

Universidade Federal do Rio de Janeiro

MÉTODO MINIATURIZADO ALTERNATIVO PARA  
IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES PREVALENTES DE  
*Staphylococcus* ISOLADAS DE ESPÉCIMES CLÍNICOS

Natalia Iorio Lopes Pontes

2007



UFRJ

MÉTODO MINIATURIZADO ALTERNATIVO PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES  
PREVALENTES DE *Staphylococcus* ISOLADAS DE ESPÉCIMES CLÍNICOS

Natalia Iorio Lopes Pontes

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Orientadora: Kátia Regina Netto dos Santos

Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2007

Iorio, Natalia Iorio Lopes Pontes.

Método miniaturizado alternativo para identificação de espécies prevalentes de *Staphylococcus* isoladas de espécimes clínicos/ Natalia Iorio Lopes Pontes. - Rio de Janeiro: UFRJ/ IMPPG, 2007.

x, 55f. il.; 31 cm.

Orientadora: Kátia Regina Netto dos Santos.

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ IMPPG/ Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia), 2007.

Referências Bibliográficas: f. 56-63.

1. *Staphylococcus*. 2. Alternativa miniaturizada de identificação. I. Santos, Kátia Regina Netto dos. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia). III. Método miniaturizado alternativo para identificação de espécies prevalentes de *Staphylococcus* isoladas de espécimes clínicos.

MÉTODO MINIATURIZADO ALTERNATIVO PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES  
PREVALENTES DE *Staphylococcus* ISOLADAS DE ESPÉCIMES CLÍNICOS

Natalia Iorio Lopes Pontes

Orientadora: Kátia Regina Netto dos Santos

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Aprovada por:

---

Presidente, Prof. Walter Martin R. Oelemann

---

Prof. André Luis Souza Santos

---

Profa. Ana Paula Ferreira Nunes

---

Profa. Marinella Silva Laport

Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2007

Às pessoas essenciais na minha vida,  
minha mãe e meu irmão. Amo vocês!!!

## AGRADECIMENTOS

---

A Deus, por se mostrar presente em todos os momentos da minha vida.

À Dra. Kátia Regina Netto dos Santos, pela orientação, confiança e incentivo. Obrigada pelo seu exemplo de mãe, esposa, professora, amiga e orientadora.

À toda equipe (ou que fizeram parte dela) do Laboratório de Infecção Hospitalar: Ana Paula Neves, Ana Paula Nunes, Anike, Carla, Carolina, Eliezer, Elizângela, Fernanda, Fred, Gustavo, Ivana, Jacqueline, Karoline, Milena, Moema, Natascha, Olinda, Priscila, Renata, Ricardo, Roberta, Rodrigo, Rosana, Thelma, Valéria e Viviane, em especial aos amigos, Carol, Fred, Ricardo e Roberta pelos momentos de descontração.

Aos amigos da equipe cara de laboratório, do terceiro turno e do bloco A: Bebeta, Felipe Piedade, Fred, Karla e Marcos Dornelas, por todos os momentos divertidos que compartilhamos.

À amiga Roberta Caboclo, pela infinita ajuda. Onde esconderam suas asinhas de anjo? Obrigada por tudo!!!

À amiga e madrinha microbiológica, Rosana, pela confiança, apoio, exemplo e por ter segurado em minhas mãos enquanto eu dava meus primeiros passinhos na bancada.

Aos amigos Helena, Marlei e Orlando, pela ajuda indispensável.

A todos os amigos do Laboratório de Micobactéria e Microbiologia Molecular.

Aos professores Bernadete, Marinella, Regina Pilotto e Walter pelo carinho e incentivo.

Ao Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, nas pessoas da Diretora Profa. Agnes Sá Figueiredo, e da Coordenadora de Pós-Graduação Profa. Thais Souto-Padrón.

Aos micro-amigos, Lafranhas e micro-homens: Anike, Aline, Badejo, Bernardo, Cae, Celso, Clarice, Carol, Danilo, Dudu, Elisa, Fábio, Fabíola, Fernanda, Gustavinho, Ivy, Jajá, Jefferson, Julia, Juliana, Lelé, Lelê, Lup, Mamá, Marianinha, Mel, Pedro, Pri Olsen, Rana, Rodrigo, Ruback e Volotão. Agradeço ou “desagradeço”? Obrigada pelos incontáveis momentos de alegria.

A dois amigos muito especiais que estiveram muito presentes nesta reta final, desde às ligações na madrugada até aos feriados no Fundão, Clarice e Rodrigo.

Aos amigos Angélica, Juliana Nunes, Juliana Valente, Michelle, Patrícia, Roberta e Rodrigo, que estiveram presentes em mais esta etapa da minha vida.

Às meninas da República Tcheca: Juliana, Maria Lúcia “Louca” e Rafaela. Obrigada por me acolherem tão bem em JF.

A todos da Microbiologia do DPPI da UFJF. Em especial aos professores Maria Luzia, Márcio e Rosângela pela confiança, compreensão, momentos de diversão e principalmente pelo exemplo de profissionalismo e união; aos colegas Délcio, Jorge e Francis pelas gargalhadas, lanches com “pipoca rosa” e mudanças de horário; e aos alunos Gilmara e Thiago pelos momentos de descontração.

Às companheiras do apartamento: Juliana, Livia, Marceli e Tainá, pelo excelente convívio e amizade.

À minha avó, Irene, e minha madrinha, Darciléa, pela dedicação e amor.

Aos meus pais, por todo apoio, carinho, incentivo, paciência, conselhos, exemplo, suporte emocional e amor incondicional.

Aos meus tios e suplentes dos meus pais, Marilda e Roberto, pela dedicação, carinho, confiança e amor.

Às “pessoinhas” que dão os beijos e abraços mais sinceros que existem, Késia, Leticia, Maria Clara, em especial Guilherme e minha afilhada, Luiza.

Ao meu irmão, por todo amor, ciúmes, discussões, apoio e tudo que o torna a pessoa mais importante da minha vida, um eterno presente de Deus. Se pudesse escolher alguém para ser meu irmão, escolheria você. Te amo!

À FAPERJ, CNPq, CAPES, PRONEX e FUJB, pelo suporte financeiro.

“Você me ensinou, mãe...  
Que o seu coração é capaz de guardar todo amor do universo.  
Que há um Deus que me escuta mesmo quando nada lhe digo.  
Que o amor se demonstra, acima de tudo, com pequenas atenções.  
Que encontrarei o caminho perfeito para cumprir cada uma das minhas metas.  
Que a sua proteção alicerçará toda a minha vida, mesmo quando me apoiar sem que eu perceba.  
Que minhas vitórias lhe dão mais alegrias do que se fossem suas.  
Que você pode ter muitas ocupações... mas eu sempre serei a mais importante.  
Que sou responsável pelo meu destino.  
Que, apesar de meus medos, devo crer que meus sonhos são possíveis.  
Que, aconteça o que acontecer, sempre contarei com sua compreensão e seu abraço.  
Você me ensinou a amar as histórias familiares,  
para que essas recordações íntimas me ajudem a construir minhas próprias viagens.  
E me ensinou, mãe, que, quando eu, esmorecer ou renunciar às minhas ilusões,  
seu amor e sua confiança me darão forças para eu dar tudo de mim uma vez mais.  
Por isso, mãe, hoje eu lhe peço:  
Fique comigo.  
Quando eu tiver que enfrentar meus desafios.  
Quando me apaixonar pela primeira vez.  
Quando parecer que a abandono por causa dos amigos, do trabalho ou das distâncias.  
Quando um problema me angustiar a ponto de gritar seu nome dentro de meu coração.  
Fique comigo, mãe, nas horas felizes dos sonhos realizados.  
Quando meus filhos me rodearem e, também, quando se afastarem.  
Quando sentir o frio silêncio das ausências.  
E quando chegar meu momento da alegria e da colheita, mãe, fique sempre comigo,  
compartilhando tudo o que há de mais profundo em minha alma.”



## RESUMO

### MÉTODO MINIATURIZADO ALTERNATIVO PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES PREVALENTES DE *Staphylococcus* ISOLADAS DE ESPÉCIMES CLÍNICOS

Natalia Iorio Lopes Pontes

Kátia Regina Netto dos Santos

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

*Staphylococcus* são importantes comensais humanos e têm sido frequentemente associados à infecções hospitalares. A identificação é indispensável em estudos epidemiológicos e na caracterização molecular de amostras. O objetivo deste estudo foi desenvolver e avaliar um método alternativo miniaturizado subordinado a um fluxograma, que propicie melhor relação custo-benefício na identificação das espécies de *Staphylococcus* prevalentes em infecções humanas. Cento e noventa e duas amostras hospitalares de *Staphylococcus* foram analisadas utilizando-se cinco testes fenotípicos em placa de microtitulação de 96 poços (produção das enzimas PYRase, urease e fosfatase, e produção de ácidos a partir de manose e trealose), associados aos testes de susceptibilidade a desferrioxamina e novobiocina e produção de fator “clumping”. Esse método foi comparado ao método convencional de 22 testes. A reação da polimerase em cadeia (PCR) foi utilizada para confirmar a identificação de amostras atípicas das espécies *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*. A leitura dos resultados do método miniaturizado foi realizada por dois observadores em 24, 48 e 72 h de incubação. Através da técnica miniaturizada foram identificadas 95,8% amostras corretamente em 24h de incubação, 97,4% amostras em 48h e 96,9% em 72h de incubação. Os resultados apresentados pela PCR foram concordantes com aqueles obtidos no método convencional. O método alternativo miniaturizado proposto mostrou grande acurácia, apresentando as vantagens de ser mais rápido, prático e econômico que a bioquímica convencional, podendo ser aplicado na rotina clínica.

Palavras-chave: *Staphylococcus* spp., métodos de identificação, método de referência, alternativa miniaturizada de identificação

**ABSTRACT****ALTERNATIVE MINIATURIZED METHOD FOR IDENTIFICATION OF PREVALENT ISOLATES OF *Staphylococcus* SPECIES FROM CLINICAL SPECIMENS**

Natalia Iorio Lopes Pontes

Kátia Regina Netto dos Santos

*Abstract* da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

*Staphylococcus* are important human commensals and they have been frequently associated with nosocomial infections. A reliable identification of these organisms is of great interest for the clinical-laboratorial diagnosis. The aim of this study was to developed and availed a alternative miniaturized method subordinates to a flowchart, that provides a better cost-effective to identification of prevalent species of *Staphylococcus* isolated from human infections. A hundred and ninety two nosocomial strains of *Staphylococcus* were analyzed by five phenotypic proofs performed in microtitulation plate with 96 wells (production of enzymes pyrrolidonyl arylamidase, urease and phosphatase, and production of acids from mannose and trehalose), associated with susceptibility to desferrioxamine and novobiocin, and clumping factor production, in comparison to the conventional method that employs 22 tests. The polymerase chain reaction (PCR) was used to confirm the identification of atypical strains of the species *S. aureus*, *S. epidermidis* and *S. haemolyticus*. The alternative miniaturized method results were observed by two readers in 24, 48 e 72 h of incubation. The alternative miniaturized method identified 95.8% strains correctly in 24h, 97.4% strains in 48h and 96.9% in 72h of incubation. The results showed by PCR were agreement with that seen in the conventional method. The alternative miniaturized method showed a great accuracy with the advantages to be more economic, practical and faster than the conventional method.

Key-words: *Staphylococcus* species; identification methods; reference method; simplified method, alternative miniaturized of identification

## SUMÁRIO

---

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	17
3 MÉTODOS	18
3.1 Amostras bacterianas	18
3.2 Identificação do gênero <i>Staphylococcus</i>	19
3.3 Identificação das espécies de <i>Staphylococcus</i> através do método convencional	20
3.4 Proposta de um método miniaturizado alternativo de identificação de <i>Staphylococcus</i>	29
3.4.1 Critérios utilizados para a seleção de um grupo mínimo de testes de identificação	29
3.4.2 Padronização dos meios de cultura, reagentes, inóculo bacteriano e período de incubação	29
3.4.3 Confeção de um fluxograma subordinado ao método miniaturizado	30
3.5 Utilização da técnica de PCR para confirmação da identificação fenotípica de amostras atípicas de <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> e <i>S. haemolyticus</i>	30
4 RESULTADOS	33
5 DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÕES	55
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
8 ANEXO	64

## 1 INTRODUÇÃO

---

### 1.1 O gênero *Staphylococcus*

Membros do gênero *Staphylococcus* se apresentam como cocos Gram-positivos, com 0,5-1,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro e genoma de baixo conteúdo G+C, pertencentes à família *Staphylococcaceae* (MADIGAN, MARTINKO & PARKER, 2004). Morfologicamente, são visualizadas células isoladas, aos pares, tétrades, pequenas cadeias (3 ou 4 células) ou irregulares, como cachos de uva. Os microrganismos do gênero são imóveis, resistentes à bacitracina, sem capacidade de esporular, normalmente catalase positivos e anaeróbios facultativos. As colônias são geralmente opacas e podem ser brancas ou cremes e algumas vezes amarelas. Geralmente, crescem em até 10% de NaCl e a temperatura ótima de crescimento está entre 30<sup>0</sup>C e 37<sup>0</sup>C (HOLT *et al.*, 1994; BANNERMAN, 2003).

*Staphylococcus* estão espalhados no ambiente (solo, ar e água) e são encontrados na pele e mucosa de mamíferos e pássaros (WILKINSON, 1997; JARLOV, 1999), sendo um entre os principais grupos de bactérias que habitam a pele e mucosa de mamíferos (PEACOCK, 2005). O gênero *Staphylococcus* é composto por 40 espécies e 24 subespécies (EUZÉBY, 2007).

Entre as espécies de *Staphylococcus* encontradas em humanos e outros primatas, estão incluídas *S. aureus*, *S. auricularis*, *S. capitis*, *S. caprae*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. pasteurii*, *S. saprophyticus*, *S. saccharolyticus*, *S. simulans*, *S. warneri* e *S. xylosum*. Muitas dessas espécies residem no homem, porém, *S. simulans* e *S. xylosum* são geralmente transitórios sendo, primariamente, adquiridos de animais domésticos, enquanto alguns *Staphylococcus* humanos são transitórios ou temporariamente residentes nesses animais (BANNERMAN, 2003).

Algumas espécies de *Staphylococcus* apresentam habitat ou nichos preferenciais no hospedeiro. Por exemplo, *S. capitis* subsp. *capitis* é encontrado, principalmente, no couro cabeludo e face, locais onde as glândulas sebáceas são numerosas e bem desenvolvidas. *S. capitis* subsp. *urealyticus* também é encontrado nestas regiões e nas axilas de alguns indivíduos. *S. auriculares* apresenta tropismo pelo ouvido médio. *S. hominis* e *S. haemolyticus* são encontrados com frequência em áreas da pele onde glândulas apócrinas são numerosas, tais como, axilas e região púbica. *S. aureus* é prevalente na narina anterior do homem adulto. *Staphylococcus* resistentes à novobiocina, particularmente *S. cohnii*, são encontrados principalmente no tecido cutâneo dos humanos. *S. saprophyticus* são isolados do trato geniturinário de mulheres, entre 10 e 30 anos de idade, aproximadamente (BANNERMAN, 2003).

Os *Staphylococcus* spp., geralmente, estão em equilíbrio na microbiota do hospedeiro. Porém, podem se tornar patogênicos se, por exemplo, o tecido hospedeiro sofrer alterações na barreira cutâneo-mucosa, tais como, inoculação por agulhas ou implantes de dispositivos médicos, justificando a presença de bactérias pertencentes a este gênero como causa comum de infecções em humanos e importantes agentes etiológicos em infecções hospitalares (VERHOEF, 1997; SALYERS & WHITT, 2003). *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* são as espécies do gênero mais relacionadas com tais tipos de infecções (PFALLER *et al.*, 1999; SPANU *et al.*, 2003)

A infecção hospitalar é um grave problema de saúde pública, representando uma das principais causas de morbidade e mortalidade em instituições hospitalares, afetando milhares de pacientes no mundo todo e gerando grandes gastos financeiros (ARCHIBALDI & GAYNES, 1995; PANNUTI & GRINBAUM, 1995). Devido à terapia ou doença de base, em geral, os pacientes apresentam-se imunocomprometidos e, na maioria dos casos, estão submetidos a algum procedimento invasivo. Estas características, em conjunto com outras,

como idade, estado clínico e doenças associadas, constituem fatores de risco para infecções por microrganismos oportunistas (BENNETT & BRACHMAN, 1998).

A resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* tem sido um dos grandes problemas enfrentados por equipes de saúde em hospitais do mundo inteiro (DIEKEMA *et al.*, 2001). A multirresistência aos antimicrobianos é uma das principais características observadas entre amostras hospitalares e, têm incluído, além da resistência à oxacilina e a outros  $\beta$ -lactâmicos, também a resistência à eritromicina, clindamicina, tetraciclina, cloranfenicol, rifampicina, sulfametoxazol-trimetoprima, aminoglicosídeos e quinolonas (MARANAN *et al.*, 1997; PEACOCK, 2005). Excreções de antimicrobianos, tais como, ciprofloxacina, através do suor durante o tratamento do paciente, tem sido associado com o aumento da colonização da pele por *S. epidermidis* resistentes à ciprofloxacina (ANDREMONT, 2003).

## **1.2 *Staphylococcus aureus***

A espécie *Staphylococcus aureus* é reconhecida, desde 1883, como causa de infecções, tendo contribuído nesta era pré-antibiótico com taxas de mortalidade de até 82%, devido às bacteriemias (SMITH & JARVIS, 1999). Hoje, essa espécie continua sendo considerada como patogênica e a de maior importância entre os *Staphylococcus* em infecções humanas, tanto de origem comunitária quanto hospitalar (SCANVIC *et al.*, 2001). As infecções por essa espécie, geralmente, são precedidas por colonização nasal de indivíduos sadios ou hospitalizados (VANDENBERGH *et al.*, 1999).

Segundo von Eiff e colaboradores (2001), *S. aureus* pode ser encontrado na mucosa nasal de 30% a 50% dos indivíduos, havendo uma forte correlação entre cepas que colonizam fossas nasais, das isoladas de focos de infecção e aquelas de hemoculturas, sugerindo que as bacteriemias por *S. aureus* podem ter uma origem endógena. Assim, pacientes colonizados apresentam maior risco de adquirir infecção hospitalar por essa bactéria.

A espécie *S. aureus* é a principal causa de infecção entre os *Staphylococcus*, podendo estar relacionada a infecções cutâneas superficiais, como impetigo e abscessos, até infecções invasivas, como: artrite, osteomielite, bacteriemia, endocardite, pneumonia e meningite. Síndromes clínicas relacionadas à produção de toxinas, incluem intoxicação alimentar associada à ingestão de toxina pré-formada, síndrome da pele escaldada e síndrome do choque tóxico estafilocócico (BARG & HARRIS, 1997; SMITH & JARVIS, 1999; SALYERS & WHITT, 2003).

Devido a variedade de mecanismos de virulência conhecidos, *S. aureus* é considerado um dos patógenos humanos mais versáteis (ARCHER, 1998). Durante a etapa de sua colonização tecidual, um conjunto de adesinas, conhecidas pela sigla MSCRAMMS (“microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules”), se liga a componentes da matriz extracelular do hospedeiro, como fibronectina, colágeno e laminina, reconhecidos como importantes receptores para aderência estafilocócica (PROJAN & NOVICK, 1997; FOSTER & HÖÖK, 1998). Outras exoproteínas bacterianas, como protease, colagenase, hialuronidase, estafiloquinase e lipase atuam aumentando a virulência deste patógeno. Com a participação destas proteínas, a partir do foco de infecção, pode ocorrer disseminação desse microrganismo para outros sítios através da corrente sanguínea (BOHACH *et al.*, 1990).

A parede celular do *S. aureus* é composta de ácido teicóico e peptideoglicana, na qual está inserida a proteína A, específica da espécie, presente em mais de 95% das cepas. Devido à sua reatividade com a porção da fração cristalizada (Fc) das imunoglobulinas, essa proteína agrega estas moléculas, além de fixar complemento, processos que implicam na patogenia das infecções pelo patógeno (JOHN & BARG, 1996). Segundo alguns autores, mais de 90% das amostras de *S. aureus* também produzem uma cápsula polissacarídica em sua superfície, que atua como fator antifagocitário (JOHN & BARG, 1996; LEE & LEE, 2000).

Em relação aos agentes etiológicos de infecções hospitalares, dados do SENTRY, coletados no período de 1997 e 1998 nos Estados Unidos, Canadá e América Latina, mostraram que *S. aureus* e *Escherichia coli* eram os agentes mais freqüentes em bacteriemias, seguidos pelos *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN), *Enterococcus* spp. e *Klebsiella* spp. (DIEKEMA *et al.*, 2000). Estudo recente do mesmo grupo e na mesma área geográfica, mostrou *S. aureus* como o patógeno mais relacionado com pacientes pediátricos (FEDLER, BIEDENBACH & JONES, 2006). Dados nacionais, obtidos por Sader *et al.* (2001), a partir de resultados de vigilância em 12 hospitais brasileiros, no período de 1997 a 1999, mostraram *S. aureus* como patógeno hospitalar mais freqüente (22,8%), seguido por *E. coli* (13,8%) e *P. aeruginosa* (13,3%). Relato de hospitais da América Latina apresentam taxas semelhantes em relação ao isolamento dos dois principais patógenos hospitalares, *S. aureus* (17,4%) e *E. coli* (16,2%) (SADER *et al.*, 2004).

*S. aureus* é o patógeno de maior prevalência em infecções hospitalares, sendo grande parte destas infecções causadas por amostras resistentes à oxacilina (MARANAN *et al.*, 1997). Um estudo recente, de 2004 do sistema NNIS (“National Nosocomial Infections Surveillance”), mostrou uma taxa de resistência à oxacilina de 59,5% entre amostras de *S. aureus* isoladas de pacientes das unidades de terapia intensiva (UTIs). Resultados do programa SENTRY de vigilância antimicrobiana, realizado no período de 1997 a 1999, envolvendo Estados Unidos, Canadá, América Latina, Europa e região do Pacífico Asiático, mostraram que a resistência à oxacilina entre amostras de *S. aureus* variou, entre os países participantes, de 1,8% na Suíça a 73,8% na China (DIEKEMA *et al.*, 2001). Dados coletados pelo sistema EARS (“European Antimicrobial Resistance Surveillance”) entre janeiro de 1999 a dezembro de 2001, verificaram taxas de até 54,2% de amostras de *S. aureus* resistentes à oxacilina (ORSA, “oxacillin resistant *S. aureus*”) nos países participantes deste programa. Outro estudo do programa SENTRY, envolvendo apenas países da América Latina,



demonstrou uma taxa de 30% de resistência à oxacilina entre amostras de *S. aureus* isoladas de infecções de corrente sanguínea (SADER *et al.*, 2003).

Entre os pacientes com alto risco de infecção por amostras ORSA estão os pacientes de hospitais terciários de grande porte, imunocomprometidos, pacientes em UTIs, pacientes queimados e aqueles com ferida cirúrgica. A duração prolongada de hospitalização, o tratamento prévio com antimicrobianos e a proximidade a pacientes colonizados são alguns dos fatores que predisõem a aquisição de amostras ORSA (BRUMFIIT & HAMILTON-MILLER, 1989; CHAMBERS, 2001).

Em relação aos custos com infecções por amostras ORSA, um estudo realizado entre 1996 e 1998, em um hospital terciário em Toronto no Canadá, demonstrou que apesar das taxas de resistência serem baixas naquela instituição (2,9 casos/1000 admissões), o custo total atribuído ao tratamento das infecções por amostras ORSA foi de \$287.000,00 no período, sendo a maioria deste custo relacionado ao aumento do tempo de hospitalização do paciente (KIM, OH & SIMON, 2001). Este mesmo estudo fez também uma projeção e mostrou que se a taxa de infecção por ORSA variasse entre 10 e 20% os custos ficariam em torno de 42 a 52 milhões de dólares por ano. Abramson e Sexton (1999) comparando os custos do tratamento de bacteriemias causadas por amostras de *S. aureus* sensíveis à oxacilina (OSSA, “oxacillin sensitive *S. aureus*”) e por amostras ORSA, verificaram que o custo médio para o tratamento destas infecções por amostras ORSA era três vezes maior que infecções por amostras OSSA. Rubin e colaboradores (1999) demonstraram que, em 1995, em Nova York o impacto econômico de infecções causadas por ORSA, foi de 94 milhões de dólares e que a taxa de óbitos foi três vezes maior em pacientes que apresentavam infecções por estas amostras em relação aos que apresentavam infecções por amostras OSSA.

Uma vacina para *S. aureus*, que consiste de um polissacarídeo cápsular conjugado, vem sendo testada e pode-se observar uma redução de 57% de infecções por este agente

etiológico em um grupo considerado crítico para o desenvolvimento de infecções estafilocócicas (SALYERS & WHITT, 2003).

*S. aureus* também tem sido associado com infecções em animais, sendo apontado como principal agente etiológico da mastite bovina (NASCIMENTO *et al.*, 2005; ANDERSON & LYMAN, 2006; HALTIA *et al.*, 2006).

### **1.3 *Staphylococcus* coagulase-negativos**

Até 1975 os *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN) eram agrupados juntos e distinguidos dos *S. aureus* por sua inabilidade de coagular plasma sanguíneo. Os SCN foram considerados durante muito tempo como microrganismos saprófitas, mas sua importância como patógenos começou a ser reconhecida devido ao aumento no uso de próteses, cateteres e dispositivos invasivos associados ao crescente número de pacientes imunocomprometidos nas instituições de saúde (KLOOS & SCHLEIFER, 1975; HUEBNER & GOLDMANN, 1999). Nas últimas três décadas, os SCN têm tido um papel relevante nas infecções hospitalares (VON EIFF, PETERS & HEIFMANN, 2002).

O uso de procedimentos invasivos em pacientes hospitalizados associado à imunossupressão dos mesmos vêm trazendo os SCN para a vanguarda dos patógenos hospitalares, resultando em aumento da morbidez e do custo do tratamento (HUEBNER & GOLDMANN, 1999). Essas bactérias são constituintes da microbiota anfibiótica humana, apresentando-se portanto, como um grande desafio à distinção entre amostras de SCN com significância clínica de amostras contaminantes (VON EIFF, PETERS & HEIFMANN, 2002).

Entre as principais infecções relacionadas com o isolamento de SCN, estão as bacteriemias (COSTA, MICELI & ANAISSIE, 2004). Em uma análise realizada pelo programa SENTRY, durante o período de 1997 e 1998, foi observada a prevalência dos SCN

como principais agentes etiológicos responsáveis por este tipo de infecção no Canadá (DIEKEMA *et al.*, 2000). Dados desse mesmo programa, coletados entre o período de 1997 e 2001 na América Latina, demonstraram o grupo dos SCN como o terceiro mais isolado de hemoculturas (SADER *et al.*, 2004).

Os SCN têm sido isolados de cerca de um terço das bacteriemias, sendo *S. epidermidis* a espécie mais prevalente. Esta espécie também tem sido isolada de casos de endocardites, infecções de sítio cirúrgico e do trato urinário, fluido cérebro espinhal, próteses articulares e cateter intravascular (MULDER, 1995; CUNHA *et al.*, 2002; BANNERMAN, 2003).

*S. epidermidis* tem sido isolado, especialmente, de pacientes com dispositivos médicos ou implante de corpos estranhos à base de polímeros. Esta espécie é responsável por 50-70% das infecções relacionadas a cateteres (VON EIFF, PETERS & HEIFMANN, 2002). Embora os fatores de virulência desse microrganismo não estejam tão bem elucidados como os de *S. aureus*, a característica que certamente contribui para a virulência de amostras de *S. epidermidis* é a habilidade desta espécie de colonizar superfícies poliméricas e formar uma densa multicamada de células, constituindo um biofilme. Um pequeno número de células bacterianas presente na pele ou mucosas dos pacientes, sítios colonizados por esta espécie bacteriana, provavelmente contamina o polímero durante a implantação cirúrgica do dispositivo médico. Vale ressaltar, que algumas vezes as bactérias são adquiridas das mãos dos profissionais de saúde (VON EIFF, PETERS & HEIFMANN, 2002; SALYERS & WHITT, 2003). Klug e colaboradores (2003) também observaram que a produção de biofilme entre amostras de *S. epidermidis* relacionadas à infecções era significativamente maior do que entre amostras contaminantes ou isoladas de colonização.

A formação de biofilme é realizada em pelo menos duas etapas: (i) aderência inicial de células à superfície do biomaterial e (ii) posterior acúmulo das células em aglomerados de multicamadas. A marca registrada é a produção de uma substância chamada PIA (adesina

polissacarídica intracelular), um polissacarídeo composto por um homopolímero de N-acetilglucosamina com porções de resíduos diacetilados, no qual as células bacterianas se inserem e são protegidas da defesa imune hospedeira e da terapia antimicrobiana (HUEBNER & GOLDMANN 1999; GÖTZ, 2002).

A redução da susceptibilidade aos antimicrobianos nas células bacterianas que compõem o biofilme pode estar relacionada à baixa atividade metabólica destas células associada à fraca difusão dos agentes antimicrobianos no biofilme (SALYERS & WHITT, 2003). Mutações nos genes responsáveis pela biossíntese do biofilme (operon *icaADBC*) induzem a um fenótipo pleiotrópico, isto é, as células se tornam biofilme negativas e incapazes de hemaglutinar, com reduzida virulência e reduzida aderência às superfícies hidrofílicas (GÖTZ, 2002).

Além da habilidade que o *S. epidermidis* tem de formar biofilme, outros fatores específicos envolvidos na patogênese desta espécie vêm sendo descritos, como a produção de bacteriocinas (VON EIFF, PETERS & HEIFMANN, 2002; NASCIMENTO *et al.*, 2005); a persistência intracelular, sendo internalizado por células endoteliais; produção de exoenzimas e toxinas (OTTO, 2004), responsáveis pela formação de poros nas membranas dos eritrócitos, hemácias e outras células de mamíferos; e a produção de sideróforos que removem ferro de transferrinas, transferindo este elemento ao microrganismo (HUEBER & GOLDMANN, 1999; VON EIFF, PETERS & HEIFMANN, 2002).

*S. haemolyticus* é o segundo SCN mais freqüentemente associado com infecções humanas, tendo sido implicado em casos de endocardites, septicemias, peritonites, infecções geniturinárias, ósseas e articulares (KLEEMAN, BANNERMAN & KLOOS, 1993; SPANU *et al.*, 2003; OTTO, 2004). Relatos recentes têm relacionado esta espécie a bacteriemias associadas à complicações, mostrando sua significância clínica (RUHE *et al.*, 2004). Esta espécie também é conhecida por sua maior resistência à oxacilina entre os SCN e,

frequentemente, tem apresentado concentrações mínimas inibitórias (CMI) para glicopeptídeos mais elevadas do que outras espécies (ING, BADDOUR & BAYER, 1997).

Amostras da espécie *S. hominis* têm sido isoladas de artrites, endocardites e de septicemias (BANNERMAN, 2003). Dentre os SCN, essa é a terceira espécie mais isolada em infecções hospitalares (ING, BADDOUR & BAYER, 1997; RUHE *et al.*, 2004; CHAVES *et al.*, 2005).

Comparados com outras espécies de SCN, infecções por *S. lugdunensis* e *S. schleiferi* podem apresentar uma maior gravidade (OTTO, 2004). Esses microrganismos têm sido relatados como frequentes agentes etiológicos de endocardites, mas também têm sido implicados em casos de artrites, osteomielites, bacteriemias e infecções associadas à complicações. Infecções relacionadas à cateteres e próteses articulares, e dos tratos urinário e respiratório também têm sido associadas a essas espécies. Pacientes com bacteriemia por esses microrganismos apresentam sintomatologia muito semelhante a daqueles pacientes com bacteriemia por *S. aureus* (VON EIFF, PETERS & HEIFMANN, 2002). Assim como *S. aureus*, as espécies *S. lugdunensis* e *S. schleiferi* também expressam fator “clumping” e DNAase (KLEEMAN, BANNERMAN & KLOOS, 1993; LEUNG, 1998; HAILE *et al.*, 2002; RUHE *et al.*, 2004).

*S. saprophyticus* é um importante patógeno, principalmente, em infecções do trato urinário de mulheres jovens, sexualmente ativas, sendo considerado o segundo patógeno de maior prevalência neste tipo de infecção, estando somente atrás de *E. coli* (VON EIFF, PETERS & HEIFMANN, 2002; OTTO, 2004). A adesão do *S. saprophyticus* é mais evidente em células do trato urinário, porque o patógeno possui adesinas em sua superfície que reconhecem N-acetyl-D-glucosamina, resíduos presentes nas células epiteliais desta mucosa (MARTINEAU *et al.*, 2000).

Outros SCN têm sido implicados em uma variedade de síndromes clínicas apresentadas na tabela 1.

TABELA 1 – Síndromes clínicas relacionadas com algumas espécies de SCN

<b>Espécie</b>	<b>Síndromes clínicas</b>
<i>S. capitis</i>	endocardite, septicemia
<i>S. caprae</i>	endocardite, artrite, osteomielite
<i>S. simulans</i>	endocardite, septicemia, osteomielite
<i>S. warneri</i>	endocardite, septicemia, osteomielite
<i>S. schleiferi</i>	septicemia, artrite, osteomielite
<i>S. cohnii</i>	endocardite, pneumonia, artrite
<i>S. xylosum</i>	artrite

(VON EIFF, PETERS & HEIFMANN, 2002; BANNERMAN, 2003; OTTO, 2004)

O aumento da problemática em relação às infecções causadas por SCN deve-se a freqüente ocorrência de amostras multirresistentes. Em trabalho realizado por Ferreira e colaboradores (2002), no Brasil, 62% das amostras de SCN analisadas apresentaram-se resistentes à oxacilina. Diekema e colaboradores (2001) já haviam demonstrado que mais de 70% das amostras isoladas de várias partes do mundo eram resistentes a este antimicrobiano. Um estudo recente do sistema NNIS (2004), realizado no período de 1992-2004, envolvendo aproximadamente 300 hospitais, apresentou uma taxa de 89,1% de resistência à oxacilina entre amostras de SCN isoladas de pacientes das UTIs analisadas.

#### **1.4 Identificação de *Staphylococcus***

Vários fatores associados às infecções causadas por *Staphylococcus* interferem com a mortalidade dentro do ambiente hospitalar. A dificuldade em se estabelecer um diagnóstico rápido do agente etiológico, especialmente para as espécies pertencentes ao grupo dos SCN, pode agravar ainda mais o quadro pelo conseqüente retardamento no tratamento, já que dependendo da espécie envolvida, tanto a virulência quanto a susceptibilidade aos antimicrobianos podem variar substancialmente (CUNHA *et al.*, 2002).

O reconhecimento da significância dos *Staphylococcus*, em especial dos SCN, como patógenos tem levado ao maior conhecimento sobre a epidemiologia e o potencial patogênico deste gênero, assim como, tem aumentado o interesse na caracterização detalhada das diferentes espécies deste grupo. Pesquisas utilizando estes microrganismos têm desenvolvido métodos acurados para sua identificação, contribuindo para a melhor caracterização epidemiológica destas amostras (DE PAULIS *et al.*, 2003; CUNHA, SINZATO & SILVEIRA, 2004) e auxiliando na compreensão do papel destes microrganismos no contexto clínico (MINTO *et al.*, 1999).

A identificação dos *Staphylococcus* em espécies é um pré-requisito para processos de tipagem e estudos epidemiológicos (IEVEN *et al.*, 1995). Não obstante, esta identificação pode nos ajudar a aprender mais sobre a diversidade, padrão de resistência e virulência destes microrganismos (ENG *et al.*, 1982).

Os *Staphylococcus* estão entre os microrganismos mais isolados no laboratório de microbiologia clínica. Em geral, a identificação destes microrganismos é limitada a um teste rápido para identificação de *S. aureus* e os microrganismos pertencentes a outras espécies do gênero são simplesmente relatados como SCN. Em adição, algumas análises microbiológicas podem levar a interpretações errôneas. Por exemplo, entre amostras clínicas de *Staphylococcus* podem estar presentes as espécies *S. lugdunensis* ou *S. schleiferi* que expressam uma proteína com afinidade ao fibrinogênio. Alguns laboratórios se limitam ao uso de testes rápidos baseados apenas na detecção do fator “clumping” (fator de ligação ao fibrinogênio) para identificação de *S. aureus*. Conseqüentemente, esse tipo de teste pode resultar em uma falsa identificação deste microrganismo (IEVEN *et al.*, 1995).

Vários métodos têm sido propostos para serem utilizados na identificação de *Staphylococcus*. Estes incluem métodos convencionais, que visam simplificar, mas, principalmente, obter acurácia na identificação (KLOOS & SCHLEIFER, 1975; BRUN,

FLEURETTE & FOREY, 1978; IEVEN *et al.*, 1995; MULDER, 1995; MONSEN *et al.*, 1998; DE PAULIS *et al.*, 2003; CUNHA, SINZATO & SILVEIRA, 2004), bem como, sistemas de identificação comercial miniaturizado (IEVEN *et al.*, 1995; RENNEBERG, RIENECK & GUTSCHIK, 1995; MONSEN *et al.*, 1998; DE PAULIS *et al.*, 2003; SPANU *et al.*, 2003; HEIKENS *et al.*, 2005) ou automatizado (WEINSTEIN *et al.*, 1998; SPANU *et al.*, 2003, 2004; MARCO, JURADO & ANTA, 2004; KANEMITSU *et al.*, 2005; NONHOFF, ROTTIERS & STRUELENS, 2005) e métodos moleculares (KANDA, HIRAMATSU & YOKOTA, 1990; MARTINEAU *et al.*, 1996, 1998; EDWARDS, KAUFMANN & SAUNDERS, 2001; COUTO *et al.*, 2001; POYART *et al.*, 2001; YUGUEROS *et al.*, 2001; FUJITA *et al.*, 2005; HEIKENS *et al.*, 2005; LAYER *et al.*, 2006).

O método convencional recomendado por Bannerman em 2003, composto por 36 testes, é considerado seguro e acurado, mas também é relativamente trabalhoso para ser usado na rotina laboratorial e pode levar até sete dias para identificação de uma amostra em espécie dentro do gênero *Staphylococcus*.

Desde a primeira avaliação de um sistema rápido de identificação convencional relatado por Kloos e Scheleifer, em 1975, composto por 13 provas bioquímicas, muitos laboratórios têm investido na utilização de métodos miniaturizados ou automatizados de identificação bacteriana com o objetivo de reduzir o número de testes, os custos laboratoriais e melhorar a identificação (RHODEN & MILLER, 1995). A prática laboratorial também é agilizada pela utilização destes métodos que requerem pouco manuseio. Porém, a acurácia obtida pelo uso destas metodologias têm variado. No caso dos sistemas miniaturizados a variação é de 81% a 97,5% (IEVEN *et al.*, 1995; MONSEN *et al.*, 1998) e em relação à automação é de 73,6% a 93,6% (WEINSTEIN *et al.*, 1998; SPANU *et al.*, 2003).

Os sistemas comerciais, miniaturizados ou automatizados, utilizados na identificação de *Staphylococcus*, de maneira geral, apresentam o mesmo tipo de problema, isto é, a falta de



informações nos bancos de dados algumas vezes não permite a identificação em espécie (RENNEBERG, RIENECK & GUTSCHIK, 1995). Estes sistemas também apresentam problemas quanto ao custo, que é normalmente elevado. Entretanto, o mais importante é que eles podem induzir a resultados incertos devido a variabilidade de expressão de características fenotípicas apresentadas pelos microrganismos, que são usadas como parâmetros de diagnóstico. Adicionalmente, muitos destes sistemas são baseados em resultados colorimétricos, ou apenas visuais e sua interpretação pode ser subjetiva (COUTO *et al.*, 2001).

A identificação precisa dos *Staphylococcus* em espécie é essencial para o diagnóstico acurado, o tratamento efetivo do paciente e para confirmar as falhas na terapêutica (SPANU *et al.*, 2003). Em 1978, Brun, Fleurette e Forey relataram a necessidade de se identificar as espécies de SCN isoladas em infecções, já que o papel patogênico deste grupo já havia sido descrito em vários relatos, confirmando a importância destes agentes na clínica médica. A emergência dos SCN não somente como patógenos humano, mas também, como reservatórios de genes de resistência a vários antimicrobianos, demonstra a necessidade do desenvolvimento de métodos para sua identificação precisa (COUTO *et al.*, 2001). Os procedimentos para a identificação precisariam ser padronizados e os laboratórios de microbiologia deveriam considerar o uso definitivo de métodos rápidos e confiáveis para identificação, ao menos das espécies prevalentes de SCN (KLEEMAN, BANNERMAN & KLOOS, 1993).

Em suma, a não identificação das várias espécies de *Staphylococcus*, através do método de referência deve-se, normalmente, à demora, à dificuldade e ao custo do método para ser implantado na rotina (BANNERMAN, 2003). Por outro lado, quando os sistemas comerciais são utilizados, permitindo a identificação mais rápida das espécies de *Staphylococcus* mais isoladas, estes mostram acurácia diminuída, além de alto custo (DE

PAULIS *et al.*, 2003). Assim, há a necessidade de se propor esquemas rápidos para identificação de *Staphylococcus* que apresentem, principalmente, alta acurácia quando comparados aos sistemas convencionais, rapidez no diagnóstico e sejam menos onerosos para uso na rotina laboratorial.

#### 1.4 Justificativa

Recentemente, nosso grupo desenvolveu um esquema simplificado para a identificação das principais espécies de *Staphylococcus* isoladas de infecções hospitalares e avaliou a acurácia de dois métodos fenotípicos de identificação, um esquema simplificado de identificação que fora desenvolvido e o método automatizado de identificação MicroScan WalkAway (Dade Behring Inc, West Sacramento, CA, EUA), em comparação com o método padrão composto por 22 testes fenotípicos.

Foram analisadas 153 amostras hospitalares de *Staphylococcus* pela identificação automatizada, método padrão e esquema simplificado formado por 9 testes fenotípicos (fator “clumping”, produção de hemólise, produção das enzimas: PYRase, urease, fosfatase, produção de ácidos a partir de manose e trealose, e susceptibilidade à novobiocina e desferrioxamina).

A utilização do método padrão permitiu a identificação de 12 espécies e 7 subespécies: *S. epidermidis* (65 amostras), *S. haemolyticus* (42), *S. hominis* subsp. *hominis* (12), *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* (7), *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus* (5), *S. sciuri* subsp. *sciuri* (4), *S. cohnii* subsp. *urealyticus* (4), *S. warneri* (4), *S. caprae* (2), *S. simulans* (2), *S. lugdunensis* (2), *S. aureus* (2), *S. capitis* subsp. *capitis* (1) e *S. capitis* subsp. *urealyticus* (1).

A automação identificou corretamente 77,8% das amostras, não identificando 10 e identificando erroneamente 24 das 153 amostras analisadas. O esquema simplificado

desenhado pelo nosso grupo identificou corretamente 97,4% das amostras de *Staphylococcus* analisadas (IORIO, 2004).

A proposta do presente estudo foi aplicar os testes do trabalho anterior em um sistema miniaturizado subordinado a um fluxograma, visando uma melhor relação custo-benefício na identificação dos *Staphylococcus* isolados de infecções hospitalares.

## 2 OBJETIVOS

---

O objetivo geral deste estudo foi confeccionar um método miniaturizado alternativo subordinado a um fluxograma para identificação de amostras de *Staphylococcus*, propiciando uma melhor relação custo-benefício na identificação das espécies prevalentes em infecções.

Os objetivos específicos foram:

- 1- Identificar amostras de *Staphylococcus*, isoladas a partir de diferentes espécimes clínicos, pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Infecção Hospitalar, DMM do IMPPG, UFRJ, por um esquema convencional composto por 22 testes fenotípicos.
- 2- Padronizar a formulação dos meios, reagentes, inóculo bacteriano e período de incubação de um grupo mínimo de testes bioquímicos previamente selecionados para identificação das espécies prevalentes de *Staphylococcus*, para compor o método miniaturizado.
- 3- Desenvolver um fluxograma subordinado ao método miniaturizado para identificar as espécies prevalentes de *Staphylococcus*.
- 4- Confirmar a identificação das amostras atípicas pertencentes às espécies mais prevalentes em infecções humanas, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, através da técnica de PCR.

### 3 MÉTODOS

---

#### 3.1 Amostras bacterianas

Foram analisadas 192 amostras clínicas de *Staphylococcus*, isoladas de diversos sítios (TABELA 2), pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Infecção Hospitalar (LIH), Departamento de Microbiologia Médica (DMM), do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes (IMPPG) da UFRJ, provenientes de pacientes oriundos de diferentes instituições nacionais de saúde.

TABELA 2 – Sítios de isolamento das 192 amostras de *Staphylococcus* analisadas

Sítio de isolamento	Nº de amostras
Sangue	130
Urina	15
Sítio cirúrgico	13
Nasofaringe	12
Outros	22
Total	192

Todas as amostras clínicas, utilizadas neste estudo, foram mantidas em caldo TSB (“Trypticase Soy Broth”, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) com 20% (v/v) de glicerol, a  $-20^{\circ}\text{C}$  (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989).

As amostras utilizadas nesse estudo como controles dos testes estão presentes na tabela 3.

TABELA 3 – Amostras utilizadas como controles dos testes

<b>Espécie</b>	<b>Referência</b>
<i>Staphylococcus epidermidis</i> *	ATCC 14990
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> *	ATCC 29970
<i>Staphylococcus aureus</i> *	ATCC 12600
<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>hominis</i> *	ATCC 27844
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> *	ATCC 15305
<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i> *	ATCC 27840
<i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> *	ATCC 29974
<i>Staphylococcus xylosus</i> *	ATCC 29971
<i>Staphylococcus lugdunensis</i> *	DSMZ 4804
<i>Staphylococcus schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i> *	DSMZ 4807
<i>Staphylococcus simulans</i>	ATCC 27851
<i>Staphylococcus warneri</i>	ATCC 10209
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 10240
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11229
<i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>	LIH 219s

ATCC – American Type Culture Collection, DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, LIH – Laboratório de Infecção Hospitalar, \* – Amostra Tipo.

### 3.2 Identificação do gênero *Staphylococcus*

Os testes para a caracterização do gênero foram realizados de acordo com as metodologias descritas por MacFaddin (1977), Bannerman (2003) e Madigan, Martinko e Parker (2004). Os testes utilizados estão listados a seguir.

#### 3.2.a Aspecto morfo-tintorial

O aspecto morfo-tintorial foi analisado através da coloração de Gram. A leitura foi realizada observando-se a coloração, a morfologia e o arranjo das células bacterianas. As células coradas em violeta foram consideradas Gram-positivas, enquanto aquelas coradas em rosa foram consideradas Gram-negativas. A amostra *S. aureus* ATCC 12600 foi utilizada como controle Gram-positiva, enquanto *E. coli* ATCC 11229 como Gram-negativa.

### 3.2.b Produção da enzima catalase

A produção da enzima catalase foi verificada em lâmina de microscopia, tocando-se em uma colônia bacteriana, crescida em TSA (“Trypticase Soy Agar”, Oxoid; Basingstoke, Inglaterra), com o auxílio de uma agulha bacteriológica e, posteriormente, em uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%. A formação de bolhas foi indicativa de reação positiva. As amostras *S. epidermidis* ATCC 14990 e *E. faecalis* ATCC 29212 foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

### 3.2.c Susceptibilidade à bacitracina

Uma suspensão bacteriana, de cada amostra, com uma turbidez equivalente à 0,5 da escala McFarland ( $\sim 10^8$  UFC/mL) foi preparada em salina 0,85% e semeada confluentemente em ágar Müeller-Hinton (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA) utilizando-se um “swab”. Posteriormente, foi depositado sobre o meio um disco impregnado de bacitracina 0,04U (CECON, São Paulo, Brasil) e a placa foi incubada a 35°C por 24h. Um halo menor ou igual a 10mm foi indicativo de resistência à bacitracina (BAKER, HACKETT & SIMARD, 1986). As amostras utilizadas no controle do teste foram *S. aureus* ATCC 12600 (resistente) e *M. luteus* ATCC 10240 (sensível).

### 3.3 Identificação das espécies de *Staphylococcus* através do método convencional

Os testes bioquímicos para identificação das espécies de *Staphylococcus* foram realizados de acordo com MacFaddin (1977), Holt e colaboradores (1994) e Bannerman (2003), com modificações, conforme descritas abaixo. O fluxograma de inoculação dos testes está apresentado na figura 1.

### **3.3.a Produção da enzima coagulase livre**

A verificação da produção da enzima coagulase foi realizada a partir de colônias isoladas, crescidas em ágar sangue [“Blood Agar Base” (Oxoid) com 5% de sangue desfibrinado de carneiro], repicadas para tubo contendo plasma de coelho diluído a 1:2 em solução salina a 0,85% (0,2mL de plasma em 0,2mL de salina). Após a incubação por 4h a 35°C, em banho-maria, a produção de coágulo indicou reação positiva. Resultados negativos foram confirmados com até 24h de incubação. A amostra utilizada como controle positivo foi *S. aureus* ATCC 12600, enquanto a amostra de *S. epidermidis* ATCC 14990 foi utilizada como controle negativo no teste.

### **3.3.b Produção de hemólise**

A verificação da produção de hemólise foi realizada por inspeção visual da cultura em meio ágar sangue nos períodos de 24, 48 e 72h de incubação, a 35°C. O aparecimento de zona de hemólise intensa ao redor das colônias em até 72h de incubação foi indicativo da presença de hemólise, enquanto zona de hemólise fraca (1mm) ou ausente em até 72h de incubação foi indicativa de hemólise fraca ou ausente, respectivamente. As amostras *S. haemolyticus* ATCC 29970 e *S. aureus* 12600 foram utilizadas como controles de hemólise positiva e *S. epidermidis* ATCC 14990 foi utilizado como controle negativo deste teste.

### **3.3.c Produção de fator “clumping”**

A produção de fator “clumping” foi verificada utilizando-se o sistema comercial “Slidex Staph Plus” (bioMérieux S/A, Inc., Durham, NC, EUA) e a leitura foi realizada de acordo com instruções do fabricante. Foram utilizadas as amostras *S. aureus* ATCC 29213 e



*S. lugdunensis* DSMZ 4804 como controles positivos, e *S. epidermidis* ATCC 12228 como controle negativo da reação.

### 3.3.d Produção da enzima pirrolidonil arilamidase (PYRase)

Três colônias da amostra foram transferidas para 0,2mL de caldo TSB (Oxoid) contendo 0,01% (p/v) de L-pirroglutamil- $\beta$ -naftilamina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) para verificar a produção da enzima pirrolidonil arilamidase. Após 4h de incubação a 37°C em banho-maria, foi realizada a leitura do teste pela adição de uma gota da solução reveladora contendo dimetilaminocinamaldeído a 1% (p/v) (Sigma Chemical Company). O aparecimento de uma coloração rosa ou púrpura em até 10min, sob agitação leve foi indicativo de um resultado positivo. Como controles positivo e negativo da reação foram usadas as amostras *S. haemolyticus* ATCC 29970 e *S. aureus* 12600, respectivamente.

Para os testes compreendidos entre os itens 3.3.e e 3.3.j foi preparada uma suspensão bacteriana de cada amostra, em salina 0,85%, com turbidez equivalente à escala 2 de McFarland ( $\sim 6 \times 10^8$  UFC/mL) e inoculada nos tubos testes (FIGURA 1).

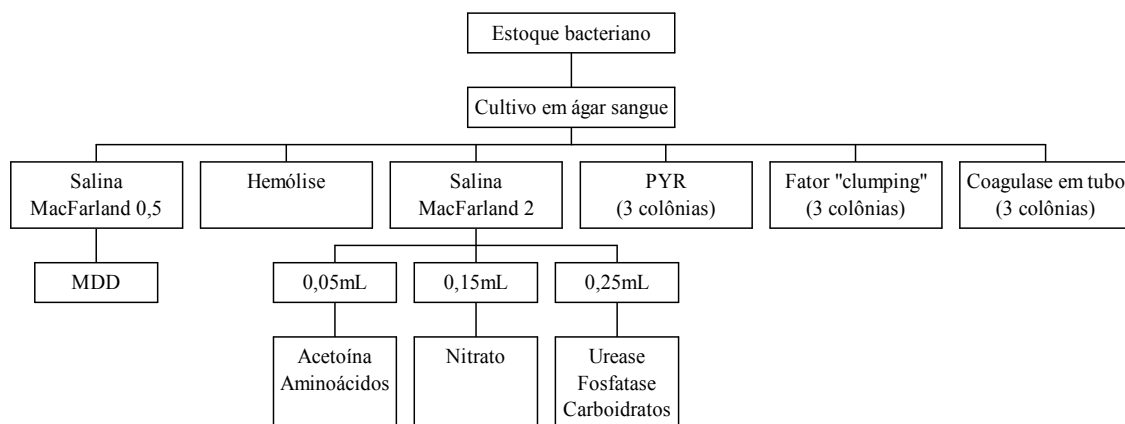


FIGURA I – Fluxograma de inoculação das provas fenotípicas. MDD – Método de Disco-Difusão para determinação da susceptibilidade à novobiocina, polimixina B e desferrioxamina.

### **3.3.e Produção da enzima urease**

A suspensão bacteriana da amostra (0,25mL) foi transferida para 3mL de caldo uréia de Rustigian & Stuart, confeccionado segundo MacFaddin (1977). A leitura foi realizada em 48h de incubação, a 35°C. A mudança da coloração do meio de amarela para vermelha ou rosa foi considerada como resultado positivo. As amostras *S. epidermidis* ATCC 14990 e *S. haemolyticus* ATCC 29970 foram utilizadas, respectivamente, como controles positivo e negativo desta prova bioquímica.

### **3.3.f Produção da enzima fosfatase**

Para a verificação da produção da enzima fosfatase foram utilizados 3mL de caldo PDP (Phenolphthalein Diphosphate) adicionado de uma gota de solução PDP (Phenolphthalein Diphosphate), ambos confeccionados segundo MacFaddin (1977). Foram adicionados 0,25mL da suspensão bacteriana e o tubo incubado por 24h, a 35°C. A leitura foi realizada após a adição de uma gota da solução reveladora de NaOH a 40% (v/v), observando-se o aparecimento de coloração rosa para amostras positivas. As amostras controles utilizadas foram *S. aureus* ATCC 12600 (controle positivo) e *S. haemolyticus* ATCC 29970 (controle negativo).

### **3.3.g Fermentação de carboidratos**

A fermentação dos carboidratos foi realizada em 3mL de caldo base vermelho de fenol, confeccionado de acordo com MacFaddin (1977), contendo 1% (p/v) de cada um dos seguintes açúcares: trealose, sacarose, ribose, celobiose, xilose (Sigma Chemical Company), lactose, manitol (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil), maltose (VETEC, RJ, Brasil) e manose

(BDH Laboratory Supplies, England). Os açúcares foram adicionados, assepticamente ao caldo base vermelho de fenol, após serem filtrados em membrana de celulose-acetato com porosidade de 0,20µm (Advantic MFS, Inc., CA, USA). Foram inoculados 0,25mL da suspensão bacteriana, por tubo, para cada açúcar. A leitura foi realizada em 24, 48 e 72h de incubação, a 35°C. A modificação da coloração do meio de vermelha para amarela foi indicativa de resultado positivo. As amostras *S. epidermidis* ATCC 14990, *S. haemolyticus* ATCC 29970, *S. hominis* subsp. *hominis* ATCC 27844, *S. lugdunensis* DSMZ 4804, *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* DSMZ 4807, *S. xylosum* ATCC 29971 e a amostra clínica LIH 219s (*S. sciuri* subsp. *sciuri*) pertencente à coleção do laboratório de Infecção Hospitalar foram utilizadas como controles negativos ou positivos nestes testes.

### **3.3.h Produção de enzimas descarboxilases**

A descarboxilação de aminoácidos foi verificada adicionando-se 0,05mL da suspensão bacteriana em 1mL de caldo base Møller (Difco Laboratories) contendo 1% (v/v) de L(+)-arginina (Merck) ou L(+)-ornitina (ISO FAR, Rio de Janeiro, Brasil). O aminoácido ornitina foi adicionado à base Møller após ser filtrado em membrana de celulose-acetato (Advantic). Após a inoculação bacteriana, o meio foi coberto assepticamente com óleo mineral. A leitura foi realizada com 24, 48 e 72h de incubação, a 35°C. A não alteração da coloração do meio ou a modificação para amarela foram indicativas de resultados negativos, enquanto que a modificação da coloração do meio para a cor roxa foi indicativa de resultado positivo. Foram utilizadas as amostras *S. haemolyticus* ATCC 29970 e *S. saprophyticus* ATCC 15305 como controles positivo e negativo da descarboxilação da arginina, respectivamente, e *S. lugdunensis* DSMZ 4804 e *S. haemolyticus* ATCC 29970 como controles positivo e negativo da descarboxilação da ornitina, respectivamente.

### 3.3.i Redução do nitrato

A redução do nitrato foi verificada em 2mL de caldo nitrato de potássio confeccionado segundo MacFaddin (1977). Foram adicionados 0,15mL da suspensão bacteriana e o tubo incubado por 24h, a 35°C. A leitura foi realizada pela adição de 0,5mL da solução reveladora de dimetil- $\beta$ - naftilamina a 0,6% e 0,5mL da solução reveladora de ácido sulfanílico a 0,8%. O surgimento da cor rosa em 30seg foi indicativo de resultado positivo e a não alteração da coloração do meio foi indicativa de resultado negativo. A confirmação do resultado negativo foi realizada pela adição de 20mg de zinco em pó, que reduz o nitrato não utilizado pela amostra, gerando uma coloração rosa. As amostras *S. epidermidis* ATCC 14990 (controle positivo) e *S. saprophyticus* ATCC 15305 (controle negativo) foram utilizadas como controles deste teste.

### 3.3.j Produção de acetoína

A produção de acetoína a partir da glicose foi verificada após inoculação de 0,05mL da suspensão bacteriana em 2,5mL de meio Clark & Lubs, confeccionado de acordo com MacFaddin (1977), e incubado a 35°C. Após 48h de incubação foram adicionadas soluções reveladoras de  $\alpha$ -naftol a 5% (0,6mL) e KOH a 40% (0,2mL). O aparecimento de coloração rosa, até 15min, sob leve agitação, foi verificado para amostras positivas. A não alteração na coloração do meio indicou resultado negativo. As amostras *S. epidermidis* ATCC 14990 e *S. haemolyticus* ATCC 29970 foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

### 3.3.1 Susceptibilidade à antimicrobianos

Uma suspensão bacteriana, de cada amostra, com uma turbidez equivalente à 0,5 da escala McFarland ( $\sim 10^8$  UFC/mL) foi preparada em salina 0,85% e semeada confluentemente utilizando-se um “swab” em ágar Müeller-Hinton (Difco Laboratories). Posteriormente, foram depositados sobre o meio discos de novobiocina (5 $\mu$ g), polimixina B (300 UI) e desferrioxamina (100 $\mu$ g) e a placa foi incubada a 35°C, por 24h.

#### 3.3.1.1 Novobiocina

Foram utilizados discos contendo 5 $\mu$ g de novobiocina (CECON). As amostras que apresentaram halos menores ou iguais a 16mm foram consideradas resistentes à novobiocina (Bannerman, 2003). As amostras padrão utilizadas como controles foram *S. saprophyticus* ATCC 15305 (resistente) e *S. epidermidis* ATCC 14990 (sensível).

#### 3.3.1.2 Polimixina B

Foram utilizados discos de 300 UI de polimixina B (CECON). Um halo menor ou igual a 16mm foi indicativo de resistência à polimixina B (MONSEN *et al.*, 1998). As amostras utilizadas no controle do teste foram *S. epidermidis* ATCC 14990 (resistente) e *S. hominis* subsp. *hominis* ATCC 27844 (sensível).

#### 3.3.1.3 Desferrioxamina

Discos de papel de filtro foram impregnados assepticamente com 100 $\mu$ g de desferrioxamina (Sigma Chemical Company). As amostras que apresentaram qualquer halo de inibição foram consideradas susceptíveis à desferrioxamina (MONSEN *et al.*, 1998). Foram

utilizadas as amostras padrão *S. hominis* ATCC 27844 e *S. warneri* ATCC 10209 como controles sensível e resistente, respectivamente.

A identificação de todas as amostras analisadas em espécies foi realizada através da análise dos resultados obtidos nos testes acima descritos, de acordo com a classificação do “*Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology*” (HOLT *et al.*, 1994), Monsen e colaboradores (1998) e “*Manual of Clinical Microbiology*” (BANNERMAN, 2003) (TABELA 4).

TABELA 4 – Características fenotípicas das principais espécies e subespécies de *Staphylococcus* isoladas de infecções

Espécies	Testes de identificação																					
	H E M	F C	C G	P Y R	U R E	F O S	A C I D O S	N O V	A R G	M A L	M A T	T R E	L A C	M A L	S A C	R I B	C E L	X I L	N O V	D E F	P O L	
<i>S. aureus</i>	+	+	+	-	nd	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	S	R	R	
<i>S. epidermidis</i>	nd	-	-	-	+	+	nd	nd	+	+	+	-	-	nd	+	+	nd	-	-	S	S	R
<i>S. haemolyticus</i>	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	nd	+	nd	+	+	nd	-	-	S	R	S
<i>S. lugdunensis</i>	+	+	-	+	nd	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	S	nd	nd
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	nd	-	-	-	-	-	-	S	nd	S
<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	-	-	-	-	+	-	-	nd	nd	nd	-	-	nd	nd	+	+	-	-	-	S	S	S
<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	nd	nd	-	-	-	nd	+	+	nd	-	-	R	S	nd
<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	nd	+	nd	+	+	-	-	-	R	nd	S
<i>S. warneri</i>	nd	-	-	-	+	-	-	nd	nd	+	-	nd	+	nd	+	+	nd	-	-	S	R	S
<i>S. simulans</i>	nd	-	-	+	+	nd	-	+	+	nd	nd	+	nd	+	nd	+	nd	-	-	S	nd	S
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	nd	-	-	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	+	-	nd	-	-	-	-	R	nd	S	
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticus</i>	nd	-	-	nd	+	+	-	-	-	nd	+	+	+	+	+	-	-	-	-	R	nd	S
<i>S. xylosum</i>	-	-	-	nd	+	nd	-	-	nd	nd	+	+	+	nd	nd	nd	nd	-	+	R	nd	S
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>	nd	-	-	-	-	+	-	-	+	-	nd	+	+	nd	nd	+	+	nd	nd	R	nd	S
<i>S. caprae</i>	nd	-	-	nd	+	+	-	+	+	+	+	nd	+	+	nd	-	-	-	-	S	nd	S
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	nd	-	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	+	+	-	-	-	nd	-	-	-	S	nd	S
<i>S. capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i>	nd	-	-	nd	+	-	-	+	+	nd	+	+	-	nd	+	+	nd	-	-	S	nd	nd

HEM – produção de hemólise; FC – fator “clumping”; CG – coagulase livre; PYR – pirrolidônio arilamidase; URE – urease; FOS – fosfatase; Ácidos a partir de: MAN – manose, MAT – manitol, TRE – trealose, LAC – lactose, MAL – maltose, SAC – ascarose, RIB – ribose, CEL – celobiose, XIL – xilose; susceptibilidade à: NOV – novobiocina, DEF – desferrioxamina, POL – polimixina; ORN – ornitina descarboxilase; ARG – arginina descarboxilase; NIT – redução do nitrato; ACT – produção de acetoina. + – 90% ou mais de cepas positivas; - – 90% ou mais de cepas negativas; R – resistente; S – sensível; nd – não determinante (Holt *et al.*, 1994; Monsen *et al.*, 1998; Bannerman, 2003).

### **3.4 Proposta de um método miniaturizado alternativo de identificação de *Staphylococcus***

A confecção do método miniaturizado alternativo de identificação de *Staphylococcus* foi realizada de acordo com os itens compreendidos entre 3.4.1 e 3.4.3.

#### **3.4.1 Critérios utilizados para a seleção de um grupo mínimo de testes de identificação**

Um grupo mínimo de testes para a identificação das principais espécies clínicas de *Staphylococcus* foi selecionado previamente pelo nosso grupo (IORIO, 2004) a partir das 22 provas bioquímicas do método convencional de identificação (BANNERMAN, 2003).

Os critérios utilizados na seleção das provas bioquímicas que constituem o método miniaturizado de identificação foram: menor período de incubação do teste; potencial de discriminação das espécies, evitando-se a utilização de provas bioquímicas que apresentem resultado variável ou não determinado, segundo Bannerman (2003); e menor percentual de atipia apresentado pelas diferentes espécies identificadas frente aos testes avaliados (IORIO, 2004).

#### **3.4.2 Padronização dos meios de cultura, reagentes, inóculo bacteriano e período de incubação**

Os meios de cultura respectivos aos testes bioquímicos previamente selecionados para compor o método miniaturizado foram padronizados quanto ao pH, concentração e volume (ANEXO, pág. 64).

Os reagentes necessários para a leitura foram padronizados quanto ao volume a ser adicionado, assim como, o inóculo bacteriano a ser utilizado neste método (ANEXO, pág. 64). O tempo de incubação foi avaliado por dois observadores independentes através da análise de diferentes períodos de incubação (24, 48 e 72h).



A padronização levou em consideração a concentração proporcional dos meios de cultura e reagentes utilizados, tempo de incubação, relação inóculo bacteriano x volume do meio, com o objetivo de permitir que as provas bioquímicas apresentassem na microplaca de poliestireno de 96 poços (Imulon 2, Dynathec Laboratories) o mesmo resultado visual que apresentaram nos tubos 13x100 do método convencional.

### **3.4.3 Confeção de um fluxograma subordinado ao método miniaturizado**

Foi confeccionado um fluxograma de identificação de *Staphylococcus* subordinado ao método miniaturizado, fundamentado na acurácia dos resultados obtidos nas provas bioquímicas.

## **3.5 Utilização da técnica da “Polymerase Chain Reaction” (PCR) para confirmação da identificação fenotípica de amostras atípicas de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. haemolyticus***

### **3.5.1 Liberação do DNA bacteriano através de lise térmica**

A liberação do DNA bacteriano foi realizada de acordo com Nunes e colaboradores (1999) com modificações. As amostras de *Staphylococcus* foram crescidas em ágar sangue (35°C por 24h) e posteriormente, cinco colônias foram transferidas para 100µL de tampão TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 7,8). Esta suspensão foi mantida a temperatura de ebulição, em torno de 100°C, por 10min e, em seguida, centrifugada por 30seg, a 9000xg a 4°C. O sobrenadante foi coletado e usado na reação de PCR.

### 3.5.2 Reação de PCR

Para a reação de PCR foram utilizados os oligonucleotídeos listados na tabela 5. A amplificação foi realizada em um termociclador (PTC-100; MJ research, Inc., Watertown, MA, EUA), utilizando-se um volume total de 25 $\mu$ L para a reação, constituída de 2,5 $\mu$ L de tampão da enzima (10mM Tris HCl, 25mM KCl), 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 $\mu$ M de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Life Technologies Inc., Gathersburg, MD, EUA), 1,5U de enzima DNA polimerase (Life Technologies), 20pM de cada oligonucleotídeo SA1, SA2, SH1, SH2, SE1 e SE2 e 3 $\mu$ L de DNA obtido através de lise térmica. As reações foram realizadas separadamente com cada par de oligonucleotídeo. Para amostras fenotipicamente atípicas não pertencentes às espécies *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* foram realizadas reações com os três pares de oligonucleotídeos simultaneamente.

Após a desnaturação inicial de 94°C por 3min, foram realizados 30 ciclos: desnaturação a 94°C/1min, anelamento a 55°C/1min, extensão a 72°C/2min, e extensão final a 72°C/ 5min. Os fragmentos amplificados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 2% em TBE 1X (0,89M Tris, 0,89M ácido bórico, 2,5mM EDTA, pH 8,2), a 100V por 1:30h. O gel foi corado, posteriormente, com solução de brometo de etídio (0,5 $\mu$ g/mL) e fotografado sob luz ultra-violeta. Como padrão de tamanho foi utilizado o marcador 100pb DNA ladder (Life Technologies).

Foram utilizadas as amostras tipo *S. aureus* ATCC 12600, *S. epidermidis* ATCC 14990 e *S. haemolyticus* ATCC 14990 como controles da reação de PCR.

TABELA 5 – Oligonucleotídios utilizados na reação de PCR para identificação das espécies *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*

Fragmento do DNA	Oligonucleotídios	Tamanho do produto (pb)	Referência
espécie-específico de <i>S. aureus</i>	5'-AATCTTTGTCGGTACACGATATTCTTCACG-3' 5'-CGTAATGAGATTTTCAGTAGATAATACAACA-3'	108	Martineau <i>et al.</i> , 1998
espécie-específico de <i>S. epidermidis</i>	5'-ATCAAAAAGTTGGCGAACCTTTTCA-3' 5'-CAAAAGAGCGTGGAGAAAAGTATCA-3'	124	Martineau <i>et al.</i> , 1996
espécie-específico de <i>S. haemolyticus</i>	5'-GGTCGCTTAGTCGGAACAAT-3' 5'-CACGAGCAATCTCATCACCT-3'	285	Menezes <i>et al.</i> , 2005

## 4 RESULTADOS

---

### 4.1 Identificação do gênero *Staphylococcus*

Todas as amostras analisadas neste estudo apresentaram-se como cocos Gram-positivos, agrupados em cachos, catalase-positivas e resistentes à bacitracina, pertencentes ao gênero *Staphylococcus*.

### 4.2 Identificação das espécies de *Staphylococcus* pelo método convencional

O conjunto de testes utilizados permitiu identificar as 192 amostras analisadas. As 13 espécies e 7 subespécies de *Staphylococcus* identificadas pela bioquímica convencional foram: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* subsp. *hominis*, *S. lugdunensis*, *S. hominis* subsp. *novobiosepticus*, *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus*, *S. warneri*, *S. capitis* subsp. *capitis*, *S. cohnii* subsp. *cohnii*, *S. sciuri* subsp. *sciuri*, *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. caprae* e *S. capitis* subsp. *urealyticus*. O número e o percentual das espécies e subespécies identificadas estão apresentados na tabela 6.

TABELA 6 – Distribuição em espécies das 192 amostras de *Staphylococcus* identificadas pelo método convencional no presente estudo

<b>Espécie</b>	<b>Nº (%) de amostras analisadas</b>
<i>S. aureus</i>	44 (22,9%)
<i>S. epidermidis</i>	44 (22,9%)
<i>S. haemolyticus</i>	38 (19,8%)
<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	17 (8,8%)
<i>S. lugdunensis</i>	9 (4,7%)
<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i>	8 (4,2%)
<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	8 (4,2%)
<i>S. warneri</i>	8 (4,2%)
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	5 (2,6%)
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	3 (1,6%)
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>	3 (1,6%)
<i>S. xylosus</i>	2 (1,0%)
<i>S. simulans</i>	1 (0,5%)
<i>S. caprae</i>	1 (0,5%)
<i>S. capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i>	1 (0,5%)
<b>Total</b>	<b>192 (100%)</b>

Setenta e seis (39,6%) das 192 amostras de *Staphylococcus* analisadas apresentaram perfil bioquímico atípico para alguma(s) prova(s) bioquímica(s) do método convencional de identificação utilizado neste estudo, isto é, apresentaram resultados contrários para testes que não são considerados variáveis pelo “*Manual of Clinical Microbiology*” (BANNERMAN, 2003). *S. haemolyticus* foi a espécie que apresentou o maior percentual de amostras atípicas (50%) dentre as três espécies de *Staphylococcus* mais frequentemente isoladas de infecções hospitalares (TABELA 7).

TABELA 7 – Percentual de amostras atípicas de *Staphylococcus* por espécie identificadas pelo método convencional

<b>Espécie (Nº de amostras)</b>	<b>Nº (%) de amostras atípicas</b>
<i>S. aureus</i> (44)	12 (27,3%)
<i>S. epidermidis</i> (44)	11 (25,0%)
<i>S. haemolyticus</i> (38)	19 (50,0%)
<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i> (17)	8 (47,1%)
<i>S. lugdunensis</i> (9)	5 (55,5%)
<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> (8)	2 (25,0%)
<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> (8)	4 (50,0%)
<i>S. warneri</i> (8)	4 (50,0%)
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i> (5)	3 (60,0%)
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> (3)	2 (66,7%)
<i>S. sciuri</i> (3)	3 (100%)
<i>S. xylosus</i> * (2)	0
<i>S. simulans</i> * (1)	1
<i>S. caprae</i> * (1)	1
<i>S. capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i> * (1)	1
<b>Total (192)</b>	<b>76 (39,6%)</b>

\* Espécies com menos de 3 amostras não foram consideradas para análise individual

### **4.3 Confeção do método miniaturizado alternativo para identificação de *Staphylococcus***

Oito testes (produção de fator “clumping”; produção das enzimas PYRase, urease e fosfatase; fermentação de manose e trealose e susceptibilidade à novobiocina e desferrioxamina) foram previamente selecionados por nosso grupo (IORIO, 2004), a partir de 22 provas bioquímicas do método convencional para identificar as principais espécies clínicas de *Staphylococcus* (Bannerman, 2003) (TABELA 8).

TABELA 8 – Método alternativo para identificação de *Staphylococcus*

Espécies	Testes de identificação							
	F	P	U	F	M	T	N	D
	C	Y	R	O	A	R	O	E
<i>S. aureus</i>	+	-	nd	+	+	+	S	R
<i>S. epidermidis</i>	-	-	+	+	+	-	S	S
<i>S. haemolyticus</i>	-	+	-	-	-	+	S	R
<i>S. lugdunensis</i>	+	+	nd	-	+	+	S	nd
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	+	+	-	+	+	nd	S	nd
<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	-	-	+	-	-	nd	S	S
<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobioceticus</i>	-	-	+	-	-	-	R	S
<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	-	-	+	-	-	+	R	nd
<i>S. warneri</i>	-	-	+	-	-	+	S	R
<i>S. simulans</i>	-	+	+	nd	nd	nd	S	nd
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	-	-	-	-	nd	+	R	nd
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticus</i>	-	nd	+	+	+	+	R	nd
<i>S. xylosum</i>	-	nd	+	nd	+	+	R	nd
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>	-	-	-	+	nd	+	R	nd
<i>S. caprae</i>	-	nd	+	+	+	+	S	nd
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	-	-	-	-	+	-	S	nd
<i>S. capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i>	-	nd	+	-	+	-	S	nd

FC – fator “clumping”; PYR – pirrolidoniil arilamidase; URE – urease; FOS – fosfatase; Ácidos a partir de: MAN – manose e TRE – trealose; Susceptibilidade à: NOV – novobiocina e DEF – desferrioxamina. + – 90% ou mais de cepas positivas; - – 90% ou mais de cepas negativas; R – resistente; S – sensível; nd – não determinante (Monsen *et al.*, 1998; Bannerman, 2003).

A figura 2 mostra o fluxograma de identificação de *Staphylococcus* subordinado ao método miniaturizado com os oito testes descritos.



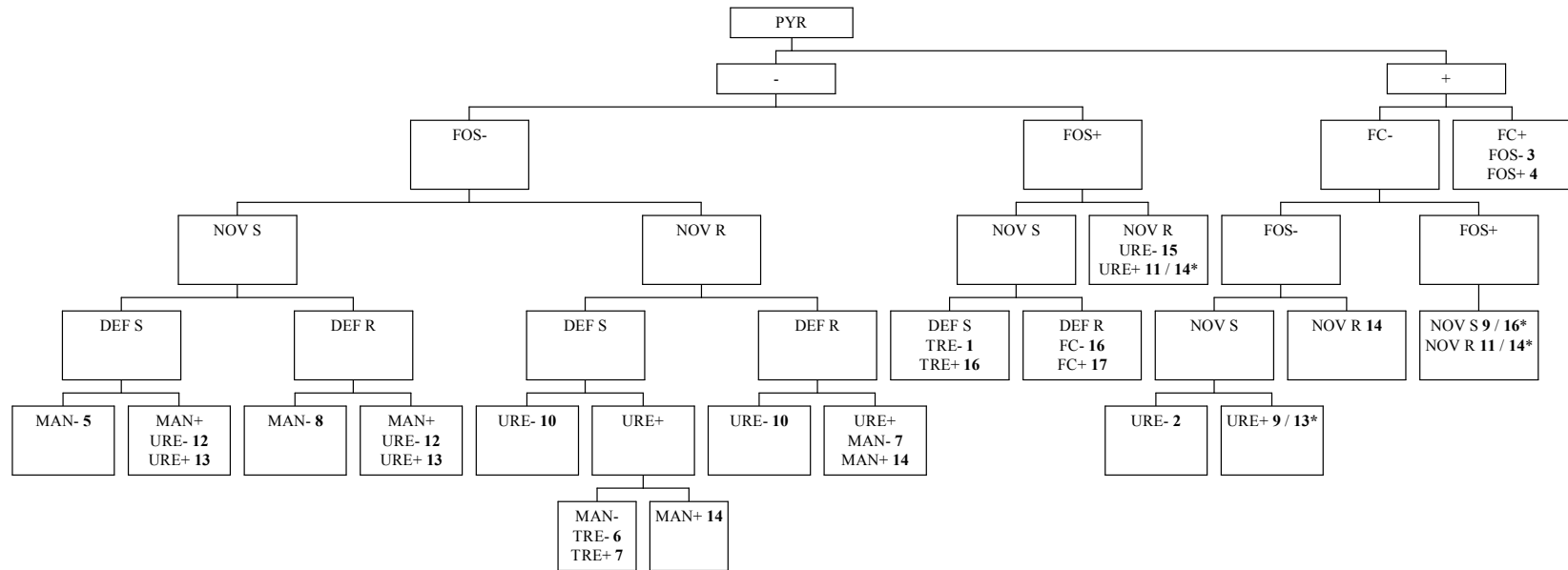


FIGURA 2 - Fluxograma de identificação de *Staphylococcus* subordinado ao método miniaturizado. FC – fator “clumping”; PYR – pirrolidonilarilamidase; URE – urease; FOS – fosfatase; Ácidos a partir de: MAN – manose e TRE – trealose.; susceptibilidade à: NOV – novobiocina, DEF – desferrioxamina. + – resultado positivo; - – resultado negativo; R – resistente; S – sensível (Bannerman, 2003). 1 – *S. epidermidis*, 2 – *S. haemolyticus*, 3 – *S. lugdunensis*, 4 – *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*, 5 – *S. hominis* subsp. *hominis*, 6 – *S. hominis* subsp. *novobiosepticus*, 7 – *S. saprophyticus*, 8 – *S. warneri*, 9 – *S. simulans*, 10 – *S. cohnii* subsp. *cohnii*, 11 – *S. cohnii* subsp. *urealyticus*, 12 – *S. capitis* subsp. *capitis*, 13 – *S. capitis* subsp. *urealyticus*, 14 – *S. xyloso*, 15 – *S. sciuri*, 16 – *S. caprae*, 17 – *S. aureus*. \*O teste de produção de ácido a partir de sacarose pode ser utilizado para discriminar a espécie 9 (*S. simulans*+) da espécie 16 (*S. caprae*-); o teste de produção de ácido a partir de xilose pode ser utilizado para discriminar a espécie 11 (*S. cohnii* subsp. *urealyticus*-) da espécie 14 (*S. xyloso*); o teste de produção de ácido a partir de N-acetilglucosamina pode ser utilizado para discriminar a espécie 9 (*S. simulans*+) da espécie 13 (*S. capitis* subsp. *urealyticus* +).

#### **4.4 Utilização do método miniaturizado em comparação com o método convencional para identificação de *Staphylococcus***

A alternativa miniaturizada para identificação subordinada ao fluxograma, identificou corretamente 10 das 12 espécies padrão utilizadas como controles neste estudo. As duas amostras padrão não identificadas quanto à espécie pelo método aqui proposto foram: *S. simulans* e *S. xylosus*, sendo necessária a utilização de um teste fenotípico adicional recomendado na figura 2. A identificação das amostras controles foi confirmada nos três períodos de incubação avaliados (TABELA 9). A visualização dos resultados da identificação na microplaca de titulação de 96 poços, utilizando-se as amostras controles, nos três períodos de incubação, está presente na figura 3.

TABELA 9 – Identificação de 12 amostras controles de *Staphylococcus* pelo método miniaturizado alternativo

Amostra	Método miniaturizado		
	24h	48h	72h
<i>S. aureus</i> ATCC 12600	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
<i>S. haemolyticus</i> ATCC 29970	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>
<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i> ATCC 27844	<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>
<i>S. lugdunensis</i> DSMZ 4804	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. lugdunensis</i>
<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> ATCC 15305	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>
<i>S. warneri</i> ATCC 10209	<i>S. warneri</i>	<i>S. warneri</i>	<i>S. warneri</i>
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i> ATCC 27840	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> ATCC 29974	<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>
<i>S. simulans</i> ATCC 27851	<i>Staphylococcus</i> *	<i>Staphylococcus</i> *	<i>Staphylococcus</i> *
<i>S. xylosus</i> ATCC 2997	<i>Staphylococcus</i> *	<i>Staphylococcus</i> *	<i>Staphylococcus</i> *
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i> DSMZ 4807	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>

\* Amostras que podem ser identificadas por um teste adicional, segundo o fluxograma apresentado na figura 2

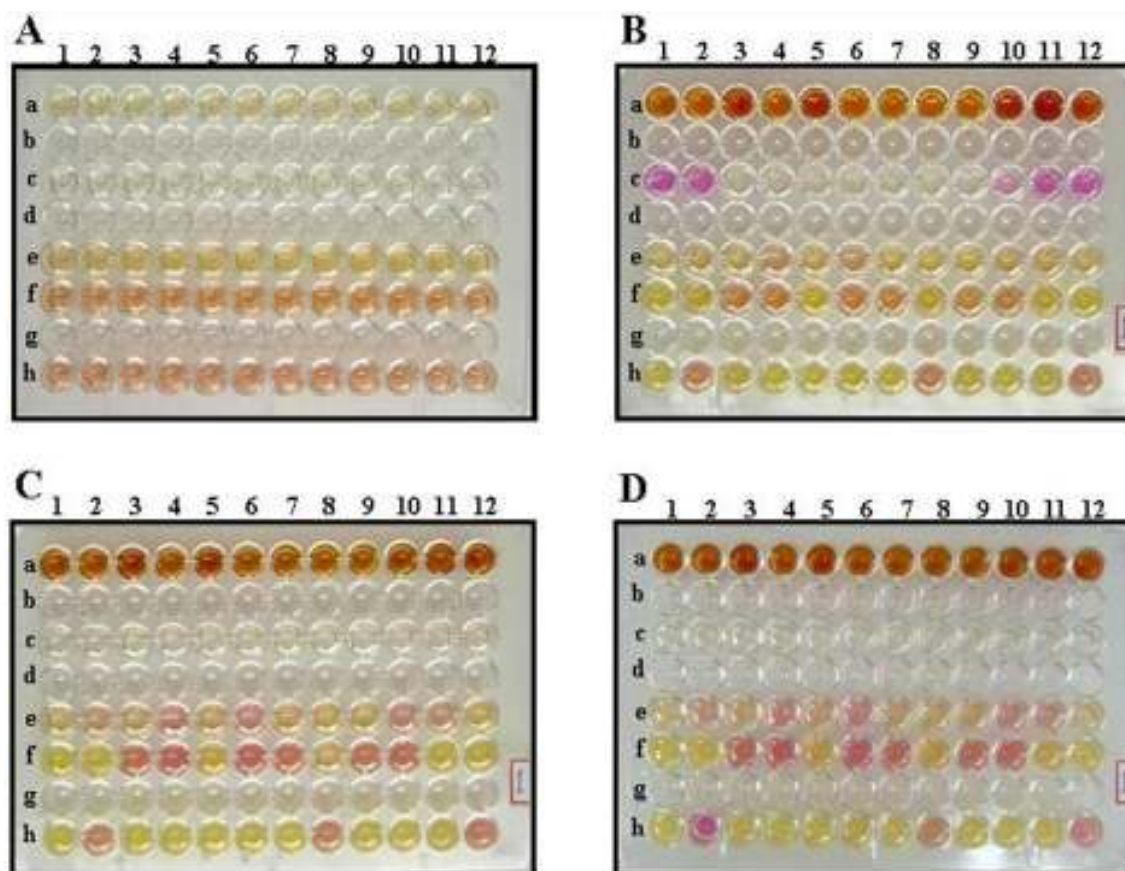


FIGURA 3 – Visualização representativa dos resultados da identificação de 12 amostras controle na microplaca, nos três períodos de incubação. A – microplaca não inoculada, B – microplaca com 24h de incubação, C – microplaca com 48h de incubação, D – microplaca com 72h de incubação. Colunas: 1 – *S. aureus* ATCC 12600, 2 – *S. epidermidis* ATCC 14990, 3 – *S. haemolyticus* ATCC 29970, 4 – *S. hominis* subsp. *hominis* ATCC 27844, 5 – *S. lugdunensis* DSMZ 4804, 6 – *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus* ATCC 15305, 7 – *S. warneri* ATCC 10209, 8 – *S. capitis* subsp. *capitis* ATCC 27840, 9 – *S. cohnii* subsp. *cohnii* ATCC 29974, 10 – *S. simulans* ATCC 27851, 11 – *S. xylosus* ATCC 29971 12 – *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* DSMZ 4807. Linhas: a – teste do PYR, c – teste da fosfatase, e – teste da urease, f – teste da manose, h – teste da trealose. Linhas b, d e g – ausência de testes.

Todas as amostras pertencentes às duas principais espécies de *Staphylococcus* isoladas de infecções em humanos, *S. aureus* e *S. epidermidis*, foram identificadas corretamente em 24, 48 ou 72 horas de incubação (TABELA 10). Todas as amostras pertencente a espécie *S. haemolyticus*, a terceira mais prevalente do gênero, foram identificadas corretamente no período de incubação de 24h, somente uma amostra foi identificada erroneamente em 48h, como *S. capitis* subsp. *urealyticus*, e duas amostras foram identificadas como *S. capitis* subsp. *urealyticus* e *Staphylococcus* spp. em 72h de incubação. Das 17 amostras de *S. hominis* subsp. *hominis* estudadas, duas foram identificadas como *S. capitis* subsp. *capitis* em 24h de incubação e uma foi identificada como *S. capitis* subsp. *urealyticus*, nos períodos de 48h e 72h. Outra subespécie analisada, *S. hominis* subsp. *novobiosepticus*, apresentou suas oito amostras identificadas corretamente nos três períodos de incubação avaliados. Uma entre as nove amostras de *S. lugdunensis* não foi identificada corretamente nos três diferentes tempos de incubação, tendo sido esta amostra identificada como *S. haemolyticus*. Todas as amostras pertencentes as espécies *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus*, *S. warneri*, *S. capitis* subsp. *capitis*, *S. cohnii* subsp. *cohnii* e *S. sciuri* foram identificadas corretamente nos diferentes períodos de incubação analisados.

As duas amostras de *S. xylosus*, assim como, a única amostra analisada de *S. capitis* subsp. *urealyticus* só foram identificadas corretamente no período de incubação de 48h e 72h. As amostras de *S. simulans* e *S. caprae*, uma de cada espécie, não foram identificadas pelo método miniaturizado alternativo (TABELA 10).

TABELA 10 – Identificação de 192 amostras de *Staphylococcus* em espécies pelo método miniaturizado alternativo, em diferentes períodos de incubação, em comparação ao método convencional

Espécie (Nº de amostras identificadas pelo método convencional)	Método miniaturizado Espécie identificada (Nº de amostras)		
	24h	48h	72h
<i>S. aureus</i> (44)	<i>S. aureus</i> (44)	<i>S. aureus</i> (44)	<i>S. aureus</i> (44)
<i>S. epidermidis</i> (44)	<i>S. epidermidis</i> (44)	<i>S. epidermidis</i> (44)	<i>S. epidermidis</i> (44)
<i>S. haemolyticus</i> (38)	<i>S. haemolyticus</i> (38)	<i>S. haemolyticus</i> (37) <i>S. capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i> (1)	<i>S. haemolyticus</i> (36) <i>S. capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i> (1) <i>Staphylococcus</i> spp. (1)*
<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i> (17)	<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i> (15) <i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i> (2)	<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i> (16) <i>S. capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i> (1)	<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i> (16) <i>S. capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i> (1)
<i>S. lugdunensis</i> (9)	<i>S. lugdunensis</i> (8) <i>S. haemolyticus</i> (1)	<i>S. lugdunensis</i> (8) <i>S. haemolyticus</i> (1)	<i>S. lugdunensis</i> (8) <i>S. haemolyticus</i> (1)
<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> (8)	<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> (8)	<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> (8)	<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> (8)
<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> (8)	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> (8)	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> (8)	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> (8)
<i>S. warneri</i> (8)	<i>S. warneri</i> (8)	<i>S. warneri</i> (8)	<i>S. warneri</i> (8)
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i> (5)	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i> (5)	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i> (5)	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i> (5)
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> (3)	<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> (3)	<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> (3)	<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> (3)
<i>S. sciuri</i> (3)	<i>S. sciuri</i> (3)	<i>S. sciuri</i> (3)	<i>S. sciuri</i> (3)
<i>S. xylosus</i> (2)	<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> (2)	<i>S. xylosus</i> (2)	<i>S. xylosus</i> (2)
<i>S. simulans</i> (1)	<i>Staphylococcus</i> spp. (1)*	<i>Staphylococcus</i> spp. (1)*	<i>Staphylococcus</i> spp. (1)*
<i>S. caprae</i> (1)	<i>Staphylococcus</i> spp. (1)*	<i>Staphylococcus</i> spp. (1)*	<i>Staphylococcus</i> spp. (1)*
<i>S. capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i> (1)	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i> (1)	<i>S. capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i> (1)	<i>S. capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i> (1)
Total 192 (100% identificadas)	184 (95,8%)	187 (97,4%)	186 (96,9%)

\* Amostras que podem ser identificadas por um teste adicional, segundo o fluxograma apresentado na figura 2

Observou-se que 184 (95,8%) amostras foram identificadas corretamente em 24h, 187 (97,4%) em 48h e 186 (96,9%) em 72h de incubação (FIGURA 4).

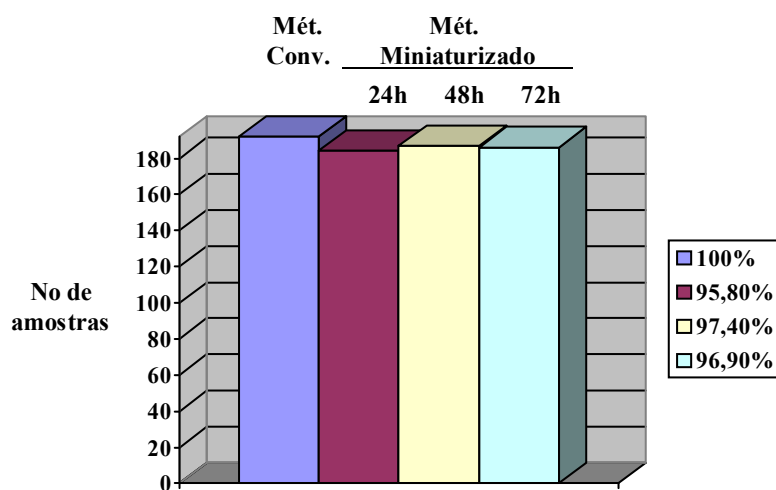


FIGURA 4 – Número de amostras de *Staphylococcus* identificadas pelo método miniaturizado alternativo nos diferentes períodos de incubação em comparação ao método convencional. A legenda apresenta o percentual de amostras corretamente identificadas pelos métodos utilizados

Na tabela 11 são apresentados os percentuais de acurácia por espécie, após utilização do método alternativo miniaturizado de identificação, nos diferentes períodos de incubação testados. As três espécies de maior importância clínica do gênero foram identificadas corretamente em 24h. Contudo, o tempo de incubação de 48h foi o período no qual encontramos o maior percentual de amostras corretamente identificadas (97,4%).

Resultados do método alternativo proposto no estudo que apresentaram discordância com o método convencional de identificação estão presentes na tabela 12. Apenas cinco das 192 amostras não foram identificadas corretamente em 48h de incubação. As espécies menos isoladas em infecções hospitalares, como: *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. caprae* e *S. capitis* subs. *urealyticus*, apresentaram uma maior discordância no período de 24h de incubação, quando comparadas ao método convencional de identificação.

#### 4.5 Discordância entre os observadores na leitura do método alternativo miniaturizado

Em um total de 960 testes lidos, ocorreu 2,7% (26 testes) de discordância entre os dois observadores, sendo 1,3% (12 testes) no período de 24h, 0,6% (6 testes) em 48h e 0,8% (8 testes) em 72h de incubação (FIGURA 5)

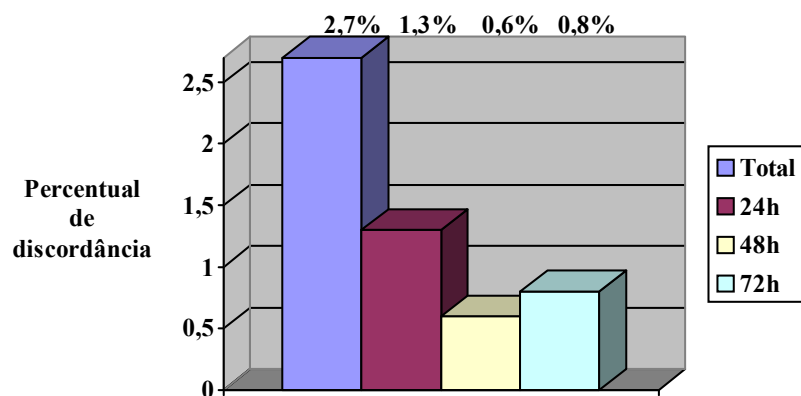


FIGURA 5 – Percentual de discordância entre os leitores nos diferentes períodos de incubação avaliados

A discordância ocorrida entre os observadores na leitura dos testes fenotípicos não foi considerada relevante, visto que, os testes discordantes não apresentavam importância no fluxograma subordinado a alternativa miniaturizada, ou eram variáveis para a identificação das espécies em questão. Desta forma, ambos os leitores obtiveram o mesmo resultado na identificação das 192 amostras.

#### **4.6 Confirmação da identificação fenotípica de amostras atípicas de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* utilizando a técnica de PCR**

Todas as amostras atípicas de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* tiveram sua identificação confirmada pela técnica de PCR. As amostras atípicas pertencentes a outras



espécies foram excluídas naturalmente de serem as espécies supra citadas após a utilização da mesma técnica. A figura 6 representa os amplicons observados em gel de agarose na detecção das espécies *S. aureus* (108 pb), *S. epidermidis* (124 pb) e *S. haemolyticus* (285 pb).

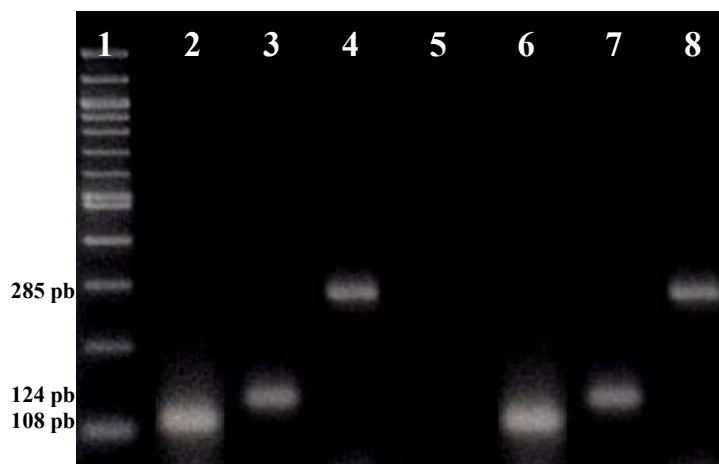


FIGURA 6 – Detecção das espécies *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. aureus* pela técnica de PCR. Foto representativa da eletroforese em gel de agarose dos fragmentos de 108 pb do fragmento espécie específico de *S. aureus*, 124 pb do fragmento espécie específico de *S. epidermidis* e 285 pb do gene *mvaA* (HMG-CoA redutase) de *S. haemolyticus*. Foi utilizado o marcador de tamanho 100 pb (DNA ladder) (Coluna 1). Colunas: 2 – *S. aureus* ATCC 12600; 3 – *S. epidermidis* ATCC 14990; 4 – *S. haemolyticus* ATCC 29970; 5 – *S. hominis* subsp. *hominis* ATCC 27840; 6 – amostra clínica de *S. aureus*; 7 – amostra clínica de *S. epidermidis*; 8 – amostra clínica de *S. haemolyticus*

#### 4.7 Folder de divulgação do método miniaturizado alternativo para identificação de *Staphylococcus*

Vislumbrado uma possível comercialização do método miniaturizado alternativo para identificação de *Staphylococcus* foi confeccionado um folder para a divulgação do produto (FIGURA 7).

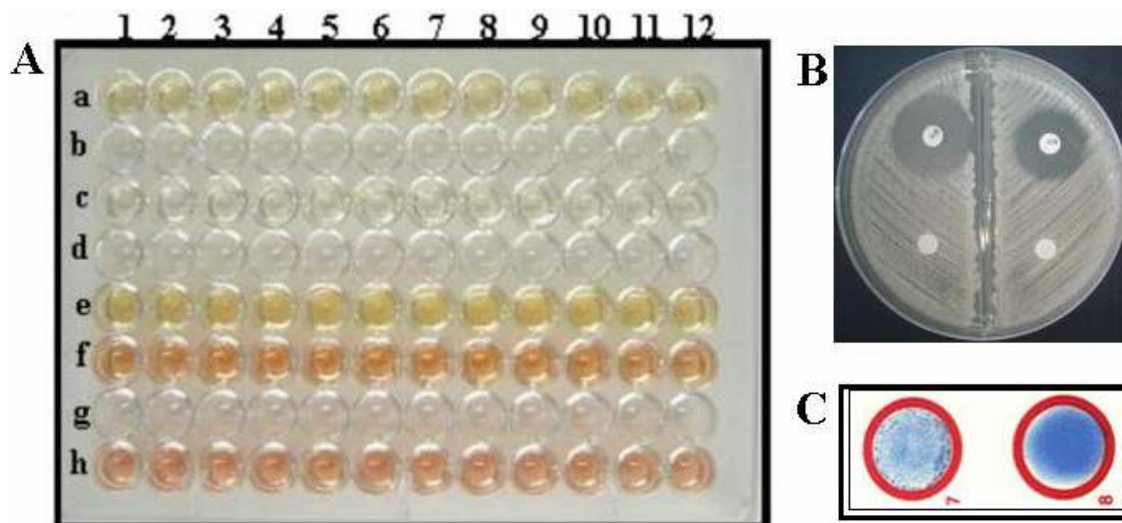


FIGURA 7 – Folder de divulgação do método miniaturizado alternativo para identificação de *Staphylococcus*. Bula: 45  $\mu$ L de uma suspensão 1 de McFarland ( $3 \times 10^8$  UFC/mL) de cada amostra preparada em salina 0,85% deverá ser inoculada em cada poço de uma coluna na microplaca (A). Os testes fenotípicos estão presentes nas linhas: a – PYRase; c – fosfatase; e – urease; f – manose; h – trealose; b, d e g – ausência de testes. A mesma suspensão bacteriana, de cada amostra será semeada confluentemente em ágar Müller-Hinton e posteriormente deve-se depositar sobre o meio discos de novobiocina (5 $\mu$ g) e desferrioxamina (100 $\mu$ g) (B) em seguida a placa será incubada a 35°C, por 24h. A produção de fator “clumping” será verificada utilizando-se o sistema comercial “Slidex Staph Plus” (bioMérieux) (C). Leitura: A: linhas: a – a leitura do teste é realizada após 24h de incubação a 35°C pela adição de 50 $\mu$ L da solução reveladora, o aparecimento de uma coloração rosa ou púrpura em até 10min após a adição do reativo é considerado resultado positivo para a PYRase; c – a leitura é realizada após 24h de incubação a 35°C pela adição de 10 $\mu$ L da solução reveladora de NaOH a 40%, o aparecimento de coloração rosa ocorre quando as amostras são positivas para a fosfatase; e – a leitura foi realizada em até 48h de incubação a 35°C, a ausência na alteração da coloração do meio (amarela) é considerada como resultado negativo para a produção de urease; f – a leitura é realizada em 24 e 48 de incubação a 35°C, a modificação da coloração do meio para amarela indica resultado positivo para a manose; h – a leitura é realizada em 24 e 48 de incubação a 35°C, a modificação da coloração do meio para amarela indica resultado positivo para a trealose. B: as amostras que apresentarem halos menores ou iguais a 16mm para novobiocina são consideradas resistentes à novobiocina e as amostras que apresentaram qualquer halo de inibição são consideradas susceptíveis à desferrioxamina. C: as amostras que aglutinarem no sistema comercial “Slidex Staph Plus” são positivas para a produção de fator “clumping”

A identificação de todas as amostras analisadas em espécies foi realizada através da análise dos resultados obtidos nos testes acima descritos, de acordo com a classificação do “*Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology*” (HOLT *et al.*, 1994), Monsen e

colaboradores (1998) e “*Manual of Clinical Microbiology*” (BANNERMAN, 2003) (TABELA 4).

## **5 DISCUSSÃO**

---

*Staphylococcus* são microrganismos comumente isolados de infecções hospitalares, reconhecidos mundialmente como importantes agentes etiológicos e estão relacionados com altas taxas de morbidade, mortalidade e custo na internação (COSTA, MICELI & ANAISSIE, 2004; PROJAN, NESIN & DUNMAN, 2006). Fatores como o uso crescente de procedimentos invasivos e drogas imunossupressoras, aquisição de resistência aos antimicrobianos por estes microrganismos e sua presença em grande número na microbiota anfibiótica humana, têm contribuído para o estabelecimento do *Staphylococcus* como um dos principais agentes etiológicos de infecção hospitalar (MARANAN *et al.*, 1997).

A identificação de *Staphylococcus* em espécies e subespécies tem sido considerada de relevância não somente para fins epidemiológicos, como também para o monitoramento destes microrganismos como reservatório de genes de resistência. No grupo dos *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN) encontramos um grande número de espécies do gênero. Estes têm sido reconhecidos como patógenos relevantes, principalmente nas últimas décadas, sendo isolados, preferencialmente, de bacteriemias e infecções relacionadas à biomateriais (Huebner & Goldmann, 1999).

A identificação dos *Staphylococcus* ainda é difícil para a maioria dos laboratórios clínicos, já que o método de referência, com mais de 20 testes, é laborioso e consome muito tempo; enquanto os sistemas comerciais disponíveis, incluindo a automação, por serem onerosos, não estão ao alcance de muitos laboratórios de rotina. Esquemas fenotípicos mais simples, compostos por um número menor de testes têm sido avaliados (IEVEN *et al.*, 1995; DE PAULIS *et al.*, 2003; CUNHA, SINZATO & SILVEIRA, 2004) com o objetivo de serem aplicados nos laboratórios clínicos. Entretanto, alguns destes métodos continuam utilizando um número inadequado de testes para identificação de poucas espécies de *Staphylococcus*. Além disso, muitos ainda necessitam de longo período de incubação.

No presente estudo, foram analisadas 192 amostras de *Staphylococcus* isoladas de casos de infecção em diferentes instituições nacionais de saúde. A utilização de 22 testes, que compõem o esquema convencional (MACFADDIN, 1977, HOLT *et al.*, 1994; BANNERMAN, 2003), permitiu a identificação de todas as amostras, que foram distribuídas em 13 espécies e 7 subespécies. Um esquema alternativo de identificação, utilizando placas de microtitulação com cinco testes e outros três testes adicionais foi avaliado utilizando as 192 amostras de *Staphylococcus*. Quando comparado ao método convencional, este apresentou 95,8% de amostras identificadas corretamente em 24h, e 96,9% em 72 horas de incubação, mas quando o período foi de 48h de incubação esse percentual aumentou para 97,4%.

Marsou e colaboradores (2001), encontraram 77% de acurácia na identificação de *Staphylococcus* através de um sistema automatizado quando comparado com um método fenotípico convencional. Em 1998, Weinstein e colaboradores observaram variações de 73,7% a 90,9% na acurácia de três métodos automatizados de identificação quando comparados com um método de referência similar ao utilizado no presente estudo. Spanu e colaboradores em 2003 e 2004, encontraram um percentual de acurácia variando de 93,6% a 98,6% ao utilizarem métodos automatizados. Porém, estes autores utilizaram como método padrão de identificação, sistemas miniaturizados comerciais. Métodos miniaturizados comerciais têm apresentado precisão variando de 81,8% a 95,5% na identificação de *Staphylococcus*, quando comparados com sistemas de identificação compostos por testes fenotípicos convencionais (IEVEN *et al.*, 1995; RENNEBERG, RIENECK & GUTSCHIK, 1995; DE PAULIS *et al.*, 2003), demonstrando que os valores de acurácia encontrados nos estudos de Spanu e colaboradores devem estar superestimados.

Weinstein e colaboradores (1998) verificaram que ao utilizarem um método automatizado de identificação, o MicroScan, este identificou corretamente somente 76,5% das amostras de *Staphylococcus* isoladas de hemoculturas. Outros autores também têm encontrado

baixos valores de acurácia, como 61,7% (HEIKENS *et al.*, 2005) e 77% (MARSOU *et al.*, 2001) para métodos automatizados na identificação do gênero em questão. Esses baixos valores de acurácia foram obtidos quando os autores também utilizaram como comparação um método padrão de identificação, semelhante ao método convencional utilizado no presente estudo.

Esquemas fenotípicos alternativos de identificação com um número reduzido de testes vêm sendo desenvolvidos nos últimos anos. Ieven e colaboradores (1995) desenvolveram um esquema fenotípico de identificação de *Staphylococcus* spp. composto por sete testes que apresentou acurácia de 97,7%. Porém, o método identificava somente oito espécies e uma subespécie de *Staphylococcus*. Um esquema simples para identificação de 11 espécies de SCN foi elaborado por outro grupo de pesquisadores (DE PAULIS *et al.*, 2003). Apesar do método utilizar poucas provas fenotípicas (13), o período de incubação era de até seis dias. Os autores obtiveram 97,5% de acurácia. Cunha, Sinzato e Silveira (2004) propuseram um método de identificação fundamentado em oito testes em uma primeira etapa e cinco testes fenotípicos em uma segunda etapa, em um total de 13 testes fenotípicos diferentes. Esse método também requeria um longo período de incubação (3 a 6 dias) e identificou 13 espécies e oito subespécies de *Staphylococcus*.

Devido a grande necessidade de se desenvolver esquemas simplificados e acurados de identificação, fundamentados no menor número possível de testes fenotípicos e em um tempo reduzido de incubação, foi proposta a alternativa miniaturizada de identificação no presente estudo, subordinada a um fluxograma para identificação de 11 espécies e 6 subespécies de *Staphylococcus* isoladas de infecções clínicas, utilizando apenas oito testes bioquímicos. O esquema apresentou melhores resultados em 48h de incubação (97,4%), identificando corretamente 187 das 192 amostras de *Staphylococcus* analisadas (FIGURA 4, pág. 44).

O período de 48h de incubação foi o que apresentou o maior percentual de amostras identificadas corretamente, assim como, mostrou um menor percentual de discordância entre os observadores, tendo sido de 0,6% (6 testes dos 960 realizados). A utilização de dois observadores realizando a leitura, independentemente, objetivou demonstrar se havia diferença na interpretação dos testes fenotípicos.

Os oito testes compreendidos no método alternativo miniaturizado de identificação foram selecionados de acordo com o menor percentual de atipia apresentado pelas amostras das diferentes espécies identificadas, frente aos 22 testes do método de referência (IORIO, 2004). Além disso, testes fenotípicos com resultados variáveis para poucas espécies ou que não apresentassem resultados variáveis na identificação das espécies prevalentes em infecções hospitalares também foram selecionados. A produção da enzima pirrolidônil arilamidase (teste do PYR), teste do fator “clumping”, seguidos pelo teste da fosfatase alcalina e dos testes de discos (novobiocina e desferrioxamina) foram aquelas provas que mostraram estas características e permitiram resultados conclusivos em 24 e 48h. O teste da urease foi o teste chave na distinção de subespécies urealíticas, como *S. capitis* subsp. *urealyticus* e *S. cohnii* subsp. *urealyticus*. Somente poucas espécies de *Staphylococcus* apresentaram resultados variáveis para a manose e trealose. Portanto, neste caso, estes testes também foram empregados no método miniaturizado.

É válido ressaltar que das cinco amostras de *Staphylococcus* que não foram identificadas corretamente pelo método miniaturizado, duas poderiam ter sido identificadas se utilizássemos um teste adicional recomendado na figura 2 (pág. 38). Outro aspecto relacionado com a acurácia do método proposto, está relacionado com o período de incubação escolhido para ser utilizado na alternativa miniaturizada de identificação, 48h. Neste período, 99,2% das amostras pertencentes as espécies prevalentes em infecções, como *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* (PFALLER *et al.*, 1999) foram identificadas. A maioria das

amostras que apresentaram problemas na identificação eram pertencentes à espécies menos isoladas de infecções humanas.

Amostras das espécies *S. xylosum*, *S. simulans*, *S. caprae*, *S. capitis* subsp. *urealyticus* não foram analisadas isoladamente quanto à atipia e à acurácia do método alternativo, devido ao reduzido número de amostras obtidas nesse estudo. Um número maior de tais espécies não foi alcançado em função do baixo percentual de isolamento destas espécies no ambiente hospitalar, já que são microrganismos mais relacionados à infecções em animais (BANNERMAN, 2003).

Embora a espécie *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* não faça parte das amostras clínicas avaliadas neste estudo, este microrganismo foi analisado como amostra controle e pôde ser facilmente identificado e distinguido de outras espécies, quando o método alternativo de identificação foi empregado. Essa espécie já foi relatada como agente de osteomielite e identificada erroneamente como *S. aureus* por um método automatizado, provavelmente, pela semelhança em alguns testes, como a capacidade de produção do fator “clumping” (CALVO *et al.*, 2000).

Embora, nenhuma amostra de *S. cohnii* subsp. *urealyticus* tenha sido avaliada, esta espécie está presente no fluxograma subordinado à alternativa miniaturizada de identificação (FIGURA 2, pág. 38) por ser facilmente confundida com outra espécie raramente encontrada na clínica, *S. xylosum*. Um teste adicional para diferenciar tais espécies foi proposto na mesma figura.

O fluxograma que também fora desenvolvido neste estudo apresentou-se essencial na análise dos resultados obtidos através do método miniaturizado. Vale ressaltar que o fluxograma é subordinado a alternativa miniaturizada e deve ser utilizado na identificação de todas as amostras que forem analisadas na microplaca.



A identificação de *Staphylococcus* através de métodos moleculares tem demonstrado grande acurácia (MARTINEAU *et al.*, 1996, 1998; YUGUEROS *et al.*, 2001). No presente estudo, as amostras atípicas das espécies *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* foram confirmadas pela técnica da PCR. Estas espécies foram selecionadas para confirmação por serem as espécies prevalentes do gênero em infecções hospitalares, responsáveis por mais de 90% dos *Staphylococcus* isolados (PFALLER *et al.*, 1999), principalmente, em pacientes com predisposição, como aqueles que utilizam procedimentos invasivos, e por apresentarem multirresistência antimicrobiana (CHAMBERS, 2001; OTTO, 2004).

O método alternativo de identificação de *Staphylococcus* realizado em placa de microtitulação, subordinado ao fluxograma, proposto no presente estudo, foi avaliado visando uma melhor relação custo-benefício em relação ao macrométodo, realizado em tubos de ensaio 13x100mm. Em ambos, as metodologias utilizam oito testes fenotípicos, porém, a redução do volume de meio de cultura utilizado por amostra avaliada é de cerca de 92% no método alternativo, podendo se analisar 12 amostras por microplaca. Assim, a alternativa miniaturizada pode ser classificada como um método rápido, prático, seguro e de baixo custo, podendo ser utilizada na rotina de laboratórios clínicos, principalmente, naqueles que não possuem métodos automatizados, ou que queiram confirmar resultados obtidos na automação. Ainda, deve-se mencionar que a rapidez na realização dos testes é muito importante, especialmente, para amostras isoladas de sítios estéreis, como sangue e fluidos corpóreos, podendo contribuir para agilidade na antibioticoterapia.

## 6 CONCLUSÕES

---

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram concluir que:

- O método alternativo miniaturizado com oito testes subordinado ao fluxograma para identificação de amostras de *Staphylococcus* se mostrou rápido, simples, econômico e com um melhor percentual de amostras identificadas corretamente (97,4%) quando o período de incubação foi de 48h. Contudo, com 24h e 72h de incubação também se pôde observar excelentes percentuais de amostras corretamente identificadas no método, 95,8% e 96,9%, respectivamente.
- A discordância verificada pelos observadores não se mostrou relevante na interpretação dos resultados, tendo sido de 0,6% em 960 testes realizados no período de incubação de 48h.
- A técnica de PCR, fundamentada na amplificação de fragmentos genômicos espécie-específicos para a detecção das três espécies prevalentes de *Staphylococcus* isoladas de infecções em humanos, confirmou os resultados obtidos no método miniaturizado, demonstrando a acurácia da técnica de identificação proposta, mesmo quando utilizadas amostras atípicas.



- CHAMBERS H.F. 2001. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg. Infect. Dis.* 7:178-182.
- CHAVES, F.; GARCÍA-ÁLVAREZ M.; SANZ, F.; ALBA, C. & OTERO J.R. 2005. Nosocomial spread of a *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* strain causing sepsis in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* 43:4877-4879.
- COSTA, S.F.; MICELI, M.H. & ANAISSIE, E.J. 2004. Mucosa or skin as source of coagulase-negative staphylococcal bacteraemia? *Lancet Infect. Dis.* 4:278-286.
- COUTO, I.; PEREIRA, S.; MIRAGAIA, M.; SANCHES, I.S. & LENCASTRE, H. 2001. Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by internal transcribed spacer PCR. *J. Clin. Microbiol.* 39:3099-3103.
- CUNHA, M.L.R.S.; LOPES, C.A.M.; RUGOLO, L.M.S.S. & CHALITA, V.A.S. 2002. Clinical significance of coagulase-negative staphylococci isolated from neonates. *J. Pediatr. (Rio J.)*. 78:279-288.
- CUNHA M.L.R.S., SINZATO Y.K., SILVEIRA L.V.A. 2004. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative staphylococci. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99:855-60.
- De PAULIS, A.N.; PREDARI, S.C.; CHAZARRETA, C.D. & SANTOIANNI, J.E. 2003. Five-test simple scheme for species-level identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 41:1219-1224.
- DIEKEMA, D.J.; PFALLER, M.A.; JONES, R.N.; DOEM, G.V.; KUGLER, K.C.; BEACH, M.L.; SADER, H.S. & SENTRY GROUP. 2000. Trends in antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infections in the USA, Canada and Latin America. *I. J. Antimicrob. Agents.* 13:257-271.
- DIEKEMA, D.J.; PFALLER, M.A.; SCMITZ, F.J.; SMAYEVSKY, J.; BELL, J.; JONES, R.N.; BEACH, M. & SENTRY GROUP. 2001. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific Region for the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997-1999. *Clin. Infect. Dis.* 32(suppl 2):S114-132.
- EDWARDS, K.J.; KAUFMANN, M.E. & SAUNDERS, N.A. 2001. Rapid and accurate identification of coagulase-negative staphylococci by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 39:3047-3051.
- ENG, R.H.K.; WANG, C.; PERSON, A.; KIEHN, T.E. & ARMSTRONG, D. 1982. Species identification of coagulase-negative staphylococcal isolates from blood culture. *J. Clin. Microbiol.* 15:439-442.
- EUZÉBY, J.P. 2007. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature - Genus *Staphylococcus*. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/cv.html>> Acesso em: 19 jan.

FEDLER, K.A.; BIEDENBACH, D.J.; JONES, R.N. 2006. Assessment of pathogen frequency and resistance patterns among pediatric patient isolates: report from the 2004 SENTRY antimicrobial surveillance program on 3 continents. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 56:427-436.

FERREIRA, R.B.R.; NUNES, A.P.F.; KOKIS, V.M.; KREPSKY, N.; FONSECA, L.S.; BASTOS, M.C.F.; GIAMBIAGI-deMARVAL, M. & SANTOS, K.R.N. 2002. Simultaneous detection of the *mecA* and *ileS-2* genes in coagulase-negative staphylococci isolated from Brazilian hospitals by multiplex PCR. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 42:205-212.

FOSTER, T.J. & HÖÖK, M. 1998. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *T. Microbiol.* 6:484-488.

FUJITA S.I., SENDA Y., IWAGAMI T., HASHIMOTO T. 2005. Rapid identification of staphylococcal strains from positive-testing blood culture bottles by internal transcribed spacer PCR followed by microchip gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 43:1149-1157.

GÖTZ, F. 2002. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol. Microbiol.* 43:1367-1378.

HAILE D.T., HUGHES J., VETTER E., SNYDER R., PATEL R., COCKERILL F.R. 2002. Frequency of isolation of *Staphylococcus lugdunensis* in consecutive urine cultures and relationship to urinary tract infection. *J. Clin. Microbiol.* 40:654-656.

HALTIA L.; HONKANEN-BUZALSKI T.; SPIRIDONOVA I.; OLKONEN, A. & MYLLYS. V. 2006. A study of bovine mastitis, milking procedures and management practices on 25 Estonian dairy herds. *Acta. Vet. Scand.* 48:22.

HEIKENS E., FLEER A., PAAUW A., FLORIJN A., FLUIT A.C. 2005. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 43:2286-2290.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A; STALEY, J.T. & WILLIAMS, S.T. 1994. Gram-positive cocci. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9<sup>th</sup> ed. Willians & Wilkins, Baltimore, USA, p.532-558.

HUEBNER, J. & GOLDMANN, D.A. 1999. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annu. Rev. Med.* 50:223-236.

IEVEN, M.; VERHOEVEN, J.; PATTYN, S.R. & GOOSSENS, H. 1995. Rapid and economical method for species identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 33:1060-1063.

ING, H.B.; BADDOUR, L.M. & BAYER, A.S. 1997. Bacteremia and infective endocarditis: pathogenesis, diagnosis, and complications. In: *The Staphylococci in Human Disease*, Crossley, K.B. & Archer, G.L. (eds), Churchill Livingstone, New York, USA. p.331-355.

IORIO, N.L.P. 2004. *Staphylococcus* coagulase-negativos: proposta de um método de identificação rápido e seguro para utilização na rotina. *Monografia (Bacharelado em Microbiologia e Imunologia)*. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 59f.

- JARLOV, J.O. 1999. Phenotypic characteristics of coagulase-negative staphylococci: typing and antibiotic susceptibility. *APMIS Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 107 (supp 91):1-42.
- JONH, J.F. & BARG, N.L. 1996. *Staphylococcus aureus*. In: *Hospital Epidemiology and Infection Control*. Mayhall, C.G. (ed.) 1<sup>st</sup> ed. Williams & Wilkins Company, Baltimore, USE p.271-289.
- KANDA, K.; HIRAMATSU, K & YOKOTA, T. 1990. Gel electrophoretic analysis of penicillin-binding proteins of coagulase negative staphylococci. *FEMS Microbiol. Lett.* 72:51-54.
- KANEMITSU, K.; KUNISHIMA, H.; HATTA, M.; INDEN, K.; SAGA, T.; OUCHI, H.; ISHIZAWA, K.; HARIGAE, H.; TAKEMURA, H. & KAKU, M. 2005 Evaluation of a fully automated system (RAISUS) for rapid identification and antimicrobial susceptibility testing of staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 43:5808-5810.
- KIM, T.M.; OH, P.I.; SIMOM, A.E. 2001. The economic impact of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Canadian hospitals. *Infect. Control.Hosp. Epidemiol.* 22:99-104.
- KLEEMAN, K.T.; BANNERMAN, T.L. & KLOOS, W.E. 1993. Species distribution of coagulase-negative staphylococcal isolates at a community hospital and implications for selection of staphylococcal identification procedures. *J. Clin. Microbiol.* 31:1318-1321.
- KLOOS, W.E. & SCHLEIFER, K.H. 1975. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* 1:82-88.
- KLUG, D.; WALLET, F.; KACET, S. & COURCOL, R.J. 2003. Involvement of adherence and adhesion *Staphylococcus epidermidis* genes in pacemaker lead-associated infections. *J. Clin. Microbiol.* 41:3348-3350.
- LAYER, F.; GHEBREMEDHIN, B.K.A.; KÖNIG, M.W. & KÖNIG, B. 2006. Comparative study using various methods for identification of *Staphylococcus* species in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 44:2824-2830.
- LEE, C.Y. & LEE, J.C. 2000. Staphylococcal capsule. In: *Gram-Positive Pathogens*. Fischetti, V.A.; Novick, R.P.; Ferretti, J.J.; Portnoy, D.A. & Rood, J.I. (eds), 1<sup>st</sup> edition. ASM Press, Washington, DC, USA p.61-366.
- LEUNG M.J., NUTTALL N., PRYCE T.M., COOMBS G.W., PEARMAN J.W. 1998. Colony variation in *Staphylococcus lugdunensis*. *J. Clin. Microbiol.* 36:3096-3098.
- MAC FADDIN, J. F. 1977. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Williams & Wilkins Company, Baltimore, USA. 312p.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M. & PARKER, J. 2004. *Microbiologia de BROCK*. 10<sup>a</sup> ed. Pretince Hall, São Paulo. 608p.

- MARANAN, M.C.; MOREIRA, B.; BOYLE-VAVRA, S. & DAUM, R.S. 1997. Antimicrobial resistance in staphylococci: epidemiology, molecular mechanisms and clinical relevance. *Infect. Dis. Clinics. North. Am.* 11:813-841.
- MARCO, F.; JURADO, A. & ANTA, M.T.J. 2004. Evaluation of the *Phoenix* system for identifying and determining the susceptibility of clinical isolates. Comparative study with the *MicroScan* system. *Rev. Esp. Quimioterap.* 17:169-176.
- MARSOU, R.; BES, M.; BRUN, Y.; BOUDOUMA, M.; IDRISSE, L.; MEUGNIER, H.; FRENEY, J. & ETIENNE, J. 2001. Molecular techniques open up new vistas for typing of coagulase-negative staphylococci. *Pathol.Biol.* 9:205-215.
- MARTINEAU, F.; PICARD, F.J.; ROY, P.H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M.G. 1996. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Clin. Microbiol.* 34:2888-2893.
- MARTINEAU, F.; PICARD, F.J.; ROY, P.H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M.G. 1998. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 36:618-623.
- MARTINEAU, F.; PICARD, F.J. MÉNARD, C.; ROY, P.H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M.G. 2000. Development of a rapid PCR assay specific *Staphylococcus saprophyticus* and application to direct detection from urine samples. *J. Clin. Microbiol.* 8:3280-3284.
- MENEZES, E.P.; SCHUENCK, R.P.; MALVAR, K.L.; IORIO, N.L.P.; SANTOS, K.R.N. 2005. Nova identificação de *Staphylococcus haemolyticus* multirresistente através de PCR multiplex utilizando iniciadores para a seqüência gênica de uma enzima da via do mevalonato. 2005. In: *XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia*.
- MINTO, E.C.M.; BARELLI, C.; MARTINEZ, R. & DARINI, A.L.C. 1999. Identification and medical importance of coagulase-negative staphylococci species. *São Paulo Méd. J.* 17:175-178.
- MONSEN, T.; RÖNNMARK, M.; OLOFSSON, J. & WISTRÖM, J. 1998. An inexpensive and reliable method for routine identification of staphylococcal species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 17:327-335.
- MULDER, J.G. 1995. A simple and inexpensive method for the identification of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus hominis*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 14:1052-1056.
- NASCIMENTO, J.S.; FAGUNDES, P.C.; BRITO, M.A.V.P.; SANTOS, K.R.N. & BASTOS, M.C.F. 2005. Production of bacteriocins by coagulase-negative staphylococci involved in bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 106:61-71.
- NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE (NNIS) SYSTEM REPORT. 2004. Data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, Georgia, USA.

- NONHOFF C., ROTTIERS, S. & STRUELENS, M.J. 2005. Evaluation of the vitek 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of *Staphylococcus* spp. *Clin. Microbiol. Infect.* 11:150-153.
- NUNES, E.L.C.; SANTOS, K.R.N.; MONDINO, P.J.J.; BASTOS, M.C.F. & GIAMBIAGI-DE-MARVAL, M. 1999. Detection of *ileS-2* gene encoding mupirocin resistance in methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* by multiplex PCR. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 34:77-81.
- OTTO, M. 2004. Virulence factors of coagulase-negative staphylococci. *Front. Biosci.* 9:841-863.
- PANNUTI, C.S. & GRINBAUM, R.S. 1995. An overview of nosocomial infection control in Brazil. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 16:170-174.
- PEACOCK, S.J. 2005. *Staphylococcus*. In: *Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections*, Boviello, S.P.; Murray, P.R. & Funke, G. (eds), 10<sup>th</sup> ed, vol 2. ASM Press. Washington, DC. USA. p.772-831.
- PFALLER M.A.; JONES, R.N.; DOERN, G.V.; SADER, H.S.; KUGLER, K.C. & BEACH, M.L. 1999. Survey of blood stream infections attributable to gram-positive cocci: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and Latin America from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. SENTRY Participants Group. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 33:283-297.
- POYART, C.; QUESNE, G.; BOUMAILA, C. & TRIEU-CUOT, P. 2001. Rapid and accurate species-level identification of coagulase-negative staphylococci by using the *sonA* gene as a target. *J. Clin. Microbiol.* 39:4296-4301.
- PROJAN, S.J. & NOVICK, R.P. 1997. The molecular basis of pathogenicity. In: *The Staphylococci in Human Disease*, Crossley, K.B. & Archer, G.L. (eds), Churchill Livingstone, New York, USA. p.55-81.
- PROJAN, S.J.; NESIN, M. & DUNMAN, P.M. 2006. Staphylococcal vaccines and immunotherapy: to dream the impossible dream? *Curr. Opin. Pharmacol.* 6:473-479.
- RENNEBERG, J.; RIENECK, K. & GUTSCHIK, E. 1995. Evaluation of Staph ID 32 system and Staph-Zym system of coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 33:1150-1153.
- RHODEN, D.L. & MILLER, M. 1995. Four-year prospective study of STAPH-IDENT system and conventional method for reference identification of *Staphylococcus*, *Stomatococcus*, and *Micrococcus* spp. *J. Clin. Microbiol.* 33:96-98.
- RUBIN, R.J.; HARRINGTON, C.A.; POOL, A.; DIETRICH, K.; GREENE, J.A. & MOIDUDDIN, A. 1999. The economic impact of *Staphylococcus aureus* infection in New York City hospitals. *Emerg. Infect. Dis.* 5:9-17.



RUHE, J.; MENON, D.; MUSHATT, D.; DEJACE, P. & HASBUN, R. 2004. Non-*epidermidis* coagulase-negative staphylococcal bacteremia: clinical predictors of true bacteremia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 26:495-498.

SADER, H.S.; JONES, R.N.; GALES, A.C.; WINOKUR, P.; KUGLER, K.C.; PFALLER, M.A.; DOERN, G.V. & SENTRY LATIN AMERICA STUDY GROUP. 2001. Antimicrobial susceptibility patterns for pathogens isolated from patients in Latin America medical centers with a diagnosis of pneumonia: analysis of results from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 32:289-301.

SADER, H.S.; JONES, R.N.; ANDRADE-BAIOCCHI, S.; BIEDENBACH, D.J. & THE SENTRY PARTICIPANTS GROUP (LATIN AMERICA). 2003. Four-year evaluation of frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from bloodstream infections in Latin American medical Centers. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 44:273-280.

SADER, H.S.; JONES, R.N.; GALES, A.N.; SILVA, J.B.; PIGNATARI, A.C. & THE SENTRY PARTICIPANTS GROUP (LATIN AMERICA). 2004. SENTRY antimicrobial surveillance program report: latin American and brazilian results for 1997 through 2001. *Braz. J. Infect. Dis.* 8:25-79.

SALYERS, A.A. & WHITT, D.D. 2003. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. 2<sup>th</sup> ed, ASM Press. Washington, DC. USA. p.216-231.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. 1989. Extration and purification of plasmid DNA. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY. Appendix A.5.

SCANVIC, A.; DENIC, F.; GAILLON, S.; GIRY, P.; ANDREMONT, A. & LUCET, J. 2001. Duration of colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after hospital discharge and risk factors for prolonged carriage. *Clin. Infect. Dis.* 32:489-495.

SMITH, T. & JARVIS, W. 1999. Antimicrobiol resistance in *Staphylococcus aureus*. *Microb. Infect.* 1:795-805.

SPANU, T.; SANGUINETTI, M.; CICCAGLIONE, D.; D'INZEO, T.; ROMANO, L.; LEONE, F. & FADDA, G. 2003. Use of the VITEK 2 system for rapid identification of clinical isolates of staphylococci from bloodstream infections. *J. Clin. Microbiol.* 41:4259-4263.

SPANU, T.; SANGUINETTI, M.; D'INZEO, T.; CICCAGLIONE, D.; ROMANO, L.; LEONE, F. & FADDA, G. 2004. Identification of methicillin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci responsible for bloodstream infections with the phoenix<sup>TM</sup> system. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 48:221-227.

VANDENBERGH, M.F.Q.; YZERMAN, E.P.F.; BELKUM, A.; BOELENS, H.M.A.; SIJMONS, M. & VERBRUGH, H.A. 1999. Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years: redefining the persistence carrier state. *J. Clin. Microbiol.* 37:3133-3140.

VERHOEF, J. 1997. Host defence against infection. In: *The Staphylococci in Human Disease*, Crossley, K.B. & Archer, G.L. (eds), Churchill Livingstone, New York, USA. p.213-232.

von EIFF, C.V.; BECKER, K.; MACHKA, K.; STAMMER, H. & PETERS, G. 2001. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *N. Engl. J. Med.* 50:1521-1527.

von EIFF, C.V.; PETERS, G. & HEIFMANN, C. 2002. Pathogenesis of infections due to coagulase negative staphylococci. *Lancet. Infect. Dis.* 2:677-685.

YUGUEROS, J.; TEMPRANO, A.; SÁNCHEZ, M.; LUENGO, J.M. & NAHARRO, G. 2001. Identification of *Staphylococcus* spp. by PCR-restriction fragment polymorphism of *gap* gene. *J. Clin. Microbiol.* 39:3693-3695.

WEINSTEIN, M.P.; MIRRETT, S.; PELT, L.V.; MCKINNON, M.; ZIMMER, B.L.; KLOOS, W. & RELLER, L.B. 1998. Clinical importance of identifying coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures: evaluation of microscan rapid and dried overnight gram-positive panels versus a conventional reference method. *J. Clin. Microbiol.* 36:2089-2092.

WILKINSON, B.J. 1997. Biology. In: *The Staphylococci in Human Disease*, Crossley, K.B. & Archer, G.L. (eds), Churchill Livingstone, New York, USA. p.1-38.

## 8 ANEXO

---

### 8.1 Padronização dos meios de cultura e reagentes do método miniaturizado

#### 8.1.1 Caldo PYR

A produção da enzima pirrolidôn timerilamidase foi verificada em caldo TSB (Oxoid) contendo 0,006% (p/v) de L-pirroglutâ timer- $\beta$ -naftilamina (Sigma Chemical Company). A leitura do teste foi realizada pela adição de 50 $\mu$ L da solução reveladora contendo dimetilaminocinamaldeído a 1% (p/v) (Sigma Chemical Company), após 24h de incubação a 35°C. O aparecimento de uma coloração rosa ou púrpura em até 10min após a adição do reativo foi considerado resultado positivo. Como controles positivo e negativo da reação foram usadas as amostras *S. haemolyticus* ATCC 29970 e *S. aureus* ATCC 12600, respectivamente.

#### 8.1.2 Caldo fosfato

A produção da enzima fosfatase foi verificada segundo MacFaddin (1977) com modificações. Ao caldo PDP [0,37% (p/v) de extrato de carne; pH 7,5] autoclavado foi adicionado 2% (v/v) de solução PDP [0,5% (p/v) de difosfato de fenolftaleína] filtrada assepticamente em membrana de celulose-acetato com porosidade de 0,20 $\mu$ m.

A leitura foi realizada após a adição de 10 $\mu$ L da solução reveladora de NaOH a 40% (v/v), após 24h de incubação a 35°C, observando-se o aparecimento de coloração rosa para amostras positivas. As amostras controles utilizadas foram *S. aureus* ATCC 12600 (controle positivo) e *S. haemolyticus* ATCC 29970 (controle negativo).

### 8.1.3 Caldo uréia

A produção da enzima urease foi verificada em caldo uréia de Rustigian & Stuart, segundo MacFaddin (1977) com modificações, conforme descrito a seguir: 1,2% (p/v)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,4% (p/v) de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,14% (p/v) de extrato de levedura, 0,014% (p/v) de vermelho de fenol, 2,5% (p/v) de uréia; pH 7,6. Antes da uréia ser adicionada ao caldo, este foi autoclavado, e a seguir, o substrato foi adicionado após ter sido filtrado em membrana de celulose-acetato com porosidade de  $0,20\mu\text{m}$ .

A leitura foi realizada em até 72h de incubação, a  $35^\circ\text{C}$ . A ausência na alteração da coloração do meio (amarela) foi considerada como resultado negativo. As amostras *S. epidermidis* ATCC 14990 e *S. haemolyticus* ATCC 29970 foram utilizadas respectivamente, como controles positivo e negativo desta prova bioquímica.

### 8.1.4 Caldo manose

A fermentação da manose foi verificada em caldo vermelho de fenol confeccionado segundo MacFaddin (1977) com modificações: 1,3% (p/v) de peptona, 0,13% (p/v) de extrato de carne, 0,66% (p/v) de  $\text{NaCl}$ , 0,0024% (p/v) de vermelho de fenol, 1,25 (p/v) de manose; pH 7,4. Antes da manose ser adicionada ao caldo, este foi autoclavado, e a seguir, o substrato foi adicionado após ter sido filtrado em membrana de celulose-acetato com porosidade de  $0,20\mu\text{m}$ .

A leitura foi realizada em 24, 48 e 72h de incubação a  $35^\circ\text{C}$ . A modificação da coloração do meio para amarela foi indicativa de resultado positivo. Como controles positivo e negativo da reação foram usadas as amostras *S. aureus* 12600 e *S. haemolyticus* ATCC 29970, respectivamente.

### 8.1.5 Caldo trealose

A fermentação da trealose foi verificada em caldo vermelho de fenol confeccionado segundo MacFaddin (1977) com modificações: 1,3% (p/v) de peptona, 0,13% (p/v) de extrato de carne, 0,66% (p/v) de NaCl, 0,0024% (p/v) de vermelho de fenol, 1,25% (p/v) de trealose; pH 7,4. Antes da trealose ser adicionada ao caldo, este foi autoclavado, e a seguir, o substrato foi adicionado após ter sido filtrado em membrana de celulose-acetato com porosidade de 0,20 $\mu$ m.

A leitura foi realizada em até 72h de incubação a 35°C. A modificação da coloração do meio para amarela foi indicativa de resultado positivo. As amostras controles utilizadas foram *S. aureus* ATCC 12600 (controle positivo) e *S. epidermidis* ATCC 14990 (controle negativo).

Os meios compreendidos entre os itens 8.1.1 e 8.1.5 foram distribuídos nas microplacas de poliestireno (Imulon 2, Dynathec Laboratories), sendo 180 $\mu$ L de meio por poço, conforme ilustrado na FIGURA 8.

PYR	PYR	PYR	PYR	PYR	PYR	PYR	PYR	PYR	PYR	PYR	PYR
FOS	FOS	FOS	FOS	FOS	FOS	FOS	FOS	FOS	FOS	FOS	FOS
URE	URE	URE	URE	URE	URE	URE	URE	URE	URE	URE	URE
MAN	MAN	MAN	MAN	MAN	MAN	MAN	MAN	MAN	MAN	MAN	MAN
TRE	TRE	TRE	TRE	TRE	TRE	TRE	TRE	TRE	TRE	TRE	TRE

FIGURA 8 – Distribuição dos meios de cultura do método miniaturizado na placa de poliestireno. PYR – caldo PYR, FOS – caldo fosfato, URE – caldo uréia, MAN – caldo manose, TRE – caldo trealose.

### **8.1.6 Produção de fator “clumping”**

A produção de fator “clumping” foi verificada conforme descrito no item 3.3.c (pág. 21).

### **8.1.7 Susceptibilidade à novobiocina**

A susceptibilidade à novobiocina foi verificada conforme descrito no item 3.3.1.1 (pág. 26).

### **8.1.8 Susceptibilidade à desferrioxamina**

A susceptibilidade à desferrioxamina foi verificada conforme descrito no item 3.3.1.3 (pág. 26).

## **8.2 Padronização do inóculo bacteriano e período de incubação**

Foram inoculados 45µL, em cada poço da microplaca, de uma suspensão bacteriana, de cada amostra, com uma turbidez equivalente à 0,5 da escala McFarland ( $\sim 10^8$  UFC/mL), por coluna (Figura 8, pág. 66).

Os resultados apresentados na microplaca foram lidos nos períodos de incubação de 24, 48 e 72h.