

Eletofórese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica

Pulsed field gel electrophoresis use in bacteriology – a technical review

RIALA6/1033

Vanda D. MAGALHÃES³; Joseane C. FERREIRA¹; Cristiane BARELLI²; Ana Lúcia C. DARINI^{1*}

* Endereço para correspondência: ¹ Laboratório de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto – SP) Brasil

¹ Laboratório de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto – SP) Brasil

² Curso de Farmácia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Passo Fundo (Passo Fundo – RS) Brasil

³ Centro de Pesquisa Experimental do Instituto de Ensino e Pesquisa Albert Einstein (São Paulo – SP) Brasil

Recebido: 22/10/2004 – Aceito para publicação: 01/08/2005

RESUMO

PFGE (“pulsed field gel eletrophoresis”) é a sigla usada para indicar qualquer técnica de eletrofórese apropriada para separar grandes fragmentos de DNA, por meio da reorientação do DNA em gel pela ação de campos elétricos alternados. Esta técnica é reconhecida como padrão ouro para identificação de linhagens bacterianas, fúngicas e de protozoários. O principal objetivo deste estudo de revisão é o da elucidação dos fundamentos da técnica de PFGE ou eletrofórese de campo pulsante aplicada em estudo com bactéria. Sua resolução depende de uma série de fatores como: voltagem, concentração de agarose, temperatura, solução tamponante, tempo de pulso e de corrida eletroforética. A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos nesse tipo de eletrofórese é fundamental para a otimização e obtenção dos resultados apropriados.

Palavras-Chaves. epidemiologia molecular, métodos moleculares, genotipagem bacteriana, PFGE.

ABSTRACT

PFGE (“pulsed field gel electrophoresis”) is an electrophoresis technique suitable for separating large fragments of DNA by means of DNA reorientation in agarose gel from the effects of alternated electric fields. This technique is considered as gold standard for performing bacteria, yeast and protozoa strains identification. The main objective of the present review is to update the PFGE technical basis for being suitable for bacteria studies. Its resolution depends on a series of factors such as agarose concentration, temperature, buffer solution, pulse time, and running time. Understanding the involved molecular mechanisms in this type of electrophoresis technique is fundamental for maximizing and attaining accurate analysis results.

Key Words. molecular epidemiology, molecular methods, bacterial genotyping, PFGE.

SUMÁRIO

Introdução	156
A teoria por detrás do método	156
Fatores que afetam o PFGE	156
Aplicações	159
A interpretação de PFGE para identificação de linhagens bacterianas	159
Abreviações	160
Referências	160

INTRODUÇÃO

A eletroforese em gel de agarose é a técnica mais difundida para separação de moléculas de DNA com relação ao tamanho. A matriz formada pela agarose atua como filtro molecular, cuja porosidade é inversamente proporcional à concentração do gel de agarose. Durante a eletroforese, as moléculas de DNA se posicionam em paralelo ao campo elétrico; a dificuldade de transpor a matriz de agarose em direção ao pólo positivo é inversamente proporcional ao tamanho de cada molécula. As menores migram mais rapidamente possibilitando a separação por tamanho ou peso molecular. Assim, quanto maior a molécula, maior o tempo de migração, possibilitando a separação dos fragmentos, qualquer que seja o tamanho. Na prática, um gel de agarose a 0,8% é apropriado para separação de fragmentos de 0,5 até 20-30 kb, aproximadamente. Géis com maiores concentrações (2,5 até 3%) separam fragmentos menores (80 até 500 pb); uma alternativa, nestes casos, é o gel de poliacrilamida. Géis de agarose a 0,5% separam fragmentos com até 50 kb, porém, são bastante frágeis e o tempo de corrida é excessivamente demorado¹. Moléculas de DNA maiores que 50 kb são de difícil separação, mesmo com a diminuição da concentração de agarose, pois sua mobilidade eletroforética se torna independente do tamanho do fragmento².

A solução do problema foi dada por Schwartz e Cantor³ com o desenvolvimento da técnica de eletroforese de campo pulsante (também traduzida por eletroforese de campos pulsados) que, originalmente, foi usada para separação de cromossomos da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Esses pesquisadores, com base nas experimentações realizadas no início dos anos 70, relataram que as moléculas de DNA que foram estiradas pela ação de um campo elétrico demandavam um maior ou menor tempo para o relaxamento, e que era proporcional ao tamanho da molécula, depois de cessada a ação do campo de força⁴.

Segundo Birren e Lai⁵ “*pulsed field*” se aplica a qualquer modalidade de eletroforese que utilize mais que um campo elétrico direcionado de forma alternada. Quando ocorre troca na direção do campo elétrico, as moléculas de DNA são compelidas à reorientação, para se posicionarem de forma paralela ao campo de força, antes de migrarem para a direção do pólo positivo. Os fragmentos menores se reorientam com maior facilidade que os maiores, que demoram mais para se adaptarem à nova direção. O tempo entre as mudanças de orientação pelo campo elétrico é chamado tempo de pulso (*switch time*). A partir de 1984 vários protocolos empíricos surgiram com o intuito de otimizar a separação de grandes moléculas de DNA, ou seja, de alto peso molecular. Os diferentes métodos resultantes podem ser agrupados em: aqueles que alternam campos elétricos transversais (CHEF, ROFE, PACE, PHOGE, OFAGE, TAFE), entre os quais o CHEF é o mais difundido, e os que utilizam alternância de campos elétricos invertidos (FIGE, ZIFE). Estas siglas e nomenclaturas complexas (ver final) mais refletem interesses econômicos do que informações de interesse científico. De modo

geral, qualquer uma destas técnicas possibilita a separação de grandes fragmentos de DNA (~600 kb) ou ainda de cromossomos inteiros.

A teoria por detrás do método

As teorias da separação de DNA por eletroforese são bastante elaboradas. Não existe um modelo exclusivo aplicável a todas as experimentações⁶. As limitações topográficas do gel produzem importante efeito sobre a molécula de DNA. A teoria introduzida por Gennes⁷ pressupõe que o polímero se movimenta como se estivesse dentro de um tubo. Outros autores^{8,9} desenvolveram a teoria que se tornou conhecida como o modelo de reptação. Este modelo explica razoavelmente a mobilidade do DNA em campos elétricos fixos, porém, não prevê que a molécula de DNA assuma a configuração dobrada no gel (em grampo) como freqüentemente ocorre na prática.

Com o intuito de obter dados a respeito da migração de moléculas de DNA através de gel de agarose, tanto em eletroforese convencional quanto em eletroforese de campo pulsante, utilizou-se a técnica de microscopia de fluorescência e corantes que intercalam a dupla hélice do DNA, como brometo de etídeo, alaranjado de acridina ou YOYO-1^{10,11}. Estes experimentos mostraram que, em eletroforese convencional, as moléculas de DNA migram com movimentos cíclicos que envolvem compactação e alongamento do polímero, sempre em paralelo ao campo elétrico aplicado, à semelhança dos movimentos da lagarta. As formas alongadas se devem ao fato da molécula ficar comprimida na porosidade do gel, enquanto que uma das extremidades (a “cabeça”) é atraída para o pólo positivo. Quando a molécula comprimida consegue se desprender, um novo ciclo é iniciado. A extremidade que irá guiar o movimento, ou seja, qual delas será a “cabeça” no próximo ciclo de migração, é aleatória e depende de qual extremidade encontrará primeiro a passagem através da matriz de agarose¹⁰. O processo é claramente dependente do tamanho da molécula, razão pela qual os polímeros maiores que 20-30 kb não são passíveis de separação por eletroforese convencional.

Na eletroforese de campo pulsante, ao se alterar a direção do campo elétrico com ângulo de 120°, a extremidade que lidera o movimento também é alterada. A cada mudança na direção do campo de força, os movimentos iniciais das moléculas ocorrem a partir da extremidade que era “cauda”, cujo posicionamento, obviamente, depende do tamanho da molécula. Quanto maior a molécula, mais distante estará a “cauda”, em comparação com uma molécula de menor tamanho, razão pela qual a velocidade de migração depende do tamanho do fragmento de DNA¹¹.

Fatores que afetam o PFGE

A resolução de PFGE depende de vários fatores (Tabela 1) como: composição e concentração de agarose, solução tamponante, tensão da corrente elétrica (voltagem), tempo de pulso e tempo de corrida eletroforética. Outros fatores como o grau de uniformidade, a força relativa dos campos elétricos, o ângulo entre os campos elétricos que se alternam (de acordo

com o aparelho empregado), a temperatura de corrida (Figura 1) e ainda, a integridade do DNA também podem afetar o limite de resolução da técnica^{2,12}.

Nos estudos iniciais, Schwartz e Cantor³ utilizaram gradientes de campo de força (não homogêneo), o que resultava em trajetórias curvas das moléculas de DNA. Em 1986, com o desenvolvimento, da técnica de campo elétrico homogêneo com eletrodos hexagonais, se tornou possível a separação de bandas das diferentes amostras de DNA o que facilitou sua comparação¹³.

Tabela 1. Parâmetros gerais de corrida eletroforética para separação de diferentes tamanhos de DNA

DNA (kb)	10 a 50	<100	100 a 2000	2000 a 6000
% agarose	1,2	1,2	1,2	0,6
TBE (X)	0,15	0,15 a 0,5	0,5	0,5
Voltagem	450	300	165 a 200	40 a 100
Tempo de pulso	0,3 a 1 s	1 a 10 s	10 a 120 s	3 a 75min.
Tempo de corrida	1 a 4 h	1 a 6 h	17 a 24 h	1 a 3 dias

(adaptação do manual do “Gene Navigator” – Amersham Biosciences)
Kb: Kilobase; TBE: Tampão Tris – Ácido Bórico – EDTA; s: segundos; h: horas.

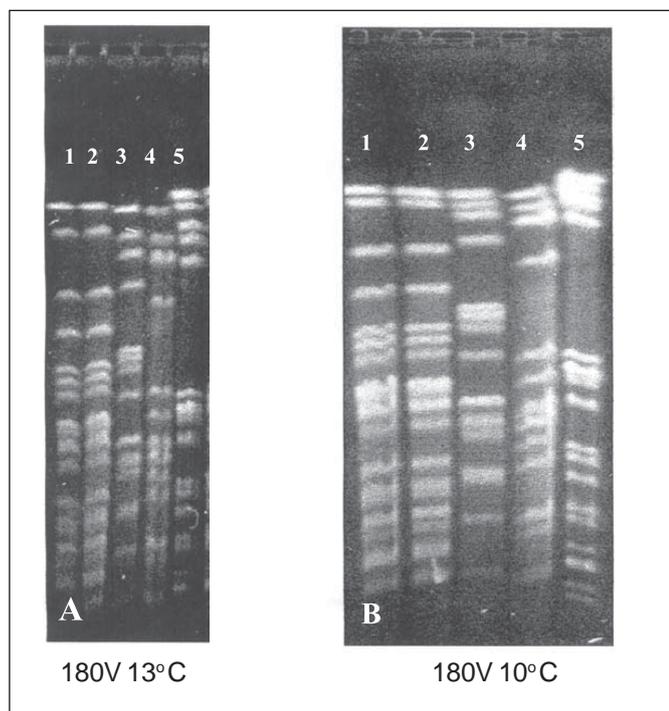


Figura 1. DNA cromossômico de amostras de *Staphylococcus aureus*, após macrorestrição com *Sma* I. PFGE realizada em aparelho Gene Navigator (Amersham Biosciences). A voltagem utilizada em ambos os géis foi de 180V, mas em duas condições de temperaturas diferentes, em A 13°C e em B 10°C. As condições de pulso foram idênticas sendo 25 segundos por 2 horas, 8 segundos por 4 horas e 0,5 segundo por 1 hora. As amostras são correspondentes em ambos os géis.

Pulsos elétricos de diferentes durações favorecem a reorientação de moléculas de DNA de diferentes tamanhos. A duração do tempo de pulso é o fator mais importante para determinação da faixa de tamanho de fragmentos a serem separados¹⁴. A duração do pulso deverá possibilitar a reorientação e a migração do polímero para uma nova direção. Pulsos mais longos possibilitam a reorientação de moléculas grandes; pulsos curtos reorientam tão somente as pequenas moléculas de DNA². Além disso, a ordem pela qual os diferentes pulsos são aplicados, também altera a resolução dos fragmentos identificados no gel (Figura 2).

A força do campo elétrico aplicado deve ser inversamente proporcional ao tamanho das moléculas de DNA que se deseja separar, ou seja, quanto maior o fragmento, menor deverá ser a tensão. Voltagem ou correntes altas podem diminuir a resolução. Alterações na tensão deverão ser compensadas com alterações no tempo de pulso para que os resultados sejam satisfatórios. Para separar moléculas de DNA bacteriano de até 1,5 Mb geralmente utiliza-se 6 V/cm (medida entre dois eletrodos opostos). Para separar cromossomos de *Neurospora crassa*, por exemplo, é utilizada um campo de 1,5 V/cm¹⁴.

O ângulo mais frequentemente utilizado em PFGE é o de 120°, que é o ângulo do aparelho CHEF-DRII (Bio-Rad) e do Gene Navigator (Amersham Biosciences), amplamente utilizados

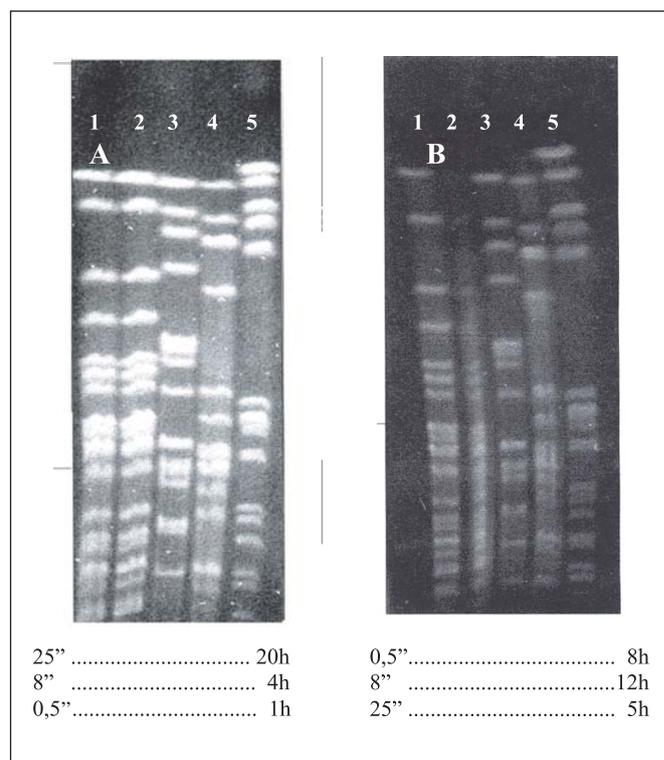


Figura 2. DNA cromossômico de amostras de *Staphylococcus aureus*, após macrorestrição com enzima *Sma* I em duas condições diferentes de pulsos especificadas em, A e B. A voltagem utilizada foi de 180V e a temperatura 13°C em ambos os géis. As amostras são correspondentes em ambos os géis.

pelos laboratórios de pesquisa. Nesses aparelhos as distâncias entre os eletrodos são distintas, e a tensão é adaptada de acordo com o equipamento empregado. Ângulos maiores reduzem a velocidade de migração, enquanto que ângulos menores possibilitam um substancial aumento na velocidade de migração de fragmentos maiores¹⁴. A forma de migração de fragmentos de DNA é dependente dos ângulos formados entre os campos elétricos que se alternam, como ficou evidenciado por experimentos de microscopia¹¹.

A condutividade da solução tamponante depende de sua concentração e volume. Assim, quanto maior a quantidade de solução tamponante usada, maior será a corrente elétrica, alterando a resolução da corrida eletroforética. Se a concentração da solução tamponante for aumentada, a resolução da corrida também será alterada, dificultando a separação dos fragmentos maiores, aumentando a corrente elétrica e a geração de calor. Neste caso, a temperatura de refrigeração deverá ser diminuída, para que este parâmetro não altere a eletroforese. Uma solução tamponante inadequada poderá resultar em baixa resolução na separação de fragmentos (Figura 3). Rotineiramente é usada solução tamponante TBE (Tris, Ácido Bórico, EDTA) com concentração de 0,5X. Entretanto, o Tris foi relatado como agente de degradação do DNA, e alguns autores obtiveram melhores resultados com o uso de outra solução tamponante, como o HEPES (N-[2-Hydroxyethyl] piperazine – N'-[2-ethanesulfonic acid])^{15,16,17}.

Melhor resolução na separação dos fragmentos eletroforéticos é obtida com o aumento da concentração de agarose, como na eletroforese horizontal, o que também interfere no tempo necessário para separação dos fragmentos. Com o uso de gel mais concentrado é necessário maior tempo de corrida,

porém com concentração mais baixa a separação dos fragmentos pode não ocorrer satisfatoriamente. Na prática, a concentração máxima de agarose usada varia de 1,2 a 2%.

Alterações na temperatura de corrida interferem na resolução, pois quanto maior a temperatura, mais rápida será a migração das moléculas¹⁴. Temperaturas de 8 até 15°C são as mais utilizadas.

A qualidade do DNA preparado para a corrida eletroforética é de fundamental importância. Como o objetivo é a separação de fragmentos de alto peso molecular, é imprescindível assegurar sua integridade. Moléculas grandes de DNA em solução, normalmente utilizadas nas preparações convencionais sofrem danos proporcionais ao quadrado de seu peso molecular². Assim, a extração de DNA cromossômico a ser usado em PFGE é feita com a incorporação das células bacterianas a serem lisadas em blocos de agarose, que proporciona proteção mecânica às moléculas de DNA. Durante o preparo dos blocos, a proporção entre as células bacterianas e a agarose, “low melting” ou ultra pura, deve ser 1:1, pois o excesso de agarose produz blocos rígidos, que dificultam a posterior digestão do DNA, bem como, nas etapas de lavagem, a remoção dos interferentes (proteínas, DNAses, etc.)⁵. Contrariamente, se a concentração de agarose for menor, o bloco terá consistência mole e pode ser destruído durante o processo de lavagem. A agarose “low melting” facilita o trabalho de confecção dos blocos, pois possibilita trabalhar com temperatura em torno de 37°C, entretanto, é possível confeccioná-los utilizando agarose ultra pura (Gibco), mas a temperatura na preparação dos blocos deve ser mantida em torno de 45°C. Este procedimento requer grande quantidade de enzimas líticas e/ou de restrição e maior tempo de digestão que os usados em metodologias convencionais, pois é preciso que as enzimas atravessem as barreiras impostas pela agarose. São também necessárias lavagens exaustivas para se eliminar traços das enzimas líticas que poderão afetar as etapas subsequentes. Outro aspecto importante no preparo das moléculas de DNA cromossômico de alto peso molecular é a proteção do material contra DNAses que são ativadas pela lise celular. Com este intuito é usada uma solução contendo um agente quelante em alta concentração (EDTA 0,5 M), que seqüestra os íons de magnésio que atuam como co-fatores das DNAses. Uma outra vantagem com a incorporação do DNA em gel de agarose é a estabilidade das amostras durante meses, quando mantidas em temperatura ambiente e durante um tempo indefinido quando conservadas em temperatura de 4°C. Este fato possibilita a reprodutibilidade de experimentos ou troca de amostras entre grupos de pesquisa².

A variação entre os pulsos pode ocorrer de forma contínua, numa abordagem dita “INTERPOLATED” ou de forma abrupta (“STEPPING”). A variação contínua entre os pulsos de 5 e 10 segundos por 2 horas, por exemplo significa que o tempo de pulso do campo elétrico em cada direção irá aumentar de 5 para 10 segundos, paulatinamente, ao longo de duas horas. No formato de “STEPPING”, pulsos de 5 segundos em direções

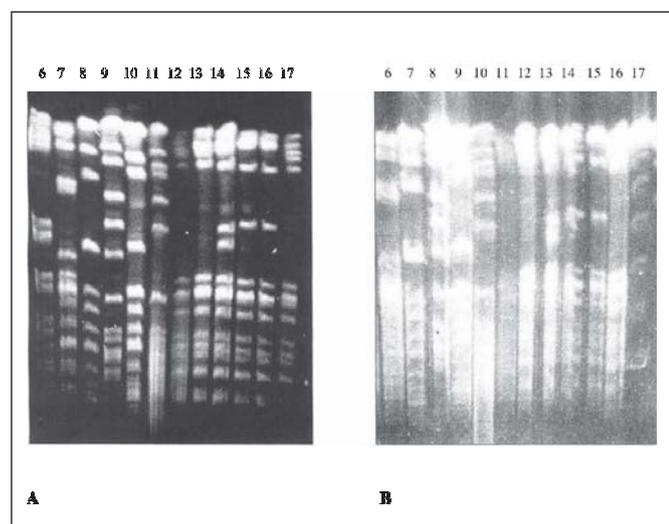


Figura 3. DNA cromossômico de amostras de *S. aureus* após macrorestrição com *Sma* I. Foram utilizadas as mesmas amostras bacterianas (*S. aureus* 6 – 17), a mesma temperatura de 13°C e a mesma voltagem de 180V na corrida eletroforética. A solução tamponante utilizada foi TBE 0,5 X nos dois géis, mas a utilizada na corrida eletroforética “B” apresentava-se precipitada. As mesmas amostras são correspondentes em ambos os géis.

alternadas ocorrem por duas horas seguidas e, numa segunda fase, os campos elétricos passam a trocar de direção a cada 10 segundos (Figura 4).

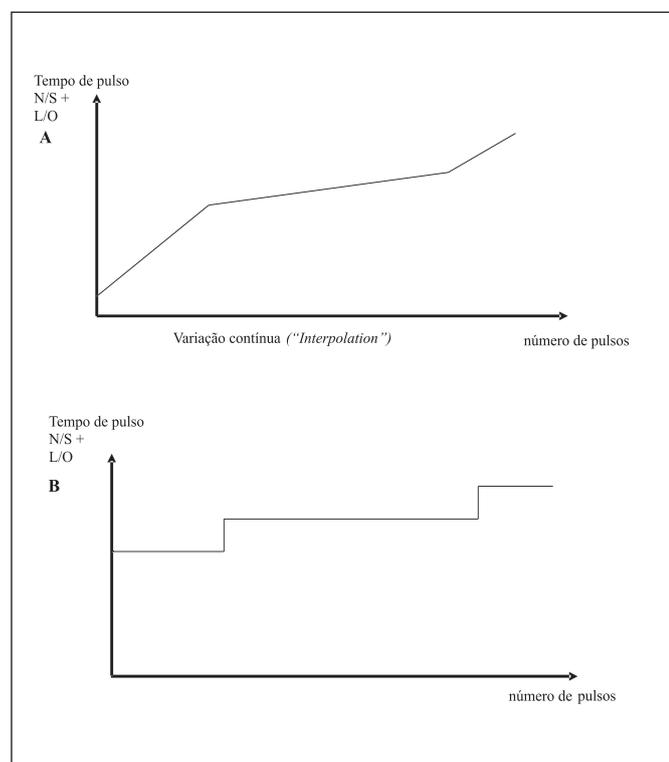


Figura 4. DNA cromossômico de amostras de *Staphylococcus aureus*, após macrorestrição com enzima *Sma* I em duas condições diferentes de pulsos especificadas em, A e B. A voltagem utilizada foi de 180V e a temperatura 13°C em ambos os géis. As amostras são correspondentes em ambos os géis.

Aplicações

Em seu trabalho de 1984, Schwartz e Cantor³ descreveram um novo método de separação de cromossomos da levedura *Saccharomyces cerevisiae* que facilitava a designação de genes específicos a determinados cromossomos por técnicas de hibridização. Após a separação dos cromossomos (cariotipagem) os mesmos foram transferidos para uma membrana e hibridados com uma sonda radioativa para indicar a localização do gene de interesse ("Southern blot").

A clonagem de fragmentos de alto peso molecular em vetores do tipo YAC ("yeast artificial chromosomes") com capacidade de receber insertos de até 2 Mb de forma estável foi possibilitada pela técnica de PFGE^{18,19}.

Algumas informações sobre a organização genômica de protozoários foram adquiridas através da técnica de PFGE. Estes organismos não apresentam condensação de cromossomos durante a metáfase e possuem um grande número de repetições *in tandem* de genes codificadores de proteínas. Informações básicas como a ploidia, número e tamanho dos cromossomos

(cariotipagem) eram desconhecidas, para a maioria das espécies. A técnica de PFGE permitiu a construção de bibliotecas genômicas destas regiões que, de outra forma, não poderiam ser analisadas²⁰.

A caracterização de linhagens patogênicas é fundamental para fins epidemiológicos. Nas últimas décadas, a identificação de linhagens bacterianas baseada em características fenotípicas cedeu espaço para as abordagens genotípicas por técnicas de biologia molecular e, entre elas o PFGE é uma das mais aceitas e utilizadas^{21,22}. Para estudos epidemiológicos de *Staphylococcus aureus*, por exemplo, embora a fagotipagem ainda seja utilizada, a eletroforese de campo pulsante é considerada o padrão-ouro. Foi utilizando esta técnica que Kreiswirth et al.²³ mostraram que a maioria de *S. aureus* resistentes à metilina (MRSA) isolados ao redor do mundo possuíam uma origem comum. Também foi estudada através de PFGE a epidemiologia de enterococos resistentes à vancomicina (VRE), que difere quanto à origem em hospitais americanos e europeus^{24,25}, a rota de transmissão de bactérias Gram-negativas como *Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas aeruginosa* entre pacientes de fibrose cística envolvidas em infecções nosocomiais intra e inter-hospitalar^{26,27}. A cariotipagem de várias espécies da levedura *Candida*, por exemplo, revelou variabilidade intra-específica que também foi utilizada para estudos de transmissão entre pacientes imunodeprimidos^{28,29}.

PFGE é utilizada tanto para estudos de surtos hospitalares de pequenas proporções^{30,31}, quanto na comparação de populações bacterianas, envolvendo microrganismos de diferentes países, ampliando o escopo epidemiológico da técnica³².

A interpretação de PFGE para identificação de linhagens bacterianas

Com o intuito de se discriminar linhagens bacterianas de uma mesma espécie, o DNA bacteriano total, incorporado em bloco de agarose, é digerido com enzimas de restrição que clivam o cromossomo em grandes fragmentos. Em PFGE são necessárias de 30 a 40U de enzima para cada bloco de agarose e o tempo de incubação pode variar de 18 a 24 horas. Os fragmentos gerados são, então separados por eletroforese de campo pulsante. A abordagem, apesar de simples, suscita uma série de dúvidas: Qual enzima utilizar com determinada espécie bacteriana? O que acontece com o padrão de bandas se houver uma mutação no sítio de reconhecimento da enzima? Pequenas diferenças, uma ou duas bandas, entre os perfis obtidos de duas bactérias testadas são suficientes para identificá-las como linhagens diferentes? Em 1995, Tenover e colaboradores²² publicaram critérios de interpretação de resultados de PFGE em um esforço para difundir e tornar mais homogêneo o uso desta técnica para fins epidemiológicos. Assim, se existe uma relação epidemiológica entre bactérias idênticas, provavelmente trata-se de um surto. Por outro lado, bactérias de mesma espécie e mesmo genótipo, isoladas de pacientes que não possuem uma

ligação epidemiológica detectável, podem representar linhagens endêmicas. Assume-se também que, bactérias não relacionadas epidemiologicamente, devem possuir genótipos diferentes. Segundo Tenover et al.²², bactérias envolvidas em um surto e/ou epidemia devem apresentar padrões indistinguíveis, enquanto que, aquelas não envolvidas com a epidemia devem apresentar padrões distintos. É importante, portanto, a utilização de linhagens-controle, não relacionadas epidemiologicamente. Os autores chamam a atenção para o fato de que antes de se realizar a técnica para estudos epidemiológicos, a combinação enzima de restrição/espécie bacteriana deve ter sido testada e validada. Considera-se que um mínimo de 10 fragmentos de DNA, conseqüentemente 10 bandas no gel, devem ser obtidos por bactérias para que a técnica tenha poder discriminatório relevante. Uma linhagem é considerada semelhante à outra quando ocorre um único evento genético como uma mutação, uma inserção ou deleção, que altere o padrão de bandas (Figura 5). Uma mutação tanto pode criar quanto suprimir um sítio de reconhecimento de enzima de restrição. Se um novo sítio é criado, o padrão apresentará uma banda a menos em relação à linhagem epidêmica e duas bandas menores surgirão. Se um sítio desaparece, o padrão alterado terá uma banda nova de tamanho maior que duas que desaparecerão na linhagem responsável

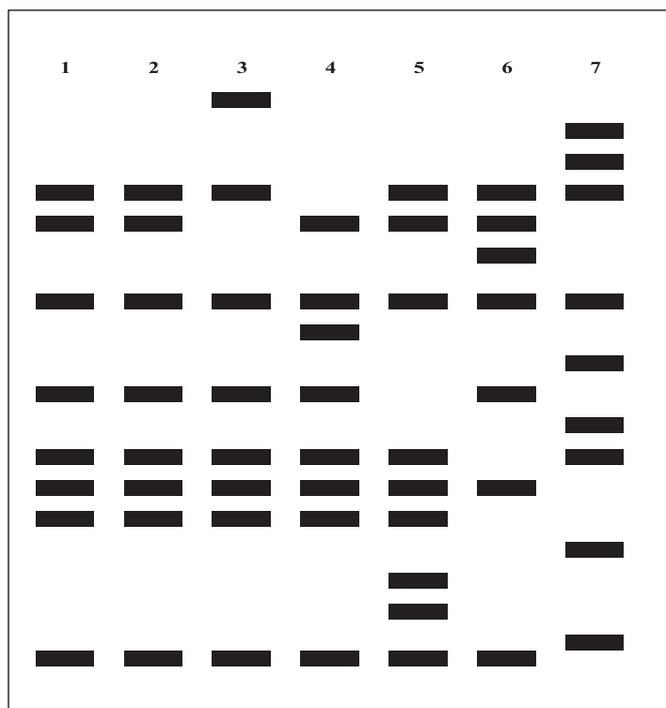


Figura 5. Esquema de padrões de PFGE. Caneletas 1 e 2 são DNA cromossômicos (crDNA) com padrões indistinguíveis e consideradas linhagens epidêmicas; canaleta 3, uma das bandas recebeu uma inserção e aumentou de tamanho; canaleta 4, uma das bandas sofreu uma deleção e diminuiu de tamanho; canaleta 5, uma mutação criou um sítio de restrição, aumentando o número de bandas; canaleta 6, uma mutação alterou um sítio de restrição e dois fragmentos foram perdidos, surgindo um de maior tamanho; canaleta 7, crDNA com padrão diferente, não relacionado ao surto.

pelo surto. Se ocorrer uma inserção de um transposon, por exemplo, e se o novo elemento não possuir um sítio reconhecível pela enzima usada, o resultado será um aumento de tamanho de uma das bandas. Se o fragmento de DNA introduzido possuir um sítio de restrição, uma banda poderá desaparecer em relação à linhagem epidêmica, e duas novas bandas surgirão. Uma deleção, por outro lado, pode fazer com que o fragmento diminua de tamanho. Qualquer um destes eventos altera o padrão da linhagem epidêmica em duas ou três bandas. Uma bactéria é considerada possivelmente relacionada quando as mudanças de padrão de restrição forem compatíveis com dois eventos genéticos, resultando em alterações envolvendo entre 4 e 6 bandas. Quando o padrão da linhagem epidêmica possuir mais da metade das bandas diferentes em relação ao padrão de outras bactérias, estas devem ser consideradas não relacionadas geneticamente. Tenover³¹ também sugere que o padrão da linhagem responsável pelo surto deve ser chamado A; aqueles semelhantes ou possivelmente relacionados de A1, A2, A3 e assim por diante. Os não relacionados devem ser designados tipo B, tipo C, etc.

PFGE é uma técnica bastante complexa com um poder discriminatório muito elevado. É considerado padrão ouro em epidemiologia molecular, mas é importante ressaltar que métodos de tipagem não substituem dados epidemiológicos, somente auxiliam e, se utilizados isoladamente, podem levar a conclusões equivocadas.

Abreviações

pb pares de bases; kb quilobases (= 1.000 bases); Mb megabases (= 1.000.000 bases); CHEF “contour-clamped homogeneous electric field”; FIGE “field-inversion gel electrophoresis”; OFAGE “orthogonal-field-alternation gel electrophoresis”; PACE “programmable autonomously controlled electrode”; PHOGE “pulsed homogeneous orthogonal-fields”; ROFE “rotating-field electrophoresis”; TAFE “transverse-alternating field electrophoresis”; ZIFE “zero-integrated field electrophoresis”.

REFERÊNCIAS

1. Fangman W. Separation of very large DNA molecules by gel electrophoresis. *Nucleic Acid Res* 1978; 5: 653-65.
2. Smith CL, Cantor CR. Purification, specific fragmentation, and separation of large DNA molecules. *Meth Enzimol* 1987; 155: 449-67.
3. Schwartz DC, Cantor RC. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 1984; 37: 67-75.
4. Klotz LC, Zimm BH. Retardation times of deoxyribonucleic acid solutions. II. Improvements in apparatus and theory. *Macromolecules* 1972; 5: 471-81.
5. Birren B, Lai E. Switch intervals and resolution in pulsed field gels. In: *Pulsed field gel electrophoresis. A practical guide*. San Diego: Academic Press; 1993. p.107-20.
6. Deutsch JM. The dynamics of DNA gel electrophoresis. In: *Burmeister, M., Ulanovsky, L. Pulsed-Field Gel Electrophoresis – Protocols, Methods and Theories*. New Jersey: Humana Press; 1992. p. 367-84.

7. Gennes PG. Reptation of a polymer chain in the presence of fixed obstacle. *J Chem Phys* 1971; 55: 572-9.
8. Lerman LS, Frisch HL. Why does the electrophoretic mobility of DNA in gels vary with the length of the molecule? *Biopolymers* 1982; 21: 995-7.
9. Lumpkin OJ, Dejardin P, Zimm BH. Theory of gel electrophoresis of DNA. *Biopolymers* 1985; 24: 1575-93.
10. Bustamante C, Gurrieri S, Smith SB. Towards a molecular description of pulsed field gel electrophoresis. *TIBTECH* 1993; 11: 23-30.
11. Gurrieri S, Smith SB, Wells KS, Johnson ID, Bustamante C. Real-time imaging of the reorientation mechanisms of YOYO-labelled DNA molecules during 90° and 120° pulsed field gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 1996 24: 4759-67.
12. Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ. Strain delineation and antifungal susceptibilities of epidemiologically related and unrelated isolates of *Candida lusitanae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994; 20: 127-33.
13. Chu G, Vollrath D, Davis RW. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science* 1986; 232: 1582-5.
14. Maule J. Pulsed-field gel electrophoresis. *Mol Biotechnol* 1998; 9: 107-26.
15. Koort JM, Lukinmaa S, Rantala M, Unkila E, Siitonen A. Technical improvement to prevent DNA degradation of enteric pathogens in pulsed field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3497-8.
16. Ray T, Weaden J, Dyson P. Tris-dependent site-related cleavage of *Streptomyces lividans* DNA. *FEMS Microbiol Lett* 1992; 96: 247-52.
17. Römmling V, Tümmler B. Achieving 100% typeability of *Pseudomonas aeruginosa* by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 200; 38: 464-5.
18. Burke DT, Carle GF, Olson MV. Cloning of large DNA fragments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* 1987; 236: 806-12.
19. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2.ed. United States of America: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989. vol.1, p.1.21-1.31.
20. Van der Ploeg LHT, Gottesdiener M, Kormun H, Weiden M, Le Blancq S. Protozoan Genomes: Karyotype analysis, chromosome structure, and specific libraries. In: Burmeister M, Ulanovsky L, eds. *Pulsed-Field Gel Electrophoresis – Protocols, Methods and Theories*. The Human Press Inc. 1991, p 203-24.
21. Miragaia M, Couto I, Perreria SF, Kristinsson KG, Westh H, Jarlov JO, et al. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones: evidence geographic dissemination. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 430-8.
22. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233-9.
23. Kreiswirth B, Kornblum J, Arbeit RD, Eisnes W, Maslow JN, Mageer M, et al. Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science* 1993; 259: 227-30.
24. Boyle JF, Soumakis SA, Rendo A, Herrington JA, Gianarkis DG, Thurberg BE, Painter BG, et al. Epidemiological analysis and genotypic characterization of a nosocomial outbreak of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1280-5.
25. Endtz HP, Van den Braak N, Kluytmans JA, Koeleman JG, Spanjaard L, Voss A, et al. Fecal carriage of vancomycin-resistant enterococci in hospitalized patients and those living in the community in the Netherlands. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3026-31.
26. Pellegrino FL, Teixeira LM, Carvalho M dM da G, Aranha Nouer S, Pinto de Oliveira M, Mello Sampaio JL, et al. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2420-4.
27. Speert DP, Henry D, Vandamme P, Corey M, Mahenthalingam E. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* Complex in patients with cystic fibrosis, Canada. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 181-7.
28. Dib J C, Dube M, Kelly C, Rinaldi ME, Patterson JE. Evaluation of pulsed field gel electrophoresis as typing system for *Candida rugosa*: comparison of karyotype and restriction fragment length polymorphisms. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1494-6.
29. Pfaller MA. Typing methods for epidemiologic investigation. In : Ballows, A. *Manual of clinical microbiology*. 5ed. Washington: American Society for Microbiology; 1991. p.171-82.
30. Darini AL, Magalhães VD, Levy CL, Barth AL, Coscina AL. Phenotyping and genotyping methods applied to investigate the relatedness of Brazilian isolates of *Enterobacter cloacae*. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32: 1077-81.
31. Magalhães VD, et al. Third generation cephalosporins selecting a particular strain of multiresistant *Staphylococcus aureus*. Abstract presented at the 97th General Meeting of the American Society for Microbiology, Miami Beach, Florida 1997; 195L: 375.
32. Liu SL, Schryvers AB, Sanderson KE, Johnston RN. Bacterial phylogenetic clusters revealed by genome structure. *J Bacteriol* 1999; 181: 6747-55.