

LUCIANA DE FREITAS VELLOSO MONTE

**Detecção de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina
por meio de *multiplex* PCR em amostras de secreção
respiratória de pacientes com fibrose cística**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Pediatria

Orientadora:

Profa. Dra. Sônia Regina Testa da Silva Ramos

São Paulo

2005

DEDICATÓRIA

Aos meus tão queridos pais, Hécio e Nícia,
e avós, Elza e Oswaldo,
Rosaura (*i.m.*) e Hélio (*i.m.*),
pelo amor incondicional,
por toda a dedicação, incentivo
e exemplo de vida,
dedico esta Dissertação.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu amado marido, Guilherme,
pelo mútuo aprendizado,
amor, compreensão e incentivo
sempre.

AGRADECIMENTOS

Aos **PACIENTES E FAMILIARES**, que gentilmente concordaram em participar do estudo. Todo o meu respeito e solidariedade.

À minha orientadora **Profa. Dra. SÔNIA REGINA TESTA DA SILVA RAMOS**, pelo exemplo de sabedoria e amor à pesquisa. Sua contribuição foi essencial para este trabalho.

Ao Dr. **LUIZ VICENTE FERREIRA DA SILVA FILHO**, médico assistente da Unidade de Pneumologia Pediátrica do Instituto da Criança – HC/ FMUSP, por todo o apoio, amizade, disposição e confiança. Um exemplo de dedicação à pesquisa. Sempre com valiosas contribuições, sem a sua ajuda em todas as etapas, este estudo não se concretizaria.

À **ADRIANA FUMIE TATENO** (Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo), excelente biomédica, sempre muito prestativa e atenciosa. Ensinou-me a Biologia Molecular com entusiasmo. Sua ajuda foi imprescindível.

Ao Dr. **JOAQUIM CARLOS RODRIGUES**, chefe da Unidade de Pneumologia Pediátrica do Instituto da Criança – HC/ FMUSP, pelo exemplo profissional e pela contribuição importante na minha formação como Pediatra e Pneumologista, englobando aspectos de assistência, pesquisa e ensino.

Ao Dr. **JOSÉ EDUARDO LEVI** (Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo), pelos importantes esclarecimentos e sugestões técnicas, que me forneceram subsídios para compreender PCR, laboratório e pesquisa.

Ao Dr. **CLÁUDIO SÉRGIO PANNUTI**, chefe do Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, pelo exemplo de ética e sabedoria.

A **CHRISTINA NAOMI ODA BENTO** e **EDELIN GITYN** (Seção de Microbiologia do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da FMUSP), pela colaboração na identificação das bactérias pela cultura e técnica de difusão de discos, além da disposição para ajudar sempre.

A **ÂNGELA GIRARDI** e **DOROTI GARCIA** (Instituto Adolfo Lutz), pela separação das cepas e realização dos Etests® com muita dedicação.

À **SILVANA FERNANDES** (Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo), pela ajuda e por importantes esclarecimentos técnicos.

À **EQUIPE DE PNEUMOLOGIA PEDIÁTRICA** do Instituto da Criança – HC/ FMUSP, pelo carinho e valiosa contribuição para o meu aprendizado. Estarão sempre no meu coração.

Aos **AMIGOS DO LABORATÓRIO DE VIROLOGIA** do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, sempre muito pacientes e amigáveis, por me explicarem o funcionamento das máquinas e materiais do laboratório.

A **NIVALDO e MILENE ROCHA** (setor de xerox do Instituto da Criança – HC/ FMUSP), pela disposição e entusiasmo de sempre.

Às **FUNCIÓNÁRIAS DA BIBLIOTECA** do Instituto da Criança – HC/ FMUSP, especialmente Mariza e Lourdes, sempre prestativas e dedicadas.

Aos **FUNCIÓNÁRIOS DO ARQUIVO e GOVERNANÇÁ** do Instituto da Criança – HC/ FMUSP, especialmente Elouise, Isaura e Luiz, pela ajuda e entusiasmo com as minhas pesquisas.

Aos **AMIGOS DO SCUT** (Serviço de Consulta, Urgência e Triagem) do Instituto da Criança – HC/ FMUSP, pelo incentivo contínuo.

Ao **Dr. ALBERT KO**, grande pesquisador, pela ajuda no texto em Inglês.

Aos **Drs. LEDA e JOSÉ ANTONIO SOUZA**, exemplos de dedicação à Medicina, à pesquisa e ao ensino.

À **MINHA QUERIDA FAMÍLIA**, pelo grande carinho, amizade, torcida e vibração pelas minhas conquistas. Por sua compreensão às minhas ausências em muitas reuniões familiares por causa de estudos e trabalho. Sentir o seu entusiasmo é vital.

Aos meus amigos e a todos aqueles que contribuíram para a concretização deste trabalho, muito obrigada.

Esta dissertação está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO:

Lista de Abreviaturas	
Resumo	
Summary	
1. INTRODUÇÃO	02
2. OBJETIVOS	09
3. MÉTODOS	11
3.1. População	11
3.2. Coleta das amostras	11
3.3. Coleta dos dados clínicos	12
3.4. Processamento das amostras	14
3.5. Identificação pela cultura	14
3.6. Cepas bacterianas	15
3.7. Extração de DNA	15
3.8. Desenvolvimento do <i>multiplex</i> PCR	17
3.9. Visualização dos produtos de PCR	19
3.10. Sensibilidade e especificidade do <i>multiplex</i> PCR	19
3.11. Comparação dos métodos e verificação dos resultados discordantes	20
3.12. Análise estatística	21
4. RESULTADOS	23
4.1. Resultados das culturas de microrganismos	23
4.2. O <i>multiplex</i> PCR	26
4.3. Sensibilidade e especificidade do <i>multiplex</i> PCR	27
4.4. Aplicação do <i>multiplex</i> PCR nas amostras clínicas	29
4.5. Comparação entre os métodos: cultura e <i>multiplex</i> PCR	29
4.6. Verificação dos resultados discordantes	35
4.7. Correlação dos resultados com o sítio de coleta	41
5. DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÕES	55
7. ANEXOS	57
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
Apêndice	

LISTA DE ABREVIATURAS:

ATCC = *American Type Culture Collection*

BLAST = *Basic Local Alignment Search Tool*

CAPPesq = Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

CIM = concentração inibitória mínima

FC = fibrose cística

IC = intervalo de confiança

pb = pares de base

PCR = *polymerase chain reaction*

PLP = proteínas de ligação à penicilina

NCBI = *National Center for Biotechnology Information*

NCCLS = *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

SARM = *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina / oxacilina

SAS = *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina/ oxacilina

VPN = valor preditivo negativo

VPP = valor preditivo positivo

RESUMO

Monte, LFV. **Deteção de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina por meio de *multiplex* PCR em amostras de secreção respiratória de pacientes com fibrose cística.** [Dissertação] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005.

A fibrose cística (FC) é uma das principais causas de pneumopatia crônica na infância. O impacto das infecções pulmonares sobre a qualidade de vida e prognóstico dos pacientes com FC motiva um grande cuidado na monitorização da colonização bacteriana do trato respiratório desses indivíduos. O *S. aureus* resistente à metilina (SARM) representa um problema de grande magnitude nos centros de FC. A infecção pelo SARM pode estar associada à deterioração clínica e resulta em dificuldades terapêuticas. As técnicas microbiológicas tradicionais para a detecção do SARM apresentam limitações, pois dependem das condições de cultivo, exigem bactérias viáveis e mais tempo para a identificação. Métodos moleculares como a PCR, visando à detecção genotípica e rápida deste patógeno, vêm sendo desenvolvidos, possibilitando um diagnóstico confiável e precoce. O objetivo do estudo foi desenvolver um *multiplex* PCR para a detecção do SARM em secreção respiratória de pacientes com FC e comparar os resultados do método molecular aos obtidos pela técnica de cultura com antibiograma. Foram incluídas 254 amostras de 106 pacientes com FC acompanhados no ambulatório de Pneumologia do Instituto da Criança – HC/ FMUSP. O *multiplex* PCR foi desenvolvido com três pares de *primers* para a amplificação dos genes: *mecA*, principal responsável pela resistência à metilina; *coa*, específico do *S. aureus*; e ribossomal 16S, universal de bactérias. O *multiplex* PCR detectou até 25 pg de DNA de SARM em amostras clínicas e não evidenciou reação cruzada com outras bactérias estudadas. O método molecular identificou 70/ 106 (66,0%) pacientes [135/ 254 (53,1%) amostras] com *S. aureus* e 28*/ 106 (26,4%) [54/ 254 (21,3%)] com SARM, enquanto que a cultura/ difusão de discos evidenciou 60/ 106 (56,6%) [117/ 254 (46,1%)] e 12*/ 106 (11,3%) [32/ 254 (12,6%)], respectivamente (* $p < 0,005$). Os resultados discordantes foram testados com *primers* diferentes, confirmando os obtidos pelo *multiplex* PCR em 81/ 84 (96,4%) reações. Considerando a cultura como “padrão-ouro”, o *multiplex* PCR teve especificidade, sensibilidade, valores preditivos positivo e negativo de 87,8%, 84,4%, 50% e 97,5%, respectivamente. Devido ao alto VPN do *multiplex* PCR, uma vez não detectado o SARM pelo método, as medidas de controle e a terapia com glicopeptídeos não seriam necessárias. Conclui-se que o *multiplex* PCR desenvolvido para a detecção do SARM diretamente em amostras clínicas de secreção respiratória de pacientes com FC mostrou-se um método rápido, simples e confiável. A implementação dessa técnica poderá trazer grandes benefícios na assistência aos pacientes e nos procedimentos de controle dos germes resistentes.

SUMMARY

Monte, LFV. **Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by multiplex PCR in respiratory secretion of cystic fibrosis patients.** [Dissertação] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005.

Cystic fibrosis (CF) is a major cause of chronic lung disease during childhood. Bacterial colonization of patient's respiratory tract is often monitored since pulmonary infections have a large impact on the quality of life and prognosis of CF patients. Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) has emerged to become a significant concern in CF centers. MRSA infections are difficult to treat and may be associated with poor outcomes. Conventional detection of MRSA by microbiological techniques has limitations since it depends on assay conditions, requires live bacteria and more time for identification. Molecular methods, such as PCR, represent a rapid and reliable alternative approach to perform the genotypic detection of MRSA infection. The objective of the study was to develop a *multiplex* PCR for MRSA detection in respiratory secretions of CF patients and evaluate the performance of this method in a comparison with culture isolation and susceptibility testing. We obtained 254 samples from 106 CF patients attending the Pulmonology Clinic of Instituto da Criança – HC/FMUSP. *Multiplex* PCR was developed using three *primer* sets that amplified sequences from genes: *mecA*, the gene responsible for methicillin resistance; *coa*, a *S. aureus*-specific gene; and 16S ribosomal gene, which is present in all bacteria. The *multiplex* PCR had a threshold of detection of 25 pg of MRSA DNA in clinical samples and did not cross-react with other bacterial species. The molecular method identified 70/ 106 (66.0%) patients [135/ 254 (53.1%) samples] with *S. aureus* and 28*/ 106 (26.4%) [54/ 254 (21.3%)] with MRSA, while culture and disk diffusion methods identified 60/ 106 (56.6%) [117/ 254 (46.1%)] and 12*/ 106 (11.3%) [32/ 254 (12.6%)], respectively (* $p < 0.005$). Further reactions using different *primer* pairs were performed to re-test samples with discordant results. These PCR confirmed the initial *multiplex* PCR results in 81/ 84 (96.4%) reactions. The *multiplex* PCR had a specificity, sensitivity, positive and negative predictive values at 87.8%, 84.4%, 50% and 97.5%, respectively, considering culture as the "gold standard". Due to the high negative predictive value, control measures and empirical treatment with glycopeptides should not be necessary when MRSA is not detected by the *multiplex* PCR. Together, these findings indicate that the developed *multiplex* PCR is a rapid, easily-performed and reliable method for direct detection of MRSA in respiratory secretions of CF patients. This method may therefore be used to guide epidemiological and therapeutic decisions in clinical practice.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO:

A fibrose cística (FC) é considerada uma das principais causas de pneumopatia crônica na faixa etária pediátrica. De herança autossômica recessiva, a FC representa a doença genética letal mais freqüente entre os caucasianos, afetando de 1/2.000 a 1/4.500 crianças. No Brasil, a incidência situa-se ao redor de 1/10.000 nascidos-vivos¹⁻³.

O defeito genético básico, descoberto na década de 80, está localizado no gene CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), que codifica uma proteína de mesmo nome cuja principal função é o transporte de íons cloro na superfície apical das células epiteliais⁴. A alteração deste transporte provoca uma modificação nas secreções das glândulas exócrinas de todo o organismo, levando a manifestações clínicas variáveis. Classicamente ocorre doença sinobroncopulmonar progressiva, insuficiência pancreática exócrina e desnutrição, além de níveis elevados de cloro no suor^{2;5-7}.

O comprometimento pulmonar está presente na maioria dos pacientes, com maior ou menor gravidade, e representa o principal determinante do prognóstico desses indivíduos. O acúmulo da secreção respiratória espessa predispõe a um processo obstrutivo das vias aéreas, infecções respiratórias de repetição e bronquiectasias. Além disso, o defeito genético da FC propicia a colonização brônquica e infecção por patógenos específicos, como a *Pseudomonas aeruginosa*, o *Staphylococcus aureus*, a *Bulholderia cepacia*, entre outros. A infecção broncopulmonar crônica é a maior causa de dano pulmonar: provoca inflamação da

mucosa respiratória, que é potencializada pela resposta imunológica desses pacientes, levando à destruição pulmonar progressiva ^{6;8}.

O impacto das infecções pulmonares sobre a qualidade de vida e prognóstico motiva um grande cuidado na monitorização da colonização bacteriana do trato respiratório desses indivíduos. Isto constitui um dos aspectos fundamentais do seguimento ambulatorial, colhendo-se periodicamente amostras de secreção respiratória para isolamento dos microrganismos por meio de cultura. O isolamento de patógenos no escarro ou esfregaço de orofaringe em portadores de FC reflete com acurácia variável a colonização do trato respiratório inferior, mas freqüentemente é utilizado como referência para a terapêutica ^{6;9-12}.

O *S. aureus* é um patógeno de alta prevalência no trato respiratório dos portadores de FC, sendo isolado numa freqüência média de 50% ^{13;14}. Nas décadas de 50 e 60, era o microrganismo mais freqüentemente isolado nas secreções respiratórias desses indivíduos e provocava graves infecções. Com o advento dos antimicrobianos, a expectativa de vida dos pacientes cresceu, e observou-se a emergência da *P. aeruginosa* como o patógeno mais prevalente. Atualmente o *S. aureus* é considerado um dos principais agentes de colonização em pacientes de baixa idade, precedendo muitas vezes a colonização pela *P. aeruginosa* ⁶. Alguns autores acreditam que a lesão pulmonar provocada por sua colonização inicial predispõe à colonização pela *P. aeruginosa* ⁸. Mesmo em adolescentes e adultos, o *S. aureus* persiste como o segundo patógeno mais prevalente ^{13;14}, e cada vez mais são evidenciadas cepas resistentes à meticilina, sobretudo nos pacientes com internações múltiplas e doença avançada. A preocupação com a infecção pelo *S. aureus* levou alguns centros de tratamento de FC a utilizarem drogas antiestafilocócicas de forma

contínua, visando a melhorar o prognóstico dos pacientes, mas alguns estudos sugerem que esta abordagem aumentaria o risco de colonização pela *P. aeruginosa*¹⁵.

Historicamente, os estafilococos são bactérias que rapidamente vêm escapando à ação dos antimicrobianos. A introdução da benzilpenicilina em 1944 foi acompanhada pelo aparecimento de cepas de estafilococos produtoras de β -lactamase, com frequência de 5% em 1946, passando para 50% em 1950 até 90% em 1996. Nos dias atuais, praticamente 100% dos estafilococos são produtores de β -lactamases. Isto pode ser explicado pela disseminação por meio de plasmídios e por um processo de seleção das cepas¹⁶.

Iniciou-se, posteriormente, o uso das penicilinas semi-sintéticas estáveis às β -lactamases, como a meticilina e oxacilina, sendo detectadas as primeiras cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (SARM) no Reino Unido, na década de 60¹⁷. Nos dias de hoje, o SARM é um microrganismo emergente e representa um problema de grande magnitude nos hospitais^{18;19}. Nas duas últimas décadas, o SARM surgiu como o principal patógeno de aquisição intra-hospitalar; atualmente é encontrado não só em centros terciários como também em hospitais de pequeno porte e, em algumas regiões, até mesmo na comunidade²⁰⁻²². A prevalência do SARM nos pacientes com FC alcança até 26% em alguns centros dos Estados Unidos¹³.

A principal forma de resistência dos *S. aureus* à meticilina ocorre por mecanismo genético cromossômico, pela aquisição horizontal e integração de um gene denominado *mecA* ao cromossomo do *S. aureus* sensível à oxacilina (SAS)^{18;23}. Esse gene também pode estar presente em outras espécies de estafilococos e não é encontrado nas cepas susceptíveis à meticilina²⁴⁻²⁶. O gene *mecA* interfere com a

ação das penicilinas, que se faz por meio de ligação a proteínas situadas na superfície externa da membrana celular das bactérias, chamadas Proteínas de Ligação à Penicilina (PLP). As PLP são enzimas responsáveis pela estabilidade e integridade da parede celular durante o crescimento bacteriano e processo de divisão, atuando na síntese dos peptidoglicanos. A ligação das penicilinas às PLP impede a ação dessas enzimas, provocando a lise bacteriana. O gene *mecA* codifica uma PLP modificada, chamada de PLP-2a ou PLP-2', que consegue manter sua função mesmo em contato com a meticilina ou oxacilina, enquanto as outras PLP estão inativadas. Esse mecanismo de resistência é denominado “uso de via alternativa para a síntese do peptidoglicano”^{16;20;23}. A expressão do gene *mecA* é induzida pelos próprios antimicrobianos β -lactâmicos e é influenciada, *in vitro*, por fatores ambientais, como alta osmolaridade, baixa temperatura e pH neutro ou alcalino (agindo como indutores de expressão da resistência)^{16;20;27}.

A infecção pelo SARM pode estar associada à deterioração clínica e resulta em dificuldades terapêuticas^{28;29}. Por esse motivo, existe ampla discussão atualmente acerca das medidas de controle desse patógeno, sugerindo que sejam adotadas o mais precocemente possível com o objetivo de evitar a disseminação do SARM^{17;30-32}. As medidas de controle incluem a identificação e triagem de indivíduos com fatores de risco para serem reservatórios de SARM, a detecção rápida e precoce deste patógeno e a instalação de precauções de contato para os portadores deste microrganismo nas primeiras horas da internação. Consideram-se pacientes com fatores de risco aqueles previamente colonizados ou infectados pelo SARM, os que utilizam antimicrobianos freqüentemente e aqueles que foram hospitalizados nos três meses anteriores à atual admissão, algo comum entre os indivíduos com FC. Acredita-se que as medidas de

controle possibilitem redução dos custos e uma melhor assistência aos pacientes, por meio da diminuição significativa das taxas de infecção pelo SARM, do tempo de internação, do uso de medicações e da transmissão intra-hospitalar deste microrganismo para os indivíduos não colonizados^{21;33-35}. Segundo Solis et al.³⁴, é necessário haver um esforço para limitar o SARM nos centros de FC, pois a colonização por este patógeno, na maioria das vezes multirresistente, pode ser contra-indicação de transplante pulmonar e fonte de disseminação para outros pacientes, além do fato de ser desejável que o uso da vancomicina seja racional e limitado. Neste aspecto, a utilização de métodos rápidos e precisos de identificação do SARM seria extremamente benéfica.

O diagnóstico microbiológico tradicional do SARM é mais comumente obtido pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM), pela técnica de difusão de discos ou por métodos automatizados. Esses métodos convencionais são simples e amplamente utilizados, porém sofrem limitações. O diagnóstico por meio destas técnicas precisa de cerca de 36 horas para ser estabelecido, exige bactérias viáveis, pode sofrer interferência de outros microrganismos e de fatores ambientais do meio de cultura, já que se baseia nas características fenotípicas do patógeno, podendo gerar resultados imprecisos^{16;20;27;36-38}. A detecção direta do gene *mecA*, evidenciando resistência intrínseca, vem sendo considerada uma alternativa superior na identificação do SARM^{16;20;39;40}. Vários métodos moleculares para a detecção genotípica e rápida deste patógeno vêm sendo desenvolvidos, possibilitando um diagnóstico confiável e precoce^{24-27;41-47}.

Um dos métodos mais utilizados é a técnica de Reação em Cadeia por Polimerase (PCR), capaz de detectar de forma simples, rápida, confiável e altamente

sensível quantidades mínimas de DNA em uma determinada amostra. A reação fundamenta-se na amplificação de seqüências genéticas a partir de um DNA-molde previamente conhecido, utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e enzima polimerase termorresistente^{48,49}. Desde a sua descrição na década de 80, a PCR vem sendo aplicada com diversas finalidades, inclusive na identificação de vários patógenos e dos genes responsáveis pela resistência a antimicrobianos. A amplificação simultânea de diferentes segmentos genéticos, denominada *multiplex* PCR, permite a identificação da espécie do microrganismo na mesma reação em que se detecta o gene de resistência. Há várias descrições do uso do *multiplex* PCR para a detecção do SARM utilizando cepas cultivadas em laboratório, com excelentes resultados^{25;27;41;43;45-47}.

Não foram encontrados, na literatura médica, estudos sobre a detecção molecular do SARM diretamente em amostras de secreção respiratória de pacientes com FC até o momento. Pela rapidez e confiabilidade, os métodos moleculares seriam de grande interesse para a identificação do SARM nesses pacientes. A pronta identificação deste patógeno, fundamentada na detecção da resistência intrínseca, provavelmente favorecerá o uso mais racional e seguro dos antimicrobianos de amplo espectro, com menor risco de indução de resistência bacteriana e menor toxicidade, além da diminuição das taxas de transmissão e infecção hospitalar, pela implementação precoce das medidas de controle. Como consequência, seriam evidenciadas melhorias na qualidade de assistência aos pacientes e minimização dos custos^{21;25;45;47}.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS:

2.1. Geral

Desenvolver um *multiplex* PCR para detecção direta do *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina em secreção respiratória de pacientes com fibrose cística.

2.2. Específicos

- Aplicar o *multiplex* PCR em amostras de secreção respiratória de pacientes com fibrose cística, comparando-o com a cultura e antibiograma por meio da técnica de difusão de discos.

- Descrever a prevalência do *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina na população estudada.

- Analisar a sensibilidade e a especificidade do *multiplex* PCR, comparando-o com o método de cultura.

MÉTODOS

3. MÉTODOS:

3.1. População

Foram incluídos no estudo 106 pacientes com FC acompanhados no ambulatório de Pneumologia Pediátrica do Instituto da Criança “Professor Pedro de Alcântara” do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ICr – HC/ FMUSP) no período de 25/09/2000 a 04/04/2001. O diagnóstico de FC nesses pacientes já era firmado, segundo os critérios internacionais

50

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da instituição (CAPPesq – HC/ FMUSP) sob o número 508/02.

3.2. Coleta das amostras

Foram colhidas 257 amostras de secreção respiratória durante o atendimento ambulatorial, após o esclarecimento e obtenção do consentimento por escrito dos responsáveis. Todas as amostras foram identificadas por etiquetas numeradas no momento da coleta e um mapa de controle do fluxo de coletas foi preenchido. Três amostras foram excluídas por motivo de extravio na fase de elaboração da técnica molecular, estudando-se um número total de 254 amostras.

O material foi coletado segundo as técnicas relatadas a seguir.

Amostras de orofaringe:

Os pacientes de baixa idade ou incapazes de expectorar foram submetidos à coleta de esfregaço de orofaringe. Com a ajuda de uma espátula, foi realizada a fricção direta do bastão de algodão (*swab*) estéril (Beckton Dickinson) na retrofaringe, se possível após a tosse, procurando resgatar a secreção respiratória. Em seguida, as amostras foram colocadas no meio de transporte próprio do *swab*, acondicionadas em um recipiente de isopor com gelo e levadas ao laboratório de Microbiologia num tempo máximo de três horas.

Amostras de escarro:

Os pacientes capazes de expectorar foram orientados a fazê-lo num coletor plástico estéril. A seguir, foi adicionada ao escarro, em igual volume, uma solução estéril de dithiothreitol (DTT) em PBS-G (solução salina tamponada com fosfato + gelatina 0,1%), na concentração de 50 µg/mL. Após 30 minutos do acréscimo da solução, o material foi homogeneizado com o auxílio de um vortex^{51;52}. De forma semelhante às da orofaringe, as amostras de escarro permaneceram acondicionadas em um isopor com gelo até o envio para o laboratório de Microbiologia, num tempo máximo de três horas.

3.3. Coleta dos dados clínicos

Somente os pacientes que receberam atendimento médico foram submetidos à coleta das amostras. Isto proporcionou o registro dos dados clínicos referentes a cada

consulta médica e, portanto, a situação clínica do paciente a cada amostra colhida. Os atendimentos poderiam ser de rotina ou de urgência.

No momento da coleta, ao final da consulta médica, foram preenchidas fichas (ANEXO A) por meio de entrevista ao paciente, responsáveis e médicos assistentes, para a obtenção dos seguintes dados:

1. identificação do paciente;
2. uso de antibióticos sistêmicos ou inalatórios no dia da coleta;
3. dados clínicos em relação a: aumento da quantidade de secreção e/ ou intensidade da tosse; mudança do aspecto da secreção; piora do cansaço ou falta de ar; presença de febre na ausência de outros focos infecciosos extrapulmonares; inapetência ou vômitos após tosse; deterioração aguda da função pulmonar (queda do volume expiratório forçado no primeiro segundo maior que 10%); alteração recente e abrupta no padrão radiológico do tórax, e perda de peso recente, sem história clínica de esteatorréia macroscópica;
4. presença de agudização da doença pulmonar, estabelecida pela existência de dois ou mais dados acima;
5. prescrição de antimicrobianos e
6. necessidade de internação.

Posteriormente, dados complementares de evolução foram obtidos por meio de pesquisa aos prontuários.

3.4. Processamento das amostras

Na Seção de Microbiologia do Laboratório Central do HC/ USP, as amostras foram imediatamente semeadas em meios de cultura. Após este procedimento, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical / USP, onde foram armazenadas. Cerca de 1 mL de cada amostra de escarro foi transferido para um criotubo. Os *swabs* de orofaringe foram colocados em criotubos contendo 0,5 ml de solução salina estéril tamponada com fosfato (PBS) por 30 minutos dentro de uma capela com fluxo laminar. Depois, foi feita a homogeneização da solução com o próprio *swab*, espremendo-o contra a parede do tubo e, em seguida, descartado. Todas as amostras foram armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.5. Identificação pela cultura

As amostras de escarro e de orofaringe foram semeadas em placas contendo os seguintes meios de cultura: ágar sangue (Columbia Agar, Oxoid), ágar chocolate (GC Agar, Biobrás, São Paulo, Brasil), ágar MacConkey (MacConkey Agar, Merck) e meio seletivo para *B. cepacia* (*Burkholderia cepacia* medium, Oxoid), permanecendo incubadas a $35\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 18 a 48 horas. Os microrganismos isolados foram identificados pelo sistema automatizado Vitek® (bioMérieux Vitek Inc., St. Louis, MO), aplicando-se cartões para Gram-negativos (GNI) e Gram-positivos (GPI), e por meio de testes bioquímicos adicionais quando necessário. Os resultados foram analisados após 24 horas de incubação a $35\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. As bactérias patogênicas

isoladas foram armazenadas a – 80 °C em caldo tríptico de soja (Tryptic Soy Broth - Merck®) com glicerol.

O teste de sensibilidade a antibióticos foi realizado pela técnica de difusão de discos, seguindo os critérios do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2000) para as cepas de *Staphylococcus* spp. e bacilos Gram-negativos, aplicando-se os cartões para Gram-positivos (GPS-110) e para Gram-negativos (GNS-650). Foram consideradas resistentes à oxacilina as cepas de *S. aureus* que produziram um halo de inibição menor ou igual a 10 mm⁵³.

3.6. Cepas bacterianas

As cepas bacterianas utilizadas para testar o *multiplex* PCR foram: cepa de *S. aureus* sensível à oxacilina *American Type Culture Collection* (ATCC) 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13637, *B. cepacia* ATCC 25416 (genomovar I), *Escherichia coli* ATCC 25922 e cepas de SARM, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella* spp., *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus epidermidis* (resistente à oxacilina), *Enterobacter* spp. e *Acinetobacter* spp., fornecidas pela Seção de Microbiologia do Laboratório Central do HC/ USP, Brasil.

3.7. Extração de DNA

O DNA bacteriano do material proveniente das culturas foi extraído pelo método clássico de digestão com proteinase K (GIBCO-BRL, 200 µg/mL em Tampão Tris 50 mM pH 8,0; Dodecil Sulfato de Sódio 0,5%, 56 °C, 2 horas), seguida

de extração orgânica com fenol e clorofórmio ⁵⁴. As cepas de *S. aureus* foram também submetidas a uma etapa inicial de digestão enzimática com lisozima, por serem mais resistentes à lise celular. Após a precipitação com etanol, o *pellet* foi dissolvido em água destilada e deionizada.

As amostras clínicas também foram submetidas a etapas iniciais de digestão enzimática, utilizando-se proteinase K e lisozima em todas as amostras, já que seria esperada uma mistura de diferentes microrganismos na mesma amostra.

O protocolo de digestão enzimática das amostras incluiu as seguintes etapas:

1. retirada de 250 a 500 μ L de cada amostra do criotubo para o microtubo de 1,7 mL identificado;
2. centrifugação à velocidade máxima (23.100 g) por 10 minutos;
3. retirada do sobrenadante com cuidado, desprezando-o;
4. etapa enzimática:
 - a. adição de solução de lisozima (Tris HCl 10 mM pH 8,0; NaCl 0,1 M; EDTA 1 mM pH 8,0; Triton X 5%), 80 μ L/ tubo, seguindo-se agitação vigorosa;
 - b. adição de lisozima (Pharmacia, 20 mg/mL), 20 μ L/ tubo, seguindo-se agitação vigorosa;
 - c. incubação a 37 °C por 30 minutos, com agitação vigorosa no meio da incubação;
 - d. adição de solução de proteinase K (Tris HCl 12 mM pH 8,0; EDTA 6 mM pH 8,0; Dodecil Sulfato de Sódio 0,5%), 80 μ L/ tubo, seguindo-se agitação vigorosa;

- e. adição de proteinase K (GIBCO-BRL, 25 mg/mL), 20 µL/ tubo, seguindo-se agitação vigorosa;
- f. incubação a 56 °C por uma hora, com agitação vigorosa no meio da incubação.

Esta fase foi seguida por duas etapas de extração orgânica com fenol e clorofórmio em partes iguais e precipitação do DNA com 2,5 partes de etanol a 100% a 2 °C e 0,1 parte de acetato de sódio (3 M, pH 5,2). As amostras foram resfriadas a – 70 °C por 20 minutos e centrifugadas por 5 minutos. Os precipitados foram lavados com etanol a 70% e, após estarem secos, solubilizados em água estéril.

A concentração de DNA foi medida em um espectrofotômetro de luz ultravioleta a 260 nm (UltraSpec 3000 UV/Visible Spectrophotometer, Pharmacia Biotch Ltda, Suécia).

3.8. Desenvolvimento do *multiplex* PCR

Para o desenvolvimento do *multiplex* PCR, foi necessário empregar, na mesma reação, pares de *primers* capazes de identificar regiões conservadas do gene *mecA*, principal responsável pela resistência à meticilina; de gene específico do *S. aureus*, já que o gene *mecA* pode estar presente em outras espécies de *Staphylococcus*; e de gene presente nas bactérias de forma universal como, por exemplo, o gene ribossomal 16S, atuando como controle interno da reação.

O *multiplex* PCR foi desenvolvido a partir de *primers* descritos na literatura ^{25;45;47;55-57}, que foram sendo progressivamente testados, baseando-se nos seguintes aspectos:

- 1. sensibilidade e especificidade:** foram testados os pares de *primers* descritos em estudos com metodologia simples, adequada e com altos valores de sensibilidade e especificidade.
- 2. seqüência-alvo:** foram selecionados *primers* cujas seqüências-alvo eram conservadas e específicas, avaliadas pelo programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool – National Center for Biotechnology Information – NCBI, EUA*);
- 3. tamanho do produto:** procurou-se selecionar os *primers* que geravam fragmentos pequenos e cujos tamanhos fossem facilmente distinguíveis à eletroforese [pelo menos 70 a 100 pares de base (pb) de diferença];
- 4. compatibilidade:** tentou-se escolher *primers* com *melting points* próximos e que não tivessem complementariedade entre eles; e
- 5. composição e número de bases/ conteúdo de guanina-citosina:** procurou-se selecionar os *primers* com pelo menos 18 nucleotídeos, na tentativa de minimizar inespecificidades, assim como manter o conteúdo guanina-citosina entre 40% e 60%.

Os *primers* foram sendo incorporados ao *multiplex* PCR ao mesmo tempo em que era avaliado o seu funcionamento em conjunto, com determinadas concentrações dos reagentes e parâmetros do termociclador. A reação foi sendo desenvolvida por meio de experimentos em que se procurou determinar a influência e a concentração ideal de cada reagente ^{55,57}, utilizando-se DNA bacteriano de cepas puras previamente conhecidas. Após a padronização da técnica, foi realizada a sua aplicação no DNA extraído diretamente das amostras coletadas (ANEXO B).

Em todas as reações foram incluídos controles positivos (amostras contendo 250 ng de DNA de cepa de *S. aureus* sensível e de cepa resistente à meticilina) e controles negativos (amostras sem adição de DNA, contendo água deionizada bidestilada).

3.9. Visualização dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL, iluminados em luz ultravioleta e fotografados pelo equipamento UltraLum (Electronic UV Transilluminator, UltraLum, Califórnia, EUA). As imagens também foram capturadas por placa processadora de imagem adaptada ao sistema UltraLum, processadas por meio de *software* Scion Image Beta 4.02 for Windows (Scion Corporation, EUA) e armazenadas.

3.10. Sensibilidade e especificidade do *multiplex* PCR

A sensibilidade da reação foi determinada de duas formas. Inicialmente foi realizado o *multiplex* PCR utilizando-se DNA de uma cepa de SARM com diluições seriadas (de 250 ng até 0,025 pg) em água deionizada bidestilada. No segundo experimento, foi preparada a diluição progressiva (de 250 ng até 0,025 pg) do DNA de uma cepa de SARM em uma amostra clínica negativa para o patógeno em questão, que foram, então, submetidas ao *multiplex* PCR. Esta técnica, denominada

spike, leva em consideração os fatores inibidores da reação, que geralmente estão presentes nas amostras clínicas, obtidas de pacientes, e ausentes nas cepas “puras”.

A especificidade da reação foi avaliada pela realização do *multiplex* PCR com 250 ng de DNA extraído de cepas das bactérias já mencionadas.

3.11. Comparação dos métodos e verificação dos resultados discordantes

Os resultados encontrados no *multiplex* PCR foram comparados com os dados de cultura e antibiograma, considerando-a como “padrão-ouro”.

As amostras com resultados discordantes foram retestadas separadamente da seguinte forma:

1. método molecular com PCR:

a. as discrepâncias para a identificação do *S. aureus* foram submetidas a uma nova reação utilizando os *primers* ARO1 e ARO2 (ANEXOS B e C), cujo alvo é um outro gene específico do *S. aureus*, o gene *aroA*⁵⁸. Este par de *primers* foi anteriormente estudado e mostrou sensibilidade e especificidade de 100% (Silva Filho, LV, 1999, dados não publicados);

b. as discrepâncias para a detecção da resistência à metilina foram submetidas a uma nova reação utilizando os *primers* *mecA1* e *mecA2* (ANEXOS B e C) para amplificar uma outra região do gene *mecA*. A sensibilidade e especificidade deste par foram 100% em estudo anterior⁴⁶.

2. técnica quantitativa de determinação da CIM por meio de Etest® (AB BIODISK, Suécia): as cepas de *S. aureus* armazenadas que tiveram

resultados discordantes entre os métodos em relação ao padrão de sensibilidade à oxacilina foram semeadas novamente, seguindo os protocolos do fabricante e do NCCLS 2004. As cepas de *S. aureus* que apresentaram CIM ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$ foram consideradas resistentes à oxacilina ^{16,59}.

3.12. Análise estatística

A estatística descritiva incluiu o cálculo da distribuição da frequência para as variáveis categóricas e o cálculo da média e do desvio padrão para as variáveis contínuas.

A sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e a acurácia do *multiplex* PCR, comparados à cultura com antibiograma, com os respectivos intervalos de confiança 95% (IC), foram verificados a partir de tabelas de contingência 2 x 2 ⁶⁰.

Para verificar a presença de associação entre as variáveis categóricas, agrupadas em tabelas 2 x 2, foi utilizada a estatística χ^2 ou o teste de Fischer bicaudal, tendo em vista as restrições impostas por Cochran ⁶¹.

Para o teste de concordância foi utilizado o método de *kappa*, com auxílio da versão 1999 do programa *Cálculos Estatísticos Básicos para Testes Diagnósticos* ⁶².

Em todas as análises adotou-se o nível de significância $\alpha < 5,00\%$ ($p < 0,05$).

O banco de dados foi elaborado a partir do programa Microsoft Access®.

As estatísticas χ^2 e o teste de Fischer bicaudal foram calculadas com o auxílio do programa EPI-INFO versão 6.02 ⁶³.

RESULTADOS

4. RESULTADOS:

Foram estudadas 254 amostras (141 de escarro e 113 de esfregaço de orofaringe) de 106 pacientes com FC, sendo 53 do sexo feminino e 53 do sexo masculino. A idade variou de seis meses a 20 anos, com média e desvio padrão de 10 ± 5 anos e mediana de 10 anos. Um resumo dos principais dados obtidos no estudo pode ser visualizado nos QUADROS A e B (APÊNDICE).

4.1. Resultados das culturas de microrganismos

A cultura das amostras estudadas resultou no isolamento de diversos patógenos, listados na TABELA 1. O *S. aureus* foi o segundo patógeno mais freqüente, isolado em 117 de 254 amostras (46,1%). Destes, 32 de 117 (27,4%) foram SARM (FIGURA 1).

A freqüência dos microrganismos mais relevantes identificados nos 106 pacientes e a sua distribuição por faixa etária estão apresentadas nas FIGURAS 2 e 3 e ANEXO D. A *P. aeruginosa* foi o patógeno de maior prevalência na população estudada, isolada em 73 de 106 (68,9%) pacientes, seguida pelo *S. aureus*, identificado em 60 de 106 (56,6%) dos indivíduos. Em 11,3% (12 entre 106) dos pacientes foi evidenciado SARM (FIGURA 4).

A idade dos pacientes com *S. aureus* variou de 2 a 19 anos, com média e desvio padrão de 11 ± 4 anos e mediana de 11 anos. A idade dos pacientes com

SARM variou de 2 a 17 anos, com média e desvio padrão de 11 ± 4 anos e mediana de 12 anos.

TABELA 1. Patógenos isolados pela cultura de 254 amostras de secreção respiratória de 106 pacientes com FC, acompanhados no ambulatório de Pneumologia Pediátrica do ICr – HC/ FMUSP, de setembro de 2000 a abril de 2001

Bactéria*	Número de amostras	%
<i>P. aeruginosa</i>	143	56,3
<i>S. aureus</i>	117	46,1
<i>H. influenzae</i>	61	24,0
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	26	10,2
<i>B. cepacia</i>	11	4,3
<i>E. coli</i>	9	3,5
<i>Enterobacter cloacae</i>	7	2,8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7	2,8
<i>S. maltophilia</i>	6	2,4
<i>Moraxella</i> spp.	2	0,8
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2	0,8
<i>Acinetobacter</i> spp.	1	0,4
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1	0,4
<i>Citrobacter freundii</i>	1	0,4
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0,4
<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	1	0,4
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0,4
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1	0,4
TOTAL	398	

*Mais de uma bactéria isolada por amostra

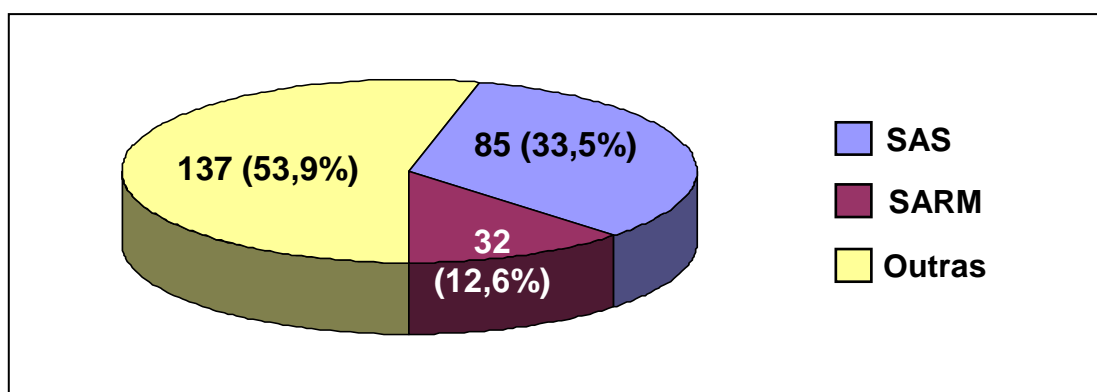
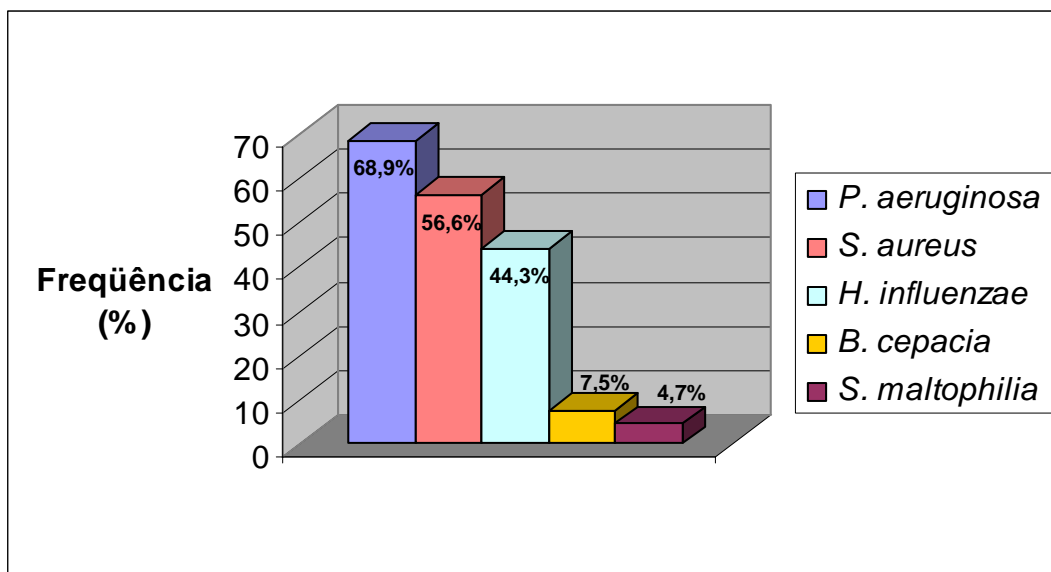
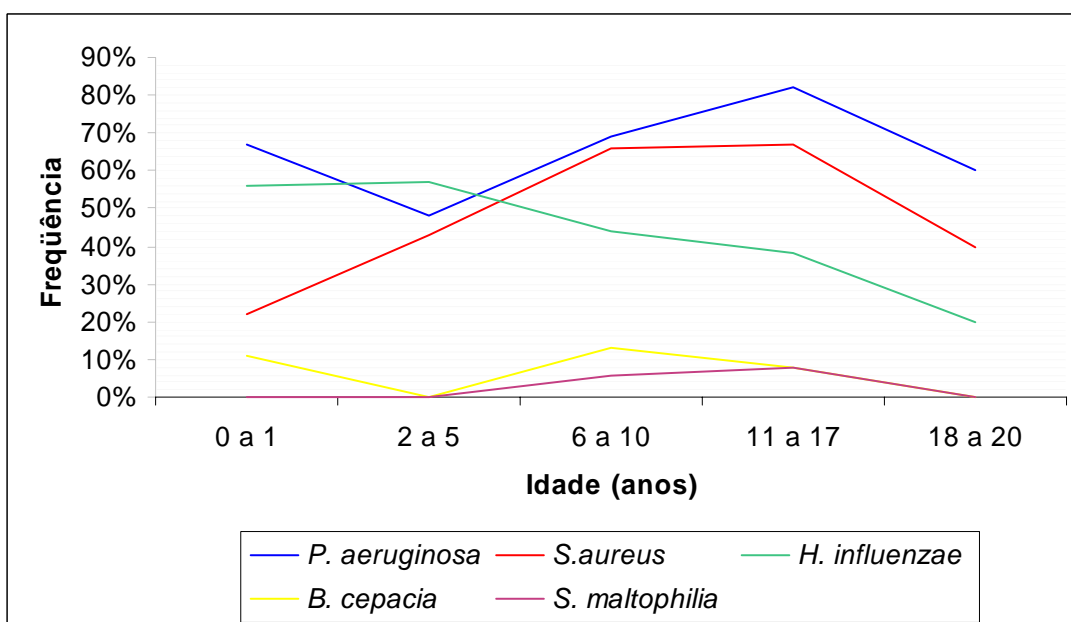


FIGURA 1. Resultado da técnica de cultura com antibiograma das 254 amostras estudadas (SARM = *S. aureus* resistente à metilicilina/ oxacilina; SAS = *S. aureus* sensível à metilicilina/ oxacilina)



* Mais de um patógeno isolado por paciente

FIGURA 2. Frequência dos principais patógenos* isolados pela cultura das amostras de secreção respiratória dos 106 pacientes com fibrose cística estudados



* Mais de um patógeno isolado por paciente

FIGURA 3. Frequência dos principais patógenos* isolados pela cultura por idade nas amostras de secreção respiratória dos 106 pacientes com fibrose cística estudados

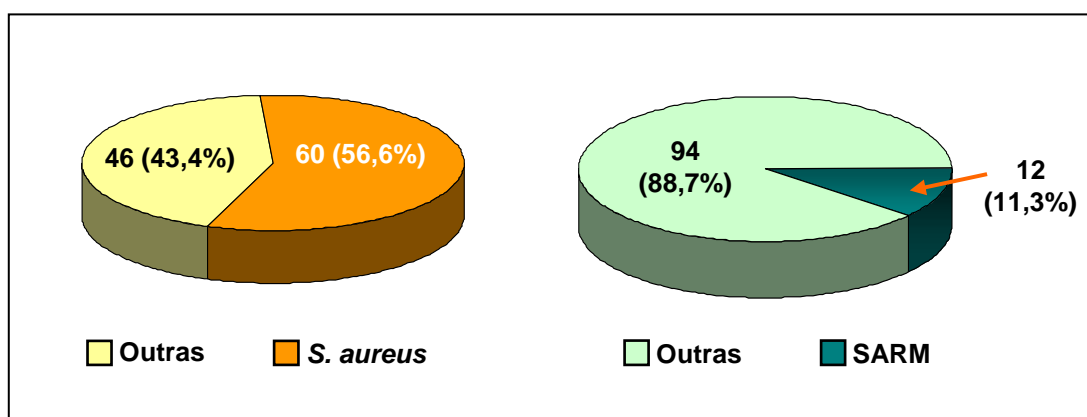


FIGURA 4. Resultado da técnica de cultura com antibiograma para o *S. aureus* das amostras de secreção respiratória dos 106 pacientes estudados (SARM = *S. aureus* resistente à metilicina)

4.2. O multiplex PCR

Os melhores resultados foram obtidos com os seguintes pares de *primers*: SA1/ SA2²⁵, para a detecção do gene *mecA*, produzindo um fragmento de 214 pb; SA3/ SA4²⁵, para a identificação do gene *coa* espécie-específico, gerando um fragmento de 117 pb; e RW01/ DG74⁴⁵ para a amplificação do gene ribossomal 16S, universal de bactérias, com um produto de 371 pb (QUADRO 1)

QUADRO 1. *Primers* utilizados no *multiplex* PCR desenvolvido

Nome	Seqüência (5'-3')	Gene alvo	Tamanho do produto	Referência
RW01 DG74	AAC TGG AGG AAG GTG GGG AT AGG AGG TGA TCC AAC CGC A	16S rRNA (universal)	371 pb	Schmitz et al., 1997 ⁴⁵
SA1 SA2	CGG TAA CAT TGA TCG CAA CGT TCA CTT TGG AAC GAT GCC TAA TCT CAT	<i>mecA</i> (resistência)	214 pb	Kearns et al., 1999 ²⁵
SA3 SA4	GTA GAT TGG GCA ATT ACA TTT TGG AGG CGC ATC AGC TTT GTT ATC CCA TGT A	<i>coa</i> (espécie <i>S. aureus</i>)	117 pb	Kearns et al., 1999 ²⁵

A = adenina, C = citosina, T = timina, G = guanina

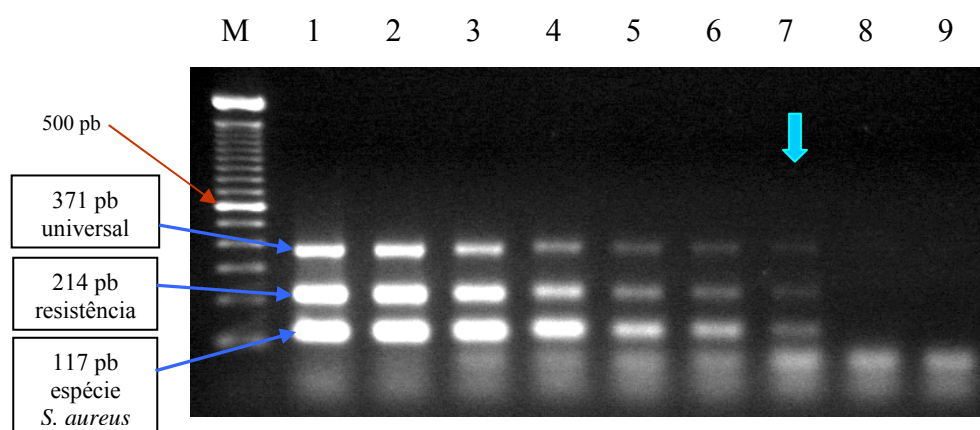
A mistura da reação incluiu 2,5 µL de cada amostra clínica, ou 250 ng de DNA bacteriano (utilizado inicialmente para testar o método e também como controle interno), 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 200 µM de cada trifosfato de desoxinucleosídeo (dNTP), 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™), 0,6 µM (cada) dos *primers* SA1, SA2, SA3 e SA4 e 0,2 µM (cada) de RW01 e DG74, com volume final de 25 µL. Foi utilizado o termociclador de gradiente Mastercycler (Eppendorf), com os seguintes parâmetros: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos e 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 65 °C e 1 minuto a 72 °C, seguidos por um período de extensão final de 7 minutos a 72 °C.

4.3. Sensibilidade e especificidade do *multiplex* PCR

A sensibilidade do *multiplex* PCR, verificada por meio de diluições seriadas do DNA de uma cepa de SARM em água deionizada bidestilada, demonstrou que o método desenvolvido foi capaz de detectar até 0,25 pg de DNA. Considerando que o tamanho do genoma do SARM é de aproximadamente 2,8 x 10⁶ pb e que o peso de 1 mol de bases é 330 g, calcula-se que o *multiplex* PCR possibilitou a detecção de aproximadamente 83 células de SARM (FIGURA 5). No segundo experimento, no qual foi realizada a diluição de uma cepa de SARM em amostra clínica, o *multiplex* PCR detectou até 25 pg de DNA, cem vezes menos.

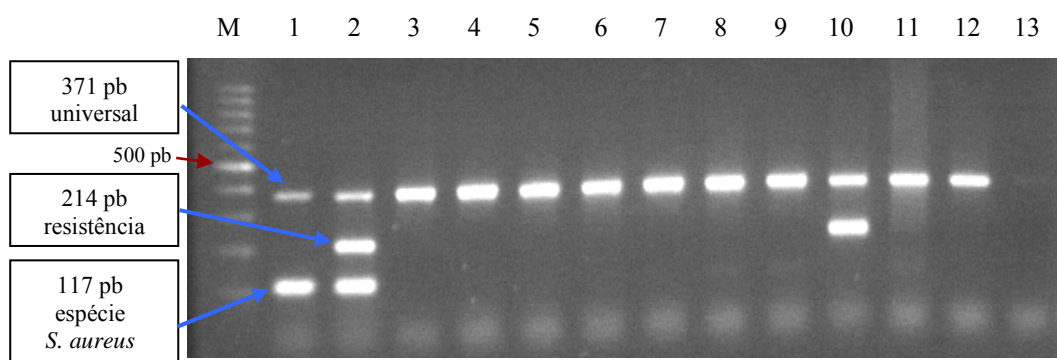
Para a avaliação da especificidade do método, o *multiplex* PCR foi testado com um painel de DNA extraído de várias espécies bacterianas conhecidas, conforme descrito acima, incluindo *S. aureus* meticilina-sensível e meticilina-resistente como controles positivos. Houve amplificação de fragmentos de 371 pb, demonstrando o

gene universal de bactérias, em todas as amostras. Apenas nas amostras de DNA de *S. aureus* foi evidenciado o fragmento de 117 pb (do gene *coa*). Foi amplificado o fragmento de 214 pb (do gene *mecA*) somente nas amostras de SARM e de *S. epidermidis* resistente à oxacilina (FIGURA 6).



Eletrforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL

FIGURA 5. Avaliação da sensibilidade do *multiplex* PCR. Coluna M: marcador de peso molecular (escada de 100 pb); colunas 1 a 8: DNA de SARM com as seguintes quantidades, respectivamente: 250 ng, 25 ng, 2,5 ng, 0,25 ng, 0,025 ng, 0,0025 ng, 0,00025 ng, 0,000025 ng; coluna 9: controle negativo (sem DNA). (SARM = *S. aureus* resistente à metilina)



Eletrforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL

FIGURA 6. *Multiplex* PCR para avaliação da especificidade da reação com DNA de diversas bactérias. Coluna M: marcador de peso molecular (escada de 100 pb); colunas 1 e 2, respectivamente: SAS e SARM (controles positivos); colunas 3 a 12, respectivamente: *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *B. cepacia*, *S. pneumoniae*, *E. coli*, *Klebsiella* spp., *H. influenzae*, *S. epidermidis* resistente à oxacilina, *Enterobacter* spp. e *Acinetobacter* spp.; coluna 13: controle negativo (sem DNA). (SARM = *S. aureus* resistente à metilina; SAS = *S. aureus* sensível à metilina)

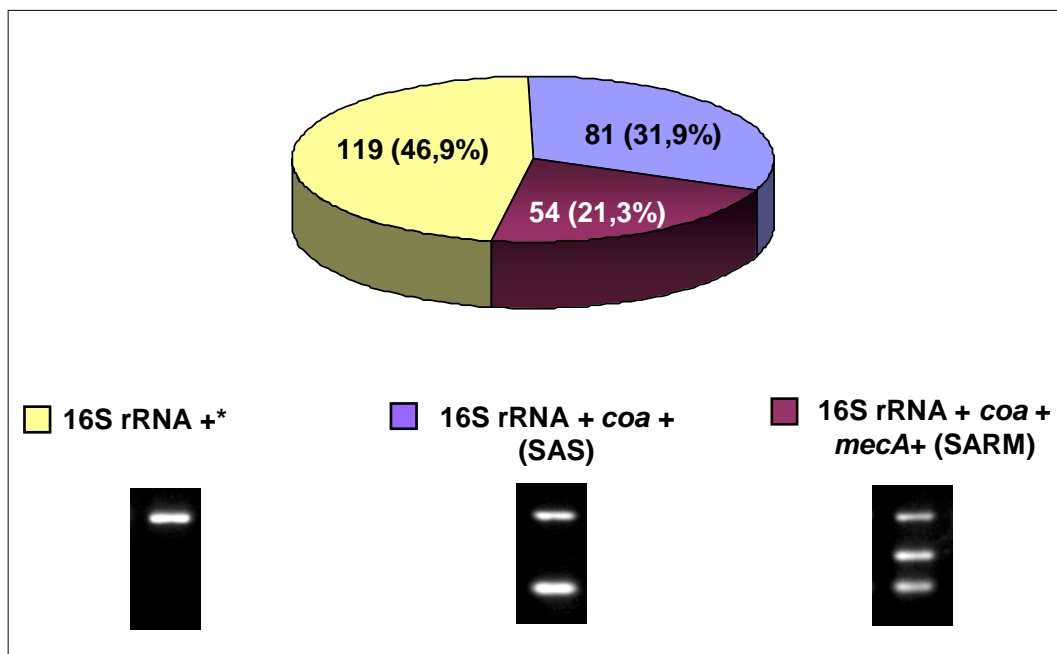
4.4. Aplicação do *multiplex* PCR nas amostras clínicas

Em todas as amostras houve a demonstração da banda de 371 pb, universal de bactérias. O *multiplex* PCR identificou o gene *coa*, específico do *S. aureus*, em 135 amostras (53,1%); destas, foi evidenciado também o gene *mecA*, demonstrando a presença do SARM, em 40,0% (54 de 135) das amostras. A frequência de *S. aureus* entre os pacientes foi de 66,0% (70 de 106). Em 26,4% (28 de 106) dos pacientes foi detectado SARM (FIGURAS 7, 8 e 9). Em uma amostra foram amplificados apenas os genes universal e *mecA*.

Algumas amostras de escarro precisaram de diluições de até 50 vezes para que fossem mais bem avaliadas, já que possuíam altas quantidades de DNA (até 15 µg) após a extração. Quando rastros (*smears*) foram evidenciados após a eletroforese, a diluição da amostra em 30 vezes foi suficiente para uma boa visualização dos resultados das reações. Apenas em seis amostras houve a necessidade de mais diluição (50 vezes) (FIGURA 10).

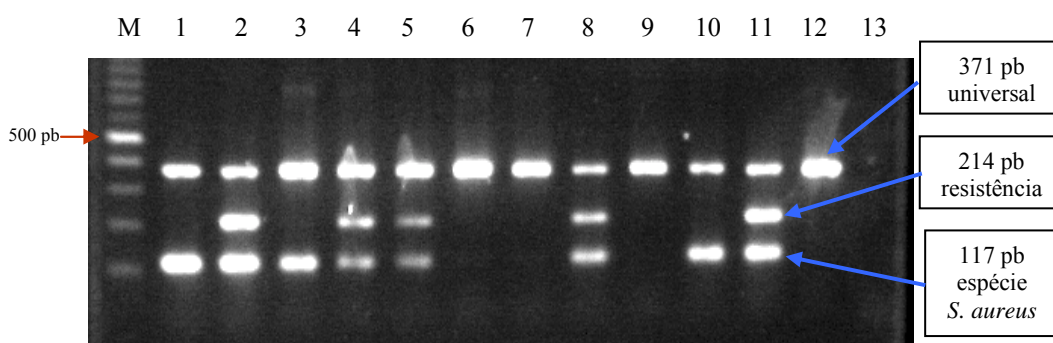
4.5. Comparação entre os métodos: cultura e *multiplex* PCR

Comparando-se os resultados obtidos pela cultura com antibiograma e pelo *multiplex* PCR desenvolvido, observou-se que o método molecular foi capaz de detectar um maior número de amostras e de pacientes com *S. aureus* ou com SARM. Estes maiores valores de detecção mostraram-se estatisticamente significantes em relação à identificação do SARM (FIGURAS 11 e 12).



* 1 amostra evidenciou 16S rRNA + e mecA +

FIGURA 7. Resultado do *multiplex* PCR nas 254 amostras clínicas estudadas (SARM = *S. aureus* resistente à metilina; SAS = *S. aureus* sensível à metilina)



Eletrforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL

FIGURA 8. *Multiplex* PCR em amostras clínicas. Coluna M: marcador de peso molecular (escada de 100 pb); colunas 1 e 2, respectivamente: DNA de SAS e SARM (controles positivos); colunas 3 a 12: amostras clínicas demonstrando, respectivamente, a presença de: SAS, SARM, SARM, outras bactérias, outras bactérias, SARM, outras bactérias, SAS, SARM e outras bactérias; coluna 13: controle negativo (sem DNA). (SARM = *S. aureus* resistente à metilina; SAS = *S. aureus* sensível à metilina)

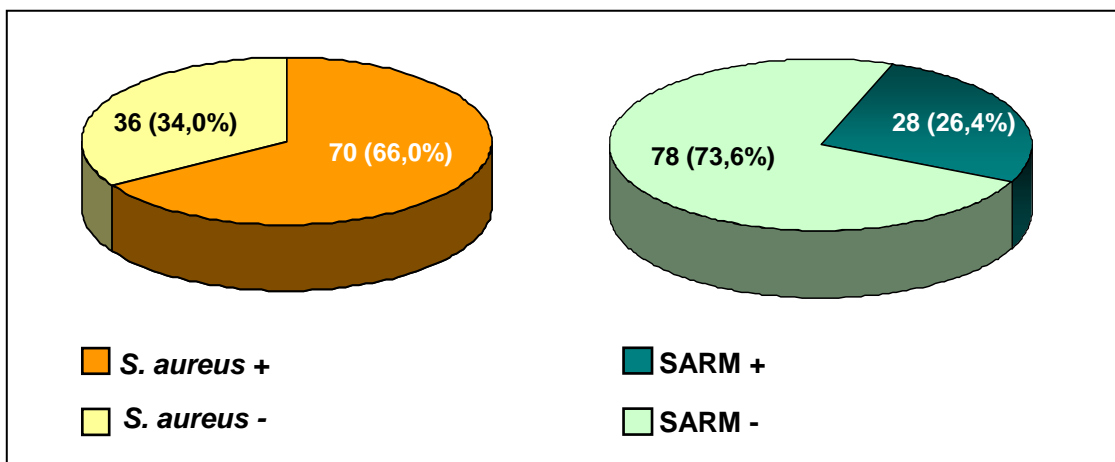
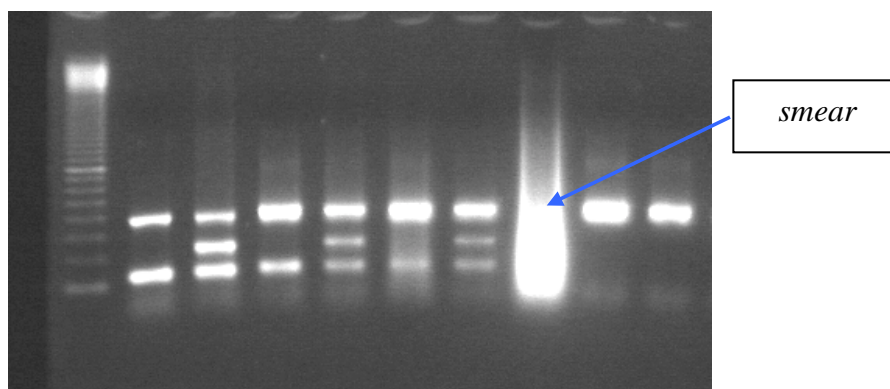


FIGURA 9. Resultado do *multiplex* PCR nos 106 pacientes estudados (SARM = *S. aureus* resistente à meticilina)



Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL

FIGURA 10. Demonstração de *smear* (rastros), por excesso de DNA

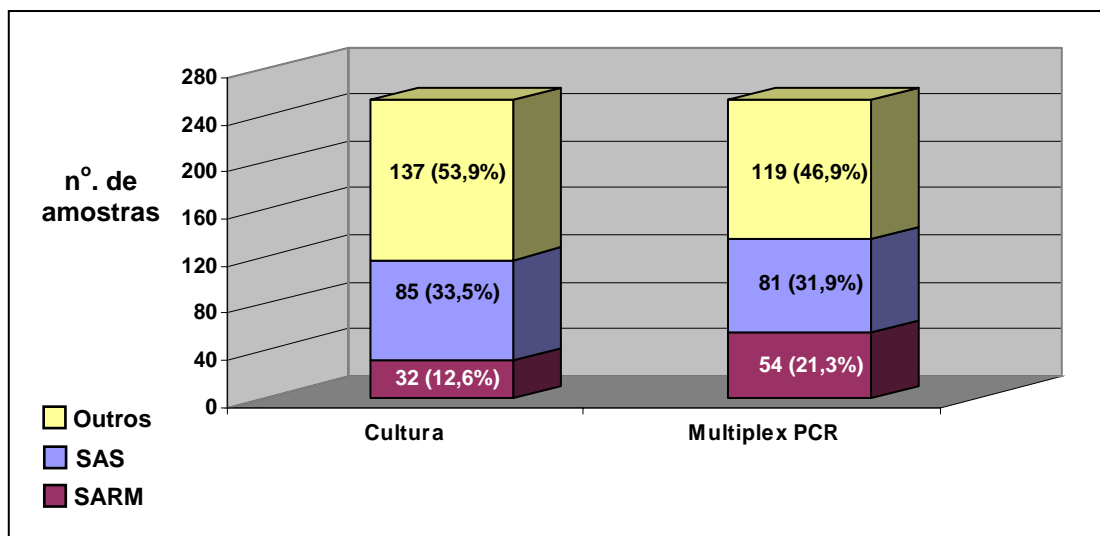


FIGURA 11. Comparação dos resultados da técnica de cultura e do *multiplex* PCR nas 254 amostras estudadas (SARM = *S. aureus* resistente à meticilina; SAS = *S. aureus* sensível à meticilina)

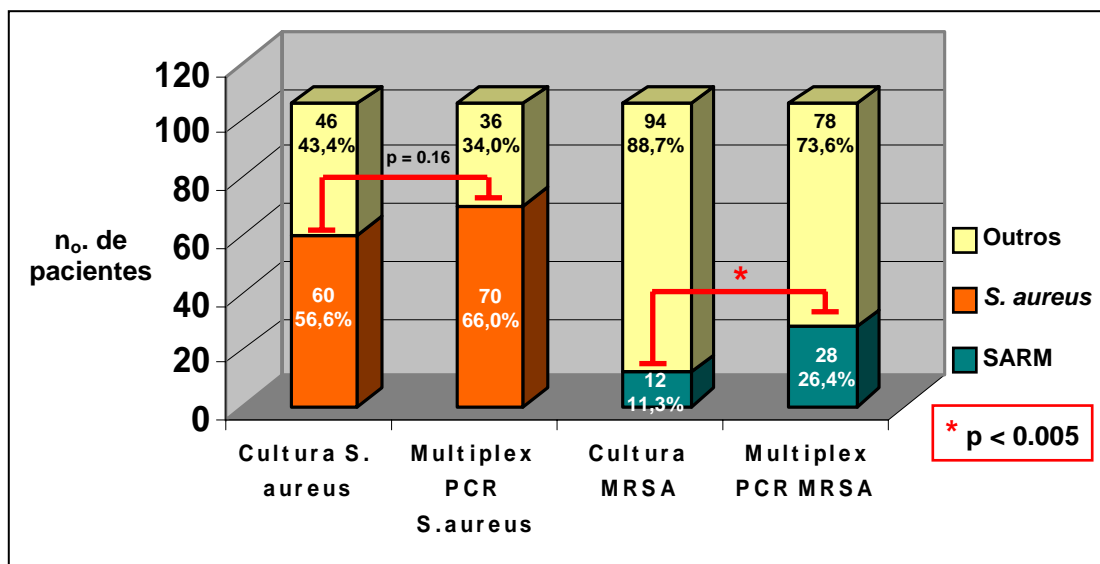


FIGURA 12. Comparação dos resultados da técnica de cultura e do *multiplex* PCR nos 106 pacientes estudados (SARM = *S. aureus* resistente à meticilina)

A comparação dos resultados entre os métodos estudados é demonstrada na TABELA 2. Para a detecção do *S. aureus* houve discordância do *multiplex* PCR com a cultura em 52 amostras. Em relação ao SARM, encontrou-se discrepância em 32 amostras.

Considerando-se a cultura como “padrão-ouro”, foram obtidos os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia do *multiplex* PCR para a detecção do SARM e do *S. aureus*, demonstrados nas TABELAS 3 e 4.

TABELA 2. Comparação dos resultados do *multiplex* PCR e da cultura nas amostras clínicas

	Cultura +	Cultura +	Cultura –	Cultura –	
	PCR +	PCR –	PCR +	PCR –	TOTAL
<i>S. aureus</i>	100 (39,4%)	17 (6,7%)	35 (13,8%)	102 (40,2%)	254 (100%)
SARM	27 (10,6%)	5 (2%)	27 (10,6%)	195 (76,8%)	254 (100%)

SARM = *S. aureus* resistente à meticilina

TABELA 3. Análise dos resultados do *multiplex* PCR comparados aos da cultura* em relação à detecção do *S. aureus*

	Valor (%)	Intervalo de confiança 95%
Sensibilidade	85,5	77,8 – 91,3
Especificidade	74,5	66,3 – 81,5
VPP	74,1	65,8 – 81,2
VPN	85,7	78,1 – 91,5
Acurácia	79,5	74,6 – 84,5

* Técnica de cultura como “padrão-ouro”

VPN = valor preditivo negativo

VPP = valor preditivo positivo

TABELA 4. Análise dos resultados do *multiplex* PCR comparados aos da cultura* em relação à detecção do *S. aureus* resistente à metilina

	Valor (%)	Intervalo de confiança 95%
Sensibilidade	84,4	67,3 – 94,7
Especificidade	87,8	82,8 – 91,8
VPP	50,0	36,1 – 63,9
VPN	97,5	94,3 – 99,2
Acurácia	87,4	83,3 – 91,5

* Técnica de cultura como “padrão-ouro”

VPN = valor preditivo negativo

VPP = valor preditivo positivo

4.6. Verificação dos resultados discordantes

A verificação dos resultados discrepantes, por meio de PCR utilizando separadamente pares de *primers* para a amplificação de seqüências genômicas diferentes das testadas no *multiplex* PCR, resultou na confirmação dos resultados do *multiplex* PCR em 96,4% (81 de 84) das reações.

Verificação com os *primers* ARO1/ ARO2:

A utilização dos *primers* ARO1 e ARO2 em nova PCR, para a amplificação do gene *aroA* do *S. aureus*, reafirmou as conclusões do *multiplex* PCR em 51 dos 52 resultados discordantes (QUADRO 2). Das 17 amostras sem a identificação de *S. aureus* por meio do *multiplex* PCR, porém com detecção deste patógeno pela cultura, foi confirmada a ausência de DNA do *S. aureus* na amostra por meio da PCR em 16 (DIAGRAMA 1). Em todas as 35 amostras em que o *multiplex* PCR detectou *S. aureus*, porém não houve a identificação deste microrganismo pela cultura, a PCR dirigida ao gene *aroA* também detectou o *S. aureus*, confirmando os resultados do *multiplex* PCR (DIAGRAMA 2).

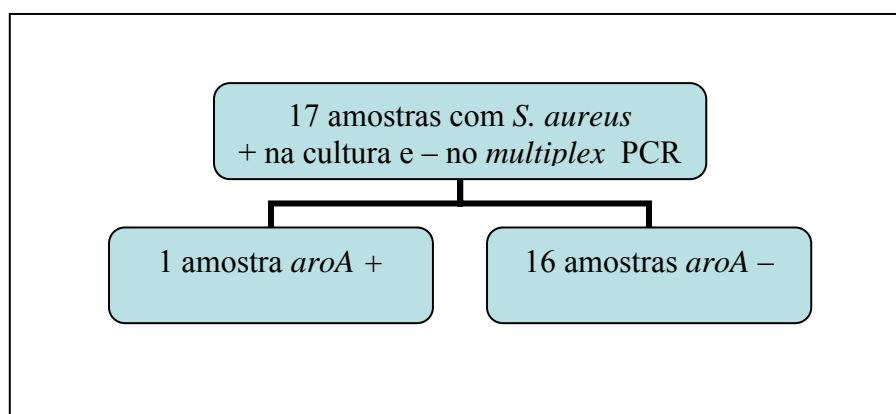


DIAGRAMA 1. Verificação das 17 amostras discordantes entre *multiplex* PCR e cultura em relação à detecção do *S. aureus* (*aroA* = gene do *S. aureus* amplificado pela PCR com os *primers* ARO1/ARO2)

QUADRO 2. Verificação dos resultados discordantes das amostras em relação à detecção do *S. aureus*

No. amostra (no. paciente)	Sítio de coleta	Cultura para <i>S. aureus</i>	Multiplex PCR (coa)	PCR com ARO1/ ARO2
20 (27)	orofaringe	+	-	-
24 (82)	orofaringe	+	-	-
26 (4)	orofaringe	+	-	-
33 (26)	orofaringe	+	-	-
34 (93)	orofaringe	+	-	-
42 (69)	escarro	+	-	-
107 (82)	orofaringe	+	-	-
110 (41)	orofaringe	+	-	-
125 (21)	escarro	+	-	-
* 154 (73)	orofaringe	+	-	+
162 (81)	orofaringe	+	-	-
163 (83)	orofaringe	+	-	-
203 (39)	orofaringe	+	-	-
209 (71)	orofaringe	+	-	-
210 (75)	orofaringe	+	-	-
214 (28)	escarro	+	-	-
244 (20)	escarro	+	-	-
10 (35)	orofaringe	-	+	+
17 (80)	orofaringe	-	+	+
55 (87)	orofaringe	-	+	+
64 (16)	escarro	-	+	+
68 (11)	orofaringe	-	+	+
76 (12)	orofaringe	-	+	+
81 (37)	orofaringe	-	+	+
87 (75)	orofaringe	-	+	+
106 (57)	escarro	-	+	+
113 (99)	escarro	-	+	+
127 (58)	escarro	-	+	+
129 (90)	orofaringe	-	+	+
145 (92)	escarro	-	+	+
146 (70)	orofaringe	-	+	+
158 (59)	orofaringe	-	+	+
167 (72)	escarro	-	+	+
172 (74)	orofaringe	-	+	+
177 (103)	orofaringe	-	+	+
184 (98)	orofaringe	-	+	+
185 (102)	orofaringe	-	+	+
187 (34)	orofaringe	-	+	+
192 (55)	orofaringe	-	+	+
193 (60)	escarro	-	+	+
196 (87)	escarro	-	+	+
205 (88)	escarro	-	+	+
213 (65)	orofaringe	-	+	+
218 (28)	escarro	-	+	+
219 (48)	orofaringe	-	+	+
225 (87)	escarro	-	+	+
226 (90)	orofaringe	-	+	+
249 (58)	escarro	-	+	+
250 (31)	escarro	-	+	+
251 (78)	escarro	-	+	+
252 (103)	orofaringe	-	+	+
254 (46)	escarro	-	+	+

* Única amostra em que a PCR com ARO1/ ARO2 teve concordância com a cultura

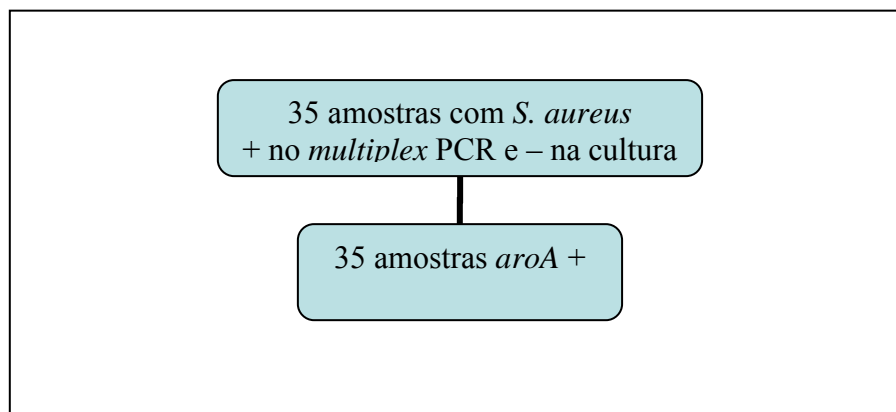


DIAGRAMA 2. Verificação das 35 amostras discordantes entre *multiplex* PCR e cultura em relação à detecção do *S. aureus* (*aroA* = gene do *S. aureus* amplificado pela PCR com os *primers* ARO1/ARO2)

Verificação com os *primers* mecA1/ mecA2:

Quanto à PCR para a amplificação de uma outra região do gene *mecA* com os *primers* *mecA1* e *mecA2*, houve a confirmação dos resultados do *multiplex* PCR em 30 dos 32 resultados discordantes (QUADRO 3).

Destas amostras, cinco evidenciaram o SARM na cultura com antibiograma, porém não houve a detecção do *mecA* no *multiplex* PCR. Em todas elas não houve detecção do gene *mecA* pela PCR com os *primers* *mecA1* e *mecA2*. Em uma delas também não houve a detecção do *S. aureus* pelo *multiplex* PCR, já incluída na descrição acima; em quatro delas houve a amplificação dos genes universal e *coa*, porém sem evidência do gene *mecA*, não confirmando a presença de resistência

intrínseca, mas sugerindo a presença do *S. aureus* sensível à meticilina (DIAGRAMA 3).

Das 27 amostras em que houve detecção de SARM pelo *multiplex* PCR, mas não pelas técnicas de cultura e difusão de discos, verificou-se o seguinte: em 12 delas foi identificado o SAS, no lugar do SARM, pela cultura com antibiograma, e em 11 destas foi confirmada a presença do gene *mecA* pela PCR com os *primers* *mecA1* e *mecA2*. Apenas uma amostra, portanto, confirmou os achados da técnica de cultura. Entre as 15 amostras restantes, das 27, a cultura não identificou o *S. aureus*, mas em todas elas foi confirmada a presença deste patógeno pela PCR com os *primers* ARO1 e ARO2, conforme descrito acima. Além disso, foi demonstrada a presença do gene *mecA* em 14 das 15 amostras por meio da PCR com os *primers* *mecA1/mecA2*, confirmando o resultado do *multiplex* PCR. Em apenas uma amostra o gene *mecA* não foi evidenciado, sugerindo a presença do SAS (DIAGRAMA 4).

Verificação por meio da determinação da CIM (Etest®):

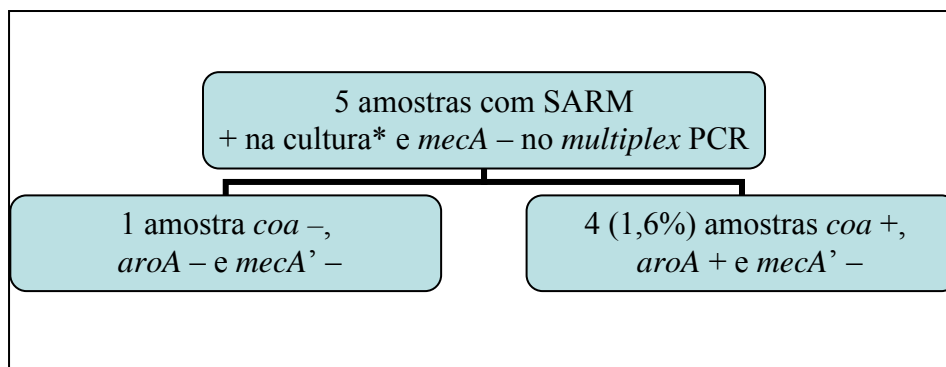
As cepas de *S. aureus* cujos resultados foram discrepantes em relação ao padrão de susceptibilidade à oxacilina foram submetidas à determinação da CIM, um outro método fenotípico de detecção de resistência. Em 15 amostras não foi possível a realização do teste, pois a cultura não havia isolado *S. aureus* e, portanto, não havia cepa disponível para o cultivo. Das 17 cepas submetidas ao teste, 13 (76,5%) tiveram padrões de sensibilidade compatíveis com os obtidos pela técnica de difusão de discos, discordando do *multiplex* PCR (QUADRO 3).

QUADRO 3. Verificação dos resultados discordantes das amostras em relação à detecção do SARM

No. amostra (No. paciente)	Sítio de coleta	Cultura com antibiograma	<i>Multiplex</i> PCR	PCR com mecA1/ mecA2	Conclusão pela CIM
9 (6)	escarro	SAS	SARM	+	R
11 (92)	escarro	SAS	SARM	+	S
13 (22)	escarro	SAS	SARM	+	S
50 (78)	escarro	SAS	SARM	+	S
75 (78)	escarro	SAS	SARM	+	R
105 (93)	orofaringe	SAS	SARM	+	S
140 (25)	escarro	SAS	SARM	+	S
170 (22)	escarro	SAS	SARM	+	S
171 (24)	escarro	SAS	SARM	+	S
195 (25)	escarro	SAS	SARM	+	S
200 (66)	escarro	SAS	SARM	+	S
*211 (94)	orofaringe	SAS	SARM	-	S
53 (64)	escarro	SARM	SAS	-	S
78 (43)	orofaringe	SARM	SAS	-	S
85 (61)	escarro	SARM	SAS	-	R
164 (95)	orofaringe	SARM	SAS	-	R
214 (23)	escarro	SARM	-	-	R
10 (35)	orofaringe	-	SARM	+	N/A
55 (87)	orofaringe	-	SARM	+	N/A
64 (16)	escarro	-	SARM	+	N/A
87 (75)	orofaringe	-	SARM	+	N/A
129 (90)	orofaringe	-	SARM	+	N/A
172 (74)	orofaringe	-	SARM	+	N/A
*177 (103)	orofaringe	-	SARM	-	N/A
192 (55)	orofaringe	-	SARM	+	N/A
196 (87)	escarro	-	SARM	+	N/A
213 (65)	orofaringe	-	SARM	+	N/A
218 (28)	escarro	-	SARM	+	N/A
225 (87)	escarro	-	SARM	+	N/A
226 (90)	orofaringe	-	SARM	+	N/A
249 (58)	escarro	-	SARM	+	N/A
251 (78)	escarro	-	SARM	+	N/A

* Amostras em que a PCR com mecA1/ mecA2 foi concordante com a cultura.

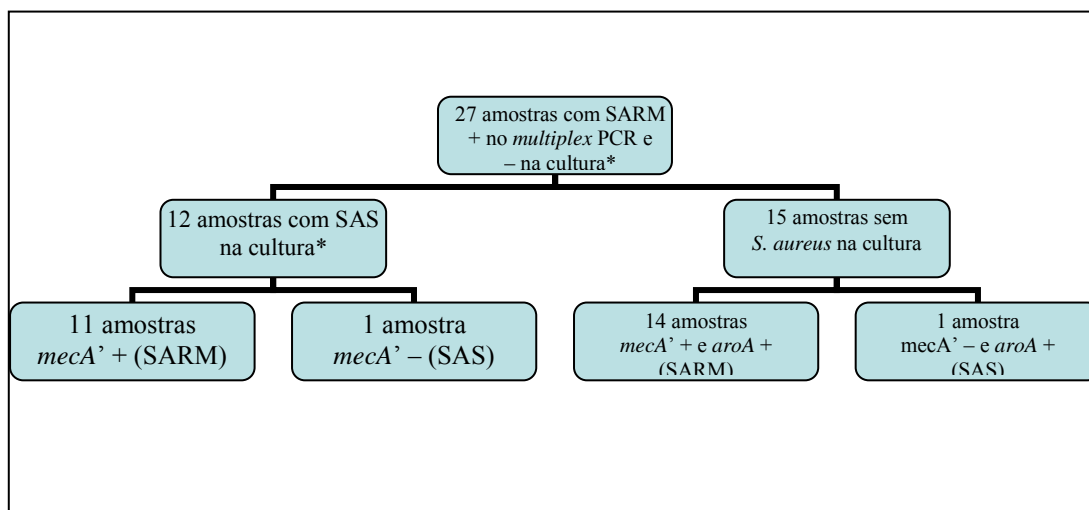
CIM = concentração inibitória mínima; N/A = não se aplica; SARM = *S. aureus* resistente à metilina; SAS = *S. aureus* sensível à metilina; R = resistente (CIM \geq 4 μ g/mL); S = sensível à oxacilina



* Cultura com antibiograma

mecA' = região do gene *mecA* amplificada pela PCR com os *primers* *mecA1/ mecA2*, diferente daquela amplificada pelo *multiplex* PCR

DIAGRAMA 3. Verificação de cinco amostras discordantes entre *multiplex* PCR e cultura em relação à detecção do *S. aureus* resistente à meticilina (SARM = *S. aureus* resistente à meticilina)



* Cultura com antibiograma

mecA' = região do gene *mecA* amplificada pela PCR com os *primers* *mecA1/ mecA2*, diferente daquela amplificada pelo *multiplex* PCR

DIAGRAMA 4. Verificação de 27 amostras discordantes entre *multiplex* PCR e cultura em relação à detecção do *S. aureus* resistente à meticilina (SARM = *S. aureus* resistente à meticilina; SAS = *S. aureus* sensível à meticilina)

4.7. Correlação dos resultados com o sítio de coleta

A análise dos resultados discordantes quanto à presença ou ausência do *S. aureus* na amostra em relação ao sítio de coleta evidenciou que em 63,5% (33 de 52) das vezes o local de coleta foi a orofaringe. Nas amostras em que o *multiplex* PCR não detectou o *S. aureus*, mas este patógeno estava presente na cultura, 76,5% (13 de 17) foram esfregaços de orofaringe (QUADRO 2).

As TABELAS 5 e 6 demonstram a influência que o sítio de coleta exerceu sobre o índice de concordância *kappa* e os valores de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia em relação à detecção do *S. aureus* e do SARM, respectivamente. Pode-se verificar que todos os valores são superiores e estatisticamente significantes no material coletado do escarro, com exceção da especificidade para o *S.aureus* e da especificidade, valor preditivo negativo e acurácia para o SARM.

Os resultados do *multiplex* PCR e da cultura com antibiograma de acordo com o sítio de coleta podem ser verificados no ANEXO E.

TABELA 5. Análise estatística dos resultados do *multiplex* PCR comparados aos da cultura* em relação à detecção do *S. aureus*, de acordo com o sítio de coleta

	Orofaringe (IC 95%)	Escarro (IC 95%)	Valor de p**
Sensibilidade	60,6% (42,1 – 77,1)	95,2% (88,3 – 98,7)	< 0,0001
Especificidade	75,0% (64,0 – 84,0)	73,7% (60,4 – 84,5)	0,7907
VPP	50,0% (33,8 – 66,2)	84,2% (75,3 – 90,9)	<0,0001
VPN	82,2% (71,5 – 90,2)	91,3% (79,2 – 97,6)	0,0283
Acurácia	70,8% (62,4 – 79,2)	86,5% (80,9 – 92,2)	0,0020
kappa	0,34 (0,14 – 0,53)	0,71 (0,59 – 0,83)	

* Técnica de cultura como “padrão-ouro”; **teste do χ^2 (1gl).

TABELA 6. Análise estatística dos resultados do *multiplex* PCR comparados aos da cultura* em relação à detecção do SARM, de acordo com o sítio de coleta

	Orofaringe (IC 95%)	Escarro (IC 95%)	Valor de p**
Sensibilidade	60% (14,7 – 94,7)	88,9% (70,8 – 97,7)	< 0,0001
Especificidade	89,8 (82,5 – 94,8)	86,0% (78,2 – 91,8)	0,2816
VPP	21,4% (4,7 – 50,8)	60,0% (43,3 – 75,2)	<0,0001
VPN	98,0% (92,9 – 99,8)	97,0% (91,6 – 99,4)	0,8880
Acurácia	88,5% (82,6 – 94,4%)	86,5% (80,9 – 92,2)	0,6380
kappa	0,27 (-0,11 – 0,64)	0,63 (0,48 – 0,79)	

* Técnica de cultura como “padrão-ouro”; **teste do χ^2 (1gl).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO:

Foi desenvolvido um *multiplex* PCR para a identificação de SARM diretamente na secreção respiratória de pacientes com FC. Três pares de *primers* foram utilizados com o objetivo de identificar o gene *mecA*, principal responsável pela resistência à meticilina, o gene *coa*, presente na espécie *S. aureus*, e o gene universal de bactérias 16S rRNA, controle positivo da reação. O *multiplex* PCR foi sendo desenvolvido e testado, baseando-se nos artigos publicados por Henegariu et al.⁵⁵, Kearns et al.²⁵ e Schmitz et al.⁴⁵, por meio de experimentos com diferentes concentrações de reagentes e gradientes de temperatura, até a obtenção dos melhores resultados. O método desenvolvido foi capaz de detectar quantidades mínimas de DNA de SARM sem reação cruzada com outras bactérias testadas, mostrando-se uma técnica de alta sensibilidade e especificidade.

Alguns estudos têm demonstrado a grande importância da PCR na detecção rápida e precisa de microrganismos na secreção respiratória dos indivíduos com FC^{64;65}, mas ainda não há publicações a respeito da identificação de SARM por PCR nestes pacientes. Silva Filho et al.⁶⁵ recentemente desenvolveram um *multiplex* PCR para a identificação de *B. cepacia*, *P. aeruginosa* e *S. maltophilia* nas mesmas amostras com resultados muito satisfatórios, melhorando bastante a detecção desses patógenos nos portadores de FC. Quando confrontados com a cultura, o método molecular mostrou VPN acima de 90% para os três microrganismos, além de alta sensibilidade para a *P. aeruginosa* e altos valores de especificidade para os outros patógenos estudados. No presente estudo, o *multiplex* PCR demonstrou alto VPN em

relação à identificação do SARM, porém valores de menor relevância de sensibilidade, especificidade e VPP quando o método foi comparado à cultura com antibiograma, considerando-a como “padrão-ouro”.

Há grande questionamento sobre a forma de comparação das técnicas moleculares de identificação bacteriana com as convencionais, baseadas em características fenotípicas do patógeno. Nos dias atuais, a tendência é considerar os métodos moleculares como “padrão-ouro”, já que se fundamentam na detecção genotípica ^{43;44;46;66;67}. Sabe-se, por exemplo, que a expressão do gene *mecA* é altamente variável, podendo ser heterogênea entre as cepas ^{20;23;24;38;42}. A expressão deste gene sofre interferência de fatores ambientais *in vitro*, como variações de osmolaridade, temperatura, pH, tamanho do inóculo e tempo de incubação, assim como é induzida pelos próprios antimicrobianos β -lactâmicos. Os fatores externos, portanto, interferem na detecção da resistência nos testes microbiológicos tradicionais, principalmente aqueles que utilizam sistemas rápidos automatizados. Isso sugere que a detecção direta do gene *mecA*, evidenciando a resistência intrínseca, pode representar uma alternativa superior na identificação do SARM ^{16;20;25-27;36;42;43;45}. Tal fato propõe que a comparação do *multiplex* PCR com a cultura, considerando-a como “padrão-ouro”, deva ser interpretada com cautela. Segundo Martineau et al. ⁴⁴, a detecção do gene *mecA* é atualmente considerada como “padrão-ouro” porque os métodos fenotípicos podem ter difícil interpretação e algumas cepas não expressam o gene *mecA* a não ser que sofram pressão seletiva dos antimicrobianos. Neste estudo, o *multiplex* PCR, confirmado pelas PCR posteriores, detectou SARM em 25 de 254 (8,8%) amostras [19 de 106 (17,9%) pacientes] em que o método de cultura não identificou tal patógeno, algo relatado por outros autores

^{24;26;41;44-46}. Como o gene *mecA* não é evidenciado nos estafilococos susceptíveis à meticilina, estando presente apenas nos resistentes ²⁴⁻²⁶, e levando em consideração as limitações das técnicas fenotípicas para a identificação da resistência à meticilina, é alta a probabilidade de que essas 25 amostras sejam resultados falso-negativos da cultura para a detecção do SARM. Se a análise estatística fosse realizada considerando o *multiplex* PCR como “padrão-ouro”, a sensibilidade da cultura mais a técnica de difusão de discos para a detecção do SARM seria de 50%. Foi observado também nesta pesquisa que, em 37,6% das ocasiões em que o SAS foi identificado pela cultura com antibiograma, havia uso concomitante de antimicrobiano inalado e/ou sistêmico, comparado a 84,4% das vezes em que o SARM foi detectado na presença de antimicrobiano (dados não mostrados). Uma das hipóteses para explicar tal fato seria a de que os antibióticos poderiam estar induzindo a expressão do gene *mecA* e selecionando cepas resistentes. Outro ponto de discussão foi a diferença encontrada entre os próprios métodos fenotípicos de determinação de susceptibilidade, em que CIM, um método mais acurado, discordou da técnica de difusão de discos em 23,5% das cepas testadas, sugerindo a variação da expressão gênica de acordo com fatores externos, algo também relatado por outros autores ^{37;38;68;69}.

Apesar das técnicas tradicionais de cultura apresentarem menores custos e serem de fácil execução, são relatadas desvantagens, pelo menos por quatro características. Além de serem baseadas nas características fenotípicas, a cultura exige tempo mais prolongado para a identificação do patógeno, necessita de bactérias viáveis e exige um inóculo maior, sofrendo interferência, por exemplo, do uso de antimicrobianos concomitantemente à coleta e da forma e do local de obtenção da

amostra. Alguns autores descrevem também que uma causa de resultados falso-negativos em relação ao isolamento do *S. aureus* pela cultura é a existência de fatores inibitórios, como a presença concomitante na amostra de bactérias Gram-negativas de crescimento rápido, por exemplo a *P. aeruginosa*, bactéria comumente isolada na secreção respiratória de pacientes com FC^{26;70}. No presente estudo, houve 35 de 254 (13,8%) amostras [30 de 106 (28,3%) pacientes] negativas para *S. aureus* na cultura, mas com detecção deste patógeno pelo *multiplex* PCR e pela PCR para o gene *aroA*, sugerindo resultados falso-negativos da cultura.

O diagnóstico microbiológico por métodos de cultura e bioquímico exige pelo menos 36 – 48 horas para ser estabelecido, com conseqüências desfavoráveis^{24-26;43;44;71}. A demora na detecção do SARM resulta na utilização de antibioticoterapia empírica, muitas vezes com espectro mais amplo do que o necessário. Leva também a dificuldades práticas na implantação das medidas de controle desse patógeno, que devem ser iniciadas o mais precocemente possível²¹. Por outro lado, a técnica de PCR, além de simples, tem sido apontada como de fácil exequibilidade num curto espaço de tempo (neste estudo, cerca de seis horas), demonstrando grande vantagem sobre os métodos convencionais. Por todos os fatos descritos, a PCR vem sendo considerada como um método de boa relação custo-benefício nos dias atuais^{24-27;41;45;72}.

Apesar de existirem razões microbiológicas definidas para controle do SARM, ainda não há comprovação de efeitos deletérios da infecção pulmonar por este microrganismo na função pulmonar em portadores de FC⁷³⁻⁷⁷. Não se conseguiu determinar até o momento se existe maior virulência do SARM em relação ao SAS. Alguns autores relatam uma associação entre colonização por SARM e maior

dificuldade terapêutica em portadores de FC. É possível que exista maior deterioração clínica ^{17;28;29;34;74;77}. Mais estudos são necessários para identificar os fatores de risco para aquisição do SARM, medidas efetivas de controle e protocolos de erradicação, bem como para verificar a associação clínica entre a presença desse patógeno e os possíveis riscos para os pacientes, especialmente nos portadores de FC ⁷⁸. Não foi objetivo deste trabalho analisar esses fatores, mas foi verificada uma associação entre a presença de SARM e um número maior de internações durante as exacerbações pulmonares, quando comparado com o SAS (dados não mostrados). O delineamento do estudo não permite definir se essa relação é causal. Além disso, pelos dados obtidos, não foi possível saber se as internações foram indicadas por motivo de gravidade clínica ou apenas para utilização de antimicrobianos intravenosos.

No presente trabalho existiram 17 dentre as 254 (6,7%) amostras [16 de 106 (15%) pacientes] com *S. aureus* identificado pela cultura, porém sem a detecção do gene *coa* no *multiplex* PCR. Em 16 amostras também não foi evidenciado o gene *aroA* na PCR confirmatória, sugerindo ausência de DNA de *S. aureus*. A explicação para tal fato poderia incluir desde a escolha do sítio de coleta até falha em qualquer etapa de processamento das amostras. Mais de 75% dessas amostras eram de orofaringe, em que o *swab* foi utilizado primeiramente para o meio de cultura para, só depois, ser disponibilizado para a extração de DNA, com possibilidade de pouca sobra de material no bastão de algodão. A etapa enzimática da extração de DNA utilizou técnica eficiente ^{54;57}. Sabe-se, porém, que há maior dificuldade para a extração do DNA das bactérias Gram-positivas, quando comparadas às Gram-negativas ⁷⁹. Muitos experimentos ^{25;39;41;42;47;72} incluem outras substâncias, como a

lisostafina, para a extração do DNA do *S. aureus*, que não foi utilizada neste estudo. Falhas na extração poderiam ter ocasionado uma melhor extração do DNA de bactérias Gram-negativas, mas não do DNA do *S. aureus*, levando à amplificação apenas do gene universal de bactérias. Outra possibilidade é a de ter ocorrido falha na reação por fatores inibitórios presentes nas amostras clínicas e por interferência da mistura de grande quantidade de DNA de diversas espécies, assim como por competição dos oligonucleotídeos. Esta possibilidade é mais remota, já que a PCR confirmatória, realizada apenas com um par de *primers*, também não detectou DNA do *S. aureus*. Seria possível também ter existido uma maior facilidade na amplificação do gene universal 16S rRNA, que está presente em muitas cópias no genoma bacteriano em detrimento da amplificação dos genes espécie-específicos, que são seqüências únicas. A probabilidade de um resultado falso-negativo por baixa sensibilidade da reação é pequena, pois o *multiplex* PCR desenvolvido foi capaz de detectar mínimas concentrações de DNA.

Neste estudo foi evidenciado SARM na cultura em quatro amostras (1,6%) [4 (3,8%) pacientes], porém com identificação do SAS pelos métodos moleculares (*multiplex* PCR e PCR confirmatória). Esses achados também foram demonstrados por diversos autores^{27,43-45} e podem corresponder a outros mecanismos de resistência descritos, que não o mediado pelo gene *mecA*, de relevância clínica bastante questionável. Este gene pode estar ausente em algumas cepas de *S. aureus* com um nível baixo de resistência à meticilina. Esse mecanismo de resistência limítrofe *in vitro*, clinicamente irrelevante, ocorre pela produção de β -lactamase em altíssimos níveis, levando a uma fraca atividade contra as penicilinas semi-sintéticas. Além disso, também são descritas cepas de *S. aureus* “variantes de pequena colônia”, que

apresentam algumas peculiaridades resultando em crescimento bacteriano lento e, conseqüentemente, absorção reduzida dos antimicrobianos ^{16;20;23}. Há relatos da presença dessas cepas por longos períodos de tempo colonizando a árvore brônquica de pacientes com FC ⁸⁰⁻⁸². Finalmente, outro mecanismo de resistência descrito *in vitro*, extremamente raro, dá-se pela modificação das PLP habituais e é resultante de genes em mosaico, que codificam PLP “mescladas” com baixa afinidade pelo antimicrobiano. A utilização de discos de amoxicilina com clavulanato para a detecção de cepas hiperprodutoras de β -lactamase e a tipagem molecular dos *S. aureus* isolados poderiam esclarecer estes pontos ^{27;42;81;83}.

Existe uma grande tendência de considerar mais fidedigno o genótipo sobre o fenótipo para a detecção de resistência ^{16;20;25-27;36;42-45}. Se as PCR confirmatórias fossem consideradas como “padrão-ouro” na análise das amostras discordantes em relação ao SARM, seria concluído que o *multiplex* PCR resultou em dois falso-positivos (dois pacientes) e a cultura mais a técnica de difusão de discos em 25 falso-negativos (19 pacientes), com conseqüências potencialmente desfavoráveis na prática clínica. O fato de não terem sido utilizados meios de cultivo enriquecidos com NaCl ou oxacilina, com o objetivo de aumentar a possibilidade de expressão do gene *mecA* ^{66;71;84}, provavelmente contribuiu para uma menor positividade da cultura com antibiograma. Os dados obtidos neste estudo não proporcionaram conclusões a respeito da evolução clínica desses pacientes. Além disso, não foi possível classificar se os pacientes estavam apenas colonizados pelo SARM ou com doença provocada por este patógeno, pelos dados analisados. Novas técnicas moleculares quantitativas, como a PCR em Tempo Real ⁸⁵, um número maior de pacientes agudizados, assim

como uma avaliação clínica mais detalhada poderiam contribuir para a análise desse tópico, que se distanciou do objetivo deste estudo.

Houve uma diferença muito significativa entre as análises obtidas separadamente de acordo com o sítio de coleta (orofaringe ou escarro). A orofaringe teve baixos VPP e sensibilidade para a detecção do SARM. Tal fato sugere que o método desenvolvido é mais confiável quando utilizado para a análise das amostras de escarro. Isto também foi observado por outros autores ^{9;11;65}. Mesmo para o diagnóstico por meio dos métodos convencionais de cultura, há muita discussão na literatura a respeito da validade do uso de *swabs* de orofaringe, já que estudos comparativos utilizando lavado broncoalveolar encontram baixa confiabilidade no esfregaço de orofaringe ^{10;12}.

A frequência do *S. aureus* na população estudada, considerando-se os resultados de cultura e antibiograma, foi de 56,6% para *S. aureus* e de 11,3% para SARM. Outros estudos demonstram uma prevalência de até 60% e 26%, respectivamente, em centros norte-americanos pelas técnicas convencionais ^{13;14}. Os altos índices encontrados poderiam ser explicados pela elevada complexidade das patologias atendidas no nosso serviço, onde apenas 41% das cepas hospitalares foram sensíveis à oxacilina no ano de 2003, segundo a Subcomissão de Controle de Infecção Hospitalar, ICr – HC/ FMUSP. Levando-se em consideração os resultados do *multiplex* PCR, a frequência de *S. aureus* e de SARM nos pacientes no período estudado foi de 66% e 26,4%, respectivamente.

Apesar de potencialmente muito vantajoso, o *multiplex* PCR desenvolvido também possui limitações. No presente estudo, apenas uma amostra evidenciou a presença de *Staphylococcus* coagulase negativo resistente à meticilina (detecção dos

genes universal e *mecA*, sem a amplificação do gene *coa*), bactéria também identificada pela cultura da mesma espécie. Em 11 amostras houve a amplificação concomitante dos três genes pesquisados (*mecA*, *coa* e 16S rRNA) pelo *multiplex* PCR, e do *mecA* pela PCR confirmatória, sugerindo a presença de SARM. Pelas técnicas convencionais de difusão de disco e determinação da CIM, nove amostras apontaram a presença do SAS. Estas nove discrepâncias, portanto, poderiam ser justificadas por falha dos métodos fenotípicos ou por distorções na interpretação do *multiplex* PCR. Discute-se aqui a detecção “cruzada” do gene *mecA* de *Staphylococcus* coagulase negativo resistente à meticilina, que poderia estar presente na “flora normal” desses indivíduos, associada à detecção de *S. aureus* sensível à meticilina, dando um resultado com três bandas no *multiplex* PCR. Neste trabalho, esta possibilidade é praticamente nula, já que nenhuma das 11 amostras evidenciou a presença do *Staphylococcus* coagulase negativo pela cultura. Além disso, nenhuma das 254 amostras estudadas evidenciou a concomitância desses dois microrganismos na cultura, sugerindo que isso possa não ser frequente. De qualquer forma, a relevância clínica dessa limitação é pequena, pois há relatos de transferência horizontal *in vivo* do gene *mecA* do *Staphylococcus* coagulase negativo para o *S. aureus*^{86;87}. Há, portanto, uma tendência de implementação das medidas de controle se houver evidência de presença de gene *mecA*, independentemente do microrganismo em que ele for encontrado. Mesmo assim, essa limitação poderá ser diminuída futuramente com a inclusão, no *multiplex* PCR, de mais um par de *primers* para amplificação de um gene específico dos *Staphylococcus* coagulase negativo. Isso definiria o diagnóstico com mais precisão: nos casos em que não houver a detecção deste gene específico, fica confirmada a presença do SARM.

Essas limitações, entretanto, de forma alguma invalidam a técnica desenvolvida. Devido ao alto VPN do *multiplex* PCR, uma vez não detectado o SARM pelo método, as medidas de controle e a terapia com glicopeptídeos não seriam necessárias. No presente estudo foi evidenciado que o *multiplex* PCR para a identificação do SARM diretamente em amostras clínicas de secreção respiratória de pacientes com FC mostrou-se um método rápido, simples e confiável. A implementação dessa técnica poderá trazer grandes benefícios na assistência aos pacientes e nos procedimentos de controle dos germes resistentes.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES:

6.1. Foi desenvolvido um *multiplex* PCR para a identificação do *Staphylococcus aureus* resistente à metilina em secreção respiratória de pacientes com fibrose cística capaz de detectar até 25 pg de DNA do patógeno nas amostras clínicas, sem reação cruzada com outras bactérias encontradas nas secreções respiratórias.

6.2. O *multiplex* PCR foi significativamente superior na identificação do *Staphylococcus aureus* resistente à metilina em secreção respiratória dos pacientes estudados [28 (26,4%) dos pacientes] quando comparado à cultura e antibiograma pela técnica de difusão de discos [12 (11,3%) pacientes; $p < 0,005$].

6.3. Quando aplicado diretamente em amostras de escarro e orofaringe dos indivíduos com fibrose cística e comparado à técnica de cultura e antibiograma por meio do teste de difusão de discos, o *multiplex* PCR demonstrou ser um método simples e confiável, com valor preditivo negativo superior a 96%, além de valores de sensibilidade, especificidade e acurácia acima de 83%.

ANEXOS

ANEXO B. Pares de *primers* utilizados no experimento

Gene alvo	Característica	Seqüência dos pares de <i>primers</i> 5' – 3'	Melting point temperature (T _m) e tamanho do produto	Sensibilidade e especificidade	Referência
<i>mec A</i>	Resistência à meticilina	M1: TGGCTATCGTGT CACAATCG M2: CTGGAAC TTGTTGAGCAGAG	52°C 310 pb	100% 98%	Vannuffel et al., 1995 ⁴⁷
<i>mec A</i>	Resistência à meticilina	SA1: CGGTAACATTGATCGCAACGTTCA SA2: CTTGGAACGATGCCTAATCTCAT	60°C 214 pb	100% 100%	Kearns et al., 1999 ²⁵
<i>mec A</i>	Resistência à meticilina	mecA1: GCAATCGCTAAAGAACTAAG mecA2: GGGACCAACATAACCTAATA	52°C 222 pb	100% 100%	Smyth et al., 2001 ⁴⁶
<i>fem A</i>	Espécie <i>S. aureus</i>	F1: CTTACTTACTGGCTGTACCTG F2: ATGTCGCTTGTATGTGC	62°C 686 pb	100% 100%	Vannuffel et al., 1995 ⁴⁷
<i>coa</i>	Espécie <i>S. aureus</i>	SA3: GTAGATTGGGCAATTACATTTTGGAGG SA4: CGCATCAGCTTTGTTATCCCATGTA	52°C 117 pb	100% 100%	Kearns et al., 1999 ²⁵
<i>aroA</i>	Espécie <i>S. aureus</i>	ARO1: TTC CAA TTG AAG CAG AAG GG ARO2: TGG TTG AAG CAT TGG TGT GT	58°C 311 pb	100% 100%	Silva Filho, LV, dados não publicados, 1999
<i>nuc</i>	Espécie <i>S. aureus</i>	nuc1: GCGATTGATGGTGATACGGTT nuc2: AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	65°C 280 pb	100% 100%	Barski et al., 1996 ⁴¹
16S rRNA	Todas as bactérias	RW01: AACTGGAGGAAGGTGGGGAT DG74: AGGAGGTGATCCAACCGCA	55°C 371 pb	100% 100%	Schmitz et al., 1997 ⁴⁵

A = adenina, C = citosina, T = timina, G = guanina

ANEXO C:**1. Protocolo de PCR com o par de primers ARO1 e ARO2*:**

Amostra clínica: 2,5 µL ou

250 ng de DNA de *S. aureus* (controle positivo) ou

2,5 µL de água deionizada bidestilada (controle negativo)

3 mM MgCl₂

20 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM KCl

200 µM de cada dNTP

0,4 µM dos primers ARO1/ ARO2 (cada)

1 U Taq DNA polimerase (Invitrogen™)

Volume final: 25 µL

Parâmetros do termociclador: 94 °C por 5 minutos

94 °C por 1 minuto	}	30 ciclos
60 °C por 1 minuto		
72 °C por 1 minuto		
72 °C por 7 minutos		

* Silva Filho, LVF, dados não publicados, 1999

2. Protocolo de PCR com o par de primers mecA1 e mecA2⁴⁵:

Amostra clínica: 2,5 µL ou

250 ng de DNA de *S. aureus* (controle positivo) ou

2,5 µL de água deionizada bidestilada (controle negativo)

4 mM MgCl₂

16 mM Tris-HCl pH 8,0, 40 mM KCl

160 µM de cada dNTP

0,4 µM dos primers mecA1/ mecA2 (cada)

1 U Taq DNA polimerase (Invitrogen™)

Volume final: 25 µL

Parâmetros do termociclador: 94 °C por 3 minutos

94 °C por 1 minuto	}	30 ciclos
53 °C por 1 minuto		
72 °C por 1 minuto		
72 °C por 5 minutos		

ANEXO D. Frequência dos principais patógenos* isolados por idade nas amostras de secreção respiratória dos 106 pacientes estudados, no período de setembro de 2000 a abril de 2001

Idade (anos)	<i>P. aeruginosa</i> n (%)	<i>S. aureus</i> n (%)	<i>H. influenzae</i> n (%)	<i>B. cepacia</i> n (%)	<i>S. maltophilia</i> n (%)	TOTAL
0 a 1	6 (66,6)	2 (22,2)	5 (55,6)	1 (11,1)	0	9
2 a 5	10 (47,6)	9 (42,9)	12 (57,1)	0	0	21
6 a 10	22 (68,8)	21 (65,6)	14 (43,8)	4 (12,5)	2 (6,3)	32
11 a 17	32 (82,1)	26 (66,7)	15 (38,5)	3 (7,7)	3 (7,7)	39
18 a 20	3 (60,0)	2 (40,0)	1 (20,0)	0	0	5
TOTAL	73 (68,9)	60 (56,6)	47 (44,3%)	8 (7,5)	5 (4,7)	106*

* Mais de um patógeno isolado por paciente

ANEXO E:

TABELA A. Resultado da técnica de cultura com antibiograma das amostras clínicas de acordo com o sítio de coleta

Patógenos	Escarro (n =141)	Esfregaço de orofaringe (n = 113)	TOTAL (n = 254)
<i>S. aureus</i>	84 (59,6%)	33 (29,2%)	117 (46,0%)
SARM	27 (19,1%)	5 (4,4%)	32 (12,5%)

TABELA B. Resultado do *multiplex* PCR das amostras clínicas de acordo com o sítio de coleta

Genes-alvo	Escarro (n =141)	Esfregaço de orofaringe (n = 113)	TOTAL (n = 254)
Universal (16S)	141 (100%)	113 (100%)	254 (100%)
<i>coa</i>	95 (67,4%)	40 (35,4%)	135 (53,1%)
<i>coa + mecA</i> (SARM)	40 (28,4%)	14 (12,4%)	54 (21,3%)

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Raskin S, Phillips III JA, Krishnamani MR, Vnencak-Jones C, Parker RA, Rozov T, Cardieri JM, Marostica P, Abreu F, Giugliani R. DNA analysis of cystic fibrosis in Brazil by direct PCR amplification from Guthrie cards. *Am J Med Genet.* 1993;46(6):665-9.
2. Rozov T. Mucoviscidose. In: Rozov T. *Doenças Pulmonares em Pediatria: Diagnóstico e Tratamento.* São Paulo: Atheneu; 1999. p. 443-59.
3. Santos GP, Domingos MT, Wittig EO, Riedi CA, Rosario NA. Neonatal cystic fibrosis screening program in the state of Parana: evaluation 30 months after implementation. *J Pediatr (Rio J).* 2005;81:240-4.
4. Tsui LC. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;151:S47-S53.
5. Welsh MJ, Smith AE. Cystic fibrosis. *Sci Am.* 1995;273(6):52-9.
6. MacLusky I, Levison H. Cystic Fibrosis. In: Chernick V, Boat TF. *Kendig's Disorders of the Respiratory Tract.* 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1998. p.838-82.
7. Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic fibrosis. *N Engl J Med.* 2005;352(19):1992-2001.

8. Zach MS. Lung disease in cystic fibrosis - an updated concept. *Pediatr Pulmonol.* 1990;8(3):188-202.
9. Thomassen MJ, Klinger JD, Badger SJ, van Heeckeren DW, Stern RC. Cultures of thoracotomy specimens confirm usefulness of sputum cultures in cystic fibrosis. *J Pediatr.* 1984;104(3):352-6.
10. Rosenfeld M, Emerson J, Accurso F, Armstrong D, Castile R, Grimwood K, Hiatt P, McCoy K, McNamara S, Ramsey B, Wagener J. Diagnostic accuracy of oropharyngeal cultures in infants and young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 1999;28(5):321-8.
11. Ramsey BW, Wentz KR, Smith AL, Richardson M, Williams-Warren J, Hedges DL, Gibson R, Redding GJ, Lent K, Harris K. Predictive value of oropharyngeal cultures for identifying lower airway bacteria in cystic fibrosis patients. *Am Rev Respir Dis.* 1991;144(2):331-7.
12. Armstrong DS, Grimwood K, Carlin JB, Carzino R, Olinsky A, Phelan PD. Bronchoalveolar lavage or oropharyngeal cultures to identify lower respiratory pathogens in infants with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 1996;21(5):267-75.
13. Cystic Fibrosis Foundation. *Patient Registry 1999 Annual Report.* Bethesda, Maryland; 2000.
14. Cystic Fibrosis Foundation. *Patient Registry 2002 Annual Report.* Bethesda, Maryland; 2003.

15. Ratjen F, Comes G, Paul K, Posselt HG, Wagner TO, Harms K. Effect of continuous antistaphylococcal therapy on the rate of *P. aeruginosa* acquisition in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2001;31(1):13-6.
16. Livermore DM, Williams JD. B-Lactams: Mode of Action and Mechanisms of Bacterial Resistance. In: Lorian V. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 4th ed. Maryland: Williams & Wilkins; 1996. p.502-65.
17. MRSA in cystic fibrosis. London, 16 June 1997. *J Hosp Infect*. 1998;40(3):179-91.
18. Stefani S, Varaldo PE. Epidemiology of methicillin-resistant staphylococci in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2003;9(12):1179-86.
19. Oliveira GA, Faria JB, Levy CE, Mamizuka EM. Characterization of the Brazilian endemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from hospitals throughout Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2001;5(4):163-70.
20. Jacoby GA, Archer GL. New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *N Engl J Med*. 1991;324(9):601-12.
21. Rubinovitch B, Pittet D. Screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the endemic hospital: what have we learned? *J Hosp Infect*. 2001;47(1):9-18.

22. Nakamura MM, Rohling KL, Shashaty M, Lu H, Tang YW, Edwards KM. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage in the community pediatric population. *Pediatr Infect Dis J*. 2002;21(10):917-22.
23. Brakstad OG, Maeland JA. Mechanisms of methicillin resistance in staphylococci. *APMIS*. 1997;105(4):264-76.
24. Jaffe RI, Lane JD, Albury SV, Niemeyer DM. Rapid extraction from and direct identification in clinical samples of methicillin-resistant staphylococci using the PCR. *J Clin Microbiol*. 2000;38(9):3407-12.
25. Kearns AM, Seiders PR, Wheeler J, Freeman R, Steward M. Rapid detection of methicillin-resistant staphylococci by multiplex PCR. *J Hosp Infect*. 1999;43(1):33-7.
26. Vannuffel P, Laterre PF, Bouyer M, Gigi J, Vandercam B, Reynaert M, Gala JL. Rapid and specific molecular identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in endotracheal aspirates from mechanically ventilated patients. *J Clin Microbiol*. 1998;36(8):2366-8.
27. Salisbury SM, Sabatini LM, Spiegel CA. Identification of methicillin-resistant staphylococci by multiplex polymerase chain reaction assay. *Am J Clin Pathol*. 1997;107(3):368-73.
28. Ren, CL and the Investigators and Coordinators of the Epidemiologic Study of Cystic Fibrosis. Relationship between methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) positive sputum culture and clinical status in

- CF patients. American Thoracic Society International Conference; 2004; USA. Abstracts. p. A921.
29. Miall LS, McGinley NT, Brownlee KG, Conway SP. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in cystic fibrosis. *Arch Dis Child*. 2001;84(2):160-2.
 30. Harbarth S, Albrich W, Goldmann DA, Huebner J. Control of multiply resistant cocci: do international comparisons help? *Lancet Infect Dis*. 2001;1(4):251-61.
 31. von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. *N Engl J Med*. 2001;344(1):11-6.
 32. Archer GL, Climo MW. *Staphylococcus aureus* bacteremia - consider the source. *N Engl J Med*. 2001;344(1):55-6.
 33. Kopp BJ, Nix DE, Armstrong EP. Clinical and economic analysis of methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Ann Pharmacother*. 2004;38(9):1377-82.
 34. Solis A, Brown D, Hughes J, Van Saene HK, Heaf DP. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with cystic fibrosis: An eradication protocol. *Pediatr Pulmonol*. 2003;36(3):189-95.
 35. Shlaes DM, Gerding DN, John JF Jr, Craig WA, Bornstein DL, Duncan RA, Eckman MR, Farrer WE, Greene WH, Lorian V, Levy S, McGowan JE Jr,

- Paul SM, Ruskin J, Tenover FC, Watanakunakorn C. Society for Healthcare Epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on the Prevention of Antimicrobial Resistance: guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1997;18(4):275-91.
36. Grisold AJ, Leitner E, Muhlbauer G, Marth E, Kessler HH. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous confirmation by automated nucleic acid extraction and real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2002;40(7):2392-7.
37. McDougal LK, Thornsberry C. New recommendations for disk diffusion antimicrobial susceptibility tests for methicillin-resistant (heteroresistant) staphylococci. *J Clin Microbiol.* 1984;19(4):482-8.
38. Mulligan ME, Citron DM, Kwok RY, Wheelock JP, Farrohi FK, Hindler JA, Johnston L. Impact of prolonged incubation on disk diffusion susceptibility test results for *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 1987;25(5):840-4.
39. Cotter L, Lynch M, Cryan B, Greer P, Fanning S. Investigation of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) outbreak in an Irish hospital: triplex PCR and DNA amplification fingerprinting. *J Hosp Infect.* 1997;36(1):37-47.
40. Ramotar K, Bobrowska M, Jessamine P, Toyé B. Detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci initially reported as methicillin

- susceptible using automated methods. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1998;30(4):267-73.
41. Barski P, Piechowicz L, Galinski J, Kur J. Rapid assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using multiplex PCR. *Mol Cell Probes*. 1996;10(6):471-5.
 42. Geha DJ, Uhl JR, Gustaferra CA, Persing DH. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol*. 1994;32(7):1768-72.
 43. Martineau F, Picard FJ, Grenier L, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Multiplex PCR assays for the detection of clinically relevant antibiotic resistance genes in staphylococci isolated from patients infected after cardiac surgery. The ESPRIT Trial. *J Antimicrob Chemother*. 2000;46(4):527-34.
 44. Martineau F, Picard FJ, Lansac N, question markenard Mi, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(2):231-8.
 45. Schmitz FJ, MacKenzie CR, Hofmann B, Verhoef J, Finken-Eigen M, Heinz HP, Kohrer K. Specific information concerning taxonomy, pathogenicity and methicillin resistance of staphylococci obtained by a multiplex PCR. *J Med Microbiol*. 1997;46(9):773-8.

46. Smyth RW, Kahlmeter G, Olsson LB, Hoffman B. Methods for identifying methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect*. 2001;48(2):103-7.
47. Vannuffel P, Gigi J, Ezzedine H, Vandercam B, Delmee M, Wauters G, Gala JL. Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 1995;33(11):2864-7.
48. Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. *Recombinant DNA*. 2nd ed. New York: WH Freeman & Co; 1992.
49. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988;239(4839):487-91.
50. Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr*. 1998;132(4):589-95.
51. Wong K, Roberts MC, Owens L, Fife M, Smith AL. Selective media for the quantitation of bacteria in cystic fibrosis sputum. *J Med Microbiol*. 1984;17(2):113-9.
52. Hammerschlag MR, Harding L, Macone A, Smith AL, Goldmann DA. Bacteriology of sputum in cystic fibrosis: evaluation of dithiothreitol as a mucolytic agent. *J Clin Microbiol*. 1980;11(6):552-7.

53. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2000.
54. Sambrook J, Maniatis T, Fritsch EF. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
55. Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*. 1997;23(3):504-11.
56. Rebouças NA. *Planejando e Otimizando a Reação de PCR*; 2003; São Paulo. Curso.
57. Silva Filho, LV. *Avaliação da colonização bacteriana do trato respiratório de pacientes portadores de fibrose cística através da técnica de multiplex PCR* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. 2002.
58. Marcos JY, Soriano AC, Salazar MS, Moral CH, Ramos SS, Smeltzer MS, Carrasco GN. Rapid identification and typing of *Staphylococcus aureus* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *aroA* gene. *J Clin Microbiol*. 1999;37(3):570-4.
59. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2004.

60. Dawson-Saunders B, Trapp RG. *Basic and Clinical Biostatistics*. Norwalk: Appleton and Lange; 1994.
61. Siegel S. *Estatística Não Paramétrica: Para as Ciências do Comportamento*. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill; 1975.
62. Braile DM and Godoy MF. *Cálculos Estatísticos Básicos para Testes Diagnósticos*. Programa de computador; 1999.
63. Centers for Disease Control and Prevention. EPI-INFO (versão 6.02). Atlanta, Georgia; 1996. Available from: <http://www.cdc.gov>.
64. Silva Filho LV, Levi JE, Oda Bento CN, Ramos SR, Rozov T. PCR identification of *Pseudomonas aeruginosa* and direct detection in clinical samples from cystic fibrosis patients. *J Med Microbiol*. 1999;48(4):357-61.
65. Silva Filho LV, Tateno AF, Velloso LF, Levi JE, Fernandes S, Bento CN, Rodrigues JC, Ramos SR. Identification of *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* complex, and *Stenotrophomonas maltophilia* in respiratory samples from cystic fibrosis patients using multiplex PCR. *Pediatr Pulmonol*. 2004;37(6):537-47.
66. Louie L, Matsumura SO, Choi E, Louie M, Simor AE. Evaluation of three rapid methods for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2000;38(6):2170-3.
67. Felten A, Grandry B, Lagrange PH, Casin I. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

- (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. *J Clin Microbiol.* 2002;40(8):2766-71.
68. Pfaller MA, Wakefield DS, Stewart B, Bale M, Hammons GT, Massanari RM. Evaluation of laboratory methods for the classification of oxacillin-resistant and oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Am J Clin Pathol.* 1988;89(1):120-5.
69. Pottumarthy S, Fritsche TR, Jones RN. Evaluation of alternative disk diffusion methods for detecting *mecA*-mediated oxacillin resistance in an international collection of staphylococci: validation report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005;51(1):57-62.
70. Flayhart D, Lema C, Borek A, Carroll KC. Comparison of the BBL CHROMagar Staph aureus agar medium to conventional media for detection of *Staphylococcus aureus* in respiratory samples. *J Clin Microbiol.* 2004;42(8):3566-9.
71. Blanc DS, Wenger A, Bille J. Evaluation of a novel medium for screening specimens from hospitalized patients to detect methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2003;41(8):3499-502.
72. Zambardi G, Reverdy ME, Bland S, Bes M, Freney J, Fleurette J. Laboratory diagnosis of oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* by a multiplex-

- polymerase chain reaction assay. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1994;19(1):25-31.
73. Boxerbaum B, Jacobs MR, Cechner RL. Prevalence and significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 1988;4(3):159-63.
74. Conway SP, Brownlee KG, Denton M, Peckham DG. Antibiotic treatment of multidrug-resistant organisms in cystic fibrosis. *Am J Respir Med*. 2003;2(4):321-32.
75. Givney R, Vickery A, Holliday A, Pegler M, Benn R. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a cystic fibrosis unit. *J Hosp Infect*. 1997;35(1):27-36.
76. Thomas SR, Gyi KM, Gaya H, Hodson ME. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: impact at a national cystic fibrosis centre. *J Hosp Infect*. 1998;40(3):203-9.
77. Widmer A. Impact of MRSA at a national cystic fibrosis centre [letter to the Editor]. *J Hosp Infect*. 1999;42:161-71.
78. Vriens MR, Fluit AC, Troelstra A, Verhoef J, van der WC. Is methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* more contagious than methicillin-susceptible *S. aureus* in a surgical intensive care unit? *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2002;23(9):491-4.

79. Heininger A, Binder M, Ellinger A, Pfisterer J, Botzenhart K, Unertl K, Doering G. Effect of comprehensive validation of the template isolation procedure on the reliability of bacteraemia detection by a 16S rRNA gene PCR. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10(5):452-8.
80. Kahl B, Herrmann M, Everding AS, Koch HG, Becker K, Harms E, Proctor RA, Peters G. Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis.* 1998;177(4):1023-9.
81. Kahl BC, Duebbers A, Lubritz G, Haeberle J, Koch HG, Ritzerfeld B, Reilly M, Harms E, Proctor RA, Herrmann M, Peters G. Population dynamics of persistent *Staphylococcus aureus* isolated from the airways of cystic fibrosis patients during a 6-year prospective study. *J Clin Microbiol.* 2003;41(9):4424-7.
82. Sadowska B, Bonar A, von Eiff C, Proctor RA, Chmiela M, Rudnicka W, Rozalska B. Characteristics of *Staphylococcus aureus*, isolated from airways of cystic fibrosis patients, and their small colony variants. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2002;32(3):191-7.
83. Trindade PA, McCulloch JA, Oliveira GA, Mamizuka EM. Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectives. *Braz J Infect Dis.* 2003;7(1):32-43.
84. Huang MB, Gay TE, Baker CN, Banerjee SN, Tenover FC. Two percent sodium chloride is required for susceptibility testing of staphylococci with

- oxacillin when using agar-based dilution methods. *J Clin Microbiol.* 1993;31(10):2683-8.
85. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(6):1292-305.
86. Deplano A, Tassios PT, Glupczynski Y, Godfroid E, Struelens MJ. In vivo deletion of the methicillin resistance *mec* region from the chromosome of *Staphylococcus aureus* strains. *J Antimicrob Chemother.* 2000;46(4):617-20.
87. Wielders CL, Vriens MR, Brisse S, Graaf-Miltenburg LA, Troelstra A, Fleer A, Schmitz FJ, Verhoef J, Fluit AC. In-vivo transfer of *mecA* DNA to *Staphylococcus aureus* [corrected]. *Lancet.* 2001;357(9269):1674-5.

APÊNDICE

QUADRO A. Resultados dos dados obtidos dos 106 pacientes com fibrose cística estudados

Paciente	Registro HC	No. da amostra	Data de coleta	Sítio	ATB no dia da coleta	Agudização	Prescrição de ATB	Internação	Bactérias identificadas pela cultura	Antibiograma <i>S. aureus</i> (TDD)	CIM ug/ml	Multiplex PCR			PCR <i>aroA</i>	PCR <i>mecA'</i>
												16S	<i>coa</i>	<i>mecA</i>		
1	6034710D	38	18/10/2000	E	garamicina inalatória	Sim	Sim	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
		95	12/6/2000	E	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+				
		150	22/1/2001	E	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
		237	21/3/2001	E	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
2	6016330E	92	12/6/2000	E		Sim	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Alcaligenes xylooxidans subs.xylooxidans</i> <i>Haemophilus influenzae</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
		181	14/2/2001	E	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
3	6056748I	202	3/1/2001	O		Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+				
4	6061996 G	26	16/10/2000	O		Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus parainfluenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina		+			-	
		194	21/2/2001	O		Não	Não	Não	<i>Streptococcus viridans</i> <i>Neisseria spp.</i>			+				
5	6026520E	48	30/10/2000	E		Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+				
		133	1/10/2001	E		Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+				
6	6018690I	9	28/9/2000	E	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina	> 256	+	+	+		+
		74	20/11/2000	E	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Neisseria spp.</i>	Sensível à oxacilina	1	+	+			

Paciente	Registro HC	No. da amostra	Data de coleta	Sítio	ATB no dia da coleta	Agudização	Prescrição de ATB	Internação	Bactérias identificadas pela cultura	Antibiograma <i>S. aureus</i> (TDD)	CIM ug/ml	Multiplex PCR			PCR <i>aroA</i>	PCR <i>mecA'</i>
												16S	<i>coa</i>	<i>mecA</i>		
7	6047007 G	65	13/11/2000	E	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>A.calcoaceticus</i> var. <i>anitratu</i> (<i>A.baumannii</i>)	Sensível à oxacilina		+	+			
		165	31/1/2001	E		Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Haemophilus parainfluenzae</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
		216	3/12/2001	E		Sim	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Neisseria</i> spp.	Sensível à oxacilina		+	+			
8	6019923J	3	25/9/2000	E		Sim	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Haemophilus parainfluenzae</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
		238	26/3/2001	E		Sim	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Haemophilus influenzae</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
9	6034652E	160	24/1/2001	O		Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+				
10	6046396 G	217	14/3/2001	O		Não	Não	Não	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
11	6020143I	68	16/11/2000	O		Não	Não	Não	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> <i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+	+		+	
		139	15/1/2001	E		Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Enterobacter cloacae</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
		235	21/3/2001	O		Não	Não	Não	<i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				

Paciente	Registro HC	No. da amostra	Data de coleta	Sítio	ATB no dia da coleta	Agudização	Prescrição de ATB	Internação	Bactérias identificadas pela cultura	Antibiograma S. aureus (TDD)	CIM ug/ml	Multiplex PCR			PCR aroA	PCR mecA'
												16S	coa	mecA		
12	6061545F	5	27/9/2000	O		Sim	Sim	Não	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
		76	23/11/2000	O		Não	Não	Não	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+	+		+	
		155	24/1/2001	O		Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus parainfluenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
		239	26/3/2001	O		Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Neisseria spp.</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
13	6031864 G	22	10/5/2000	E	garamicina inalatória	Sim	Sim	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Neisseria spp.</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+				
		97	12/11/2000	E	garamicina inalatória	Sim	Sim	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
		182	14/2/2001	E	garamicina inalatória	Sim	Sim	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Neisseria spp.</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
14	6051481H	137	15/1/2001	E		Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Haemophilus parainfluenzae</i> <i>Burkholderia cepacia</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
15	6071429F	19	10/5/2000	E	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Neisseria spp.</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				

Paciente	Registro HC	No. da amostra	Data de coleta	Sítio	ATB no dia da coleta	Agudização	Prescrição de ATB	Internação	Bactérias identificadas pela cultura	Antibiograma <i>S. aureus</i> (TDD)	CIM ug/ml	Multiplex PCR			PCR <i>aroA</i>	PCR <i>mecA'</i>
												16S	<i>coa</i>	<i>mecA</i>		
16	6018605I	18	10/5/2000	E		Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Haemophilus parainfluenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Resistente à oxacilina		+	+	+		
		64	13/11/2000	E	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+	+	+	+	+
		115	20/12/2000	E	IM + garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Neisseria spp.</i>	Resistente à oxacilina		+	+	+		
		206	3/5/2001	E	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Resistente à oxacilina		+	+	+		
		253	4/4/2001	E	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Resistente à oxacilina		+	+	+		
17	6015191J	94	12/6/2000	E	garamicina inalatória	Sim	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
		190	21/2/2001	E	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Enterobacter cloacae</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
18	6033937J	80	27/11/2000	E	garamicina inalatória	Sim	Sim	Sim	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Neisseria spp.</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+				
		130	1/10/2001	E	oral + garamicina inalatória	Sim	Sim	Sim	<i>Burkholderia cepacia</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+				
		157	24/1/2001	E	IM + garamicina inalatória	Não	Sim	Não	<i>Burkholderia cepacia</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
19	6032185A	32	16/10/2000	O		Não	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
		141	15/1/2001	O		Sim	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina		+	+			

Paciente	Registro HC	No. da amostra	Data de coleta	Sítio	ATB no dia da coleta	Agudização	Prescrição de ATB	Internação	Bactérias identificadas pela cultura	Antibiograma <i>S. aureus</i> (TDD)	CIM ug/ml	Multiplex PCR			PCR	PCR
												16S	coa	mecA	aroA	mecA'
20	6074959F	143	15/1/2001	E	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
		223	15/3/2001	E	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
		244	28/3/2001	E	ciprofloxacina oral + garamicina inalatória	Sim	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sensível à oxacilina		+			-	
21	6026604C	91	12/4/2000	E	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+				
		125	1/8/2001	E	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Haemophilus influenzae</i>	Sensível à oxacilina		+			-	
22	6017271B	13	10/4/2000	E	garamicina inalatória	Sim	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Haemophilus influenzae</i>	Sensível à oxacilina	1	+	+	+		+
		88	12/4/2000	E	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
		170	2/1/2001	E	amoxicilina oral + garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Neisseria spp.</i>	Sensível à oxacilina	1	+	+	+		+

Paciente	Registro HC	No. da amostra	Data de coleta	Sítio	ATB no dia da coleta	Agudização	Prescrição de ATB	Internação	Bactérias identificadas pela cultura	Antibiograma <i>S. aureus</i> (TDD)	CIM ug/ml	Multiplex PCR			PCR <i>aroA</i>	PCR <i>mecA'</i>
												16S	<i>coa</i>	<i>mecA</i>		
23	6019891F	31	16/10/2000	E	ciprofloxacina oral + garamicina inalatória	Sim	Sim	Sim	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Neisseria</i> spp.	Resistente à oxacilina		+	+	+		
		79	23/11/2000	E	azitromicina oral + colistina inalatória	Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Resistente à oxacilina		+	+	+		
		90	12/4/2000	E	azitromicina oral + colistina inalatória	Sim	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Neisseria</i> spp.	Resistente à oxacilina		+	+	+		
		100	12/11/2000	E	ciprofloxacina oral + colistina inalatória	Sim	Sim	Sim	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Resistente à oxacilina		+	+	+		
		123	1/8/2001	E	azitromicina oral + colistina inalatória	Sim	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Resistente à oxacilina		+	+	+		
		136	15/1/2001	E	ciprofloxacina oral + garamicina inalatória	Sim	Sim	Sim	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Neisseria</i> spp.	Resistente à oxacilina		+	+	+		
		214	3/12/2001	E	SMZ/TMP oral + colistina inalatória	Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Resistente à oxacilina	> 256	+			-	-
		236	21/3/2001	E	SMZ/TMP oral + colistina inalatória	Sim	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Neisseria</i> spp.	Resistente à oxacilina		+	+	+		
		243	26/3/2001	E	ciprofloxacina oral + colistina inalatória	Sim	Sim	Sim	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Resistente à oxacilina		+	+	+		

Paciente	Registro HC	No. da amostra	Data de coleta	Sítio	ATB no dia da coleta	Agudização	Prescrição de ATB	Internação	Bactérias identificadas pela cultura	Antibiograma S. aureus (TDD)	CIM ug/ml	Multiplex PCR			PCR aroA	PCR mecA'
												16S	coa	mecA		
24	6020792D	14	10/4/2000	E		Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
		89	12/4/2000	E		Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
		171	2/1/2001	E		Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina	0,75	+	+	+		+
25	6045338F	140	15/1/2001	E		Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Sensível à oxacilina	0,75	+	+	+		+
		195	21/2/2001	E		Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sensível à oxacilina	1	+	+	+		+
26	6031670E	33	16/10/2000	O		Não	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina		+			-	
		142	15/1/2001	O		Não	Não	Não	<i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
27	6060127I	20	10/5/2000	O		Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina		+			-	
28	6051382K	63	13/11/2000	O		Não	Não	Não	<i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
		148	22/1/2001	O		Não	Não	Não	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i>			+				
		218	14/3/2001	E	azitromicina oral	Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+	+	+	+	+
29	6091042K	132	1/10/2001	E		Sim	Sim	Não	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Flavimonas oryzihabitans</i>			+				

Paciente	Registro HC	No. da amostra	Data de coleta	Sítio	ATB no dia da coleta	Agudização	Prescrição de ATB	Internação	Bactérias identificadas pela cultura	Antibiograma S. aureus (TDD)	CIM ug/ml	Multiplex PCR			PCR aroA	PCR mecA'
												16S	coa	mecA		
30	6058181 G	131	1/10/2001	E	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Haemophilus influenzae</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
		179	2/12/2001	E	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
31	6036927I	250	4/2/2001	E	ciprofloxacina oral + garamicina inalatória	Sim	Sim	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>			+	+		+	
32	6071134I	220	14/3/2001	E		Sim	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Escherichia coli</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
33	6078145C	144	17/1/2001	O		Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
		228	19/3/2001	O		Sim	Sim	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
34	6073920 G	187	15/2/2001	O		Não	Não	Não	<i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+	+		+	
35	6097144H	10	9/28/2000	O		Não	Não	Não	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i>			+	+	+	+	+
		178	2/7/2001	O		Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Haemophilus parainfluenzae</i>	Resistente à oxacilina		+	+	+		
36	3170530H	1	25/9/2000	O		Sim	Sim	Não	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
		82	27/11/2000	O		Não	Não	Não	<i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i>			+				

Paciente	Registro HC	No. da amostra	Data de coleta	Sítio	ATB no dia da coleta	Agudização	Prescrição de ATB	Internação	Bactérias identificadas pela cultura	Antibiograma <i>S. aureus</i> (TDD)	CIM ug/ml	Multiplex PCR			PCR	PCR
												16S	coa	mecA	aroA	mecA'
37	6071972K	2	25/9/2000	O		Não	Não	Não	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
		81	27/11/2000	O		Não	Não	Não	<i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+	+		+	
38	6045833B	43	25/10/2000	E	garamicina inalatória	Sim	Sim	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
		98	12/11/2000	E		Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
		229	19/3/2001	E	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+				
39	6064604K	101	13/12/2000	O	ciprofloxacina oral	Sim	Sim	Não	<i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
		168	31/1/2001	O	ciprofloxacina oral + garamicina inalatória	Sim	Sim	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
		203	3/1/2001	O	amoxicilina + clavulanato oral + garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sensível à oxacilina		+			-	
40	6090357 G	197	22/2/2001	O		Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Neisseria</i> spp.	Sensível à oxacilina		+	+			
41	3312140K	23	16/10/2000	O		Não	Não	Não	<i>Escherichia coli</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
		110	20/12/2000	O		Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus parainfluenzae</i> <i>Escherichia coli</i>	Sensível à oxacilina		+			-	
		212	3/12/2001	O		Não	Não	Não	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+				

Paciente	Registro HC	No. da amostra	Data de coleta	Sítio	ATB no dia da coleta	Agudização	Prescrição de ATB	Internação	Bactérias identificadas pela cultura	Antibiograma <i>S. aureus</i> (TDD)	CIM ug/ml	Multiplex PCR			PCR <i>aroA</i>	PCR <i>mecA'</i>
												16S	<i>coa</i>	<i>mecA</i>		
42	6068776H	102	13/12/2000	O		Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
		183	14/2/2001	O		Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i>			+				
43	6050464E	78	23/11/2000	O		Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus parainfluenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Resistente à oxacilina	0,75	+	+			-
		119*	21/12/2000	O		Sim	Sim	Não	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>							
44	6110277B	153	22/1/2001	O		Sim	Sim	Não	<i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
45	6112637J	30	16/10/2000	O	SMZ/TMP oral	Sim	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
		198	22/2/2001	O	ciprofloxacina oral	Não	Não	Não	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
46	6046148F	8	28/9/2000	E		Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+				
		166	31/1/2001	E		Sim	Sim	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Haemophilus parainfluenzae</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
		254	4/4/2001	E		Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+	+		+	
47	6067042J	233	21/3/2001	O		Sim	Sim	Não	<i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				

Paciente	Registro HC	No. da amostra	Data de coleta	Sítio	ATB no dia da coleta	Agudização	Prescrição de ATB	Internação	Bactérias identificadas pela cultura	Antibiograma S. aureus (TDD)	CIM ug/ml	Multiplex PCR			PCR aroA	PCR mecA'
												16S	coa	mecA		
48	6083097I	51	30/10/2000	O		Sim	Sim	Não	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i>			+				
		58	11/6/2000	O	ciprofloxacina oral + garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
		174	2/5/2001	O		Não	Não	Não	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
		219	14/3/2001	O		Não	Não	Não	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+	+		+	
49	6025092J	161	24/1/2001	O		Sim	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Haemophilus parainfluenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
50	6023714K	247	4/2/2001	E		Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
51	6046480A	47	25/10/2000	E	amoxicilina oral	Sim	Sim	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+				
		245	28/3/2001	E		Sim	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
52	6025141H	7	27/9/2000	E		Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Resistente à oxacilina		+	+	+		
53	6041211J	93	12/6/2000	E		Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
		180	2/12/2001	E		Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina		+	+			

Paciente	Registro HC	No. da amostra	Data de coleta	Sítio	ATB no dia da coleta	Agudização	Prescrição de ATB	Internação	Bactérias identificadas pela cultura	Antibiograma <i>S. aureus</i> (TDD)	CIM ug/ml	Multiplex PCR			PCR <i>aroA</i>	PCR <i>mecA'</i>
												16S	<i>coa</i>	<i>mecA</i>		
54	6067013 G	16	10/4/2000	O		Não	Não	Não	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
		257	4/4/2001	O		Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Neisseria spp.</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
55	6056220J	25	16/10/2000	O	amoxicilina oral	Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
		192	21/2/2001	O		Não	Não	Não	<i>Neisseria spp.</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+	+	+	+	+
56	6049648D	6	27/9/2000	E	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Burkholderia cepacia</i>	Resistente à oxacilina		+	+	+		
		66	13/11/2000	E	garamicina inalatória	Sim	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Resistente à oxacilina		+	+	+		
		103	18/12/2000	E	cefalexina oral + garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Resistente à oxacilina		+	+	+		
		173	2/5/2001	E	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Resistente à oxacilina		+	+	+		
57	6021543J	21	10/5/2000	E	SMZ/TMP oral	Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
		106	18/12/2000	E		Sim	Sim	Não	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+	+		+	

Paciente	Registro HC	No. da amostra	Data de coleta	Sítio	ATB no dia da coleta	Agudização	Prescrição de ATB	Internação	Bactérias identificadas pela cultura	Antibiograma S. aureus (TDD)	CIM ug/ml	Multiplex PCR			PCR aroA	PCR mecA'
												16S	coa	mecA		
58	6020501 G	54	30/10/2000	E	amoxicilin a+ clavulanato oral + garamicina inalatória	Sim	Sim	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+		+		
		127	1/8/2001	E	ciprofloxacina oral	Sim	Sim	Não	<i>Pseudomonas</i> spp. <i>Corynebacterium</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i>			+	+		+	
		249	4/2/2001	E	quinolona oral	Não	Não	Não	<i>A.calcoaceticus var.anitratus (A.baumannii)</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+	+	+	+	+
59	6065800B	61	11/9/2000	O	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>			+				
		158	24/1/2001	O	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Neisseria subflava</i>			+	+		+	
60	6044569D	46	25/10/2000	E	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+				
		109	18/12/2000	E	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Neisseria</i> spp.			+				
		193	21/2/2001	E	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Neisseria</i> spp.			+	+		+	
61	6098609A	85	29/11/2000	E	garamicina inalatória	Sim	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i>	Resistente à oxacilina	> 256	+	+		-	
		117	20/12/2000	E	garamicina inalatória	Sim	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i>	Resistente à oxacilina		+	+	+		
		126	1/8/2001	E	SMZ/TMP oral + garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus parainfluenzae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Resistente à oxacilina		+	+	+		

Paciente	Registro HC	No. da amostra	Data de coleta	Sítio	ATB no dia da coleta	Agudização	Prescrição de ATB	Internação	Bactérias identificadas pela cultura	Antibiograma <i>S. aureus</i> (TDD)	CIM ug/ml	Multiplex PCR			PCR <i>aroA</i>	PCR <i>mecA'</i>	
												16S	<i>coa</i>	<i>mecA</i>			
62	6068550F	52	30/10/2000	O		Não	Não	Não	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+					
		114	20/12/2000	O		Não	Não	Não	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> <i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i>				+				
		135	15/1/2001	O		Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina			+	+			
		204	3/1/2001	O		Sim	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Alcaligenes xylosoxidans</i> subs. <i>denitrificans</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina			+	+			
63	6107877D	69	20/11/2000	O		Não	Não	Não	<i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i>				+				
		149	22/1/2001	O		Não	Não	Não	<i>Neisseira</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i>				+				
		222	15/3/2001	O		Não	Não	Não	<i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i>				+				
64	6063807E	53	30/10/2000	E		Sim	Sim	Sim	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Haemophilus influenzae</i>	Resistente à oxacilina	0,75	+	+			-	
		112	20/12/2000	O		Não	Não	Não	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> <i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>				+				
		189	19/2/2001	E		Sim	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Sensível à oxacilina			+	+			
		246	4/2/2001	E		Não	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina			+	+			

Paciente	Registro HC	No. da amostra	Data de coleta	Sítio	ATB no dia da coleta	Agudização	Prescrição de ATB	Internação	Bactérias identificadas pela cultura	Antibiograma <i>S. aureus</i> (TDD)	CIM ug/ml	Multiplex PCR			PCR	PCR
												16S	coa	mecA	aroA	mecA'
65	6109602F	45	25/10/2000	O		Não	Não	Não	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+				
		59	11/8/2000	O	amoxicilina oral	Não	Não	Não	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+				
		138	15/1/2001	O	amoxicilina oral	Sim	Sim	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+				
		213	3/12/2001	O	cefaclor oral	Não	Não	Não	<i>Streptococcus viridans</i>			+	+	+	+	+
66	6041688J	200	22/2/2001	E		Sim	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sensível à oxacilina	1,5	+	+	+		+
67	6015430F	62	11/9/2000	E	rifampicina oral + garamicina inalatória	Sim	Sim	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
		99	12/11/2000	E	azitromicina oral + garamicina inalatória	Sim	Sim	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>			+				
		169	31/1/2001	E	azitromicina oral + garamicina inalatória	Sim	Sim	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+				
68	6058545J	186	15/2/2001	E	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Citrobacter freundii</i>			+				
69	6050253F	15	10/4/2000	E		Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
		42	25/10/2000	E	ciprofloxacina oral + garamicina inalatória	Sim	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina		+			-	
		256	4/4/2001	E		Sim	Sim	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+				

Paciente	Registro HC	No. da amostra	Data de coleta	Sítio	ATB no dia da coleta	Agudização	Prescrição de ATB	Internação	Bactérias identificadas pela cultura	Antibiograma S. aureus (TDD)	CIM ug/ml	Multiplex PCR			PCR aroA	PCR mecA'
												16S	coa	mecA		
70	6077930F	44	25/10/2000	O	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
		146	18/1/2001	O	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Moraxella</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+	+		+	
		230	19/3/2001	O		Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus agalactiae</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
71	6044448D	128	1/8/2001	E	garamicina inalatória	Sim	Sim	Sim	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Neisseria</i> spp.	Sensível à oxacilina		+	+			
		209	3/5/2001	O	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sensível à oxacilina		+			-	
		242	26/3/2001	E	garamicina inalatória	Sim	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Neisseria</i> spp.	Sensível à oxacilina		+	+			
72	6045488I	167	13/1/2001	E		Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Haemophilus parainfluenzae</i> <i>Neisseria</i> spp.			+	+		+	
73	6054668F	28	16/10/2000	O	cefadroxil oral	Sim	Sim	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Haemophilus parainfluenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+				
		83	27/11/2000	O		Sim	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
		154	24/1/2001	O	SMZ/TMP oral	Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sensível à oxacilina		+			+	
		224	15/3/2001	O		Sim	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina		+	+			

Paciente	Registro HC	No. da amostra	Data de coleta	Sítio	ATB no dia da coleta	Agudização	Prescrição de ATB	Internação	Bactérias identificadas pela cultura	Antibiograma <i>S. aureus</i> (TDD)	CIM ug/ml	Multiplex PCR			PCR <i>aroA</i>	PCR <i>mecA'</i>
												16S	<i>coa</i>	<i>mecA</i>		
74	6016385 G	27	16/10/2000	O		Não	Não	Não	<i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
		172	2/1/2001	O		Não	Não	Não	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> <i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+	+	+	+	+
75	6054204K	87	12/4/2000	O	garamicina inalatória	Sim	Sim	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Haemophilus influenzae</i>			+	+	+	+	+
		210	3/5/2001	O	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Neisseria</i> spp.	Sensível à oxacilina		+			-	
76	6034751B	29	16/10/2000	E	garamicina inalatória	Sim	Sim	Sim	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
		176	2/7/2001	E	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Burkholderia cepacia</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
77	6051478D	41	23/10/2000	O		Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+				
		124	1/8/2001	O	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
		232	21/3/2001	O	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i>			+				

Paciente	Registro HC	No. da amostra	Data de coleta	Sítio	ATB no dia da coleta	Agudização	Prescrição de ATB	Internação	Bactérias identificadas pela cultura	Antibiograma S. aureus (TDD)	CIM ug/ml	Multiplex PCR			PCR aroA	PCR mecA'
												16S	coa	mecA		
78	6071857E	50	30/10/2000	E	ciprofloxacina oral	Sim	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sensível à oxacilina	0,75	+	+	+		+
		75	22/11/2000	E	garamicina inalatória	Sim	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sensível à oxacilina	> 256	+	+	+		+
		104	18/12/2000	E	ciprofloxacina oral + garamicina inalatória	Sim	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Resistente à oxacilina	> 256	+	+	+		
		231	19/3/2001	E	garamicina inalatória	Sim	Sim	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Haemophilus influenzae</i>			+				
		251	4/2/2001	E	ciprofloxacina oral + garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+	+	+	+	+
79	6030977B	71	20/11/2000	E	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+				
		118	20/12/2000	E	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+				
		151	22/1/2001	E	garamicina inalatória	Sim	Sim	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+				
80	6073011A	17	10/4/2000	O		Sim	Sim	Não	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+	+		+	
		86	29/11/2000	O		Não	Não	Não	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+				
		248	4/2/2001	O		Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Neisseria spp.</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+				
81	6055516K	73	20/11/2000	O		Não	Não	Não	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Neisseria spp.</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+				
		162	29/1/2001	O		Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina		+				-

Paciente	Registro HC	No. da amostra	Data de coleta	Sítio	ATB no dia da coleta	Agudização	Prescrição de ATB	Internação	Bactérias identificadas pela cultura	Antibiograma S. aureus (TDD)	CIM ug/ml	Multiplex PCR			PCR aroA	PCR mecA'
												16S	coa	mecA		
82	6057740A	24	16/10/2000	O	amoxicilina oral	Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina		+			-	
		107	18/12/2000	O		Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina		+			-	
		199	22/2/2001	O		Não	Não	Não	<i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
83	6097227 G	72	20/11/2000	O		Não	Não	Não	<i>Moraxella</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i>			+				
		163	29/1/2001	O		Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina		+			-	
84	6057739F	4	27/9/2000	E		Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
		77	23/11/2000	E		Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
		156	24/1/2001	E		Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus parainfluenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
		240	26/3/2001	E		Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
85	6010800B	191	21/2/2001	E		Sim	Sim	Sim	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
86	6023055D	49	30/10/2000	E	garamicina inalatória	Sim	Sim	Sim	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
		175	2/7/2001	E	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Resistente à oxacilina		+	+	+		
		221	14/3/2001	E	garamicina inalatória	Sim	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Resistente à oxacilina		+	+	+		

Paciente	Registro HC	No. da amostra	Data de coleta	Sítio	ATB no dia da coleta	Agudização	Prescrição de ATB	Internação	Bactérias identificadas pela cultura	Antibiograma S. aureus (TDD)	CIM ug/ml	Multiplex PCR			PCR aroA	PCR mecA'
												16S	coa	mecA		
87	6063702C	55	30/10/2000	O		Não	Sim	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+	+	+	+	+
		196	21/2/2001	E	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+	+	+	+	+
		225	15/3/2001	E	oral + garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>			+	+	+	+	+
88	6024837D	108	18/12/2000	E	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+				
		205	3/1/2001	E	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>			+	+		+	
89	6065943E	96	12/6/2000	E		Não	Não	Não	<i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Neisseria spp.</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+				
		159	24/1/2001	E		Não	Sim	Não	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
		227	19/3/2001	E		Não	Não	Não	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
90	6074546F	57	11/6/2000	O	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Neisseria spp.</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
		129	1/10/2001	O	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+	+	+	+	+
		226	19/3/2001	O	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+	+	+	+	+
91	6049357C	152	22/1/2001	O		Não	Não	Não	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+				

Paciente	Registro HC	No. da amostra	Data de coleta	Sítio	ATB no dia da coleta	Agudização	Prescrição de ATB	Internação	Bactérias identificadas pela cultura	Antibiograma <i>S. aureus</i> (TDD)	CIM ug/ml	Multiplex PCR			PCR <i>aroA</i>	PCR <i>mecA'</i>
												16S	<i>coa</i>	<i>mecA</i>		
92	6025232F	11	10/2/2000	E	garamicina inalatória	Não	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina	1,5	+	+	+		+
		60	11/9/2000	E	garamicina inalatória	Sim	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
		121*	21/12/2000	E	ciprofloxacina oral + garamicina inalatória	Sim	Sim	Sim	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>							
		145	17/1/2001	E	cefalexina oral + garamicina inalatória	Não	Sim	Não	<i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+	+		+	
		234	21/3/2001	E		Sim	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
93	6033866F	34	16/10/2000	O	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina		+			-	
		105	18/12/2000	O	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina	0,75	+	+	+		+
94	6090453 G	147	18/1/2001	O		Sim	Sim	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i>			+				
		211	3/5/2001	O		Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina	1	+	+	+		-
95	6059997E	40	23/10/2000	O	garamicina inalatória	Sim	Sim	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+				
		67	16/11/2000	E	garamicina inalatória	Sim	Sim	Sim	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+				
		164	31/1/2001	O	garamicina inalatória	Sim	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Resistente à oxacilina	> 256	+	+			-
		255	4/4/2001	E	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Resistente à oxacilina	> 256	+	+	+		

Paciente	Registro HC	No. da amostra	Data de coleta	Sítio	ATB no dia da coleta	Agudização	Prescrição de ATB	Internação	Bactérias identificadas pela cultura	Antibiograma S. aureus (TDD)	CIM ug/ml	Multiplex PCR			PCR aroA	PCR mecA'
												16S	coa	mecA		
96	6056656A	84	29/11/2000	O		Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Haemophilus parainfluenzae</i> <i>Neisseria</i> spp.			+				
		122	1/8/2001	O		Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Haemophilus influenzae</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
		207	3/5/2001	O		Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+				
97	6021251J	56	30/10/2000	O	garamicina inalatória	Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Resistente à oxacilina		+	+	+		
		208	3/5/2001	O	garamicina inalatória	Não	Não	Sim	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Resistente à oxacilina		+	+	+		
		241	26/3/2001	E	garamicina inalatória	Sim	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Resistente à oxacilina		+	+	+		
98	6091681I	184	14/2/2001	O		Não	Não	Não	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+	+		+	
99	6052606C	39	23/10/2000	E		Não	Sim	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+				
		113	20/12/2000	E	garamicina inalatória	Não	Sim	Não	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+	+		+	
		188	19/2/2001	E		Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
100	6057239D	70	20/11/2000	O		Não	Não	Não	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Neisseria</i> spp.			+				

Paciente	Registro HC	No. da amostra	Data de coleta	Sítio	ATB no dia da coleta	Agudização	Prescrição de ATB	Internação	Bactérias identificadas pela cultura	Antibiograma S. aureus (TDD)	CIM ug/ml	Multiplex PCR			PCR	PCR
												16S	coa	mecA	aroA	mecA'
101	6071991F	36	18/10/2000	O		Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i>			+				
		120*	21/12/2000	O		Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i>							
		201	3/1/2001	O		Não	Não	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+				
102	6076947A	37	18/10/2000	O		Não	Não	Não	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+				
		185	15/2/2001	O		Não	Não	Não	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+	+		+	
103	6091354E	177	2/7/2001	O	cloranfenicol oral	Não	Não	Não	<i>Burkholderia cepacia</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+	+	+	+	-
		252	4/4/2001	O		Sim	Sim	Sim	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+	+		+	
104	6033238D	134	15/1/2001	E	garamicina inalatória	Sim	Sim	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coagulase neg</i>			+				
105	6065064A	12	10/4/2000	E		Não	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
		111	20/12/2000	E		Não	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Acinetobacter</i> spp.	Sensível à oxacilina		+	+			
		215	3/12/2001	E		Sim	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sensível à oxacilina		+	+			

Paciente	Registro HC	No. da amostra	Data de coleta	Sítio	ATB no dia da coleta	Agudização	Prescrição de ATB	Internação	Bactérias identificadas pela cultura	Antibiograma <i>S. aureus</i> (TDD)	CIM ug/ml	Multiplex PCR			PCR <i>aroA</i>	PCR <i>mecA'</i>
												16S	<i>coa</i>	<i>mecA</i>		
106	6022052A	35	17/10/2000	E		Sim	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível à oxacilina		+	+			
		116	20/12/2000	E		Sim	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sensível à oxacilina		+	+			

HC: Hospital das Clínicas

ATB: antibiótico

TDD: Teste de Difusão de Discos

CIM: concentração inibitória mínima pela técnica do E Test

mecA': PCR para amplificação de fragmento de outra região do gene *mecA*

E: escarro

O: orofaringe

* amostra excluída por extravio

SMZ/TMP: sulfametoxazol / trimetoprim

IM: intramuscular

Cor azul: discordância por presença de *coa* no multiplex PCR

Cor verde: discordância por presença de *mecA* no multiplex PCR

Cor amarela: discordância por falta de banda no multiplex PCR

Cor lilás: discordância do reteste de PCR com o multiplex PCR

QUADRO B. Descrição da evolução clínica dos pacientes em exacerbação pulmonar cujos resultados das técnicas de *multiplex* PCR e de cultura com teste de difusão de discos foram discordantes

Paciente	No. da amostra	Data de coleta	Sítio	ATB no dia da coleta	Agudização	Prescrição de ATB	Internação	Bactérias identificadas pela cultura	Antibiograma <i>S. aureus</i> (TDD)	CIM ug/ml	Multiplex PCR			PCR <i>aroA</i>	PCR <i>mecA'</i>	Evolução clínica
											16S	<i>coa</i>	<i>mecA</i>			
20	244	28/3/2001	E	ciprofloxacina oral + garamicina inalatória	Sim	Sim: manteve ciprofloxacina 14 dias	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sensível a oxacilina / ciprofloxacina		+			-		Melhora
22	13	10/4/2000	E	garamicina inalatória	Sim	Sim: ciprofloxacina oral 14 dias	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Haemophilus influenzae</i>	Sensível a oxacilina / ciprofloxacina	1	+	+	+		+	Melhora
31	250	4/2/2001	E	ciprofloxacina oral + garamicina inalatória	Sim	Sim: manteve ciprofloxacina 14 dias	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>			+	+		+		Melhora
57	106	18/12/2000	E		Sim	Sim: SMZ/TMP oral	Não	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coag. neg</i>			+	+		+		Melhora
58	127	1/8/2001	E	ciprofloxacina oral	Sim	Sim: manteve ciprofloxacina 21 dias	Não	<i>Pseudomonas spp.</i> <i>Corynebacterium spp.</i> <i>Streptococcus viridans</i>			+	+		+		Melhora
61	85	29/11/2000	E	garamicina inalatória	Sim	Sim: ciprofloxacina oral 14 dias	Não	<i>Staphylococcus aureus</i>	Resistente a oxacilina / ciprofloxacina	> 256	+	+			-	Melhora
64	53	30/10/2000	E		Sim	Sim: oxacilina + ceftazidima + amicacina IV 14 dias	Sim	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Haemophilus influenzae</i>	Resistente à oxacilina	0,75	+	+			-	Melhora
66	200	22/2/2001	E		Sim	Sim: ciprofloxacina oral 14 dias	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sensível à oxacilina	1,5	+	+	+		+	Melhora

Paciente	No. da amostra	Data de coleta	Sítio	ATB no dia da coleta	Agudização	Prescrição de ATB	Internação	Bactérias identificadas pela cultura	Antibiograma S. aureus (TDD)	CIM ug/ml	Multiplex PCR			PCR aroA	PCR mecA'	Evolução clínica
											16S	coa	mecA			
69	42	25/10/2000	E	ciprofloxacina oral + garamicina inalatória	Sim	Sim	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus viridans</i>	Sensível a oxacilina / ciprofloxacina		+			-		Dados não disponíveis
75	87	12/4/2000	O	garamicina inalatória	Sim	Sim: ciprofloxacina oral 14 dias	Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Haemophilus influenzae</i>			+	+	+	+	+	Melhora
78	50	30/10/2000	E	ciprofloxacina oral	Sim	Sim: ciprofloxacina oral 14 dias	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sensível à oxacilina / resistente à ciprofloxacina	0,75	+	+	+		+	Melhora parcial
	75	22/11/2000	E	garamicina inalatória	Sim	Sim: cefadroxil oral 14 dias + amicacina IM 10 dias	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sensível a oxacilina / ciprofloxacina	> 256	+	+	+		+	Manutenção dos sintomas
80	17	10/4/2000	O		Sim	Sim: cloranfenicol oral 14 dias	Não	<i>parainfluenzae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coag. neg</i>			+	+		+		Melhora
95	164	31/1/2001	O	garamicina inalatória	Sim	Sim: ciprofloxacina 14 dias	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Resistente a oxacilina / ciprofloxacina	> 256	+	+			-	Melhora
103	252	4/4/2001	O		Sim	Sim: ciprofloxacina IV 14 dias	Sim	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Neisseria spp.</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus coag. neg</i>			+	+		+		Melhora

HC: Hospital das Clínicas

ATB: antibiótico

TDD: Teste de Difusão de Discos

CIM: concentração inibitória mínima pela técnica do E Test

mecA': PCR para amplificação de fragmento de outra região do gene mecA

E: escarro

O: orofaringe

* amostra excluída por extravio

SMZ/TMP: sulfametoxazol / trimetoprim

IM: intramuscular

IV: intravenoso

Cor azul: discordância por presença de coa no multiplex PCR

Cor verde: discordância por presença de mecA no multiplex PCR

Cor amarela: discordância por falta de banda no multiplex PCR

Cor lilás: discordância do reteste de PCR com o multiplex PCR

Cor laranja: pacientes em agudização e com amostras discrepantes