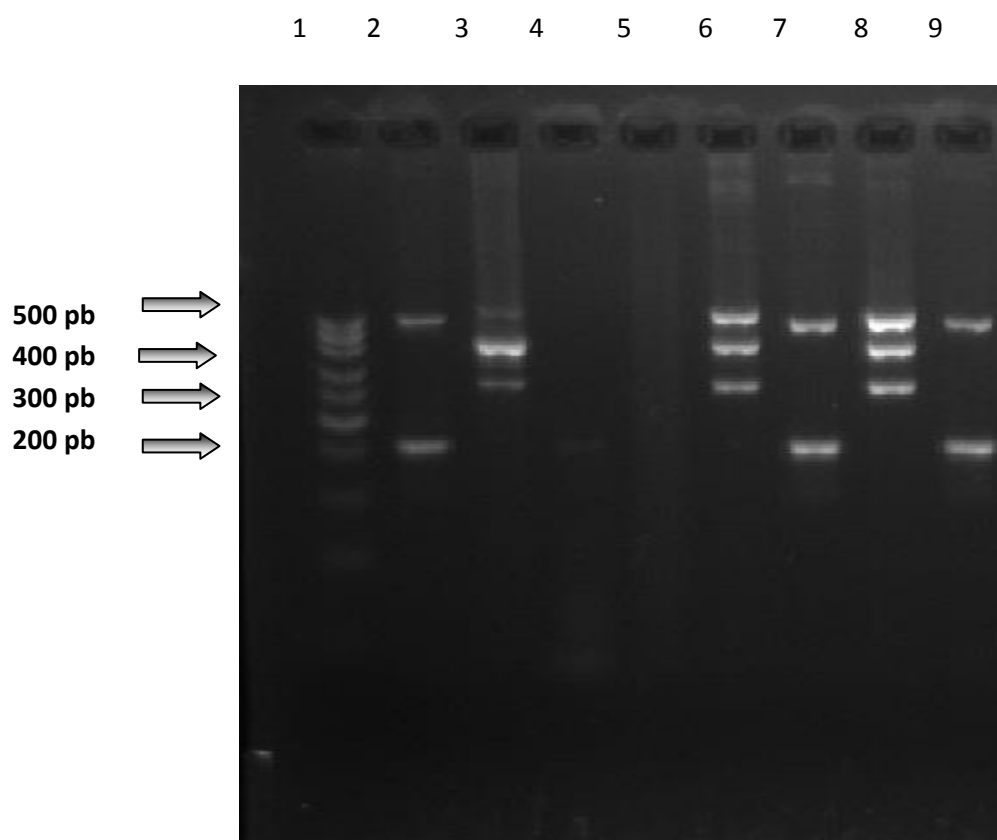


Figura 24: Gel de eletroforese (agarose 3%) do produto da amplificação do multiplex 2 para detecção do operon *ica* em amostras de ECN. Coluna 1: Ladder de 500pb; Coluna 2: amostra de ECN positiva para *icaR* e *icaD*; Coluna 3: amostra de ECN positiva para *icaA*, *icaC* e *icaB*; Coluna 4 e 5: amostra de ECN negativa para o operon *ica*; Coluna 6: amostra de ECN positiva para *icaA*, *icaC* e *icaB*; Coluna 7: amostra de ECN positiva para *icaR* e *icaD*; Coluna 8: amostra de ECN positiva para *icaA*, *icaC* e *icaB* e Coluna 9: amostra de ECN positiva para *icaR* e *icaD*.

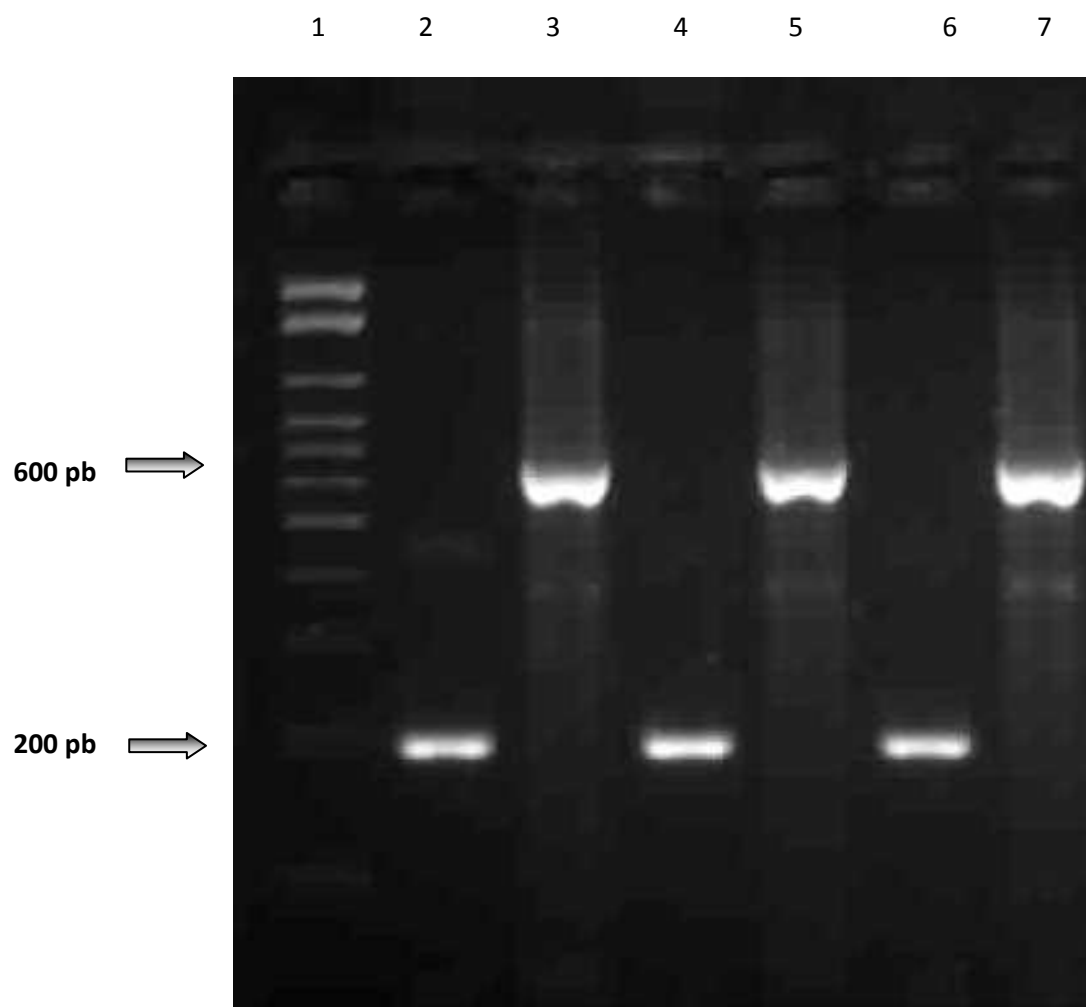


Figura 25: Gel de eletroforese (agarose 3%) do produto da amplificação do Multiplex 2 para detecção do operon *ica* para amostras de *S. aureus*. Coluna 1: Ladder de 2.000pb; Coluna 2: amostra de *S. aureus* positivo para *icaD* e negativo para o *icaR*; Coluna 3: amostra de *S. aureus* positivo para o *icaA* e negativo para o *icaC* e *icaB*; Coluna 4: amostra de *S. aureus* positivo para *icaD* e negativo para o *icaR*; Coluna 5: amostra de *S. aureus* positivo para o *icaA* e negativo para o *icaC* e *icaB*; Coluna 6: amostra de *S. aureus* positivo para *icaD* e negativo para o *icaR* e *icaB*; Coluna 7: amostra de *S. aureus* positivo para o *icaA* e negativo para o *icaC* e *icaB*.

Tabela 7: Distribuição dos genes do operon *ica* encontrados nas amostras de ECN e *S.aureus* pelo multiplex 2.

Microrganismo	Nº de isolados	<i>icaA</i>	<i>icaB</i>	<i>icaC</i>	<i>icaD</i>	<i>icaR</i>	<i>icaA</i> + <i>icaD</i>	Operon completo	Negativo
<i>S. aureus</i>	85	83	26	29	70	3	70	3	2
<i>S. epidermidis</i>	152	84	84	87	98	85	78	75	47
<i>S. haemolyticus</i>	36	5	2	7	20	9	4	2	12
<i>S. hominis</i>	36	6	2	5	13	5	3	2	22
<i>S. capitis</i>	23	16	4	6	13	10	9	4	3
<i>S. warneri</i>	18	7	3	7	12	6	5	2	4
<i>S. lugdunensis</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>S. simulans</i>	5	1	1	1	3	1	1	1	2
<i>S. caprae</i>	7	3	1	1	5	3	3	1	2
<i>S. xylosus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>S. saprophyticus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>S. cohnii</i>	2	1	0	0	0	0	0	1	0
<i>S. schleiferi</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	0

4.8 Multiplex 3

O PCR multiplex 3 foi padronizado para identificar diretamente do frasco de hemoculturas as espécies: *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. capitis* e *S. lugdunensis*.

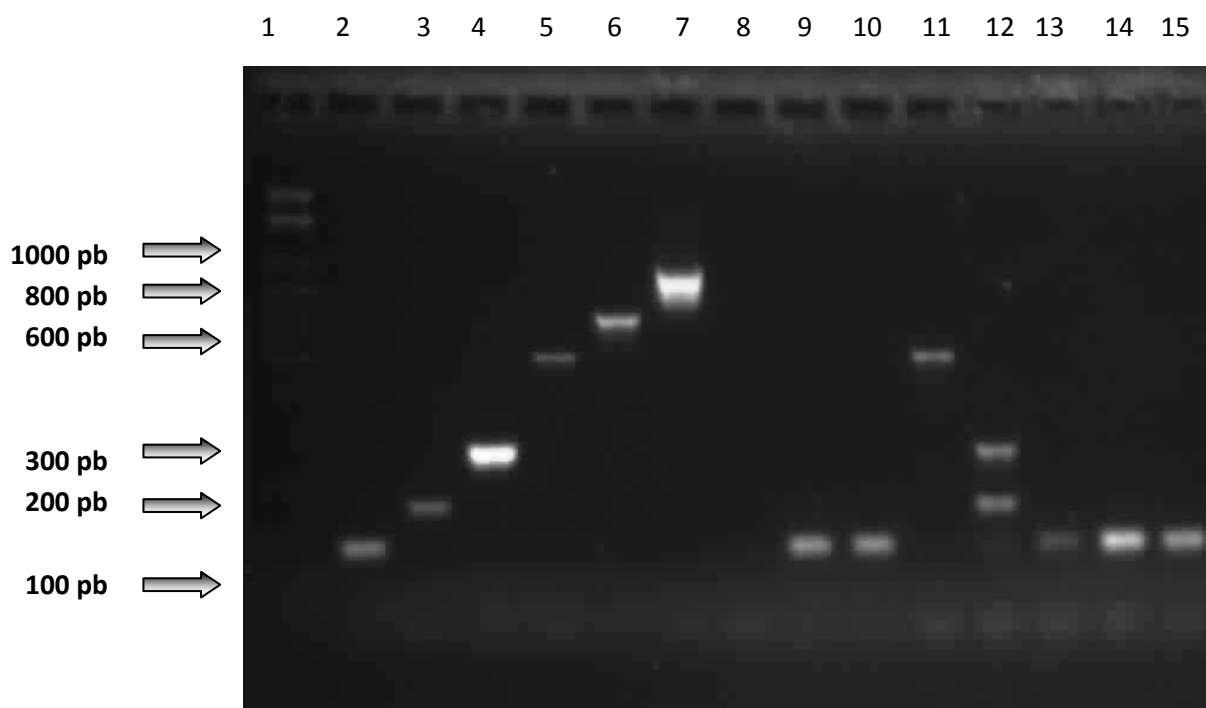


Figura 26: gel de eletroforese da amplificação do multiplex 3 para a identificação de espécies de ECN diretamente dos frasco de hemoculturas. Coluna 1: Ladder de 2.000pb; Coluna 2: *S. epidermidis* (SE-124pb); Coluna 3: *S. hominis* (SHo-177pb); Coluna 4: *S. haemolyticus* (SHa-271pb); Coluna 5: *S. capitis* (SCap-525pb); Coluna 6: *S. lugdunensis* (SLu-695pb); Coluna 7: *S. warneri* (SWa-999pb); Coluna 8: Controle negativo; Coluna 9 e 10: amostra de *S. epidermidis*; Coluna 11: amostra de *S. lugdunensis*; Coluna 12: amostra concomitantemente de *S. hominis* e *S. haemolyticus*; Coluna 13, 14 e 15: amostra de *S. epidermidis*.

Das 371 amostras de hemoculturas positivas para o gênero *Staphylococcus* coletadas durante o trabalho, 286 foram identificadas como ECN pelo multiplex 1. Posteriormente, foi realizado o PCR multiplex 3 para a identificação genotípica dessas espécies. Como mostra a tabela 8, a comparação dos resultados obtidos na identificação fenotípica e genotípica de espécies das 286 de ECN mostrou concordância de 93,0% (266 amostras).

Tabela 8: Discordância entre identificação fenotípica e genotípica no PCR multiplex 3.

ID FENOTÍPICA	Nº DE AMOSTRAS	ID GENOTÍPICA	DISCORDÂNCIA NO TESTE CONVENCIONAL	ITS PCR
<i>S. epidermidis</i>	1	<i>S. capitis</i>	Manitol-	<i>S. capitis</i>
<i>S. capitis</i>	2	<i>S. epidermidis</i>	Manitol +	<i>S. epidermidis</i>
<i>S. warneri</i>	10	<i>S. epidermidis</i>	Trealose +	<i>S. epidermidis</i>
<i>S. warneri</i>	7	<i>S. haemolyticus</i>	Uréia +	<i>S. haemolyticus</i>

4.9 Identificação Genotípica ITS-PCR

A identificação genotípica realizada pelo método de ITS-PCR nas amostras em que ocorreu discordância na identificação pelo método convencional e pelo genotípico, concordou em 100% com a identificação do PCR multiplex 3 (Figura 27).

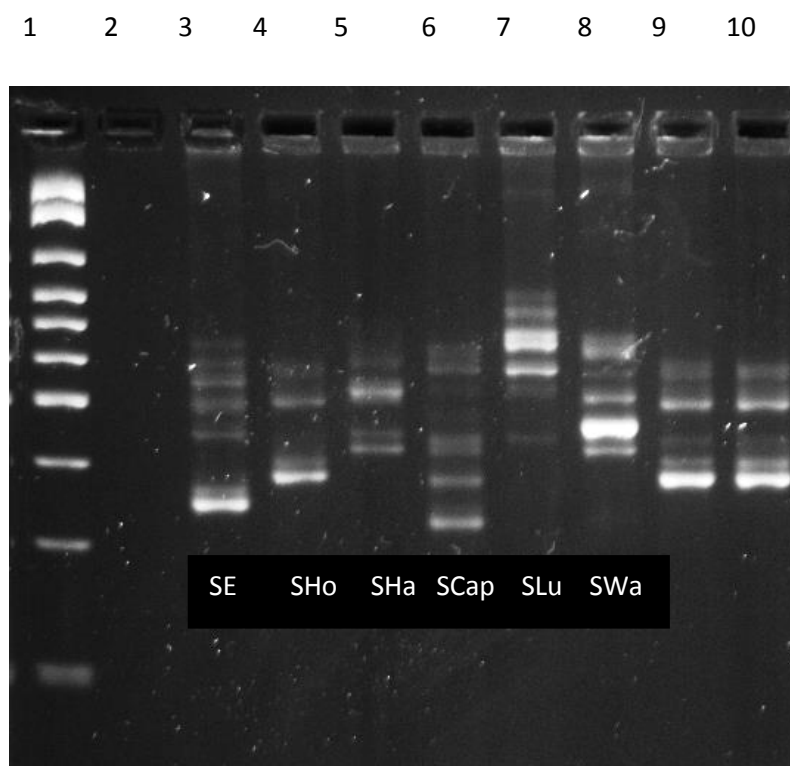


Figura 27: Gel de eletroforese do ITS-PCR para a identificação das amostras em que ocorreu discrepância com o resultado da identificação fenotípica. Coluna 1: Ladder de 2.000 pb; Coluna 2: Controle negativo; Coluna 3: ATCC 12228 (*S. epidermidis*); Coluna 4: ATCC 700237 (*S. hominis*); Coluna 5: ATCC 29970 (*S. haemolyticus*), Coluna 6: ATCC 49325 (*S. capitis*); Coluna 7: ATCC 700328 (*S. lugdunensis*); Coluna 8: ATCC 00243 (*S. warneri*) e Coluna 9 e 10: amostras que foram tipadas.

4.10 Identificação Genotípica

Dentre os 286 ECN identificados pelo PCR multiplex, foram encontrados 162 (56,6%) *S. epidermidis*, 44 (15,4%) *S. haemolyticus*, 36 (12,6%) *S. hominis*, 22 (7,7%) *S. capitis*, um *S. warneri*, um *S. lugdunensis*, concomitantemente um *S. epidermidis* e *S. lugdunensis*, um *S. haemolyticus* e *S. hominis* e 18 amostras não identificadas pelo PCR multiplex (Figura 28).

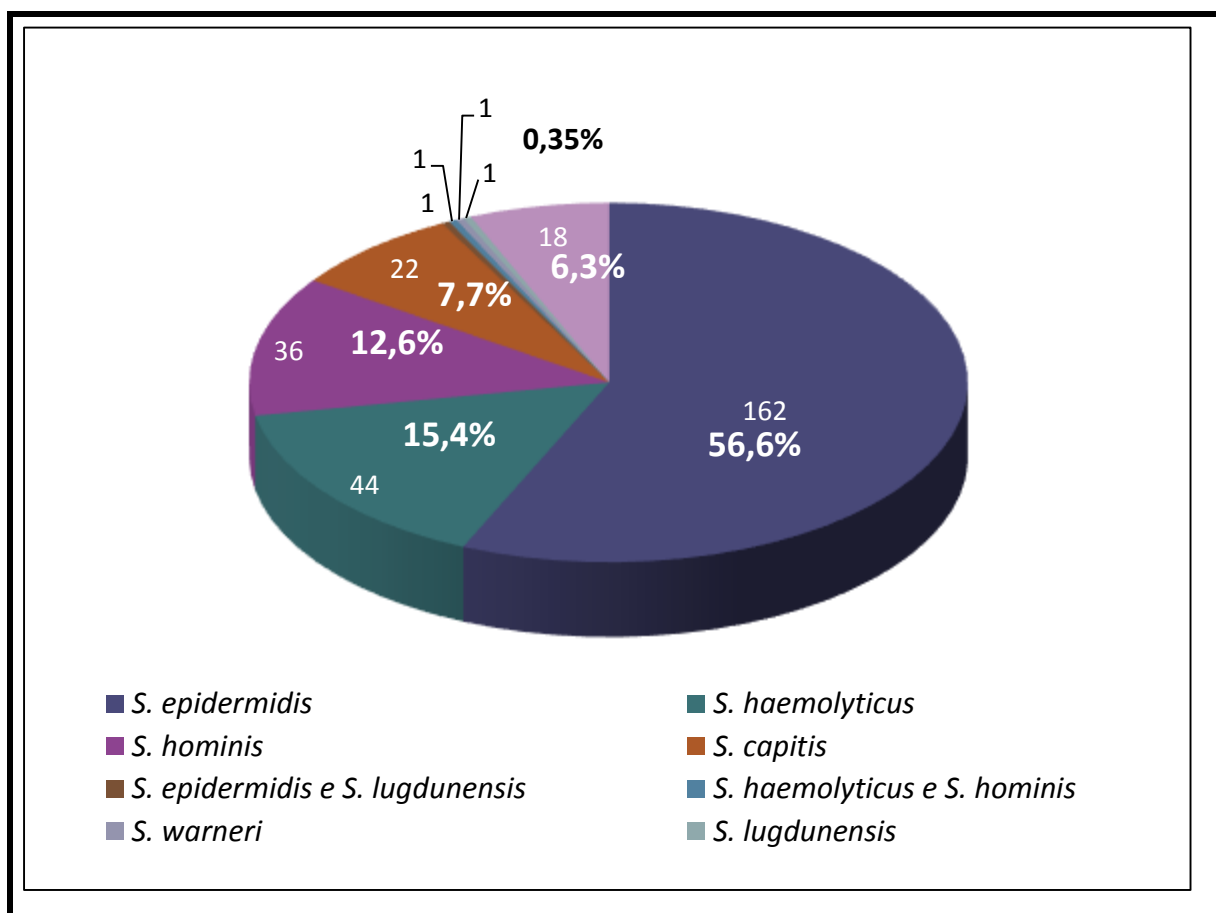


Figura 28: Identificação genotípica do multiplex 3 para identificação de espécies de ECN diretamente de hemoculturas.

4.11 Custos

A Tabela 9 apresenta a comparação dos custos para a identificação dos microrganismos isolados das hemoculturas positivas no Laboratório de Microbiologia da Seção Técnica de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, que utiliza o sistema automatizado Vitek 2 após o isolamento dos microrganismos em Ágar MacConkey e Ágar sangue com a identificação genotípica realizada diretamente dos frascos de hemocultura (extração de DNA, multiplex 1 e multiplex 3) padronizada nesse estudo.

Tabela 9: Comparação do custos da identificação realizada pelo aparelho Vitek e pela técnica de PCR multiplex.

Método	Custo
Identificação Vitek	Ágar Sangue: \$ 1,19
Total: \$ 16,12 por amostra	MacConkey: \$ 0,49
	Cartela Vitek: \$ 14,44
Identificação PCR multiplex	Extração: \$ 6,80
Total: \$ 12,64 por amostra	PCR Multiplex 1: \$ 2,90
	Gel de eletroforese 1: \$0,70
	PCR Multiplex 3: \$ 1,64
	Gel de eletroforese 2: \$ 0,60

Discussão

5. DISCUSSÃO

Das 371 hemoculturas positivas para *Staphylococcus* spp. coletadas durante o período do trabalho, 77% foram positivas fenotipicamente para ECN. Por muito tempo os ECN foram apenas considerados como colonizadores da microbiota humana. Atualmente são reconhecidos como patógenos com potencial para causarem infecções hospitalares, particularmente em pacientes imunocomprometidos e com o uso de dispositivos médicos¹¹.

Os dados deste estudo estão de acordo os encontrados em outros trabalhos^{1,63,64} que também relataram os ECN como os principais responsáveis por infecções da corrente sanguínea.

Outro fator relevante encontrado neste estudo foi a resistência à oxacilina, com 82,5% entre ECN e 50,6% entre *S. aureus*. Na década de 50 quando o uso da penicilina foi introduzido, mais de 90% dos *Staphylococcus* spp. eram sensíveis a essa droga⁶⁵, e em menos de uma década, 80 a 90% dos isolados já se apresentavam resistentes. Estudo realizado pela ANVISA (Agência de Vigilância Sanitária)⁶⁶ em 75 hospitais brasileiros no período de julho de 2006 a junho de 2008 mostrou que além de *Staphylococcus* spp. serem os microrganismos mais isolados de infecções da corrente sanguínea, apenas 39% dos *S. aureus* eram sensíveis à oxacilina. De acordo com trabalhos realizados com pacientes do Hospital Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu⁶⁷, 45,1 % dos isolados de *S. aureus* e 72,5% dos ECN foram resistentes a esta droga. Outros estudos mostram a alta taxa de isolados resistentes à oxacilina^{31,68,69}. Devido a esse aumento de isolados resistentes à oxacilina, a terapia apropriada está restrita ao uso de Glicopeptídeos e novas drogas sintéticas como a Linezolida⁷⁰. Estas além de serem mais caras e tóxicas, estão selecionando cepas resistentes, onde em alguns países já existem relatos de *Staphylococcus* spp. com resistência à Vancomicina^{71,72}, limitando assim cada vez mais a opção terapêutica.

Assim quanto mais rápida for a liberação do resultado da cultura e do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, o médico poderá adequar o tratamento, diminuindo os riscos e os danos causados ao organismo do paciente. Neste trabalho foi padronizado um PCR multiplex para ser utilizado diretamente da hemocultura para a rápida identificação de *Staphylococcus* spp., e da resistência à oxacilina. A utilização do PCR multiplex permitiu o diagnóstico em menos de 10 horas, pelo fato desta ter sido realizado diretamente da hemocultura, não necessitando de semicultivos. Em 1994, Greisen et al.⁷³ elaboraram um dos primeiros PCR para a identificação de bactérias em hemocultivos, porém este trabalho utilizou o gene *rRNA 16S* de diversas eubactérias, não sendo específico para a identificação de *S. aureus* e ECN. Salisbury et al.⁷⁴, elaboraram um PCR multiplex onde foi utilizado *rRNA 16S* encontrado em *S. aureus*, porém este fragmento era limitado a um número de ECN e em seus experimentos não foram incluídas outras espécies de bactérias para testar a especificidade do método. Neste estudo foi utilizado o primer *RNAr16S* específico para o gênero *Staphylococcus* spp., mostrando 100% de concordância com a identificação fenotípica e no teste realizado com diferentes gêneros de bactérias para analisar a especificidade, não amplificando outros gêneros de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas ou levedura, revelando ótima especificidade.

Em nosso trabalho, elaboramos PCR multiplex capaz de detectar amplamente as espécies de *Staphylococcus* spp. diretamente de hemoculturas, utilizando uma técnica de extração que se mostrou eficiente e capaz de eliminar os interferentes presentes no sangue, o primer para detecção do gene *rRNA 16S* específico para o gênero *Staphylococcus*, a pesquisa do gene *coa* que diferencia o grupo dos estafilococos coagulase positiva e negativa e ainda o primer SAU específico para *S. aureus*, capaz de diferenciar a espécie *S. aureus* mais importante encontrada em hemoculturas, de outros estafilococos coagulase positiva. A pesquisa do gene *coa* também presente no multiplex 1, detectou como estafilococos coagulase positiva somente a espécie *S. aureus*, porém pode ocorrer o aparecimento de outras espécies de

coagulase positiva. Assim, com a utilização do PCR padronizado nesse trabalho, com o primer para a detecção do gene *coa* concomitante com o primer SAU, específico de *S. aureus* é possível estabelecer se a amostra é um *S. aureus* ou não. Schimitz et al.⁷⁵ padronizaram um PCR multiplex com o uso de *rRNA 16S* específico para o gênero *Staphylococcus*, além de incluir o gene *coa* e o gene *mecA*, porém com esse método não é possível diferenciar *S. aureus* de outras espécies positivas para o gene *coa*.

Além da detecção de espécies de *Staphylococcus* spp., foi utilizada a pesquisa do gene *mecA* para a detecção da resistência à oxacilina, podendo assim direcionar o tratamento do paciente já no momento da identificação. Pereira e colaboradores⁴⁴ elaboraram em 2010 um PCR multiplex que identificava, diretamente de hemoculturas três espécies de *Staphylococcus* spp., *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* e o gene *mecA*, porém sua identificação ficava restrita a essas espécies, excluindo outras que possam ser encontradas em hemoculturas. Com o mutiplex 1 padronizado nesse estudo todas as espécies de estafilococos isoladas de bacteremias são detectadas. O PCR multiplex foi testado em 371 amostras clínicas, 13 amostras de hemoculturas com a presença de outras espécies de bactérias e DNA bacteriano de outras espécies diretamente da cultura bacteriana, mostrando ótima sensibilidade e especificidade. Mason et al.⁵³ elaboraram um PCR multiplex utilizando primers para a pesquisa dos genes *rRNA 16S*, gene *coa* e o gene *clfA*, detectando o gênero *Staphylococcus* e a espécie *S. aureus*. Porém, um dos problemas citados pelos autores foi a utilização de um pequeno número de amostras, podendo assim ter falhado na detecção de qualquer problema.

A única discrepância do PCR multiplex 1 padronizado nesse estudo foi quanto a detecção do gene *mecA* e da suscetibilidade à oxacilina em testes fenotípicos, sendo que em 19 amostras não foi detectado o gene *mecA* e estas amostras se mostraram resistentes no teste de suscetibilidade à oxacilina (1 amostra de *S. aureus* e 18 de ECN). Nessas amostras foi realizada

a detecção do gene *mecA* por PCR simplex, ocorrendo confirmação dos resultados do PCR multiplex. Outros estudos também relataram esta discrepância^{53,75,76,77,78}, que pode estar relacionado com outras formas de resistência, como a hiperprodução de beta-lactamase ou modificação de outra PBP. Em adição, 8 amostras foram positivas para o gene *mecA* e se mostraram sensíveis pelo teste fenotípico (1 amostra de *S.aureus* e 7 de ECN), mostrando a importância da técnica genotípica na detecção de resistência à oxacilina, mas não descartando a importância de outras técnicas fenotípicas para a implantação de um tratamento mais específico e eficaz.

O PCR multiplex se mostrou sensível, específico, rápido e com uma boa concordância com os resultados fenotípicos, podendo ser utilizado para auxiliar em laboratórios clínicos para uma identificação rápida, iniciando um tratamento mais específico e eficaz, diminuindo assim a probabilidade de mortalidade e morbidade dos pacientes, além de contribuir para a diminuição do uso indevido de outras classes de antimicrobianos, que além de serem mais caros e tóxicos, contribuem para um aumento no aparecimento de resistência por essas bactérias.

Além da alta taxa de resistência a antibióticos, outro fator que pode dificultar o tratamento e a recuperação do paciente está associado a capacidade dos *Staphylococcus* spp. em produzir biofilme. O segundo multiplex padronizado em nosso trabalho objetivou a detecção do operon *ica* em amostras de ECN e de *S. aureus* diretamente dos frascos de hemocultura. Hernández e colaboradores⁷⁹ descrevem a produção do biofilme como sendo um importante fator de virulência, pois promove a bactéria uma camada protetora contra o sistema imune e aos antibióticos, podendo estar relacionado inclusive com a sua resistência a esses, assim a rápida detecção da possível capacidade de produzir biofilme é de suma importância para a recuperação do paciente.

Para as 286 amostras de ECN foram realizadas as reações 1 e 2 para a detecção dos genes presentes no operon *ica*, em 96 (33,5%) amostras não ocorreu a amplificação de nenhum gene, enquanto que em 88 (30,7%) houve a amplificação do operon completo e 98 (34,2%) amostras apresentaram alguns dos genes do operon, e concomitantemente o gene *icaA* e *icaD*. Das 85 amostras de *S. aureus*, somente 3 (3,5%) apresentaram o operon completo, 70 (82,3%) revelaram a presença concomitante dos genes *icaA* e *icaD* e duas (2,3%) amostras não apresentaram a amplificação de nenhum gene *ica*.

Dentre os ECN a espécie que mais apresentou os genes do operon *ica* foi *S. epidermidis*, com 49,3 % positivos para o operon completo e em 51,3% ocorreu a amplificação concomitante dos genes *icaA* e *icaD*. Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho elaborado por Arciola e colaboradores⁵⁸ com multiplex para a detecção do operon *ica* em amostras de *S. epidermidis*, porém não diretamente de amostras clínicas, e sim da cultura pura da bactéria.

S. epidermidis foi relatado como a primeira espécie a produzir biofilme, porém já se sabe que essa capacidade também é encontrada em *S. aureus* e em outros ECN⁸⁰. Nas outras espécies de ECN também ocorreu a amplificação de genes do operon, exceto nas 2 amostras de *S. lugdunensis*, uma de *S. saprophyticus* e uma de *S. xylosus*.

Nas amostras de *S. aureus* 82,3% foram positivos para os genes *icaA* e *icaD*, resultados similares aos relatados por outros trabalhos^{81,82}, porém superiores aos resultados encontrados por Arciola et al.⁸³. Esse resultado é explicado devido ao fato de que o primer utilizado por Arciola et al.⁸³ ter sido desenhado em cima da sequência do operon *icaADBC* de *S. epidermidis*, e o *icaA* e o *icaD* deste apresentar 72 e 76% de similaridade com os respectivos genes do *S. aureus*⁸⁰.

Com a elaboração do multiplex para a detecção do operon *ica* diretamente do frasco de hemocultura, diminuimos o tempo necessário para a detecção de genes contidos no operon. O uso de dispositivos e próteses se tornou uma importante porta de entrada para os *Staphylococcus* spp. devido a sua capacidade de colonizar esses dispositivos⁸⁴, assim com a informação da presença desses genes o médico poderá direcionar uma conduta mais específica quanto ao procedimento a ser tomado.

Porém não realizamos um teste fenotípico para a detecção da produção de biofilme. O gene está presente, mas isso não pode afirmar que este está sendo expresso, não implicando realmente que está ocorrendo a produção do biofilme. Porém muitos trabalhos relatam a importância do operon *ica*, principalmente da presença dos genes *icaA* e *icaD* na formação do biofilme^{85,86}, onde a relação da taxa de detecção de presença dos genes e da produção de biofilme são altas.

Outro fato que reforça a importância de um PCR multiplex para a rápida detecção dos genes *ica*, é a correlação entre a produção de biofilme e resistência a antibióticos, sendo que a formação de biofilme pode implicar em falha terapêutica, já que em biofilme os microrganismos são protegidos da ação dos antimicrobianos^{79,87}. A produção de biofilme também pode ser influenciada por condições em que estas bactérias são expostas, dentre elas a presença de concentrações subinibitórias de antibióticos, promovendo a expressão gênica e a produção do biofilme⁸⁸.

Assim o PCR multiplex 2 padronizado para a detecção do operon *ica* em amostras de ECN e *S. aureus* se mostrou uma técnica rápida, sensível e de grande importância, podendo melhorar a conduta médica.

O terceiro multiplex padronizado nesse estudo teve como objetivo de identificar as espécies de ECN mais isoladas em hemoculturas, como *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*

S. hominis, *S. capitis*, *S. warneri*⁸⁹ e *S. lugdunensis*, onde este, apesar de raro, é um importante patógeno⁹⁰. ECN estão em grande número presentes na microbiota normal da pele humana, sendo predominantemente um dos maiores contaminantes de hemoculturas^{91,92}, porém a incidência de infecções causadas por esses agentes teve um grande aumento nos últimos anos, associadas ao uso de cateteres, próteses, válvulas^{61,93} devido a sua capacidade de colonizar esses dispositivos, tornando-se capazes de adentrarem o organismo do paciente e promover infecções mais sérias⁹⁴. Outro fator de grande importância é a taxa de ECN resistentes a antimicrobianos, tornando-se assim importante sua rápida identificação.

Dentre as espécies de ECN, identificadas pelo método bioquímico convencional, o mais frequente foi o *S. epidermidis*, das 286 amostras de ECN, identificado em 53,1%. Segundo trabalho de Schuenck et al.¹⁵, a segunda espécie de ECN prevalente é o *S. haemolyticus*, dado esse também encontrado em nosso trabalho. Os autores descrevem a preocupação sobre esse fato, devido a alta taxa de isolados de *S. haemolyticus* resistentes a múltiplas drogas, das 36 amostras de *S. haemolyticus* isolados em nosso trabalho 91,6% se mostraram resistentes à oxacilina, dificultando o tratamento das infecções causadas por esses microrganismos.

A terceira espécie mais identificada foi *S. hominis* e a quarta foi *S. capitis*. Essa última espécie tem sido isolada de hemoculturas, mas não nessa proporção⁹⁵. *S. warneri* ficou em quinto lugar, porém a sua identificação é a mais difícil de ser realizada, devido a baixa acurácia na identificação fenotípica⁹⁶.

S. lugdunensis foi isolada em somente duas hemoculturas, porém apesar da baixa frequência em hemoculturas, essa espécie pode apresentar uma virulência similar à de *S. aureus*⁹⁷, e causar infecções invasivas e severas como endocardites²⁰, devendo ser valorizado, sempre que isolado de espécimes clínicos.

A identificação de ECN requer muito tempo e o uso de muitas provas bioquímicas, não sendo viáveis para a rotina dos laboratórios de microbiologia clínica⁹. Entre o isolamento e a identificação fenotípica das espécies de ECN, levou-se um período de 3 a 5 dias, principalmente em espécies que necessitaram de provas complementares, além das provas simplificadas⁴³.

No terceiro multiplex elaborado nesse estudo, a extração foi realizada diretamente da hemocultura, não necessitando de subcultivos, diminuindo o tempo em que o resultado é liberado, e a identificação simultânea de seis espécies de ECN, as cinco primeiras (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. capitis* e *S. warneri*) mais frequentemente isoladas de hemoculturas, totalizando 93% dos isolados, e também *S. lugdunensis*, menos frequente, mas de importante significância clínica.

Os resultados da identificação fenotípica e genotípica mostraram algumas discrepâncias. Duas amostras de *S. epidermidis* foram identificadas pelas provas bioquímicas como *S. capitis*, a discrepância foi na prova de utilização do açúcar Manitol, que deveria ser negativa, mas positivou. Uma amostra de *S. capitis* identificado como *S. epidermidis* fenotipicamente, onde o problema aconteceu com o mesmo açúcar, porém nesse caso o manitol deveria ser positivo, mas foi negativo. Outras 10 amostras de *S. epidermidis* foram identificadas fenotipicamente como *S. warneri*, devido à utilização do açúcar trealose por essas cepas que deveriam ser negativas e positivaram. Também foi verificado 7 amostras de *S. haemolyticus* identificadas fenotipicamente como *S. warneri*, onde a discrepância ocorreu devido a utilização da uréia por essas amostras, fato que não deveria ter ocorrido em amostras de *S. haemolyticus*. Essas discrepâncias podem ter acontecido devido a aquisição de genes, mutações no DNA dessas bactérias ou devido a não expressão de genes. Entretanto, essas discrepâncias (6,9%) em relação à utilização fenotípica de substratos é esperada, já que nenhuma prova bioquímica é 100% encontrada em todos os isolados de uma determinada

espécie. Esses resultados são importantes, pois revelam um perfil variável para a utilização de trealose e manitol por *S. epidermidis* e de uréia por *S. haemolyticus*, indicando a importância de testes moleculares na confirmação da identificação de espécies de ECN. Em outros estudos^{89,91} também foram encontradas discrepâncias entre os resultados obtidos nas provas bioquímicas convencionais e resultados de identificação genotípica de ECN.

Devido ao fato de que a identificação fenotípica necessitar de muito tempo para ser realizada, e por poder ocorrer falhas na utilização dos açúcares outros autores elaboraram trabalhos com PCR para a identificação genotípica desses microrganismos^{98,99}. Em 2001, Couto et al.⁶¹ elaboraram um estudo com um PCR simplex, onde este identificava espécies de ECN, detectando uma região satélite do RNAr. Porém a técnica padronizada é demorada, em média 18 horas para a liberação dos resultados, além da extração ser realizada de colônias já isoladas. Já em nosso estudo, entre a extração e a identificação por PCR Multiplex 3, o tempo gasto foi em média de seis a sete horas.

O PCR multiplex se mostrou uma técnica rápida e de grande eficácia na identificação de ECN diretamente de hemoculturas, e os resultados demonstraram boa concordância com os resultados obtidos no ITS-PCR que é muito mais demorado e realizado somente a partir de culturas puras de microrganismos, e envolvendo a utilização de vários controles (cepas ATCC) que acabam aumentando o número de amostras a serem processadas, o que dificulta e encarece a técnica para ser utilizada em laboratórios de microbiologia clínica de rotina.

Porém, ao se pensar em uma técnica de biologia molecular como o PCR multiplex para auxiliar no diagnóstico rápido em casos de infecção da corrente sanguínea logo se pensa nos custos dessa técnica para a instituição. Em um levantamento realizado por nosso trabalho, detectou-se que para a identificação das espécies da cultura, ou seja, após a detecção da positividade da hemocultura pelo aparelho Bactec, sua semeadura em placas contendo cultura e

sua identificação, que no caso do Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu utiliza o aparelho Vitek, sai em média \$ 16,12 reais.

No caso do PCR multiplex que não necessita da semeadura da hemocultura por ocorrer a identificação diretamente do frasco de hemocultivo, o PCR multiplex 1 para a detecção do gênero de *Staphylococcus* spp., da espécie de *S. aureus* e do gene *mecA*, e do PCR multiplex 3 que identifica as 6 espécies de *Staphylococcus* isoladas de hemoculturas tem um custo de \$ 12,73 por amostra.

Assim o PCR multiplex mostrou-se uma técnica rápida, sensível e eficaz, não sendo mais cara que o método automatizado de identificação por provas bioquímicas realizadas pelo laboratório de microbiologia do Hospital das Clínicas de Botucatu, podendo ser utilizado para auxiliar no diagnóstico de Estafilococos em hemoculturas, liberando o resultado mais rapidamente para auxiliar na conduta médica.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

- O PCR multiplex apresentou boa concordância com os métodos fenotípicos para a identificação de *S. aureus*, ECN e do gene *mecA* de resistência à oxacilina direto dos frascos de hemoculturas.
- A detecção do operon *ica* diretamente dos frascos de hemoculturas se mostrou uma técnica rápida, sensível e de grande importância para a conduta médica.
- O PCR multiplex para identificação de espécies de ECN se mostrou sensível e específico para essas espécies, podendo contribuir para a identificação rápida dessas espécies.
- O PCR multiplex se mostrou uma técnica rápida, custo adequado, sensível e específica, podendo auxiliar na identificação de espécies de estafilococos em um tempo mais curto, podendo direcionar o médico em um tratamento mais rápido e específico.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Banderó Filho VC, Reschke CR, Horner R. Perfil epidemiológico das infecções hospitalares na unidade de terapia intensiva infantil do hospital de caridade e beneficência de Cachoeira do sul, RS.RBAC 2006; 38: 267-70.
2. Menezes EA, Sá KM, Cunha FA, Ângelo MRF, Oliveira IRN, Salviano MNC. Frequência e percentual de suscetibilidade de bactérias isoladas em pacientes atendidos na unidade de terapia intensiva do Hospital Geral de Fortaleza. J Bras de Patol Med Lab 2007; v.43 n.3.
3. Russel JA. Management of sepsis. N Engl J Med. 2006; 355:1699-713.
4. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. N Engl J Med 2003; 348: p138-150.
5. Guilarde AO, Turchi MD, Martelli CMT, Primo MGB, Batista LJA. Bacteremias em pacientes internados em hospital universitário. Rev. Assoc. Med. Bras. 2007; v.53 n.1.
6. Siegman-Igra Y, Fourer B, Orni-Wasserlauf R, Golan Y, Noy A, Schwartz D, Giladi M. Reappraisal of community-acquired bacteremia: a proposal of a new classification for the spectrum of acquisition of bacteremia. Clin Infect Dis 2002; 34:p1431-1439.

7. Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, Schneider A, Patel J, Srinivasan A, Kallen A, Limbago B, Fridkin S. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. *Infect Control HospEpidemiol.* 2013; 34:1-14.
8. Euzeby J. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: LPSN. 2013. <<http://www.bacterio.net/s/staphylococcus.html>> acessado em 01/09/2013.
9. Silva CHPM, Lins AP, Cruz CSO. Avaliação do sistema staph-id para a identificação de *Staphylococcus* isolados a partir de espécimes clínicos humanos. *RBAC.* 2006;38:7-9.
10. Springer B, Orendi U, Much P, Hoger G, Ruppitsch W, Krziwanek K, Metz-Gercek S, Mittermayer H. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new zoonotic agent?. *Wien KlinWochenschr.* 2009; 121:86-90.
11. Bannerman TL. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and the other catalase-positive cocci that grow aerocally. In: PR Murray , EJ Baron, JH Jorgensen, MA Pfaller , RH Tenover , editors. *Manual of Clinical Microbiology*, Eighth Edition. ASM Press. 2003; 384-403.
12. Archer GL, Climo, MW. *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. *N Engl J Méd.* 2001; 344: 55-56.
13. Foster, TJ. Immune evasion by *Staphylococci*. *Nat Rev Microbiol.* 2005; 3:948-958.

14. Gill SR, Fouts DE, Archer GL, Mongodim EF, Deboy RT, Ravel J, et al. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistance *Staphylococcus epidermidis* strain. J Bacteriol. 2005; 187(7): 2426-38.
15. Schuenck RP, Pereira EM, Iorio NL, Dos Santos KR. Multiplex PCR assay to identify methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. FEMS Immunol Med Microbiol. 2008; 52: 431-435.
16. Shittu A, Lin J, Morrison D, Kolawole D. Isolation and molecular characterization of multiresistant *Staphylococcus sciuri* and *Staphylococcus haemolyticus* associated with skin and soft-tissue infections. J Med Microbiol. 2004; 53:51-55.
17. Ferreira AM, Bonesso MF, Mondelli AL, Cunha MLRS. Identification of *Staphylococcus saprophyticus* isolated from patients with urinary tract infection using a simple set of biochemical tests correlating with 16S–23S interspace region molecular weight patterns. J of Microbiol Methods. 2012; 91: 406–411.
18. Rosenstein R, Gotz F. Staphylococcal lipases: biochemical and molecular characterization. Biochimie 2000; 82: 1005-1014.
19. Mateu M, Maestre JT, Aguilar L, Cafini F, Puente P, Sanchez P, Alou L, Gimenez MJ, Prieto J. Genotypic versus phenotypic characterization, with respect to susceptibility and identification, of 17 clinical isolates of *S. lugdunensis*. J Antimicrob Chemother. 2005; 56(2): 287-91.

20. Von Eiff CV, Peters G, Heilmann C. Coagulase-negative *Staphylococci* as nosocomial pathogens. *The Lancet Infectious diseases*. 2002; 2:677-685.
21. Kessler RB, Kimbrough RC, Jones SR. Infective endocarditis caused by *S. hominis* after vasectomy. *Clin Infect Dis*. 1998; 27:216-217.
22. Mack D, Riedewald J, Rohde H, Magnus T, Feucht HH, Elsner HA, Laufs R, Rupp ME. Essential functional role of the polysaccharide intercellular adhesin of *Staphylococcus epidermidis* in hemagglutination. *Infection and Immunity*. 1999; v 67(2): 1004-1008.
23. Mack D, Sabottke A, Dobinsky S, Rohde H, Horstkotte MA, Knobloch KM. Differential expression of methicillin resistance by different biofilm-negative *S. epidermidis* Transposon mutant classes. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2002; 46:1, 178-183.
24. Cafiso V, Bertuccio T, Campanile F, Amicosante G, Perilli MG, Selan L, Nicoletti G, Stefani S. Presence of the *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. *Clin Microbiol Infect*. 2004; 10: 1081-8.
25. Morales M, Mendez-Alvarez S, Martin-Lopez JV, Mrrero C, Freytes CO. Biofilm: the microbial “bunker” for intravascular cateter-related infection. *Support Care Cancer*. 2004; 12:701-7.
26. Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Fatima T, Rattan A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian J Med Microbiol*. 2006; 24:25-9.

27. Heilmann C, Hussain M, Peters G, Gotz F. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *S. epidermidis* to a polystyrene surface. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1997; 24(5): 1013-1024.
28. Von Eiff C, Heillman C, Peters G. New aspects in the molecular basis of polymer-associated infections due to *Staphylococci*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000; 18(2): 843-46.
29. Alcaraz LE, Satorres SE, Lucero RM, Centorbi ONP. Species identification, slime production and oxacillin susceptibility in coagulase-negative staphylococci isolated from nosocomial specimens. *Braz J Microbiol*. 2003; 34:45-51.
30. Costerton W, Veeh R, Shirtliff M, Pasmore M, Post C, Ehrlich G. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest*. 2003; 112: 1466-77.
31. Kaiser TDL, Pacheco FC, Lima AA, Pereira EM, Santos KRN, Nunes APF. Avaliação de métodos comumente usados em laboratório para adeterminação da suscetibilidade à oxacilina entre amostras de *Staphylococcus* spp., isoladas de um Hospital de Vitória, estado do espírito Santo. *Soc Bras Med Trop*. 2010; 43: 298-303.
32. Sader HS, Jones RN, Gales AC, Silva JB, Pignatari AC. SENTRY Participants Group (Latin America). SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin America and Brazilian results for 1997 though 2001. *Bras J Infect Dis*. 2004; 8(1): 25-79.

33. Scheffers DJ, Pinho MG. Bacterial wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2005; 69(4): 585-607.
34. Holtje JV. The alternative to penicillins. *Nat Med.* 2001; 10: 1100-01.
35. Giesbrecht P, Kersten T, Maidho H, Weck J. Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998; 62(4): 1371-1414.
36. Lyon BR, Skurray R. Antimicrobial resistance of *S. aureus*: genetic basis. *Microbiol Rev.* 1987; 51(1): 88-134. Review.
37. Hackbarth CJ, Chambers HF. Methicillin-resistant *Staphylococci*: genetics and mechanisms of resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989; 33(7):991-94.
38. Garcia CR, Mallorqui FG, Marrero A, Potempa J, Coll M, Gomis FRX. On the transcriptional regulation of methicillin resistance: MecI repressor in complex with is operator. *J Biol Chem.* 2004; 279(17): 17888-96.
39. Lim TT, Coombs GW, Grubb WB. Genetic organization of *mecA* and *mecA*-regulatory genes in epidemic methicillin-resistance *S. aureus* from Australia and England. *J Antimicrob Chemother.* 2002; 50(6): 819-24.

40. Weinstein MP, Murphy JR, Reller LB, Lichtenstein KA. Clinical significance of positive blood cultures: a comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. II. Clinical observations, with special reference to factors influencing prognosis. *Rev Infect Dis.* 1983; 5:54-70.
41. Bryan CS. Clinical implications of positive blood cultures. *Clin Microbiol Rev.* 1989; 2: 329-353.
42. Macdonald LC, Weinstein MP, Fune J, Mirrett S, Reimer LG, Reller LB. Controlled comparison of Bact/ALERT FAN aerobic medium and Bactec fungal blood culture medium for detection of fungemia. *J Clin Microbiol.* 2001; 39:622-624.
43. Cunha MLRS, Sinzato YK, Silveira LVA. Comparison of methods for identification of Coagulase-negative *Staphylococci*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004; 99:855-60.
44. Pereira EM, Schuenck RP, Malvar KL, Iorio NLP, Matos PDM, Olendzki AN, Oelemann WMR, Santos KRN. *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*: Methicillin-resistant isolates are detected directly in blood cultures by multiplex PCR. *Microbiol Reser.* 2010; 165:243-249.
45. Millar B, Moore J, Mallon P, Xu J, Crowe M, Macclurg R, Raoult D, Earle J, Hone R, Murphy P. Molecular diagnosis of infective endocarditis-a new Duke's criterion. *Scand J Infect Dis.* 2001; 33: 673-680.

46. Geha DJ, Uhl JR, Gustaferra CA. Persing Dh. Multiplex PCR for identification of methicillin resistance *Staphylococci* in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 1994; 32: 1768-1772.
47. Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol.* 1997; 63: 3741-3751.
48. Al-Soud WA, Randstrom P. Purification and characterization of PCR- inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 485-493.
49. Hogg GM, McKenna JP, Ong G. Rapid detection of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from positive BacT/Alert® blood culture bottles using real-time polymerase chain reaction: evaluation and comparison of 4 DNA extraction methods. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008; 61: 446-452.
50. Fredricks DN, Relman DA. Improved amplification of microbial DNA from blood cultures by removal of the PCR inhibitor sodium polyanethanesulfonate. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 2810-2816.
51. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Approved standards: M100-S22. CLSI; 2012.
52. Riffon R, Sayasith K, Khalil H, Dubreuil P, Drolet M, Lagacé J. Development of a Rapid and Sensitive Test for Identification of Major Pathogens in Bovine Mastitis by PCR. *J Clin Microbiol.* 2001; 39:2584-2589.

53. Mason WJ, Blevins JS, Beenken K, Wibowo N, Ojha N, Smeltzer MS. Multiplex PCR Protocol for the Diagnosis of Staphylococcal Infection. J Clin Microbiol. 2001; 39(9):3332.
54. Kearns AM, Siders PR, Wheeler J, Freeman R, Steward M. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococci* by multiplex PCR. J Hosp Infect. 1999; 53:33-37.
55. Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. Identification of Methicillin-Resistant Strains of *Staphylococci* by Polymerase Chain Reaction. J Clin Microbiol. 1991; 29: 2240-2244.
56. Vandecasteele SJ, Peetermans WE, Merckx RR, Rijinders BJA, Eldere JV. Reability of the *ica* and *atlE* genes in the discrimination between invasive, colonizing and contaminant *Staphylococcus epidermidis* isolates in the diagnosis of catheter-related infections. Euro Soc Clin Microbiol Infec. 2003; 9:114-119.
57. Rohde H, Burandt EC, Siemssen N, Frommelt L, Burdelski C, Wurster S, Scherpe S, Davies AP, Harris LG, Horstkotte MA, Knobloch JKM, Ragunath C, Kaplan JB, Mack D. Polysaccharide intercellular adhesion or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. Biomaterials. 2007; 28:1711-1720.
58. Arciola CR, Gamberini S, Campoccia D, Visai L, Speziale P, Baldassarri L, Montanaro L. A multiplex PCR method for the detection of all five individual genes of *ica* locus in *Staphylococcus epidermidis*. A survey on 400 clinical isolates from prosthesis-associated infections. Inc Biomed Mater Res. 2005; 75A: 408-413.

59. Martineau F, Picard FJ, Ke D, Paradis S, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Species-specific and ubiquitous DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. J Clin Microbiol. 1996; 34:2888-2893.
60. Hirota S, Sasaki T, Kuwahara-arai K, Hiramatsu K. Rapid Accurate Identification of Human-Associated *Staphylococci* by Use of Multiplex PCR. J Clin Microbiol. 2011; 49:3627-3631
61. Couto I, Pereira S, Miragaia M, Sanches IS, Lencastre H. Identification of Clinical *Staphylococcal* Isolates from Humans by Internal Transcribed Spacer PCR. J Clin Microbiol. 2001; 39: 3099-3103.
62. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics. 1977; 33:159-174.
63. Al-Tawfiq JA, Sufi I. Infective endocarditis at a hospital in Saudi Arabia: epidemiology, bacterial pathogens and outcome. Ann Saudi Med. 2009; 29: 433-6.
64. Ge Y, Liu XQ, Xu YC, Xu S, Yu MH, Zhang W, Deng GH. Blood collection procedures influence contamination rates in blood culture: a prospective study. Chin Med J (Engl). 2011;124: 4002-6.
65. Livermore DM. Antibiotic resistance in *Staphylococci*. Int J Antimicrob. 2000; 16:3-10.

66. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim Informativo da Rede Nacional de monitoramento da resistência Microbiana em Serviço de Saúde. 10 de julho 2009; Ano III; nº1.<www.anvisa.gov.br/divulga> acessado em 10/06/2012.
67. Martins A, Pereira VC, Cunha MLRS. Oxacillin resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from the university hospital of Botucatu Medical School in Brazil. *Chemotherapy*. 2010; 56:112-119.
68. Cuevas O, Cercenado E, Goyanes MJ, Vindel A, Trincado P, Boquete T, Marín M, Bouza E. *Staphylococcus* spp. in Spain: present situation and evolution of antimicrobial resistance (1986-2006). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008; 26: 269-277.
69. Cunha MLRS, Lopes CAM. Estudo da produção de beta-lactamases e sensibilidade às drogas em linhagens de Estafilococos coagulase-negativos isolados de recém-nascidos. *J Bras Patol Med Lab*. 2002; 38: 281-290.
70. Woods W, Ramotar K, Lem P, Toye B. Oxacillin susceptibility testing of coagulase-negative *Staphylococci* using the disk diffusion method and the Vitek GPS card. *Giagn Microbiol Infect Dis*. 2002; 42: 291-294.
71. Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, Shah S, Rudrik JT, Pupp GR, Brown WJ, Cardo D, Fridkin SK. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *N Engl J Med*. 2003; 348: 342-347.

72. Martins A, Cunha MLRS. Epidemiological aspects of oxacillin-resistant *Staphylococcus* spp.: the use of molecular tools with emphasis on MLST. In: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha. (Ed.). *Epidemiology Insights*. 1ed. Rijeka, Croatia: InTech - Open Access Publisher, 2012; 1: 95-110.
73. Greisen K, Loeffeholz M, Purohit A, Leong D. PCR primers and probes for the *16S rRNA* gene of the most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol*. 1994; 32: 335-351.
74. Salisbury SM, Sabatini LM, Spiegel CA. identification of methicillin-resistant *staphylococci* by multiplex PCR assay. *Am J Clin Patol*. 1997;107: 368-373.
75. Schimitz FJ, Mackenzie CR, Hofman B, Verhoef J, Finken-Eigen M, Heinz HP, Kohrer K. Specific information concerning taxonomy, pathogenicity and methicillin resistance of *staphylococci* obtained by multiplex PCR. *J Méd Microbiol*. 1997;46:773-778.
76. Caierão J, Superti S, Dias CA, d'Azevedo PA. Automated systems in the identification and determination of methicillin resistance among coagulase negative *Staphylococci*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006; 101: 277-80.
77. Pereira VC, Martins A, Rugolo LMSS, Cunha MLRS. Detection of Oxacillin Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolated from the Neonatal and Pediatric Units of a Brazilian Teaching Hospital. *Clinical Medicine Pediatrics*. 2009; 3:23-31.

78. Kilic A, Muldrew KL, Tang YW, Baustaoglu AC. Triplex real-time polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci and determination of methicillin resistance directly from positive blood culture bottles. *Diagn Microbiol Inf Dis*. 2010;66:349-355.

79. Hernández BD, Santos FS, Miranda BL, Bejarano LP, Novales GM. Production of *ica*ADBC-encoded polysaccharide intercellular adhesin and therapeutic failure in pediatric patients with staphylococcal device-related infections. *BMC Inf Dis*. 2010; 10:1-6.

80. Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Gotz F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun*. 1999; 67: 5427-5433.

81. Fowler VG, Fey PD, Reller LB, Chamis AL, Corey GR, Rupp ME. The intercellular adhesion locus *ica* is present in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from bacteremic patients with infected and uninfected prosthetic joints. *Med Microbiol Immunol*. 2001; 189:127-131.

82. Rohde H, Knobloch JKM, Horstkotte MA, Mack D. Correlation of *Staphylococcus aureus* *ica*ADBC genotype and Biofilm Expression Phenotype. *J Clin Microbiol*. 2001; 39:4595-4596.

83. Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of Staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol*. 2001; 39: 2151-2156.

84. López JVM, Gil OD, Morales M, Batista N, Villar J, Martín FC, Álvarez SM. Simultaneous PCR detection of *ica* cluster and methicillin genes in catheter-isolated *Staphylococcus*. *Inten Microb*. 2004; 7:63-66.
85. Yasdani R, Oshaghi M, Havayi A, Salehi R, Sadeghizadeh M, foroohesh H. Detection of *icaAD* gene and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates from wound infections. *Iranian J publ Health*. 2006; 35:25-28.
86. Oliveira A, Cunha MRLS. Bacterial biofilms with emphasis on coagulase-negative *Staphylococci*. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2008; 14: 573-595.
87. Araujo GL, Coelho LR, Carvalho CB, Maciel RM, Coronado AZ, Rozenbaum R, Carvalho BTF, Figueiredo AMS, Teixeira LA. Commensal isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* are also well equipped to produce biofilm on polystyrene surfaces. *J Antim Chem*. 2006; 57: 855-864.
88. Miyamoto H, Imamura K, Kojima A, Takenaka H, Hara N, Ikenouchi A, Tanabe T, Taniguchi H. Survey of nasal colonization by, and assessment of a novel multiplex PCR method for detection of biofilm-forming methicillin-resistant *staphylococci* in healthy medical students. *J Hosp Infect*. 2003; 53:215-223.
89. Alexopoulou K, Foka A, Petinaki E, Jelastopulu E, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I. Comparison of two commercial methods with PCR restriction fragment length polymorphism of the *tuf* gene in the identification of coagulase-negative staphylococci. *Letters in Applied Microbiology*. 2006; 43:450-454.

90. Frank AI, Del Pozo JL, Patel R. From clinical microbiology to infection pathogenesis: how daring to be diferente Works for *Staphylococcus lugdunensis*. J Clin Microbiol.2008; 21:111-133.
91. Fujita S, Senda Y, Iwagami T, Hashimoto T. Rapid Identification of Staphylococcal Strains from Positive-Testing Blood Culture Bottles by Internal Transcribed Spacer PCR Followed by Microchip Gel Electrophoresis. J Clin Microbiol. 2005; 43:1149-1157.
92. Lark RL, Chenoweth C, Saint S, Zemencuk JK, Lipsky BA, PlordeJJ.Four year prospective evaluation of nosocomial bacteremia: epidemiology, microbiology, and patient outcome.Diagn Microbiol Infect Dis. 2000; 38:131-140.
93. Martineau F, Picard FJ, Ke D, Paradis S, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Development of a PCR Assay for identification of Staphylococci at Genus and Species Levels. J Clin Microbiol. 2001; 39: 2541-2547.
94. Kools WE, Bannerman TL. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. Manual of clinical microbiology. 1999; 7: 264-282.
95. Caierão J, Superti S, Dias CA, d'Azevedo PA. Automated systems in the identification and determination of methicillin resistance among coagulase negative *Staphylococci*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006; 101: 277-80.
96. Bannerman TL, Kleeman KT, Kloos WE. Evaluation of the Vitek Systems Gram-positive identification card for species identification of coagulase-negative *Staphylococci*. J Clin Microbiol. 1993; 31: 1322-1325.

97. Cernado E. *Staphylococcus lugdunensis*: un estafilococo coagulase negative diferente de los demás. *Enf Inf Microbiol Clin*. 2009; 27:139-142.
98. De Paulis AN, Predari SC, Chazarreta CD, Santoianni JE. Five-test scheme for species – level identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol*. 2003; 41:1219-1224.
99. Heikens E, Fleer A, Paauw A, Florijin A, Fluit AC. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase negative staphylococci. *J Clin Microbiol*. 2005; 43:2286-2290.

8. ANEXO

Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participação em Pesquisa Científica

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participação em Pesquisa Científica

Projeto de Pesquisa: “Detecção do operon *ica* da produção de biofilme, gene *mecA* de resistência à oxacilina e identificação de espécies de *Staphylococcus* spp. diretamente dos frascos de hemoculturas pela técnica de PCR multiplex.”

O objetivo da pesquisa é detectar a presença da bactéria *Staphylococcus* spp. diretamente dos frascos de hemoculturas de pacientes atendidos pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu utilizando método de biologia molecular (PCR) para a identificação de genes da bactéria que permite sua identificação e fatores que implicam em um agravante na infecção.

Solicito seu consentimento para participar desta pesquisa, você não precisará coletar material nenhum além do que já foi pedido pelo médico, nós utilizaremos a amostra de hemocultura coletada, identificada e descartada pelo Laboratório de Microbiologia da Seção Técnica de Laboratórios e Análises Clínicas do Hospital. A pesquisadora estará disponível para responder quaisquer perguntas e você poderá retirar seu consentimento a qualquer momento.

Tendo sido satisfatoriamente informado sobre a pesquisa sob responsabilidade da Bióloga Taisa Trevizani Rocchetti, orientada pela professora Dr.^a Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP, responsável pelo Laboratório de Bacteriologia, declaro que concordo em participar da mesma, permitindo o uso da amostra de hemocultura já identificada e descartada pelo Laboratório de Microbiologia.

Esclarecimentos adicionais poderão ser obtidos com a pesquisadora pelo telefone: 3882-6240

Botucatu, ____ de ____ de 2011.

Assinatura da Pesquisadora

Assinatura do Paciente ou Responsável

Amostra N°:

Nome do Paciente:

RG do Paciente:

Assinatura do Paciente com
idade abaixo de 18 anos

Endereço e telefone do pesquisador: Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, tel.14-3882-6240/ 14- 99627-6201; taisa_texrocchetti@hotmail.com

Endereço e telefone da orientadora: Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, tel. 14 – 3811-6240; cunhamlr@ibb.unesp.br.