

André Nogueira Olendzki

**Avaliação da acurácia do sistema MicroScan WalkAway na
identificação e detecção da resistência à oxacilina em
amostras de *Staphylococcus coagulase-negativos***



Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. 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)

Orientadores:

Marcia Giambiagi-deMarval
Kátia Regina Netto dos Santos



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF PAULO DE GÓES

RIO DE JANEIRO
JUNHO DE 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Olendzki, André Nogueira

Avaliação da acurácia do sistema MicroScan WalkAway na identificação e detecção da resistência à oxacilina em amostras de *Staphylococcus* coagulase-negativos / André Nogueira Olendzki – Rio de Janeiro, 2009.

xiii, 60p.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)

Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, 2009.

Orientadores: Marcia Giambiagi-deMarval e Kátia Regina Netto dos Santos

Referências bibliográficas: f. 52 - 60

1. sistema MicroScan 2. identificação de *Staphylococcus* 3. resistência à oxacilina 4. métodos moleculares 5. microdiluição em caldo 6. sistema automatizado. I. Giambiagi de-Marval, Márcia e Santos, Kátia Regina Netto dos. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Mestrado em Ciências Biológicas (Microbiologia). III. Avaliação da acurácia do sistema MicroScan WalkAway na identificação e detecção da resistência à oxacilina em amostras de *Staphylococcus* coagulase-negativos.

André Nogueira Olendzki

**Avaliação da acurácia do sistema MicroScan WalkAway na
identificação e detecção da resistência à oxacilina em amostras de
*Staphylococcus coagulase-negativos***

Rio de Janeiro, 15 de junho de 2009.

(Marcia Giambiagi-deMarval, Ph.D, UFRJ – Professor Orientador)

(Kátia Regina Netto dos Santos, Ph.D, UFRJ – Professor Orientador)

(Beatriz Meurer Moreira, Ph.D, UFRJ – Presidente Banca)

(Ana Luíza de Mattos Guaraldi, Ph.D, UERJ – Membro Banca)

(Marinella Silva Laport, Ph.D, UFRJ – Membro Banca)

(Ana Paula Vieira Colombo, Ph.D, UFRJ – Revisor Banca)

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia Molecular, Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação da Prof.^{as} Marcia Giambiagi-deMarval e Kátia Regina Netto dos Santos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado boa vontade, saúde, capacidade para buscar o conhecimento, além de uma maravilhosa família e amigos verdadeiros.

À minha esposa Melissa pela cumplicidade nos sucessos e insucessos da minha vida.

À minha filha Beatriz por ter transformado as minhas angústias em ternura.

À Prof^ª. Marcia Giambiagi-deMarval agradeço pela amizade, pelo incentivo e orientações.

À Prof^ª. Kátia Regina Netto dos Santos, pela confiança.

À Prof^ª. Marinella Silva Laport agradeço pelo apoio, confiança e pela amizade.

Aos amigos e colegas do laboratório de Microbiologia Molecular e do laboratório de Infecções Hospitalares: Olinda, Paula, Naira, Elaine, Orlando, Nathália, Juliana, Cleyton, Palloma, Luana, Lorayne e Eliezer por todos os momentos que farão parte de minha vida apoio e momentos divertidos e agradáveis proporcionados ao longo desse período.

Aos queridos colegas do Hospital Naval Marcílio Dias: Maria, Maria Elizabeth, Marta, Chaves, Mário e Melissa por terem tornado possível esta conquista.

Ao Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, nas pessoas da Prof^ª. Agnes Marie Sá Figueiredo, Diretora, e Prof^ª. Ana Paula Colombo, Coordenadora de Pós-Graduação.

*À minha amada esposa
Pela amizade, respeito e carinho,
Pela obstinação em me fazer feliz,
Por estarmos unidos nesta caminhada,
dedico.*

*À minha mãe Lais, meus irmãos Rodrigo e Álvaro,
companheiros para todos os momentos,
com amor, ofereço.*

RESUMO

André Nogueira Olendzki

Avaliação da acurácia do sistema MicroScan WalkAway na identificação e detecção da resistência à oxacilina em amostras de *Staphylococcus* coagulase-negativos

Orientadores: Marcia Giambiagi-deMarval e Kátia Regina Netto dos Santos

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

Os *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN) são microrganismos da microbiota normal humana, mas com o aumento da utilização de dispositivos médicos e de populações de indivíduos imunocomprometidos, sua incidência e importância nas infecções humanas têm crescido. *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus saprophyticus* representam as espécies de SCN mais prevalentes em infecções humanas, enquanto *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus warneri* e *Staphylococcus simulans* são patógenos oportunistas menos frequentes. A multirresistência apresentada por amostras de estafilococos contribui para o aumento da mortalidade e a permanência prolongada do paciente no hospital. As taxas de resistência à oxacilina tem se apresentado acima de 70% em hospitais do mundo inteiro. O sistema MicroScan WalkAway, muito utilizado nos laboratórios de rotina devido ao seu fácil manejo e rapidez nos resultados, tem demonstrado acurácia de cerca de 80% na identificação das espécies de SCN. Em relação à detecção da resistência à oxacilina, tem apresentado alta especificidade, porém baixa sensibilidade. O objetivo deste trabalho foi determinar a acurácia do sistema MicroScan WalkAway na identificação das espécies estafilocócicas e sua da resistência à oxacilina em amostras de SCN. O sistema foi comparado a métodos moleculares como a PCR, PCR-RFLP, SDS-PAGE ou técnicas convencionais. Um total de 196 amostras clínicas da coleção do laboratório de bacteriologia do Hospital Naval Marcílio Dias, RJ foi avaliado. O sistema apresentou 100% de confiabilidade ao identificar amostras clínicas como *S. haemolyticus*, *S. hominis* e *S. cohnii*; 98,03% para *S. epidermidis*; 70% para *S. lugdunensis*; 40% para *S. warneri*; 28,57% para *S. capitis* e nenhuma para *S. auricularis*, *S. simulans* e *S. xylosus*. Os métodos utilizados como referência definiram que a baixa confiabilidade para algumas espécies deveu-se, em geral, ao comportamento bioquímico atípico apresentado por amostras de *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* e até mesmo *S. aureus*, resultando na indicação de espécies menos frequentemente isoladas. Na detecção da resistência à oxacilina entre as 196 amostras testadas, 178 tiveram seus resultados confirmados por PCR, com a detecção do gene *mecA*. O sistema demonstrou 99,48% de especificidade e 91,32% de sensibilidade. Tais resultados sugerem que as provas bioquímicas do sistema automatizado, muitas vezes, foram incapazes de diferenciar as espécies estafilocócicas utilizadas no trabalho. Sugerem ainda que o método da microdiluição em caldo, presente no sistema, é pouco eficiente para detectar resistência à oxacilina, provavelmente devido à alta taxa de heterorresistência entre os SCN.

Palavras-chave:

1. sistema MicroScan 2. identificação de *Staphylococcus* 3. resistência à oxacilina 4. métodos moleculares 5. microdiluição em caldo 6. sistema automatizado

Rio de Janeiro
Junho de 2009

ABSTRACT

André Nogueira Olendzki

Evaluation of MicroScan WalkAway`s accuracy in identifying and detecting resistance to oxacillin in coagulase-negative staphylococci strains

Orientadores: Marcia Giambiagi-deMarval e Kátia dos Santos Netto

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

Coagulase-negative staphylococci (CNS) are considered commensal organisms of the normal human microbiota. However, their incidence and importance as human pathogens have increased due to the frequent utilization of medical devices made of plastic in health services, as well as emergence of immunocompromised population. *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus saprophyticus* are the most common species in human infections, while *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus warneri* and *Staphylococcus simulans* are unusual opportunistic pathogens. CNS multidrug resistance leads to high rates of mortality and morbidity, which contributes to long-stay hospital care. Oxacillin resistance rates superior to 70% have been reported in hospitals worldwide. The MicroScan WalkAway system has been very useful in clinical laboratories due to its easy operation and short-time results; however, the accuracy in identifying CNS species has been reported to be around 80%. As for oxacillin resistance detection, the system has showed high specificity but low sensitivity. This study aimed to measure MicroScan WalkAway`s accuracy for identifying and detecting oxacillin resistance in CNS strains employing molecular methods, such as PCR, PCR-RFLP, SDS-PAGE or conventional ones; testing 196 clinical strains from the collection of the Bacteriology Laboratory of the Hospital Naval Marcílio Dias, RJ. The system showed 100% accuracy for detecting clinical strains identified as *S. haemolyticus*, *S. hominis* and *S. cohnii*; 98,03% for *S. epidermidis*; 70% for *S. lugdunensis*; 40% for *S. warneri*; 28,57% for *S. capitis* and no accuracy for identifying *S. auricularis*, *S. simulans* and *S. xylosus*. According to these data, most of the misidentified isolates included strains with unusual biochemical behavior, such as *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* or even *S. aureus*. As for oxacillin resistant detection; from 196 strains tested, 178 out of 196 had their results confirmed by PCR. The system showed 99,48% specificity and 91,32 % sensitivity. This fact suggests that the biochemical tests of the system often failed to identify the staphylococcal species in this study. It still suggests that the broth microdilution method of the system is not accurate to detect oxacillin resistance, probably due to the high heteroresistance rates, observed in CNS.

Key-words:

1. MicroScan system 2. *Staphylococcus* identification 3. resistance to oxacillin 4. molecular methods 5. broth microdilution 6. automated system

Rio de Janeiro
Junho de 2009

SUMÁRIO

Lista de siglas e abreviaturas.....	xi
Lista de ilustrações.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Importância clínica de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos	01
1.2. Métodos de identificação de SCN.....	04
1.2.1. Métodos convencionais.....	05
1.2.2. Métodos moleculares.....	06
1.3. Aquisição de resistência aos antimicrobianos.....	07
1.4. Detecção da resistência à oxacilina.....	10
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. Objetivo geral.....	13
2.2. Esquema Experimental.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Amostras de referência e controle.....	14
3.2. Amostras de SCN identificadas pelo sistema automatizado MicroScan WalkAway.....	14
3.2.1. Coloração pela técnica de Gram.....	16
3.2.2. Teste da catalase.....	16
3.3. Cultivo e armazenamento das amostras.....	17
3.4. Confirmação da identificação das espécies <i>S. epidermidis</i> e <i>S. haemolyticus</i> e detecção do gene <i>mecA</i> por PCR-multiplex.....	17
3.4.1. Metodologia de PCR.....	17
3.4.1.1. Liberação de DNA bacteriano através de lise térmica.....	17
3.4.1.2. Reação de PCR-multiplex.....	17
3.5. Identificação das demais espécies de SCN por PCR-RFLP.....	19
3.5.1. Extração de DNA total com tiocianato de guanidina.....	19
3.5.2. Digestão de DNA λ com <i>Hind</i> III.....	20
3.5.3. Reação de polimerase em cadeia (PCR) para uma sequência parcial do gene <i>groEL</i>	20
3.5.4. Eletroforese do DNA em gel de agarose.....	21
3.5.5. Digestão com enzima de restrição <i>AluI</i>	22
3.5.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	23
3.6. Observação e documentação dos géis de agarose e poliacrilamida.....	24

3.7. Identificação das espécies de SCN por SDS-PAGE.....	25
3.7.1. Preparação do lisado de proteínas totais.....	25
3.7.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS.....	26
3.8. Identificação das espécies de <i>Staphylococcus</i> através do método fenotípico convencional.....	26
3.8.1. Produção de coagulase livre.....	27
3.8.2. Produção de hemolisina.....	27
3.8.3. Produção de fator “clumping”.....	28
3.8.4. Produção da enzima pirrolidonil arilamidase (PYRase).....	28
3.8.5. Produção da enzima urease.....	28
3.8.6. Produção da enzima fosfatase.....	29
3.8.7. Fermentação de carboidratos.....	29
3.8.8. Produção de enzimas descarboxilases.....	30
3.8.9. Redução do nitrato.....	30
3.8.10. Produção da acetoína.....	31
3.8.11. Teste de resistência a agentes antimicrobianos.....	31
3.8.11.1. Susceptibilidade à bacitracina.....	31
3.8.11.2. Novobiocina.....	32
3.8.11.3. Polimixina B.....	32
3.8.11.4. Desferrioxamina.....	32
3.9. Análise Estatística.....	34
4.0. RESULTADOS.....	35
4.1. Confirmação da identificação obtida pelo sistema MicroScan WalkAway..	35
4.1.1. <i>S. epidermidis</i>	36
4.1.2. <i>S. haemolyticus</i>	36
4.1.3. <i>S. lugdunensis</i>	37
4.1.4. <i>S. capitis</i>	38
4.1.5. <i>S. hominis</i>	38
4.1.6. <i>S. auricularis</i>	39
4.1.7. <i>S. cohnii</i>	40
4.1.8. <i>S. simulans</i>	41
4.1.9. <i>S. xylosus</i>	42
4.1.10. <i>S. warneri</i>	42
4.2. Avaliação do sistema MicroScan para a detecção da resistência à oxacilina.....	43

5. DISCUSSÃO.....	45
6. CONCLUSÕES.....	51
7. BIBLIOGRAFIA.....	52

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC = “American Type Culture Collection”

BHI = “Brain Heart Infusion” (Infusão de coração e cérebro)

CLSI = “Clinical and Laboratory Standards Institute”

CMI = Concentração mínima inibitória

DNA = ácido desoxirribonucléico

dNTPs = desoxirribonucleotídeos 5’-trifosfatados

EDTA = ácido etilenodiaminotetracético

MRSA = “methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*” (*Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina)

ND = não determinado

pb = pares de base

PCR = “Polymerase Chain Reaction” (Reação de polimerase em cadeia)

PVL = “Panton-Valentine Leukocidin” (Leucocidina Panton-Valentine)

RFLP = “Restriction Fragment Length Polymorphism”

SCC_{mec} = “Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*” (Cassete cromossômico de estafilococos *mec*)

SDS-PAGE = “Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrilamide Gel Eletrophoresis”

TAE = Tris – Ácido acético – EDTA

Taq = *Thermus aquaticus*

TE = Tris – EDTA

TRIS = Hidroximetil – aminometano

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação esquemática da distribuição das provas bioquímicas e antibióticos no painel PC21 do sistema MicroScan.

Figura 2: Eletroforese em gel de agarose a 2,5% com a presença de fragmentos de 286pb, 218pb e 154pb, amplificados por PCR, identificando as espécies *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* e gene *mecA*, respectivamente.

Figura 3: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% do fragmento de cerca de 550pb do gene *groEL* digerido com *AluI* de amostras das 12 espécies prevalentes em humanos de *Staphylococcus* (Barros *et al.*, 2007).

Figura 4: Eletroforese em gel de agarose a 2,5% do produto da reação de PCR-multiplex de amostras identificadas pelo sistema MicroScan WalkAway como *S. epidermidis* utilizando oligonucleotídeos para a detecção de fragmentos específicos de *S. epidermidis* e gene *mecA*.

Figura 5: Eletroforese em gel de agarose a 2,5% do produto da reação de PCR-multiplex utilizando oligonucleotídeos para a detecção de fragmentos específicos de *S. haemolyticus* e gene *mecA*. Coluna 1: amostra 182834 (*S. haemolyticus*, *mecA*-positiva).

Figura 6: Eletroforese em gel de agarose a 2,5% do produto da reação de PCR-multiplex utilizando oligonucleotídeos para a detecção de fragmentos específicos de *S. haemolyticus* (286pb) e gene *mecA* (154pb).

Figura 7: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% do fragmento de cerca de 550pb do gene *groEL* digerido pela *AluI* de amostras identificadas pelo sistema MicroScan WalkAway como *S. lugdunensis*.

Figura 8: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% do fragmento de cerca de 550pb do gene *groEL* digerido pela *AluI* de amostras identificadas pelo sistema MicroScan WalkAway como *S. capitis*.

Figura 9: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% do fragmento de cerca de 550pb do gene *groEL* digerido pela *AluI* de amostras identificadas pelo sistema MicroScan WalkAway e confirmadas por PCR-RFLP como *S. hominis*.

Figura 10: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% do fragmento de cerca de 550pb do gene *groEL* digerido pela *AluI* de amostras identificadas pelo sistema MicroScan WalkAway como *S. auricularis*.

Figura 11: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% do fragmento de cerca de 550pb do gene *groEL* digerido pela *AluI* de amostras identificadas pelo sistema MicroScan WalkAway como *S. cohnii*.

Figura 12: Resultado apresentado pela técnica do SDS-PAGE para amostras identificadas pelo sistema MicroScan WalkAway como *S. cohnii* subespécie *urealyticus*, amostra identificada pelo sistema como *S. xylosus*. amostras controle: 67s (*S. cohnii* subsp. *urealyticus*), ATCC 29974 (*S. cohnii* subsp. *cohnii*) e ATCC 29971 (*S. xylosus*).

Figura 13: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% do fragmento de cerca de 550pb do gene *groEL* digerido pela *AluI* de amostras identificadas pelo sistema MicroScan WalkAway como *S. simulans*.

Figura 14: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% do fragmento amplificado de cerca de 550pb do gene *groEL* digerido pela *AluI* da amostra identificada pelo sistema MicroScan WalkAway como *S. xylosus*.

Figura 15: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% do fragmento de cerca de 550pb do gene *groEL* de amostras identificadas pelo sistema MicroScan WalkAway como *S. warneri*.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Importância clínica de *Staphylococcus* coagulase-negativos

Os estafilococos são divididos em dois grupos, os coagulase-positivos, representados principalmente por *Staphylococcus aureus*, e coagulase-negativos, grupo que engloba a grande maioria das espécies estafilocócicas (BANNERMAN & PEACOCK, 2007). *S. aureus* é a espécie melhor estudada, por estar frequentemente envolvida com uma série de infecções e intoxicações em humanos imunocompetentes. Os *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN), por muito tempo, foram considerados micro-organismos saprófitas, ou raramente patogênicos. Entretanto, sua incidência crescente em infecções tem sido reconhecida, especialmente, em bacteriemias (HUEBNER & GOLDMANN, 1999; ABDALLAH *et al.*, 2006).

Os SCN ganharam especial interesse por estarem envolvidos em infecções hospitalares associadas a catéteres (OTTO, 2004), próteses de válvulas cardíacas e implantes ortopédicos (HUEBNER & GOLDMANN, 1999), dispositivos estes que ganham espaço na medicina moderna a cada dia. Os SCN também são bastante incidentes nas infecções que acometem pacientes imunocomprometidos (MARTINS & CUNHA, 2007). Podem causar infecções variadas, tais como: infecção no sistema nervoso central, endocardite, infecções do trato urinário e endoftalmite (HUEBNER & GOLDMANN, 1999).

O gênero *Staphylococcus* compreende 41 espécies e 25 subespécies (http://www.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature, acessado em 06/06/2009), sendo as espécies de SCN mais incidentes nas infecções humanas *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus saprophyticus* (LAYER *et al.*, 2006). Esta última constitui uma importante espécie causadora de infecções urinárias

comunitárias que acometem principalmente mulheres sexualmente ativas (ISHIHARA *et al.*, 2001).

Uma das importantes características que conferem aos SCN, principalmente ao *S. epidermidis*, a capacidade de causar infecções pelo uso de dispositivos implantáveis é a formação de biofilme que, nas últimas décadas, tem sido um importante foco de estudos. O biofilme, uma vez formado, protege a bactéria contra a ação de antimicrobianos e do sistema imune, permitindo a sua persistência no hospedeiro (KLOOS & BANERMANN, 1994). Os fatores de virulência envolvidos na adesão à superfície de dispositivos implantáveis e no acúmulo das células bacterianas são os principais responsáveis pela formação do biofilme (MONTANARO, CAMPOCCIA & ARCIOLA, 2007). A produção de lipases, proteases e outras exoenzimas também podem contribuir para a persistência dos SCN no hospedeiro, permitindo assim, dano aos tecidos (OTTO, 2004).

A espécie *S. epidermidis* emergiu como um patógeno oportunista responsável por várias infecções em pacientes neutropênicos (BEN HASSEN *et al.*, 2001; NOUWEN *et al.*, 1998) e representa a espécie de micro-organismo Gram-positivo mais prevalente nas infecções associadas aos catéteres em pacientes transplantados de medula óssea (BUTT *et al.*, 2004). Sua notória capacidade de formar biofilme na superfície de dispositivos implantáveis faz com que o tratamento das infecções tenha êxito improvável, sendo frequentemente necessária a remoção do dispositivo (MCCANN, GILMORE & GORAN, 2008).

S. haemolyticus representa a segunda espécie mais comumente isolada de humanos (PFALLER *et al.*, 1999; FERREIRA *et al.*, 2003), e é superado somente pelo *S. epidermidis* na frequência de isolamento em hemoculturas associadas a catéteres (ING, BADDOUR & BAYER, 1997; FALCONE *et al.*, 2006), podendo causar também peritonites, otites, infecções urinárias e septicemias. Cepas resistentes à oxacilina têm sido

associadas a dispositivos implantáveis (FALCONE *et al.*, 2006). Dentre os SCN, *S. haemolyticus* foi a primeira espécie a ser detectada com susceptibilidade diminuída à teicoplanina e à vancomicina (SCHWALBE, STAPLETON & GILLIGAN, 1987). Amostras resistentes à linezolida em centros de terapia intensiva também têm sido relatadas (RODRIGUEZ-ARANDA *et al.*, 2009).

Apesar de pouco frequente nas infecções humanas, *S. lugdunensis* tem sido associada a casos de infecções de tecidos moles, ventriculite, endocardite e celulite (SJOLUND & KAHLMETER, 2008; SPANU *et al.*, 2008; TAKAHASHI *et al.*, 2008). Além disso, podem causar infecções superficiais de pele similares às causadas por *S. aureus* (BOCHER *et al.*, 2009).

Recentemente, *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* foram isolados de culturas de sangue e de outros espécimes clínicos (KLOOS *et al.*, 1998). O nome da subespécie deriva de sua resistência à novobiocina e de sua capacidade de causar septicemia. Tal patógeno normalmente apresenta resistência a múltiplos antibióticos, como à oxacilina e outros agentes (KLOOS *et al.*, 1998; CHAVES *et al.*, 2005).

Outras espécies, tais como: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus saccharolyticus* são patógenos oportunistas menos frequentes em infecções humanas (LAYER *et al.*, 2006). Contudo, *S. cohnii* tem sido associado a infecções em pacientes hospitalizados, podendo apresentar até mesmo resistência à linezolida, antibiótico amplamente utilizado para o tratamento de infecções por bactérias Gram-positivas resistentes à vancomicina (AZEVEDO *et al.*, 2008; PETINAKI *et al.*, 2009). *S. capitis* tem sido relatado como causa de sinusite crônica e endocardite (HYO, YAMADA & HARADA, 2008; NALMAS *et al.*, 2008).

Outro aspecto importante em relação as espécies de SCN é o fato de que algumas SCN atuam como reservatório de genes codificadores de resistência a antimicrobianos, como por exemplo, o gene *ileS-2*, responsável pela resistência à mupirocina. Este antimicrobiano de uso tópico é amplamente utilizado na descolonização de pacientes portadores de *S. aureus* resistentes à oxacilina, cuja transferência ocorre entre estafilococos da mesma espécie ou mesmo entre espécies diferentes (BASTOS *et al.*, 1999).

1.2. Métodos de identificação de SCN

Em muitos laboratórios de rotina, os *Staphylococcus* são identificados baseando-se somente no aspecto colonial, coloração de Gram, produção de catalase e coagulase, o que só permite a diferenciação entre *S. aureus* e SCN. Esta simples diferenciação tem sido insuficiente para o correto auxílio ao clínico na escolha de uma conduta médica adequada (CUNHA, SINZATO & SILVEIRA, 2004).

Com a emergência dos SCN como importantes patógenos humanos, a correta identificação de SCN isolados de infecções tem se tornado essencial para a análise epidemiológica da distribuição de *Staphylococcus* envolvidos em infecções hospitalares e para o controle terapêutico destas infecções (KLOOS & BANNERMAN, 1999). Igualmente importante, é o conhecimento do potencial patogênico de cada espécie isoladamente (CAIERÃO *et al.*, 2006).

1.2.1. Métodos convencionais

Existem vários métodos fenotípicos propostos para a identificação de SCN, todos visando uma maior acurácia e simplicidade (KLOOS & SCHLEIFER, 1975; MONSEN *et al.*, 1998; DE PAULIS *et al.*, 2003).

O método proposto por Bannerman e Peacock (2003) é composto por mais de 20 provas bioquímicas e outras características fenotípicas. Além de demorado, ele é considerado bastante trabalhoso para a utilização em laboratórios de rotina. Contudo, é bastante seguro e acurado, sendo considerado o método de referência para a identificação das espécies *Staphylococcus* (CUNHA, SINZATO & SILVEIRA, 2004).

Alguns esquemas simplificados de identificação, baseados no método convencional têm sido propostos. Eles utilizam um menor número de testes e fornecem resultados em tempo inferior quando comparado ao convencional. Além disso, têm apresentado grande acurácia na identificação das espécies prevalentes nas infecções humanas (CUNHA, SINZATO & SILVEIRA, 2004; IÓRIO *et al.*, 2007).

Os sistemas automatizados são métodos fenotípicos igualmente baseados em provas bioquímicas e sensibilidade aos antibióticos que, apesar do seu alto custo, são amplamente utilizados pelos laboratórios de rotina, devido à rapidez dos resultados e à simplicidade na utilização. Porém, a acurácia na identificação de *Staphylococcus* é bastante discutível. Dependendo do sistema utilizado, a acurácia pode variar de menos de 80% (HEIKENS *et al.*, 2005) até 96,8% (CAIERÃO *et al.*, 2006). Outra limitação é a baixa reprodutibilidade de resultados, originária das variações fenotípicas apresentadas pelas amostras de SCN (LAYER *et al.*, 2006; CARBONNELLE *et al.*, 2007). Além disso, a utilização de inóculos mistos pode não ser detectada pelos métodos fenotípicos, incluindo os automatizados. Neste caso, a associação de duas ou mais espécies diferentes pode resultar em um perfil fenotípico compatível com o perfil de uma outra espécie, levando a identificações equivocadas (HIGA *et al.*, 2008). Um dos sistemas automatizados mais utilizados mundialmente nos laboratórios de rotina é o MicroScan WalkAway. Ele é constituído de um conjunto de provas bioquímicas e antibióticos aos quais as amostras de *Staphylococcus* são submetidas. Através do comportamento das amostras frente a tais provas, obtém-se um

biotipo numérico que é utilizado na indicação da espécie mais provável, bem como da percentagem da probabilidade na identificação (<http://www.dadebehrling.com>).

1.2.2. Métodos moleculares

Os métodos moleculares podem apresentar alta sensibilidade e especificidade para a identificação de *Staphylococcus* (DRANCOURT & RAOULT, 2002, BARROS *et al.*, 2007), porém ainda não estão disponíveis nos laboratórios de rotina. Eles são baseados, ou na detecção de sequências espécie-específicas, ou nas variações na sequência de elementos ubiquitários (CHESNEAU *et al.*, 1993).

O gene *groEL* provou ser ideal como um alvo para a identificação a nível de espécie por possuir sequências de DNA bem conservadas, mas com variações nestas suficientes para diferenciar várias espécies de *Staphylococcus* (GOH *et al.*, 1996). Ele codifica a proteína GroEL ou HSP60 (“Heat Shock Protein” 60), que é uma chaperonina de 60kDa, que auxilia no enovelamento de proteínas bacterianas (FINK, 1999).

No método de identificação de espécies de *Staphylococcus*, estabelecido por Barros *et al.* (2007), um par de oligonucleotídeos degenerados (GOH *et al.*, 1996) amplificam através da técnica da “Polymerase Chain Reaction” (PCR), uma sequência parcial de cerca de 550pb do gene *groEL*. Para a identificação das diferentes espécies estafilocócicas é feita a análise do polimorfismo genético do *groEL* pela digestão com a enzima de restrição *AluI*. Os padrões de “Restriction Fragment Length Polymorphism” (RFLP) obtidos das amostras analisadas são comparados aos esperados para as 12 espécies abordadas no estudo de Barros e colaboradores (2007). Santos e colaboradores (2007) empregaram o mesmo método, porém utilizando amostras isoladas de mastite bovina, o que reforçou a confiabilidade do método na identificação de algumas das espécies estudadas por Barros e

colaboradores (2007) e definiu o padrão de RFLP para outras espécies que, embora presentes na mastite bovina, podem ser isolados de espécimes clínicos humanos.

O uso de técnicas de amplificação de DNA no diagnóstico microbiológico moderno não apenas permite uma identificação sensível e precisa de micro-organismos, mas também a detecção de genes específicos que codificam resistência a antimicrobianos (SCHMITZ *et al.*, 1997). A detecção de sequências de DNA específicas das diferentes espécies estafilocócicas pela técnica de PCR tem apresentado boa acurácia na identificação, e tem provado que, devido à sua rapidez e simplicidade, pode ser utilizada nos laboratórios de rotina (MARTINEAU *et al.* 1996; SCHUENCK *et al.*, 2008).

A utilização das proteínas celulares totais na técnica de dodecilsulfato de sódio – eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) também pode ser bastante útil no agrupamento de espécies e subespécies de *Staphylococcus*. As subespécies possuem o perfil característico de suas espécies, porém podem ser diferenciadas por um grupo de polipeptídeos variáveis (THOMSON-CARTER & PENNINGTON, 1989; PENNINGTON, HARKER & THOMSON-CARTER, 1991; BENITO *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2009).

1.3. Aquisição de resistência aos antimicrobianos

Em 1944, quando a penicilina foi introduzida, 94% das cepas estafilocócicas eram sensíveis a esta droga. Este número caiu à metade nos anos 50 e, atualmente, situa-se entre 10 e 20% (CDC, 2005). A introdução das penicilinas semi-sintéticas resistentes às penicilinases em 1959, como a meticilina e a oxacilina, representou um grande avanço na terapia das infecções estafilocócicas. Porém em 1961, foi relatado o primeiro caso de resistência a tais drogas (BARBER, 1961).

Mundialmente, as taxas de SCN resistentes à oxacilina encontradas têm sido superiores a 70% (DIEKEMA *et al.*, 2001). No Brasil, em alguns hospitais, a resistência à

oxacilina em SCN pode chegar a 80% (SADER *et al.* 2001). Frequentemente, a vancomicina e a teicoplanina são consideradas como último recurso para o tratamento das infecções (ENDTZ *et al.*, 1999), pois são medicamentos caros e possuem efeitos colaterais graves, além de poder selecionar cepas resistentes (HIRAMATSU *et al.*, 1997).

A base genética da resistência à oxacilina, ou meticilina, em amostras de *Staphylococcus* é a presença do gene *mecA*, que codifica a proteína de ligação da penicilina modificada, a “Penicillin Binding Protein” 2a (PBP2a). Esta proteína é suplementar às PBP primitivas e tem baixa afinidade pelos antibióticos beta-lactâmicos; portanto, torna a bactéria resistente a todos os antimicrobianos desta classe, inclusive as cefalosporinas e carbapenemas. O gene *mecA* é invariavelmente localizado em um elemento genético móvel chamado “Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*” (SCC*mec*) (FRANÇOIS *et al.*, 2004). Ele integra o cromossomo de modo sítio-específico numa orientação única e sua excisão do cromossomo também acontece de maneira precisa. A excisão e a integração do SCC*mec* foram observadas *in vivo* e são, provavelmente, dependentes dos produtos dos genes *ccr*, localizados no elemento, que codificam recombinases da família invertase/resolvase (QI *et al.*, 2005). Os tipos SCC*mec* são classificados de acordo com a combinação de dois elementos: o complexo *ccr* (*ccrAB1*, *ccrAB2*, *ccrAB3*, *ccrAB4* e *ccrC*) e o complexo *mec* (classes A ao E), resultando em diferentes tipos de SCC*mec*. Foram relatados também vários subtipos de SCC*mec* (HANSSEN *et al.*, 2005). São descritos sete tipos de SCC*mec*: tipos I, II, III e VI, encontrados, principalmente, em amostras de origem hospitalar e tipos IV, V e VII, em amostras de origem comunitária (ITO *et al.*, 2004; OLIVEIRA, MILHEIRIÇO & DE LENCASTRE, 2006; HIGUSHI *et al.*, 2008). Os SCC*mec* tipos IV e V, normalmente, não carregam outros genes de resistência além do gene *mecA* (HIRAMATSU *et al.*, 2001). Contudo, amostras de *S. aureus* que possuem o SCC*mec* do tipo IV têm sido responsáveis

por infecções cutâneas e pneumonias graves e estão associadas a fatores de virulência extracelulares, como a leucocidina de Panton-Valentine (PVL) (BHAKDI & TRANUM-JENSEN, 1991). Recentemente, o SCCmec tipo IV vem sendo encontrado também entre amostras de *S. aureus* de origem hospitalar (PATEL *et al.*, 2008). Muitos outros fatores além do gene *mecA* estão envolvidos na modulação da expressão da resistência à oxacilina, tais como *fem* e *aux* (BERGER & ROHRER, 2002). A grande complexidade na regulação da expressão do gene *mecA* explica a heterorresistência à oxacilina, que é caracterizada pela variação na expressão do gene *mecA* pelos membros de uma mesma população bacteriana. A emergência de populações com resistência heterogênea à oxacilina leva a uma grande dificuldade na detecção de cepas resistentes nos laboratórios de rotina clínica (FERREIRA *et al.*, 2003; CAUWELIER *et al.*, 2007).

No início dos anos 90, observou-se um aumento no uso da vancomicina para o tratamento das infecções causadas por *Staphylococcus* resistentes à oxacilina, o que levou ao estabelecimento de uma pressão seletiva e, conseqüentemente, ao aparecimento de cepas de *Staphylococcus* com susceptibilidade diminuída à vancomicina e a outros glicopeptídeos (TIWARI & SEN, 2006). Também tem sido relatados isolamentos de amostras de SCN apresentando heterorresistência à vancomicina (NUNES *et al.*, 2006). O termo heterorresistência tem sido usado para amostras de *Staphylococcus* que apresentam diferentes populações com níveis variados de resistência à vancomicina (PALAZZO, ARAÚJO & DARINI, 2005).

O espessamento da parede celular é considerado um pré-requisito para a resistência à vancomicina (HIRAMATSU *et al.*, 2001; CUI *et al.*, 2006). Contudo, a base genética dessa resistência ainda não é clara. Uma diminuição nas ligações cruzadas das cadeias laterais peptídicas levam a acumulação de terminações de D-alanil–D-alanina livres no peptideoglicano, atuando como falsos alvos para a vancomicina (SIERADZKI, VILLRI &

TOMASZ, 1998; CUI *et al.*, 2000; REIPERT *et al.*, 2003). Os genes envolvidos na resistência aos glicopeptídeos em *Enterococcus* não têm sido associados com a resistência à vancomicina em *Staphylococcus*, porém sete amostras de “Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus*” (VRSA) carreando o gene *vanA* foram isoladas (WERNER, STROMMINGER & WITTE, 2008).

Infecções hospitalares causadas por bactérias multirresistentes levam a uma maior mortalidade e morbidade nas instituições de saúde, contribuindo para a permanência prolongada do paciente no hospital e aumentando o risco de óbito. Além disso, requerem tratamentos mais tóxicos e dispendiosos (GRAF & MARTIN, 2000).

1.4. Detecção da resistência à oxacilina

Com o aparecimento de *Staphylococcus* resistentes à penicilina, fato este que se deu pouco tempo após o início da utilização deste antibiótico em infecções humanas, surgiu a necessidade de técnicas laboratoriais capazes de detectar tal resistência. Em 1966, Kirby e colaboradores padronizaram o método de disco-difusão, que se baseia na aplicação de discos impregnados com concentrações conhecidas de um antimicrobiano sobre uma placa de meio de cultura previamente semeada de maneira confluenta com uma suspensão bacteriana padronizada em teste. Após incubação, são observados os halos de inibição que servem de referência para a interpretação dos resultados. Mesmo hoje, este método ainda é bastante utilizado nos laboratórios de rotina. O “Clinical Laboratory Standards Institute” (CLSI) recomenda os “breakpoints” para cada antibiótico, que são as medidas do halo de inibição utilizadas como referência na interpretação do antibiograma (BAILEY *et al.*, 1998). A recente recomendação do CLSI sobre o uso do disco de cefoxitina (30 µg) ao invés do disco de oxacilina (1 µg) para a detecção de amostras de *Staphylococcus* resistentes à oxacilina tornou o procedimento mais confiável, uma vez que a cefoxitina

induz mais eficientemente a expressão do gene *mecA*, reduzindo o problema da falsa sensibilidade observada para *Staphylococcus* (LEE *et al.*, 2007).

Os sistemas automatizados, como o MicroScan, ao detectarem a susceptibilidade antimicrobiana, utilizam uma simplificação da microdiluição em caldo. Por esta técnica, obtém-se a Concentração Mínima Inibitória (CMI), que corresponde à menor concentração capaz de promover a inibição de uma suspensão bacteriana padronizada, o que é observado pela ausência de turvação do caldo. Além de ter padronizado o método, o CLSI também sugere os “breakpoints”, que, neste caso, são os valores de CMI utilizados como referência na interpretação como sensível, intermediário ou resistente para cada antibiótico. Para os SCN, uma CMI igual ou superior a 0,5 µg/ml é correspondente a faixa de resistência à oxacilina (CLSI 2005). Estudos comparativos entre os métodos de detecção da resistência à oxacilina têm indicado uma alta especificidade, porém baixa sensibilidade para o sistema MicroScan, o que compromete a sua acurácia (RAMOTAR *et al.*, 1998; CAIERÃO *et al.*, 2004).

A detecção do gene *mecA* pela amplificação de um fragmento desse gene, pode ser muito útil para o relato precoce e acurado de cepas de *Staphylococcus* multirresistentes. A técnica de PCR tem sido considerada como o padrão ouro na detecção da resistência à oxacilina (ERCIS, SANCAK & HASÇELIK, 2008; MOHANASOUNDARAM & LALITHA, 2008). É uma técnica dispendiosa, porém rápida, e chega a apresentar 100% de sensibilidade e especificidade. Além disso, não está sujeita às variações do inóculo, tempo de incubação, pH do meio e concentração de cloreto de sódio (MOHANASOUNDARAM & LALITHA, 2008).

Os sistemas fenotípicos convencionais utilizados nos laboratórios de rotina para a detecção da resistência à oxacilina em amostras de SCN têm se mostrado pouco acurados. Além de demorada, a detecção fenotípica da resistência à oxacilina pode falhar,

especialmente em amostras de SCN, já que algumas cepas são heterorresistentes e, neste caso, somente algumas células expressariam a PBP2a (CHAMBERS, 1997).

O fenômeno da heterorresistência à oxacilina é frequente fonte de erro na sua avaliação, podendo servir de base para terapias equivocadas (ERCIS, SANCAK & HASÇELIK, 2008).

O aumento da incidência dos SCN nas infecções humanas, aliado ao perfil predominantemente multirresistente das amostras clínicas, exige um maior conhecimento epidemiológico de cada espécie, assim como técnicas rápidas, baratas e acuradas de identificação nos laboratórios de rotina. Assim, neste trabalho nos propomos a analisar a confiabilidade e acurácia do sistema MicroScan, já que este representa uma importante ferramenta para a identificação de SCN e detecção da resistência à oxacilina para muitos laboratórios de rotina e, portanto, devem fornecer resultados acurados face à emergência dos SCN como patógenos humanos. Além disso, essa avaliação proverá dados valiosos para futuras melhorias do sistema e melhor aplicação no diagnóstico laboratorial.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo

Avaliar a acurácia do sistema automatizado MicroScan utilizando metodologias moleculares e convencionais, na identificação e detecção de resistência à oxacilina em amostras de *Staphylococcus coagulase-negativos* (SCN).

2.2. Esquema experimental

2.2.1. Utilizar a metodologia de multiplex-PCR para confirmar a identificação de amostras clínicas das espécies *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, e PCR-RFLP para confirmar a identificação de outras espécies de SCN.

2.2.2. Executar a identificação das amostras, pelo método convencional de referência, sempre que houver discordância entre os resultados dos métodos automatizado e moleculares.

2.2.3. Utilizar o método SDS-PAGE para confirmar a identificação, a nível de subespécie, das amostras identificadas pelo sistema automatizado como *S. cohnii*, e como complemento para os casos em que os demais métodos sejam insuficientes para uma identificação definitiva.

2.2.4. Comparar as metodologias de automação (MicroScan WalkAway) e PCR na detecção da resistência à oxacilina em amostras clínicas de SCN.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras de referência e controle

Foram utilizadas como amostras de referência das espécies de *Staphylococcus*: *S. capitis* ATCC 27840; *S. cohnii* subespécie *cohnii* ATCC 29974; *S. epidermidis* ATCC 14990; *S. haemolyticus* ATCC 29970; *S. hominis* ATCC 27844; *S. lugdunensis* DSM 4804; *S. xylosus* ATCC 29971; *S. simulans* ATCC 27851 e *S. warneri* ATCC 10209. Também foi utilizada a amostra 67s de *S. cohnii* subespécie *urealyticus* pertencente à coleção do Laboratório de Infecção Hospitalar, Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, da UFRJ. Para os testes bioquímicos ainda foram utilizadas as seguintes amostras controle: *S. aureus* ATCC 12600, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Micrococcus luteus* ATCC 10240, *S. saprophyticus* ATCC 15305 e *Staphylococcus schleiferi* subespécie *schleiferi* DSM 4807.

3.2. Amostras de *Staphylococcus* coagulase-negativos identificadas pelo sistema automatizado MicroScan WalkAway (Dade-Behring, West Sacramento, CA, EUA).

Foram utilizadas 196 amostras de SCN, isoladas entre 2005 e 2007, previamente identificadas pelo sistema MicroScan WalkAway, no laboratório de Bacteriologia do Hospital Naval Marcílio Dias (Tabela 1). As amostras utilizadas eram registradas naquele hospital por uma sequência numérica.

A identificação das amostras e a determinação da susceptibilidade à oxacilina pelo sistema foram realizadas de acordo com as especificações do fabricante que, basicamente, compreendem as fases: inclusão dos dados do paciente e do micro-organismo no software de gerência do equipamento, padronização da suspensão bacteriana, inoculação da suspensão no painel PC21, incubação do painel no aparelho de 16 a 44 horas, adição

automática dos reagentes reveladores das provas bioquímicas, leitura automática das provas, análise crítica e liberação dos resultados pelo bacteriologista.

Tabela 1: Amostras de *Staphylococcus* identificadas pelo sistema MicroScan WalkAway, organizadas por espécie, utilizadas neste estudo.

Espécie de <i>Staphylococcus</i>	nº amostras
<i>S. haemolyticus</i>	59
<i>S. epidermidis</i>	51
<i>S. hominis</i>	33
<i>S. capitis</i>	14
<i>S. lugdunensis</i>	10
<i>S. auricularis</i>	9
<i>S. cohnii-urealyticus</i>	8
<i>S. simulans</i>	6
<i>S. warneri</i>	5
<i>S. xylosus</i>	1
Total	196

O sistema fornece resultados dentro de 16 a 44 horas de incubação para a identificação e entre 16 a 24 horas para o perfil de susceptibilidade à oxacilina. Mais de 20 testes fazem parte do sistema de identificação. São eles: redução de nitrato, produção de duas glicosidases, indoxil fosfatase, produção de acetoína, fosfatase alcalina, pirrolidonil arilamidase, arginina dihidrolase, urease e fermentação de carboidratos; rafinose, alfa-lactose, D-trealose, D-manose, L-sorbose, L-arabinose, D-ribose, D-manitol e inulina. Os testes de susceptibilidade a novobiocina e bacitracina também fazem parte do sistema. (Dade-Behring, 2003) (Figura 1). Dois testes prévios, a coloração pela técnica de Gram e a prova da catalase, foram necessários para a caracterização das amostras como espécie

pertencente ao gênero *Staphylococcus* ou *Micrococcus*. O teste da resistência à bacitracina, também necessária para diferenciar os dois gêneros, está contida no painel.

MicroScan® - Pos Combo Panel Type 21 B1017 - 201

C	G	TFG	CV	NOV	VP	BE	PGT	LAC	NACL	RBS	BAC
8/4	16/8 A/S	500 GmS	MS	PGR	OPT	PYR	URE	TRE	SOR	INU	PRV
1	2 Cp	1000 StS	NIT	IDX	PHO	ARG	MAN	MNS	ARA	RAF	2/38 T/S
2	4 Gat	0.25	0.5	2	4	8 Am	0.03	0.12	0.25	2	8 P
2	4 LYX	4/2 Aug	2	4	0.25	0.5	1	0.5	0.25	0.25	2
4	8 Nxn	LOC	4	8	0.5	1	2	1	0.5	0.5	4
32	64 Fd	4	8	16	1	2	4	2	1	1	8
1	2 Rif	8 Te	16 Ctz	32 Cax	2 Cd	4 E	8 Gm	4 Lzd	2 Ox	2 Syn	16 Va

Antimicrobial Agents	Dilutions	Antimicrobial Agents	Dilutions
Aug – Amoxicillin/K Clavulanate	4/2	Lzd – Linezolid	0.5 – 4
Am – Ampicillin	0.25 – 0.5, 2 – 8	Fd – Nitrofurantoin	32 – 64
A/S – Ampicillin/Sulbactam	8/4 – 16/8	Nxn – Norfloxacin	4 – 8
Ctz – Cefazolin	2 – 16	Ox – Oxadolin	0.25 – 2
Cax – Ceftriaxone	4 – 32	P – Penicillin	0.03, 0.12 – 0.25, 2, 8
Cp – Ciprofloxacin	1 – 2	Rif – Rifampin	1 – 2
Cd – Clindamycin	0.25 – 2	StS – Streptomycin Synergy Screen	1000
E – Erythromycin	0.5 – 4	Syn – Synercid	0.25 – 2
Gat – Gatifloxacin	2 – 4	Te – Tetracycline	4 – 8
Gm – Gentamicin	1 – 8	T/S – Trimethoprim/Sulfamethoxazole	2/38
GmS – Gentamicin Synergy Screen	500	Va – Vancomycin	2 – 16
LYX – Levofloxacin	2 – 4		

Figura 1: Representação esquemática da distribuição das provas bioquímicas e antibióticos no painel PC21 do sistema MicroScan.

3.2.1. Coloração pela técnica de Gram

A determinação do tipo morfo-tintorial foi realizada através da técnica da coloração de Gram. Cepas padrão de *S. aureus* ATCC 12600 e *E. coli* ATCC 11229 foram utilizadas como controle cocos Gram-positivo e bastonetes Gram-negativo, respectivamente.

3.2.2. Teste da catalase

Neste teste, uma colônia crescida em TSA (“Trypticase Soy Ágar”, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) foi imersa em peróxido de hidrogênio 10 volumes (Rioquímica, Manaus, AM) contido em um tubo de ensaio. O aparecimento de bolhas caracterizou a

produção da enzima catalase, indicando que se tratava de um *Staphylococcus* ou *Micrococcus* (KLOOS & BANNERMAN, 1999). As amostras *S. epidermidis* ATCC 14990 e *E. faecalis* ATCC 29212 foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

3.3. Cultivo e armazenamento das amostras

As amostras de SCN foram mantidas em caldo “Trypticase Soy Broth”, Oxoid (TSB) contendo 30% de glicerol e mantidas a -20°C. Para os teste a seguir todas as amostras foram cultivadas em *ágar-sangue* (Blood *Ágar* Base, Oxoid) com 5% de sangue desfibrinado de carneiro, a 35°C por 24 a 48 horas.

3.4. Confirmação da identificação das espécies *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* e detecção do gene *mecA* por PCR-multiplex

3.4.1. Metodologia de PCR

3.4.1.1. Liberação de DNA bacteriano através de lise térmica

A liberação do DNA bacteriano foi realizada de acordo com Schuenck *et al.* (2008). Três a cinco colônias de cada amostra cultivada em *ágar-sangue* com 5% de sangue desfibrinado de carneiro foram transferidas para 100 µL de tampão TE [10 mM de Tris (Sigma, St. Louis, MO, EUA), 1 mM de EDTA (Sigma), pH 7,8]. Esta suspensão foi mantida à temperatura de ebulição, em torno de 100°C, por 10 minutos e, em seguida, centrifugada por 30 segundos a 10.000 *xg* (microcentrífuga Fanem, modelo 213, São Paulo, SP). Os sobrenadantes, contendo o DNA liberado, foram separados e utilizados para a reação de PCR.

3.4.1.2. Reação de PCR-multiplex

A confirmação da identificação das amostras clínicas e de referência das espécies *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* foi realizada pela detecção de segmentos genômicos específicos, com detecção simultânea do gene *mecA*, conforme descrito por Pereira (2007). Foram utilizados os oligonucleotídeo SEpF e SEpR (Dados não publicados) para detecção de um fragmento espécie-específico de 218 pb de *S. epidermidis* para as amostras identificadas pelo sistema automatizado como tal. Para as amostras identificadas pelo sistema como *S. haemolyticus* foram utilizados os oligonucleotídeos SHF (5'GGTCGCTTAGTCGGAACAAT3') e SHR (5'CACGAGCAATCTCATCACCT3') que amplificam um fragmento de 286 pb correspondente ao gene *mvaA*, que codifica a enzima HMG-CoA redutase para a identificação de *S. haemolyticus* (SCHUENCK *et al.*, 2008). Em ambos os casos utilizaram-se os oligonucleotídeos MRS1 (5'TAGAAATGACTGAACGTCCG3') e MRS2 (5'TTGCGATCAATGTTACCTAG3') para detecção de um fragmento de 154 pb do gene *mecA* (SANTOS *et al.*, 1999). A amplificação foi realizada em um termociclador (PTC-100; MJ Research Inc. Waltham, MA, EUA), em uma mistura da reação com volume final de 50 µL contendo 5 µL de DNA da amostra, 2,5mM dos quatro desoxinucleotídeos 5' trifosfatados (Biotools), 25 pmoles de cada um dos oligonucleotídeos acima citados (conforme a espécie), 5 µL do tampão da enzima 10X (KCl 50mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,4 – Biotools) e 1,5 mM de MgCl₂ (Biotools).

Após realização de uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, foram realizados 30 ciclos de amplificação: desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, seguidos de uma etapa final de extensão, realizada a 72°C por 5 minutos.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de ágarose a 2,5% em TBE [0,89 M de Tris (Sigma), 0,89 M de ácido bórico (Madison, WI, EUA), 2,5 mM de EDTA (Sigma), pH 8,2], a 80V por 1:30h. Em cada gel, foi colocado o padrão de tamanho molecular de 100 pb DNA ladder (Biotools) (figura 2).

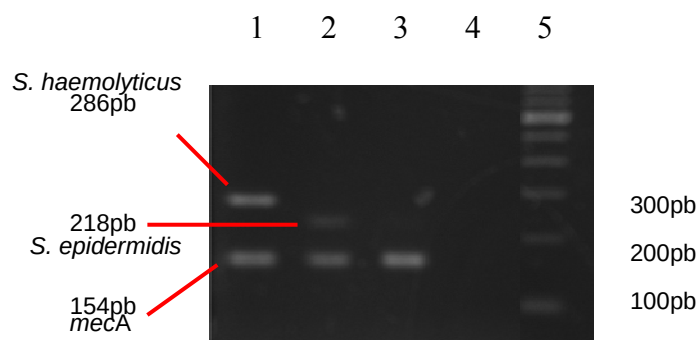


Figura 2: Eletroforese em gel de ágarose a 2,5% com a presença de fragmentos de 286pb, 218pb e 154pb, amplificados por PCR, identificando as espécies *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* e gene *mecA*, respectivamente. A coluna 1 representa uma amostra de *S. haemolyticus mecA*-positivo; coluna 2: uma amostra de *S. epidermidis mecA*-positivo; coluna 3: amostra de SCN não *S. epidermidis* ou *S. haemolyticus mecA*-positivo; coluna 4: amostra de SCN não *S. epidermidis* ou *S. haemolyticus mecA*-negativo e, a coluna 5: padrão de 100pb

Para as demais espécies foi realizada a reação de PCR somente utilizando os oligonucleotídeos MRS1 e MRS2, para o gene *mecA*, pois a confirmação de suas identificações foi realizada por PCR-RFLP.

3.5. Identificação das demais espécies de SCN por PCR-RFLP (BARROS *et al.*, 2007)

3.5.1. Extração de DNA total com tiocianato de guanidina

As amostras bacterianas foram crescidas em 5 ml de BHI (Brain Heart Infusion, Himedia) a 37°C por 24 horas. A partir do caldo de cultura, 1 ml foi transferido para um tubo do tipo “eppendorf”. Essa suspensão bacteriana foi centrifugada a 10000 *xg*/5 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento suspenso em 1 ml de tampão TE

1X. A cultura foi novamente centrifugada a 10000 xg /5 minutos, o sobrenadante desprezado e o sedimento dissolvido em 100 μ l de tampão TE 1X contendo 5 mg de lisozima (Amersham Pharmacia Biotech, Chesham, Buckinghamshire, Reino Unido). Em seguida, foram adicionados 2 μ l de lisostafina (1 mg/ml – Sigma), 5 μ l de RNase (1 mg/ml – Sigma) e 5 μ l de Brij (0,5% - Sigma). Após incubação a 37°C por 1 hora, foram adicionados 500 μ l de tiocianado de guanidina 5 M (Promega, Madison, Wisconsin, EUA). Os tubos foram agitados manualmente e posteriormente incubados a temperatura ambiente, por 7 minutos. Esta etapa foi seguida por um resfriamento do lisado em gelo por 10 minutos, e adição de 250 μ l de acetato de amônio 7,5 M (Reagen, Rio de Janeiro, RJ). Os tubos foram agitados invertendo-os por várias vezes e incubados no gelo por 10 minutos. A essa solução foram adicionados 500 μ l de clorofórmio-isoamil álcool 24:1 (Merck, Darmstadt, Alemanha). Os tubos foram agitados manualmente e posteriormente centrifugados a 12000 xg /12 minutos. A fase aquosa foi, então, transferida para um novo tubo “eppendorf” e o DNA precipitado com 430 μ l de isopropanol (Merck) gelado. A solução foi invertida várias vezes até a visualização de um precipitado branco fibroso. Após centrifugação a 12000 xg /5 minutos, o sobrenadante foi desprezado, o sedimento lavado por 5 vezes com 100 μ l de etanol 70% (Merck) gelado e, finalmente, suspenso em 50 μ l de tampão TE 1X. O DNA foi guardado a 4°C.

3.5.2. Digestão de DNA λ com *Hind* III

Para o volume final de 20 μ l, 500ng de DNA de λ foram adicionados a uma solução contendo tampão 1X da enzima e 10U da enzima de restrição *Hind*III (Invitrogen). Esta solução foi incubada a 37°C por, pelo menos, 3 horas. A metade do volume foi utilizada como padrão para se estimar a concentração do DNA extraído, e metade para o produto do

PCR obtido, através de análise visual intensidade dos fragmentos em eletroforese em gel de ágarose 0,8%.

3.5.3. Reação de polimerase em cadeia (PCR) para uma sequência parcial do gene *groEL*

O protocolo para a amplificação parcial do gene *groEL* foi feito segundo GOH *et al.* (1996) e compreendeu uma etapa inicial de aquecimento a 95°C por 3 minutos, para a desnaturação do DNA, seguido por 40 ciclos de 94°C por 1 minuto (desnaturação), 37°C por 2 minutos (anelamento) e 72°C por 1 minuto (extensão), e uma extensão final a 72°C durante 10 minutos. Os produtos obtidos por PCR foram submetidos à eletroforese em gel de ágarose.

As reações de PCR foram feitas utilizando-se um termociclador com controle de temperatura programável. A mistura de reação, com volume final de 50 µl, foi constituída por uma solução contendo 2,5 mM de cada um dos quatro desoxinucleotídeos 5'-trifosfatos (Biotools), 5 ml de tampão 10X da enzima (KCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,4 – Biotools); 1,5 mM de MgCl₂ (Biotools), 100 ng de DNA, 2U de *Taq* DNA-polimerase (Biotools) e 0,5 µg de cada um dos iniciadores H279A [5'GAIHIGCIGGIGA(TC)GGIACIACIAC3'] e H280A [5'(TC)(TG)I(TC)(TG)ITCICC(AG)AAICGIGGIGC(TC)TT3'], descritos por GOH *et al.* (1996).

3.5.4. Eletroforese de DNA em gel de agarose

Este procedimento foi realizado após a extração do DNA bacteriano com o fim de quantificá-lo, visando a adição de quantidade adequada do DNA na reação da PCR. Foi também realizado para checar se o tamanho do fragmento amplificado era de cerca de 550

pb, após a reação da PCR para o gene *groEL* e quantificá-lo a fim de adicionar quantidade adequada de DNA amplificado para a digestão com a enzima *AluI*. O gel de ágarose 0,8% (p/v) foi preparado em tampão TBE 1X. Às preparações de DNA foi adicionado 1/5 do volume de tampão de amostra e estas foram submetidas à eletroforese em cuba horizontal (Life Technologies – Horizon 11-14) a 150V, em tampão TBE 1X por aproximadamente 90 minutos. Em cada gel, foi colocado o padrão de tamanho molecular de DNA Lambda (GibcoBRL) digerido com *HindIII* (GibcoBRL).

3.5.5. Digestão com enzima de restrição *AluI*

As sequências parciais com aproximadamente 550 pb do gene *groEL* obtidas no banco público de dados “GenBank” foram determinadas por GOH *et al.* (1996). Estas sequências foram analisadas em trabalho anterior (BARROS *et al.*, 2007), em um programa de bioinformática “Restriction Mapper Program” (version 3; <http://www.restrictionmapper.org/>), de modo que enzimas de restrição capazes de revelar o polimorfismo das diferentes sequências parciais do gene fossem pesquisadas. A enzima de restrição escolhida para a análise por RFLP foi a *AluI*. Esta enzima foi utilizada para a digestão do fragmento do gene *groEL* obtido por PCR de todas as estirpes selecionadas neste trabalho. A tabela 2 apresenta o tamanho teórico esperado dos fragmentos de DNA obtidos após a digestão com a enzima, para cada espécie.

Segundo Barros *et al.* (2007), o fragmento de 106 pb de algumas amostras de *S. lugdunensis* adquiriram um sítio de restrição para enzima *AluI* resultando em dois fragmentos de aproximadamente 70 e 40 pb, demonstrando polimorfismo nesta espécie.

A digestão foi realizada conforme descrito por SAMBROOK & RUSSELL (2001). Para um volume final de 30 µl, 500 ng de DNA amplificado por PCR foram adicionados a uma solução contendo tampão 1X da enzima e 5U da enzima de restrição *AluI*. Esta

solução foi incubada a 37°C por, pelo menos, 2 horas. O DNA digerido foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida.

Tabela 2: Comparação entre os tamanhos dos fragmentos de restrição esperado para cada espécie de *Staphylococcus*, fornecidos pelo programa “Mapper Restriction”, após a digestão enzimática com a enzima de restrição *AluI* do fragmento de 550 pb do gene *groEL* (Barros *et al.*, 2007).

Espécies	Fragmentos (pb)
<i>S. aureus</i>	14/ 78/ 204/ 258
<i>S. capitis</i>	9/ 11/ 66/ 106/ 360
<i>S. cohnii</i>	2/24/65/90/93/267
<i>S. epidermidis</i>	173/ 189/ 191
<i>S. haemolyticus</i>	9/ 107/ 438
<i>S. hominis</i>	5/ 547
<i>S. lugdunensis</i>	106/ 111/ 337
<i>S. saprophyticus</i>	20/ 75/ 87/ 372
<i>S. schleiferi</i>	19/ 81/ 117/ 337
<i>S. simulans</i>	1/ 46/ 114/ 147/ 246
<i>S. warneri</i>	102/ 115/ 337
<i>S. xylosus</i>	19/ 75/ 80/ 123/ 258

3.5.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Após a digestão do fragmento amplificado, foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida para a identificação das amostras através do polimorfismo do gene *groEL*. O gel de poliacrilamida não desnaturante a 10% foi feito como descrito por SAMBROOK & RUSSELL (2001). O gel foi preparado utilizando-se acrilamida (Pharmacia Biotech, Cambridge, Reino Unido) e bisacrilamida (BIO-RAD, Hercules, CA, EUA) na proporção

29:1 (%p/v), TBE 1X, persulfato de amônio a 10% e solução Temed (Amershan Biosciences). Às preparações de DNA foram adicionados 1/5 do volume de tampão de amostra e estas foram submetidas à eletroforese em cuba vertical a 150V, em tampão TBE 1X, por aproximadamente 1 hora e 40 minutos. Em cada gel, foi utilizado o padrão de tamanho molecular de 25pb-DNA ladder (Invitrogen, Calrsbad, CA, EUA) (figura 3).

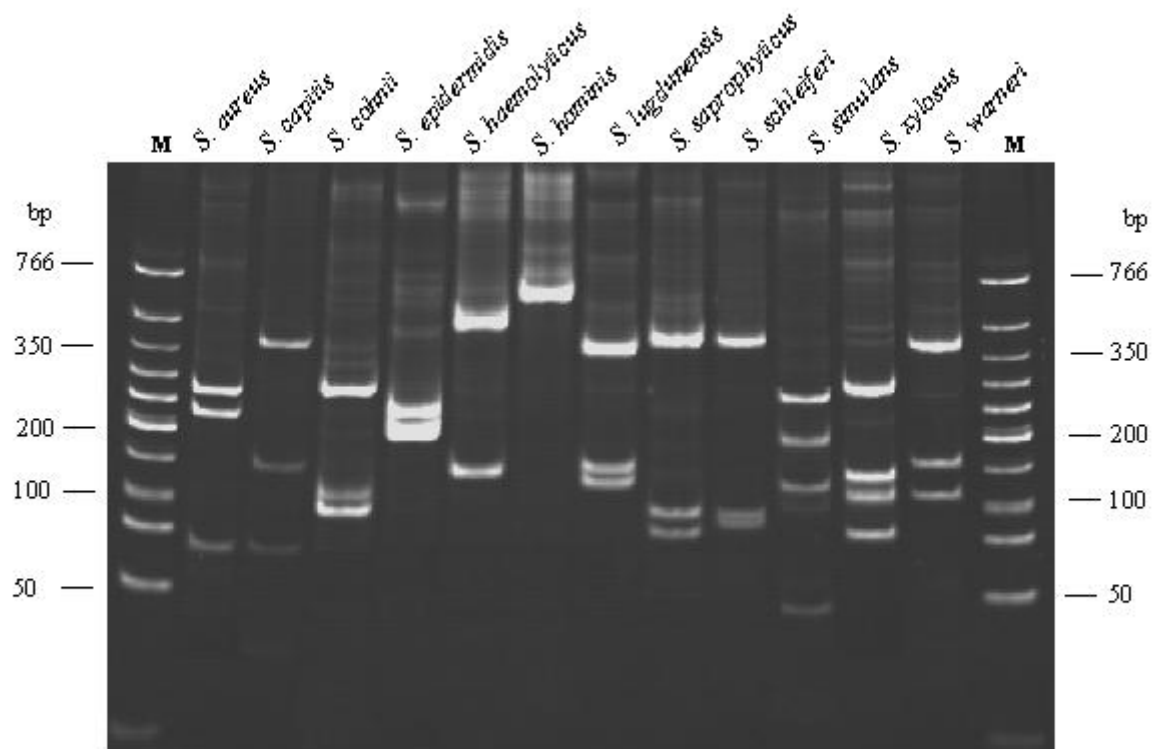


Figura 3: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% do fragmento de cerca de 550pb do gene *groEL* digerido com *AluI* de amostras das 12 espécies de *Staphylococcus* prevalentes em humanos (Barros *et al.*, 2007).

3.6. Observação e documentação dos géis de ágarose e poliacrilamida

Após a corrida, os géis de ágarose e poliacrilamida obtidos nas técnicas PCR, PCR-multiplex e PCR-RFLP foram corados com uma solução de brometo de etídio na concentração final de 0,5µg/ml, durante 30 minutos. Posteriormente, foram observados através de um transiluminador de luz UV e as imagens documentadas pelo Sistema de Fotodocumentação Doc-PrintII (Vilber Lourmat, Eberhardzell, Alemanha).

3.7. Identificação das espécies de SCN por SDS-PAGE (Santos *et al.*, 2009)

Esta técnica foi utilizada como auxílio na verificação da acurácia do sistema automatizado na identificação a nível de subespécie das amostras identificadas como *S. cohnii* subsp. *urealyticus*.

3.7.1. Preparação do lisado de proteínas totais

A extração de proteínas totais foi realizada segundo Laport *et al.*, 2001. As amostras bacterianas foram cultivadas em meio BHI (Difco, Nova Jersey, EUA) sob agitação de 500xg, a 37°C, por uma noite. Após este período, foi realizada uma diluição de 1:10 (1ml do inóculo para 9ml de BHI), e foram novamente colocadas na estufa a 37°C, sob agitação de 500xg por 1 hora. As células em fase exponencial de crescimento foram centrifugadas (centrífuga Sorvall – rotor do modelo SS-34, Newtonn. Conn – EUA) a 1.500xg por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado duas vezes em 1ml de tampão TE 1X, sendo centrifugado sob velocidade de 10.000xg após cada lavagem. Os sedimentos bacterianos foram, então, suspensos em 50µl deste mesmo tampão e incubados com lisozima (20 mg/ml) e lisostafina (0,1 mg/ml) por 2 horas a 37°C. Para análise em eletroforese em SDS-PAGE, foram adicionados 50µl de tampão de tratamento [0,002g de azul de coomassie; 0,5 M de Tris, pH 6,8; 4% (p/v) de SDS (Pharmacia); 10% (p/v) de β-mercaptoetanol (Reagen); 20% (p/v) de glicerol]. As amostras foram, então, aquecidas a 100°C por 5 minutos e centrifugadas a 2.500xg por 5 minutos, para a obtenção do sobrenadante, que foi estocado a -20°C.

3.7.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

Para a realização da eletroforese unidimensional de proteínas, o gel de poliacrilamida foi preparado como descrito por Laemmli (1970), constando de um sistema vertical e descontínuo. A eletroforese foi feita a partir de um gel de empilhamento [25% (p/v) de Tris-HCl, pH 6,8; 1% (p/v) de SDS; 16,6% (p/v) de acrilamida bis-acrilamida; 1% (p/v) de persulfato de amônio 10%; 0,14% (p/v) de Temed] e de um gel de separação [47,3% (p/v) de Tris-HCl, pH 8,8; 0,9% (p/v) de SDS; 9,9% (p/v) de glicerol; 34,2% (p/v) de acrilamida-bis-acrilamida; 0,6% (p/v) de persulfato de amônio 10%; 0,09% (p/v) de temed]. Os extratos protéicos contendo igual número de células foram separados em gel de poliacrilamida 10% sob uma corrente de 20mA em tampão de corrida [25mM de Tris; 193mM de glicina; 0,1% (p/v) de SDS]. As proteínas separadas por eletroforese foram visualizadas após coloração com uma solução de azul de coomassie [0,125% de “coomassie brilliant blue” R-250; 50% (v/v) de metanol; 10% (v/v) de ácido acético] por, aproximadamente, 2 horas. A seguir, realizou-se a descoloração por 2 horas, com uma solução de 50% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético e com uma solução contendo os mesmos reagentes a 5 e 7% (v/v), respectivamente, até o clareamento do fundo.

A seguir, os géis foram secados e submetidos à análise visual, comparando-se o padrão apresentado pelas amostras clínicas e as cepas utilizadas como referência.

3.8. Identificação das espécies de *Staphylococcus* através do método fenotípico convencional

Este método foi realizado para que obtéssemos uma identificação definitiva daquelas amostras em que se observou discordância entre a identificação pelo sistema

automatizado e os moleculares. Os testes para a caracterização do gênero e espécies de *Staphylococcus* foram realizados de acordo com as metodologias descritas por MacFaddin (1997), Holt e colaboradores (1994) e Bannerman e Peacock (2003). O perfil fenotípico das espécies mais prevalentes podem ser vistos na tabela 3.

Os testes foram realizados de acordo com MacFaddin (1977), e Bannerman (2003), com modificações. Os testes utilizados foram:

3.8.1. Produção de coagulase livre

Neste teste colônias isoladas, crescidas em ágar-sangue com 5% de sangue disfibrinado de carneiro, foram repicadas para um tubo contendo plasma de coelho diluído a 1:1 em solução salina a 0,85% (0,2 ml de plasma em 0,2 ml de salina). Após a incubação por 4 horas a 37°C, em banho-maria, a produção de coágulo indicou reação positiva. Resultados negativos foram confirmados com até 24 horas de incubação. As amostras *S. aureus* ATCC 12600 e *S. epidermidis* ATCC 14990 foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente.

3.8.2. Produção de hemolisina

Este teste foi feito por inspeção visual da cultura em meio ágar-sangue, em 24, 48 e 72 horas de incubação a 35°C. O aparecimento de zona de hemólise intensa ao redor das colônias em até 48 horas de incubação foi indicativo da presença de hemólise, enquanto a zona de hemólise fraca (1 mm) ou ausente em até 72 horas de incubação foi indicativa de hemólise fraca ou ausente, respectivamente. As amostras de *S. haemolyticus* ATCC 29970 e *S. aureus* ATCC 12600 foram

utilizadas como controles de hemólise positiva e *S. epidermidis* ATCC 14990 foi utilizado como controle negativo.

3.8.3. 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 de *S. aureus* ATCC 29213 e *S. lugdunensis* DSM 4804 como controles positivos, e *S. epidermidis* ATCC 12228 como controle negativo da reação.

3.8.4. Produção da enzima pirrolidonil arilamidase (PYRase)

Um inóculo denso (0,25 ml – Escala McFarland 2) da suspensão bacteriana foi transferido para 0,2 ml de caldo TSB contendo 0,01% (p/v) de L-pirroglutamil- β -nafitalamina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA). A leitura do teste foi realizada pela adição de uma gota da solução reveladora contendo dimetilaminocinamaldeído a 1% (p/v) (Sigma), após 4 horas de incubação a 37°C, em banho-maria. O aparecimento de uma coloração rosa ou púrpura em até 10 minutos, sob leve agitação foi indicativo de um resultado positivo. Como controles positivo e negativo da reação foram usadas as amostras de *S. haemolyticus* ATCC 29970 e *S. aureus* ATCC12600, respectivamente.

3.8.5. Produção da enzima urease

Um inóculo denso (0,25 ml – Escala McFarland 2) da suspensão bacteriana foi transferido para 3 ml de caldo de uréia de Rustigian & Stuart, confeccionado segundo MacFaddin (1977). A leitura foi realizada em 48 horas de incubação, a 37°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 como controles positivo e negativo, respectivamente.

3.8.6. Produção da enzima fosfatase

Um inóculo denso (0,25 ml – Escala McFarland 2) da suspensão bacteriana foi transferido para 3 mL de caldo “Phenolphthalein Disphosphate” (PDP- Merck) adicionado de uma gota de PDP, ambos confeccionados segundo MacFaddin (1977). A leitura foi realizada após um período de incubação de 24h a 37°C e adição de uma gota de solução reveladora de NaOH a 40% (v/v). O aparecimento de coloração rosa foi considerado como resultado positivo. As amostras *S. aureus* ATCC 12600 e *S. haemolyticus* ATCC 29970 foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

3.8.7. Fermentação de carboidratos

A fermentação dos carboidratos foi realizada em 3 ml 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, celebiose, xilose (Sigma), lactose, manitol (Reagen), maltose (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil) e manose (BDH Laboratory Supplies, Inglaterra). Os açúcares foram adicionados assepticamente ao caldo base vermelho de fenol [peptona 1,2% (Merck); extrato de carne 0,12% (Merck); NaCl 0,6% (Merck); Vermelho de fenol 0,0022% (Vetec)] após serem filtrados em membrana de celulose-acetato com porosidade de 0,20µm (Advantec MFS, Inc., CA, USA). Foi utilizado um inóculo denso (0,25mL – Escala McFarland 2) da suspensão bacteriana por tubo. A leitura foi realizada em 24, 48 e 72h de incubação a 37°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* DSM 4804, *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* DSM 4807, *S. xylosus* ATCC 29971 e a amostra clínica 1s (*S. sciuri* subsp. *sciuri*) pertencente à coleção do laboratório de Infecção Hospitalar foram utilizados como controles negativos ou positivos nestes testes.

3.8.8. Produção de enzimas descarboxilases

Um pequeno inóculo (0,05mL – Escala McFarland 2) da suspensão bacteriana foi transferido para 1 mL de caldo base Moller (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 Moller após ser filtrado em membrana de celulose-acetato (Advantec MFS, Inc., CA, USA). Após a inoculação bacteriana, o meio foi coberto com óleo mineral. A leitura foi realizada com 24, 48 e 72h de incubação, a 37°C. A modificação da coloração do meio para a cor roxa foi indicativa de resultado positivo, enquanto a não alteração da cor do meio, ou a modificação para amarelo, foi indicativo de resultado negativo. As amostras *S. haemolyticus* ATCC 29970 e *S. saprophyticus* ATCC 15305 foram utilizadas como controles positivo e negativo da descarboxilação da arginina, respectivamente. As amostras *S. lugdunensis* DSM 4804 e *S. haemolyticus* ATCC 29970 foram utilizadas como controles positivo e negativo da descarboxilação da ornitina, respectivamente.

3.8.9. Redução do nitrato

Um inóculo denso (0,25mL – Escala McFarland 2) da suspensão bacteriana foi transferido para 2 mL de caldo de nitrato de potássio confeccionado segundo MacFaddin (1977). A leitura foi realizada após um período de incubação de 24h a 37°C e adição de 0,5

mL da solução reveladora de dimetil- β -naftilamina (Reagen) a 0,6% e 0,5 mL da solução reveladora de ácido sulfanílico (Vetec) a 0,8%. O surgimento da cor rosa em 30 seg foi indicativo de resultado positivo e a não alteração da coloração do meio foi indicativo 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 e *S. saprophyticus* ATCC 15305 foram utilizadas como controle positivo e negativo deste teste.

3.8.10. Produção da acetoína

A produção de acetoína a partir da glicose foi verificada após inoculação de 0,05 mL da suspensão bacteriana (McFarland 2) em 2,5 mL de meio Clark & Lubs, confeccionado de acordo com MacFaddin (1977). A leitura foi realizada após um período de incubação de 48h a 35°C e adição de 0,6 mL da solução reveladora de α -naftol (Vetec) a 5% e 0,2 mL de KOH (Vetec) a 40%. O aparecimento de coloração rosa, de 10 a 15 min sob leve agitação foi indicativo de resultado positivo. As amostras *S. epidermidis* ATCC 14990 e *S. haemolyticus* ATCC 29970 foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente.

3.8.11. Teste de resistência a agentes antimicrobianos

Uma suspensão bacteriana com turbidez equivalente à 0,5 da escala de McFarland ($\sim 10^8$ UFC/mL) foi preparada em salina 0,85% e semeada confluentemente com o auxílio de um “swab” em ágar Muller-Hinton (Difco Laboratories). Posteriormente, foram depositados sobre o meio discos de bacitracina, novobiocina, polimixina B e desferrioxamina. A placa foi incubada a 35°C e a leitura foi feita após 24h de incubação.

3.8.11.1. Bacitracina

Foram aplicados discos impregnados de bacitracina 0,04U (CECON, SP, Brasil). A. Um halo menor ou igual a 9mm foi indicativo de resistência à bacitracina (BANNERMAN, 2003). As amostras utilizadas no controle do teste foram *S. aureus* ATCC 12600 (resistente) e *Micrococcus luteus* ATCC 10240 (sensível).

3.8.11.2. Novobiocina

Foram utilizados discos contendo 5µg de novobiocina (CECON). As amostras que apresentarem halos menores ou iguais a 16mm foram consideradas resistentes à novobiocina (BANNERMAN, 2003). As amostras *S. saprophyticus* ATCC 15305 e *S. epidermidis* ATCC 14990 foram utilizadas como padrões de resistência e sensibilidade, respectivamente.

3.8.11.3. Polimixina B

Foram utilizados discos de Polimixina B (300UI – CECON). Um halo menor ou igual a 16 mm foi indicativo de resistência à polimixina B (MONSEN *et al.*, 1998). As amostras *S. epidermidis* ATCC 14990 e *S. hominis* subsp. *hominis* ATCC 27844 foram utilizadas como padrões de resistência e sensibilidade, respectivamente.

3.8.11.4. Desferrioxamina

Discos de papel de filtro de 6 mm foram impregnados assepticamente com 100 µg de desferrioxamina (Sigma Chemical Company). As amostras que apresentaram qualquer halo de inibição foram consideradas sensíveis à desferrioxamina (MONSEN *et al.*, 1998). As amostras *S. warneri* ATCC 10209 e *S. hominis* subsp. *hominis* ATCC 27844 foram utilizadas como padrões de resistência e sensibilidade, respectivamente.

A identificação das espécies foi realizada através 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 & PEACOCK, 2003), como mostrado na Tabela 3.

Tabela 3: Características fenotípicas das principais espécies de *Staphylococcus* isoladas de infecções humanas.

Espécies	Testes de identificação																						
	H	F	C	P	U	F	O	A	N	A	M	M	T	L	M	S	R	C	X	N	D	P	
	E	C	G	Y	R	O	R	R	I	C	A	A	R	E	C	A	A	I	E	I	O	E	O
	M			R	E	S	N	G	T	T	N	T	E	C	L	C	B	L	L	V	F	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. xylosus</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 – pirrolidonil arilamidase; URE – urease; FOS – fosfatase; ORN – ornitina descarboxilase; ARG – arginina descarboxilase; NIT – redução do nitrato; ACT – produção de acetoína; Ácidos a partir de: MAN – manose, MAT – manitol, TRE – trealose, LAC – lactose, MAL – maltose, SAC – sacarose, RIB – ribose, CEL – celobiose, XIL – xilose; Susceptibilidade à: NOV – novobiocina, DEF – desferrioxamina, POL – polimixina. + – 90% ou mais de amostras positivas; - – 90% ou mais de amostras negativas; R – resistente; S – sensível; nd – não determinado (Holt *et al.*, 1994; Monsen *et al.*, 1998; Bannerman & Peacock, 2003).

3.9. Análise Estatística

A taxa de concordância na identificação foi obtida pela relação percentual entre o número de amostras cujas identificações pelo sistema automatizado que foram confirmados por métodos moleculares ou fenotípicos e o total de amostras para cada espécie.

A sensibilidade na detecção da resistência à oxacilina pelo sistema MicroScan WalkAway foi obtida pela relação percentual entre o número de amostras que não apresentaram falsa susceptibilidade à oxacilina e o total de amostras analisadas, ao passo que a especificidade foi obtida pela razão percentual entre o número de amostras que não apresentaram falsa resistência e o total de amostras analisadas.

4. RESULTADOS

4.1. Confirmação da identificação obtida pelo sistema MicroScan WalkAway

Foi realizado um confronto entre os resultados de identificação obtidos pelo sistema MicroScan WalkAway e os métodos moleculares. Para um total de 196 amostras de SCN, houve concordância em 163 (83,16%) em relação às identificações consideradas como definitivas. Na tabela 4, estão apresentados, para cada espécie, o percentual de concordância do sistema MicroScan WalkAway para a identificação, bem como o resumo das discrepâncias encontradas.

Tabela 4: Resumo dos resultados e relação de discrepâncias por espécie.

Resultado MicroScan WalkAway (n°)	Percentagem de concordância com PCR, PCR-RFLP e/ou método de referência (n°)	Identificação definitiva das amostras discrepantes (n°)
<i>S. epidermidis</i> (51)	98,03% (50)	<i>S. haemolyticus</i> (1)
<i>S. haemolyticus</i> (59)	100% (59)	Não houve
<i>S. lugdunensis</i> (10)	70% (7)	<i>S. hominis</i> (3)
<i>S. capitis</i> (14)	28,57% (4)	<i>S. aureus</i> (1)
		<i>S. epidermidis</i> (2)
		<i>S. caprae</i> (2)
		<i>S. hominis</i> (1)
		<i>Staphylococcus</i> sp (4)
<i>S. hominis</i> (33)	100 % (33)	Não houve
<i>S. auricularis</i> (9)	0	<i>S. haemolyticus</i> (9)
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticus</i> (8)	100% *(8)	Não houve
<i>S. simulans</i> (6)	0	<i>S. haemolyticus</i> (4)
		<i>S. hominis</i> (1)
		<i>S. epidermidis</i> (1)
<i>S. xylosus</i> (1)	0	<i>S. cohnii</i> * (1)
<i>S. warneri</i> (5)	40% (2)	<i>S. haemolyticus</i> (1)
		<i>S. aureus</i> (1)
		<i>S. hominis</i> (1)

*confirmada por SDS-PAGE

n° = número de amostras.

4.1.1. *S. epidermidis*

De um total de 51 amostras identificadas pelo sistema MicroScan WalkAway como *S. epidermidis*, 50 foram confirmadas por PCR-multiplex. Para a amostra não confirmada, (n° 182834), não houve amplificação da sequência espécie-específica de 218 pb do *S. epidermidis*, havendo somente a amplificação do fragmento de 154 pb do gene *mecA* (figura 4, coluna 8). Contudo, esta amostra apresentou amplificação do fragmento específico de 286pb de *S. haemolyticus* pela mesma técnica (figura 5). O método convencional de referência confirmou a amostra como *S. haemolyticus*.



Figura 4: Eletroforese em gel de ágarose a 2,5% do produto da reação de PCR-multiplex de amostras identificadas pelo sistema MicroScan WalkAway como *S. epidermidis* utilizando oligonucleotídeos para a detecção de fragmentos específicos de *S. epidermidis* e gene *mecA*. Colunas de 1 a 7 e 9 a 12: amostras confirmadas por PCR como *S. epidermidis*. Coluna 8: amostra 182834. Coluna 13: padrão de 100pb.

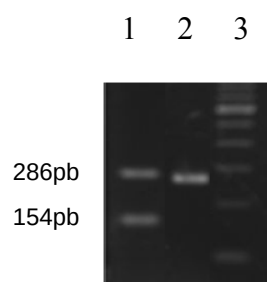


Figura 5: Eletroforese em gel de ágarose a 2,5% do produto da reação de PCR-multiplex utilizando oligonucleotídeos para a detecção de fragmentos específicos de *S. haemolyticus* e gene *mecA*. Coluna 1: amostra 182834 (*S. haemolyticus*, *mecA*-positiva). Coluna 2: amostra de *S. haemolyticus* *mecA*-negativa. Coluna 3: padrão de 100 pb.

4.1.2. *S. haemolyticus*

De um total de 59 amostras identificadas pelo sistema MicroScan WalkAway como *S. haemolyticus*, todas foram confirmadas por PCR-multiplex, ou seja, em todas as

amostras, observou-se a amplificação do fragmento de 286 pb, específico da espécie (figura 6).

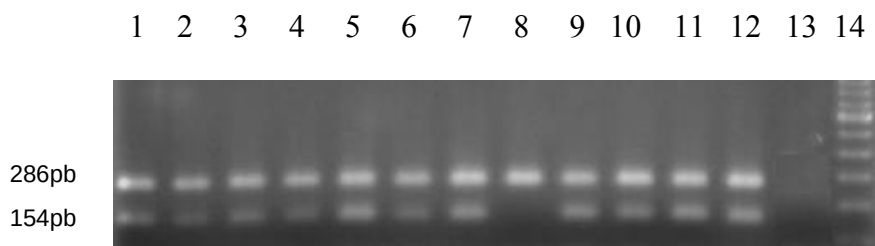


Figura 6: Eletroforese em gel de ágarose a 2,5% do produto da reação de PCR-multiplex utilizando oligonucleotídeos para a detecção de fragmentos específicos de *S. haemolyticus* (286 pb) e gene *mecA* (154 pb). Colunas 1 a 12: amostras identificadas pelo sistema MicroScan WalkAway como *S. haemolyticus* e confirmadas por PCR; coluna 8: amostra *mecA*-negativa, coluna 13; controle negativo. Coluna 14: padrão de 100 pb.

4.1.3. *S. lugdunensis*

De um total de 10 amostras identificadas pelo sistema MicroScan WalkAway como *S. lugdunensis*, 7 foram confirmadas por PCR-RFLP. Dentre elas 2 apresentaram um padrão de polimorfismo anteriormente descrito por Barros *et al.* (2007) A técnica molecular sugeriu que as 3 amostras discrepantes eram *S. hominis*, uma vez que não houve clivagem aparente do fragmento de cerca de 550 pb pela enzima *AluI* (figura 7). O método convencional de referência identificou tais amostras como *S. hominis*.

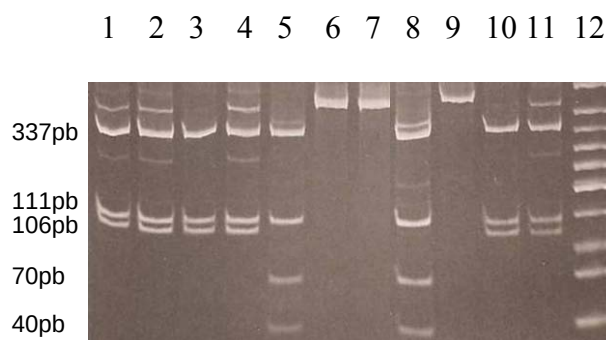


Figura 7: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% do fragmento de cerca de 550 pb do gene *groEL* digerido pela *AluI* de amostras identificadas pelo sistema MicroScan WalkAway como *S. lugdunensis*. Por PCR-RFLP; colunas 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9 e 10: *S. lugdunensis*; colunas 5 e 8 observa-se o polimorfismo do gene *groEL* para *S. lugdunensis*, colunas 6, 7 e 10 apresentaram o fragmento de cerca de 550 pb aparentemente sem clivagem pela enzima *AluI*; coluna 11: DSM4804 (*S. lugdunensis*). coluna 12: padrão de 25 pb.

4.1.4. *S. capitis*

De um total de 14 amostras identificadas pelo sistema MicroScan WalkAway como *S. capitis*, 4 foram confirmadas por PCR-RFLP (figura 8, colunas 5 e 6). Já das outras 10 amostras discrepantes, 2 foram identificadas como *S. caprae* (figura 8, colunas 1 e 2), 2 como *S. epidermidis* (figura 8, colunas 7 e 11), 1 como *S. aureus* (figura 8, coluna 4) e 1 como *S. hominis* (figura 8, coluna 10) pela PCR-RFLP. Tais identificações foram confirmadas pelo método convencional de referência. As 4 amostras restantes não puderam ser identificadas nem pelo método de PCR-RFLP, nem pelo método convencional de referência, sendo classificadas como *Staphylococcus* sp não pertencente às espécies citadas nos trabalhos utilizados como referência para a técnica de PCR-RFLP (BARROS *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2007) (figura 8, colunas 3, 8 e 9).

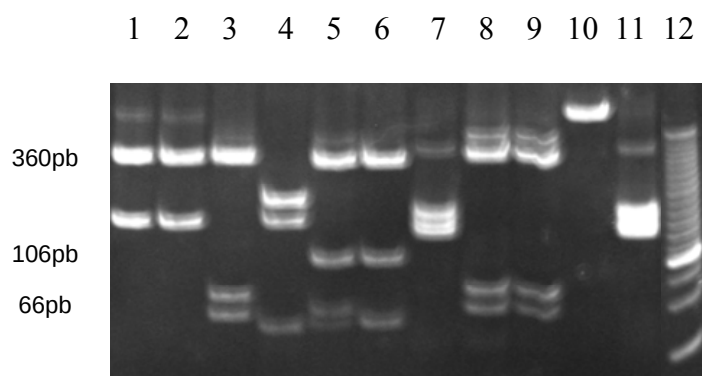


Figura 8: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% do fragmento de cerca de 550 pb do gene *groEL* digerido pela *AluI* de amostras identificadas pelo sistema MicroScan WalkAway como *S. capitis*. Por PCR-RFLP, colunas 1 e 2: *S. caprae*, colunas 3, 8 e 9: *Staphylococcus* sp, coluna 4: *S. aureus*, colunas 5 e 6: *S. capitis*, coluna 10: *S. hominis*, colunas 7 e 11: *S. epidermidis* e coluna 12: padrão de 25 pb.

4.1.5. *S. hominis*

Todas as 33 amostras identificadas pelo sistema MicroScan como *S. hominis* foram confirmadas por PCR-RFLP, pois não houve clivagem aparente dos fragmentos de cerca de 550 pb pela enzima *AluI* (figura 9).

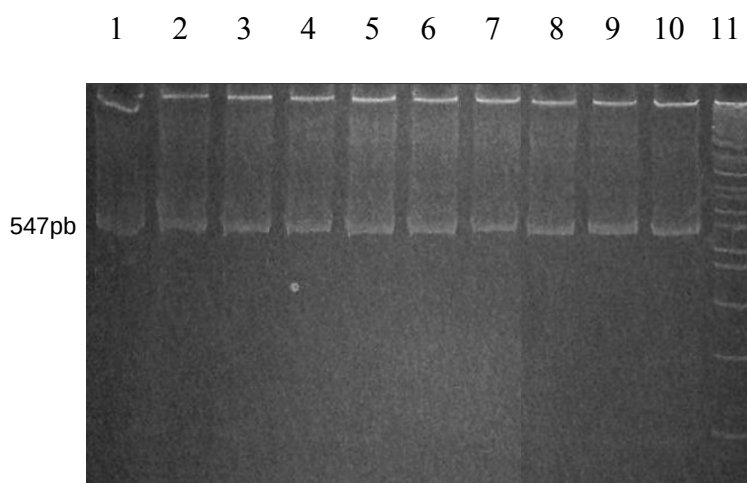


Figura 9: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% do fragmento de cerca de 550 pb do gene *groEL* digerido pela *AluI* de amostras identificadas pelo sistema MicroScan WalkAway e confirmadas por PCR-RFLP como *S. hominis*.(colunas 1 a 10). Coluna 11: padrão de 1Kb.

4.1.6. *S. auricularis*

De um total de 9 amostras identificadas pelo sistema MicroScan WalkAway como *S. auricularis*, nenhuma foi confirmada por PCR-RFLP. Por esta técnica todas foram identificadas como *S. haemolyticus* (figura 10), o que foi confirmado pelo método convencional de referência.

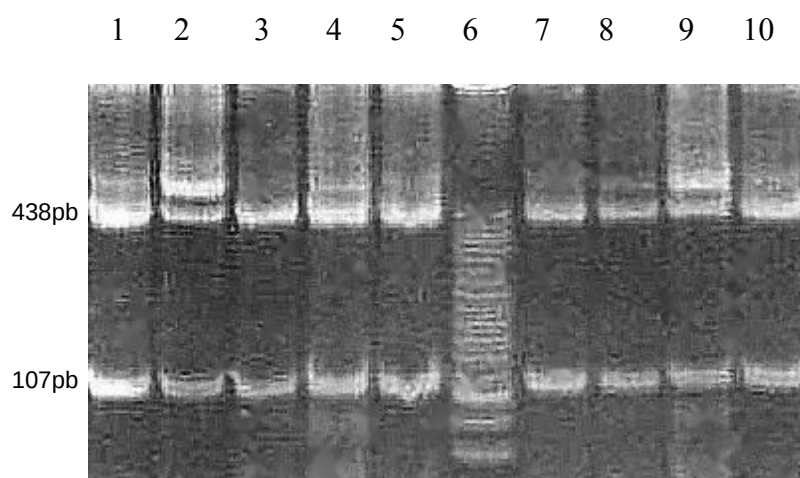


Figura 10: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% do fragmento de cerca de 550 pb do gene *groEL* digerido pela *AluI* de amostras identificadas pelo sistema MicroScan

WalkAway como *S. auricularis*. Por PCR-RFLP, colunas 1 a 5 e 7 a 10: amostras identificadas como *S. haemolyticus*. Coluna 6: padrão de 25 pb.

4.1.7. *S. cohnii*

De um total de 8 amostras identificadas pelo sistema MicroScan WalkAway como *S. cohnii* subespécie *urealyticum*, todas foram confirmadas por PCR-RFLP como *S. cohnii* (figura 11). O padrão apresentado é de difícil diferenciação do padrão apresentado pelo *S. xylosus*. Além disso, pelo método convencional de referência, tal diferenciação é igualmente difícil, pois dentre todas as provas bioquímicas que compõem o método, apenas o açúcar xilose pode distinguir *S. xylosus* de *S. cohnii* subespécie *urealyticum*. Para a obtenção de dados mais elucidativos, foi utilizada a técnica de SDS-PAGE, confrontando as amostras identificadas como *S. cohnii* e *S. xylosus* com cepas-padrão de *S. cohnii* subespécie *cohnii* (ATCC29974), *S. xylosus* (ATCC29971) e com a amostra clínica 67s utilizada como referência de *S. cohnii* subespécie *urealyticum* da coleção do Laboratório de Infecções Hospitalares do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, UFRJ. Observou-se que as amostras analisadas apresentaram perfil protéico compatível com a amostra utilizada como referência de *S. cohnii* subespécie *urealyticum*, o que coincidiu com a identificação pelo sistema MicroScan WalkAway a nível de subespécie (figura 12). Neste caso, o sistema apresentou 100% de acurácia.

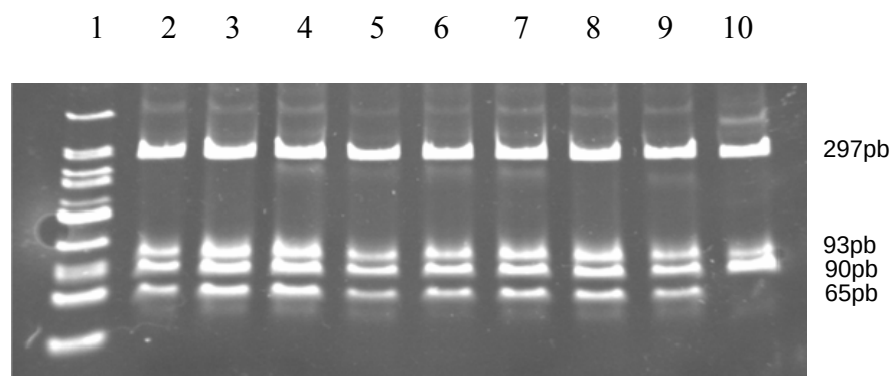


Figura 11: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% do fragmento de cerca de 550 pb do gene *groEL* digerido pela *AluI* de amostras identificadas pelo sistema MicroScan WalkAway como *S. cohnii*. Coluna 1: padrão de 25 pb. Colunas 2 a 9: amostras confirmadas como *S. cohnii* por PCR-RFLP. Coluna 10: cepa ATCC29974 (*S. cohnii*).

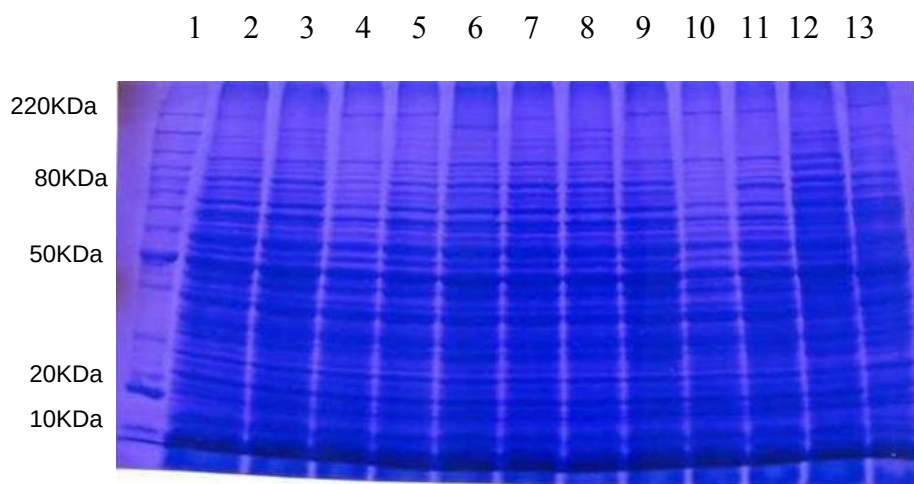


Figura 12: Resultado apresentado pela técnica do SDS-PAGE onde, coluna 1: Marcador de peso molecular (BenchMarker Protein Ladder); colunas 2 a 7, 9 e 10: amostras identificadas pelo sistema MicroScan WalkAway como *S. cohnii* subespécie *urealyticus*; coluna 8: amostra 170967 identificada pelo sistema como *S. xylosus*. Colunas 11 a 13: amostras controle: 67s (*S. cohnii* subsp. *urealyticus*), ATCC 29974 (*S. cohnii* subsp. *cohnii*) e ATCC 29971 (*S. xylosus*), respectivamente.

4.1.8. *S. simulans*

De um total de 6 amostras identificadas pelo sistema MicroScan WalkAway como *S. simulans*, nenhuma foi confirmada por PCR-RFLP. Das amostras discrepantes, 4 foram identificadas por PCR-RFLP como *S. haemolyticus* (figura 13, colunas 1, 2, 3 e 6), 1 como *S. epidermidis* (figura 13, coluna 4) e 1 como *S. hominis* (figura 13, coluna 5), o que foi confirmado pelo método convencional de referência.

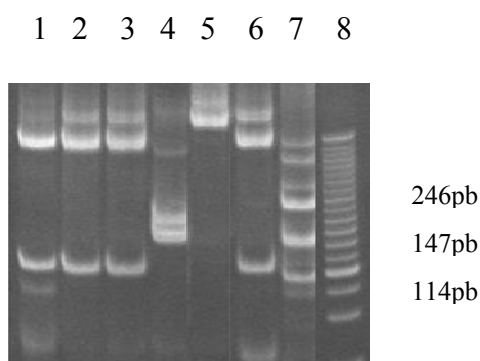


Figura 13: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% do fragmento de cerca de 550 pb do gene *groEL* digerido pela *AluI* de amostras identificadas pelo sistema MicroScan WalkAway como *S. simulans*. Por PCR-RFLP; Colunas 1, 2, 3 e 6: *S. haemolyticus*; coluna 4: *S. epidermidis*; coluna 5: *S. hominis*; coluna 7: ATCC 27851 (*S. simulans*) e coluna 8: padrão de 25 pb.

4.1.9. *S. xylosus*

A única amostra identificada como *S. xylosus* pelo sistema MicroScan WalkAway da coleção utilizada no trabalho não teve sua identificação confirmada por PCR-RFLP, que a identificou como *S. cohnii* (figura 14), apesar da difícil diferenciação entre as duas espécies pela técnica. Por motivos já expostos no item 4.1.7, foi realizada a técnica do SDS-PAGE, para a identificação definitiva da amostra (figura 12).

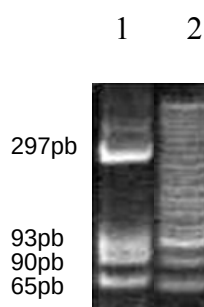


Figura 14: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% do fragmento amplificado de cerca de 550 pb do gene *groEL* digerido pela *AluI* da amostra identificada pelo sistema MicroScan WalkAway como *S. xylosus*. Por PCR-RFLP; coluna 1: *S. cohnii*. Coluna 2: padrão de 25 pb.

4.1.10. *S. warneri*

De um total de 5 amostras identificadas pelo sistema MicroScan como *S. warneri*, pelo método PCR-RFLP, 2 foram confirmadas (figura 15, colunas 2 e 5), 1 foi identificada como *S. aureus* (figura 15, coluna 1), 1 como *S. haemolyticus* (figura 15, coluna 4) e 1 como *S. hominis* (figura 15, coluna 3), o que foi confirmado pelo método convencional de referência.

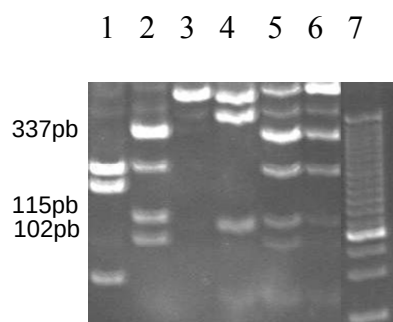


Figura 15: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% do fragmento de cerca de 550 pb do gene *groEL* de amostras identificadas pelo sistema MicroScan WalkAway como *S. warneri*. Por PCR-RFLP; coluna 1: *S. aureus*; colunas 2 e 5: *S. warneri*; coluna 3: *S. hominis*; coluna 4: *S. haemolyticus*; coluna 6: ATCC 10209 (*S. warneri*). Coluna 7: padrão de 25 pb.

4.2. Avaliação do sistema MicroScan para a detecção da resistência à oxacilina

Todas as amostras da coleção utilizada neste trabalho tiveram seus resultados de resistência à oxacilina obtidos pelo sistema MicroScan WalkAway, confrontados com a presença do gene *mecA* pela técnica de PCR. Observou-se que, dentre as 196 amostras de SCN, 178 (90,81%) apresentaram resultados de PCR compatíveis com as CMI obtidas pelo sistema. Das 18 amostras onde foram observadas discrepâncias em relação ao método de referência, 17 amostras *mecA*-positivas apresentaram falsa sensibilidade, uma vez que o sistema automatizado acusou CMI igual ou inferior a 0,25 µg/ml para oxacilina. A amostra restante foi definida como *mecA*-negativa e apresentou CMI de 0,5 µg/ml, que representa o ponto de corte para resistência ao antibiótico. Assim, o sistema MicroScan WalkAway apresentou sensibilidade e especificidade na detecção da resistência à oxacilina em amostras de SCN de 91,32% e 99,48%, respectivamente. A tabela 6 apresenta a relação de amostras discrepantes com seus respectivos CMI para oxacilina e o resultado da pesquisa do gene *mecA* por PCR.

Tabela 6 Comparação entre as CMI para a oxacilina obtidas pelo sistema MicroScan WalkAway e presença do gene *mecA* por PCR das 18 amostras discrepantes.

Espécie	Identificação	CMI	<i>mecA</i>
161901	<i>S. lugdunensis</i>	0,5	-
196151	<i>S. lugdunensis</i>	<0,25	+
290188	<i>S. hominis</i>	<0,25	+
561434	<i>S. hominis</i>	<0,25	+
148968	<i>S. hominis</i>	<0,25	+
198183	<i>S. hominis</i>	<0,25	+
172572	<i>S. hominis</i>	<0,25	+
176363	<i>S. hominis</i>	<0,25	+
176744	<i>S. caprae</i>	<0,25	+
570787	<i>S. caprae</i>	<0,25	+
162653	<i>S. aureus</i>	<0,25	+
566935	<i>S. capitis</i>	<0,25	+
571784	<i>S. capitis</i>	<0,25	+
100480	<i>S. capitis</i>	<0,25	+
150454	<i>S. capitis</i>	<0,25	+
187222	<i>S. warneri</i>	<0,25	+
573663	<i>Staphylococcus sp</i>	<0,25	+
105766	<i>S. epidermidis</i>	<0,25	+

5. DISCUSSÃO

Staphylococcus são bactérias amplamente relacionadas às infecções hospitalares no mundo todo e são responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade, além do alto custo da internação (COSTA, MICELI & ANAÏSSIE, 2004). O grupo dos SCN tem sido reconhecido como importante causa de variados processos infecciosos nas últimas décadas, sendo as bacteriemias e as infecções relacionadas a biomateriais as mais comuns (HUEBNER & GOLDMANN, 1999). Sua capacidade de colonizar diferentes áreas do corpo como face, mãos, axilas, narinas, pele, etc, além de vários outros fatores de virulência contribuem para o sucesso de sua invasão (TIEMERSMA *et al.*, 2004; APPELBAUM, 2006).

Muito embora *S. epidermidis* seja a espécie de SCN prevalente nas infecções humanas, diversos processos infecciosos têm sido atribuídos às demais espécies (JARLOV, 1999), o que faz com que a boa acurácia dos métodos de identificação seja essencial para as amostras clinicamente importantes de SCN (DRANCOURT & RAOULT, 2002). O método de identificação proposto por Kloos & Schleiferi (1975) e modificado por Bannerman & Peacock (2003) tem sido o método convencional utilizado para a identificação de *Staphylococcus*. Entretanto, este método é relativamente trabalhoso para o uso na rotina, uma vez que um grande número de testes bioquímicos é requerido. Além disso, este método é frequentemente incapaz de identificar corretamente algumas amostras de *Staphylococcus*, pois muitas expressam fenótipos atípicos (LEE & PARK, 2001).

Nos últimos anos, muitos sistemas comerciais estão sendo utilizados para a identificação rápida de *Staphylococcus*, como uma alternativa ao protocolo de identificação clássica (BANNERMAN & PEACOCK, 2003). Além do problema do custo, eles possuem limitações que incluem a expressão variável de certas características

bacterianas e a subjetividade na interpretação (BIRNBAUM, KELLY & CHOW, 1991). Em um estudo feito por Iório e colaboradores (2007), o sistema MicroScan WalkAway identificou corretamente 79,3% das amostras analisadas. Já Saa e colaboradores (1999) mostraram que o sistema MicroScan WalkAway foi um método satisfatório para a identificação de *Staphylococcus* (94,2%), embora 8,2% das amostras tenham sido identificadas a nível de espécie somente após o uso de testes adicionais. De acordo com o estudo realizado por Barros e colaboradores (2007), a taxa de concordância entre o método convencional de referência e o sistema MicroScan WalkAway foi de 86,5%. No presente estudo, a taxa de concordância entre os resultados do sistema automatizado e as identificações definitivas (moleculares e fenotípicas) das amostras, foi de 83,16% para o total das amostras de SCN utilizadas. Estratificando os resultados por espécie, observou-se que os obtidos pelo sistema MicroScan WalkAway mostraram-se bastante confiáveis para as espécies *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* e *S. cohnii*. Curiosamente, tais espécies são também as de maior prevalência nas infecções humanas. Entretanto, muitas amostras de algumas destas espécies deixaram de ser identificadas corretamente. Um bom exemplo seria o fato de que todas as nove amostras identificadas pelo sistema MicroScan WalkAway como *S. auricularis* foram definidas pelo método de referência como *S. haemolyticus*. Com exceção do *S. lugdunensis*, que apresentou confiabilidade na identificação pelo sistema automatizado em 70% das amostras, para as espécies mais raramente isoladas, tais como *S. capitis*, *S. simulans*, *S. warneri*, *S. xylosus* e o já citado *S. auricularis*, o sistema apresentou baixa confiabilidade, já que se observou pouca ou nenhuma concordância com os métodos utilizados como confirmatórios ou de referência. Nestes casos, as amostras discrepantes eram, em geral, amostras de *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, ou até mesmo de *S. aureus*, as quais apresentavam perfil bioquímico atípico. Se, neste trabalho, utilizássemos somente amostras das espécies mais

usuais, tais como *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* ou *S. cohnii*, o grau de concordância tenderia a 100%. Contudo, se excluíssemos tais amostras, a confiabilidade do sistema MicroScan WalkAway quanto à identificação de SCN seria inferior a 20%. Isto sugere que o sistema necessita de melhorias; seja através da inclusão ou substituição de provas bioquímicas, ou pela alteração do tempo de incubação de algumas das provas. Além disso, uma constante revisão dos algoritmos de identificação dos *Staphylococcus*, pode contribuir para incrementar a diferenciação entre as espécies prevalentes que apresentam variações em seu comportamento fenotípico e as espécies menos frequentes. Estudos similares relacionados à avaliação da capacidade de identificação do sistema MicroScan WalkAway para os SCN, utilizando o mesmo método de referência, confirmam os dados do presente estudo. Barros *et al.* (2007) reportaram amostras de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* foram identificadas pelo sistema automatizado como *S. simulans*. Relataram também uma amostra de *S. epidermidis* identificada como *S. capitis*, além da difícil diferenciação bioquímica entre *S. cohnii* e *S. xylosus*, que também foi observada no estudo de Iório *et al.* (2007). Estes autores verificaram ainda que amostras de *S. haemolyticus* foram identificadas como *S. auricularis* e *S. epidermidis*. Seguindo a mesma linha, Caierão *et al.* (2006) relataram amostras de *S. haemolyticus* identificadas pelo sistema automatizado como *S. auricularis* e como *S. simulans*. A grande confiabilidade do sistema MicroScan WalkAway para os resultados que indicavam as espécies *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* e *S. cohnii* também foi verificada nos trabalhos supramencionados. Porém, nestes três estudos o sistema demonstrou 100% de confiabilidade para identificar a espécie *S. warneri*, fato que não foi observado pelo presente trabalho.

A tipificação molecular das amostras pertencentes às espécies em que houve grande discrepância ou concordância com os resultados definitivos complementariam este estudo,

uma vez que amostras pertencentes a uma mesma linhagem tendem a comportar-se fenotipicamente de modo semelhante. A hipótese de que todas as nove amostras identificadas pelo sistema automatizado como *S. auricularis* e definidas como *S. haemolyticus*, pertencessem a uma mesma linhagem, por exemplo, limitariam a conclusão sobre a baixa confiabilidade dos resultados que indicaram *S. auricularis* pelo sistema. Tal hipótese é bastante possível, já que foram obtidas de um mesmo hospital em um mesmo período.

A detecção rápida e precisa da resistência à oxacilina é essencial para a escolha de uma antibioticoterapia adequada para o tratamento da infecção estafilocócica, uma vez que tal resistência confere à bactéria tolerância a todos os beta-lactâmicos e geralmente a outras classes de antimicrobianos, levando a um aumento da utilização dos glicopeptídeos. Os métodos fenotípicos utilizados nos laboratórios de rotina são relativamente lentos e a expressão da resistência à oxacilina pode ser heterogênea, muitas vezes difícil de induzir, o que leva à falsa sensibilidade ao antibiótico (TOMASZ, NACHMAN & LEAF, 1991; RIBEIRO *et al.*, 1999). Outro aspecto é que as metodologias fenotípicas, como triagem em ágar, disco-difusão ou determinação da CMI envolvem uma série de variáveis, tais como concentração do sal, estabilidade do antibiótico e temperatura, que podem influenciar na expressão da resistência. A detecção do gene *mecA* por PCR é considerada o padrão-ouro para a detecção da resistência à oxacilina em *Staphylococcus* (CHAMBERS, 1997). Neste trabalho, o confronto dos resultados do perfil de susceptibilidade das amostras fornecido pelo sistema MicroScan WalkAway com a presença do gene *mecA* pela técnica da PCR mostrou que houve concordância em 178 amostras (90,81%) das 196 testadas. Idealmente, amostras que apresentam CMI iguais ou superiores a 0,5 mg/ml devem ser *mecA*-positivas pela técnica de PCR. Portanto, amostras que apresentam CMI inferiores ou iguais a 0,25 mg/ml devem ser *mecA*-negativas pela mesma técnica. O padrão prevalente

de discrepância esperado é o da falsa sensibilidade, face ao fenômeno da heterorresistência à oxacilina, já anteriormente mencionado e que é fruto da grande complexidade na regulação do gene *mecA*. Este fenômeno constitui a maior causa de erro na determinação da resistência a tal antibiótico pelos métodos fenotípicos.

Das 174 amostras que possuíam o gene *mecA* em seu genoma, 157 (90,22%) foram detectadas pelo sistema MicroScan WalkAway. Tal proporção foi compatível com o estudo de Caierão *et al.* (2006), onde foram relatadas 62 amostras detectadas (88,54%) em 70 amostras de SCN *mecA*-positivas. Levando-se em conta somente aquelas amostras que apresentaram CMI superiores a 0,5mg/ml, de um total de 158 amostras, apenas uma amostra (0,63%) apresentou falsa resistência. Assim, o sistema automatizado apresentou 99,48% de especificidade na detecção da resistência à oxacilina. Entretanto, para aquelas que apresentaram CMI inferiores ou iguais a 0,25 mg/ml; de 38 amostras, 17 (44,73%) apresentaram falsa susceptibilidade, pois possuíam o gene *mecA* no seu genoma. Tal observação conferiu ao sistema MicroScan WalkAway uma sensibilidade de 91,32% na detecção da resistência à oxacilina, provavelmente devido ao alto grau de heterorresistência das amostras. Resultados semelhantes foram observados por Swenson *et al.* (2001), os quais relataram sensibilidade e especificidade de 90,90% e 100%, respectivamente, utilizando 55 amostras de *S. aureus*.

O constante aumento do emprego dos dispositivos plásticos implantáveis na medicina moderna trouxe mudanças importantes relacionadas à microbiologia nas infecções hospitalares. Os SCN passaram a ser considerados como patógenos hospitalares importantes e, com isso, passou a ser notória a dificuldade de diferenciação fenotípica das espécies estafilocócicas, bem como da detecção da resistência à oxacilina em amostras heterorresistentes. Consequentemente, a constante revisão e aperfeiçoamento dos métodos comerciais fenotípicos, devem ser praticadas, já que a melhoria dos mesmos proveriam a

máxima segurança para a escolha de uma terapia adequada e para a obtenção de dados epidemiológicos consistentes.

Além de ser considerada o padrão-ouro na detecção de resistência à oxacilina, a técnica de PCR é relativamente simples e rápida e poderia fazer parte da realidade na maioria dos laboratórios de rotina bacteriológica, especialmente se houver a possibilidade de detecção do gene *mecA* diretamente de espécimes clínicos, como o sangue.

Nos hospitais, o relato equivocado de amostras clínicas *mecA* positivas como sensíveis à oxacilina levam a indicação dos antimicrobianos da classes dos beta-lactâmicos como primeira opção terapêutica, o que, dependendo da gravidade da infecção, traz consequências irreversíveis,.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram concluir que:

- O sistema MicroScan WalkAway demonstrou confiabilidade na identificação igual ou superior a 70%, somente quando o resultado indicou as espécies, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis* e *S. hominis*. No caso de *S. cohnii*, o sistema demonstrou ainda, confiabilidade de 100% na identificação em nível de subespécie.
- O sistema MicroScan WalkAway apresentou limitações na sua capacidade de identificar amostras atípicas de espécies como *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. cohnii* e até mesmo *S. aureus*, que apresentaram perfil bioquímico pouco usual. Tais amostras foram identificadas pelo sistema como espécies menos frequentes, como, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. xylosus*, *S. simulans* e *S. auricularis*, respectivamente.
- O sistema MicroScan WalkAway apresentou 99,48% de especificidade e 91,32% de sensibilidade na detecção da resistência à oxacilina, o que confirma a dificuldade de detecção de tal resistência através de métodos fenotípicos, como o da microdiluição em caldo, em amostras heterorresistentes.

7. BIBLIOGRAFIA

ABDALLAH, I. M.; ARAJ, G. F.; MATAR, G. M.; ABDELNOUR, G.; UWAYDAHMD, M. & ABDELNOOR, A. M. **Polymerase chain reaction identification of coagulase-negative staphylococci and of strain diversity and spread of *Staphylococcus epidermidis* in a major medical center in Lebanon.** Inf Control Hosp Epidemiol. 27: 781-3, 2006.

APPELBAUM, P. C. **MRSA - the tip of the iceberg.** Clin Microbiol Infect. 12: 3-12, 2006.

AZEVEDO, P. A.; ANTUNES, A. L. S.; MARTINO, M. D. V. & PIGNATARI, A. C. C. ***Staphylococcus cohnii* spp *urealyticus*: relato de caso de um patógeno incomum.** Rev Soc Bras Med Trop 41:197-199, 2008.

BANNERMAN, T.L. & PEACOCK, S. J. ***Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase-positive cocci that grown aerobically.*** In: *Manual of Clinical Microbiology*, 384-404, Edity by Murray, P.R.; Barron, E.J.; Tenover, F.C.& Tenover, F.C. & Tenover, F.C. & Tenover, F.C. (eds), 8th ed, ASM Press. Washington, DC, 2003.

BARBER, M. **Methicillin-resistant staphilococci.** J Clin Pathol. 14: 385-93, 1961.

BARROS, E. M.; IÓRIO, N. L. P.; BASTOS, M. C. F.; SANTOS, K. R. N. & GIAMBIAGI-deMARVAL, M. **Species-level identification of clinical staphylococcal isolates based on polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism analysis of a partial *groEL* gene sequence.** Diagn Microbiol Infect Dis. 59: 251-7, 2007.

BASTOS, M. C. F.; MONDINO, P. J. J.; AZEVEDO, M. L. B.; SANTOS, K. R. N. & GIAMBIAGI-deMARVAL, M. **Molecular characterization and transfer among *Staphylococcus* strains of a plasmid conferring high-level resistance to mupirocin.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 18: 393-398, 1999.

BAILEY, E. W.; SCOTT. **Diagnostic Microbiology – Scientific and laboratory basis for clinical microbiology**, part 10th ed, Mosby Inc. 257pp, 2007.

BEN HASSEN, A.; GRECO, A.; JOUAIHIA, W. & LECLERCQ, R. **Profile´pide´miologique des souches de *Staphylococcus epidermidis* meticilline resistant de sensibilite diminuee a la teicoplanine et isolees chez des patients neutrope´niques au Centre National de Greffe de Moelle Osseuse a` Tunis.** Pathol Biol 49:634–640, 2001.

BENITO M. J. ; SERRADILLA, M. J.; MARTIN, A.; ARANDA, E.; HERNANDEZ, A. & CORDOBA, M. G. **Differentiation of *Staphylococci* from Iberian dry fermented sausages by protein fingerprinting.** Food Microbiol. 25:676-82, 2008.

BERGER, B.; ROHRER, S. **Factors influencing methicillin resistance in staphylococci.** Arch Microbiol 178:165–171, 2002.

BHAKDI, S. & TRANUM-JENSEN, J. **Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus***. Microbiol Rev. 55: 733-751, 1991.

BIRNBAUM, D.; KELLY, M. & CHOW, A. W. **Epidemiologic typing systems for coagulase-negative staphylococci**. Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 12: 319-326, 1991.

BOCHER, S.; TONNING, B.; SKOV, R. L. & PRAG, J. ***Staphylococcus lugdunensis*, a common cause of skin and soft tissue infections in the community**. J Clin Microbiol. 47:946-50, 2009.

BUTT, T.; AFZAL, R. K.; AHMAD, R. N.; SALMAN, M.; MAHMOOD, A. & ANWAR, M. **Bloodstream infections in febrile neutropenic patients: bacterial spectrum and antimicrobial susceptibility pattern**. J Ayub Med Coll Abbottabad 16:18–22, 2004.

CAIERÃO, J.; MUSSKOPF, M.; SUPERTI, S.; ROESCH E.; DIAS, C. G. & D'AZEVEDO, P. A. **Evaluation of phenotypic methods for methicillin resistance characterization in coagulase-negative staphylococci (CNS)**. J Med Microbiol. 53:1195-9, 2004.

CAIERÃO J, SUPERTI S, DIAS CA, D'AZEVEDO PA. **Automated systems in the identification and determination of methicillin resistance among coagulase negative staphylococci**. Mem Inst Oswaldo Cruz. 101: 277-80, 2006.

CARBONNELLE, E.; BERETTI, J. L.; COTTYN, S.; QUESNE, G.; BERCHE, P.; NASSIF, X. & FERRONI, A. **Rapid identification of staphylococci isolated in clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry**. J Clin Microbiol. 45: 2156-61, 2007.

CAUWELIER, B.; GORDTS, B.; DESCHEEMAECKER, P. & VAN LANDUYT, H. **Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30 microg) for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 23: 867-8, 2007.

CHAMBERS, H. F. **Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications**. Clin Microbiol Rev. 10: 781-791, 1997.

CHAVES, F.; GARCIA-ALVAREZ, M.; SANZ, F.; ALBA, C. & OTERO, J. R. **Nosocomial spread of a *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* strain causing sepsis in a neonatal intensive care unit**. J Clin Microbiol. 43: 4877–4879, 2005.

CHESNEAU, O.; MORVAN, A.; GRIMONT, F.; LABISCHINSKI, H. & SOHL, N. ***Staphylococcus pasteurii* sp. nov., isolated from human, animal and food specimens**. Ins J Syst Bacteriol. 43: 237-44, 1993.

CLINICAL LABORATORY STANDARD INSTITUTE. 2005a. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved Standard: M7-A6. NCCLS, Wayne, Pennsylvania.

COSTA, S. F.; MICELI, M. H. & ANAISSIE, E. J. **Mucosa or skin as source of coagulase-negative staphylococcal bacteremia?** *Lancet Infect. Dis.* 4: 278-286, 2004.

CUI, L.; MURAKAMI, H.; KUWAHARA-ARAI, K.; HANAKI, H. & HIRAMATSU, K. **Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50.** *Antimicrob Agents Chemother.* 44: 2276–2285, 2000.

CUI, L.; IWAMOTO, A.; LIAN, J. Q.; NEOH, H. M.; MARUYAMA, T.; HORIKAWA Y. & HIRAMATSU, K. **Novel mechanism of antibiotic resistance originating in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*.** *Antimicrob Agents Chemother.* 50: 428-38, 2006.

CUNHA, M. L.; SINZATO, Y. K. & SILVEIRA, L. V. **Comparison of methods for the identification of coagulase-negative staphylococci.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 99: 855-60, 2004.

DE PAULIS, N. A.; PREDARI, S. C.; CHAZARRETA, C. D. & SANTOIANNI, J. E. **Five-test simple scheme for species-level identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci.** *J Clin Microbiol.* 41: 1219-1224, 2003.

DIEKEMA, D. J.; PFALLER, M. A.; SCHMITZ, F. J.; SMAYEVSKY, J.; BELL, J.; JONES, R. N.; BEACH, M. & SENTRY GROUP. **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, 2001.

DRANCOURT, M. & RAOULT, D. ***rpoB* gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species.** *J Clin Microbiol.* 40: 1333-8, 2002.

ENDTZ, H.P.; BRAAK, N.; VERBRUGH, H.A. & BELKUM, A. **Vancomycin resistance: status quo and quo vadis.** *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18: 683-690, 1999.

ERCIS, S.; SANCAK, B. & HASÇELİK, G. **A comparison of PCR detection of *mecA* with oxacillin disk susceptibility testing in different media and sceptor automated system for both *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolates.** *Ind J Med Microb.* 26: 21-4, 2008.

FALCONE, M.; GIANNELLA, M.; RAPONI, G., MANCINI, C. & VENDITTI, M. **Teicoplanin use and emergence of *Staphylococcus haemolyticus*: is there a link?** *Clin Microbiol Infect.* 12:96–97, 2006.

FERREIRA, R. B. R.; NUNES, A. P. F.; KOKIS, V. M.; KEPSKY, N.; FONSECA, L. S.; BASTOS, M. C. F.; GIAMBIAGI-DE MARVAL, M. & SANTOS, K. R. N. **Simultaneous detection of *mecA* and *ileS-2* genes in coagulase-negative staphylococci isolated from Brazilian hospitals.** *Diagn Microbiol Infect Dis.* 42: 205-212, 2003.

FINK, A. L. **Chaperone-mediated protein folding.** *Physiol Rev* 79:425–449, 1999.

FRANÇOIS, P.; RENZI, G.; PITTET, D.; BENTO, M.; LEW, D.; HARBARTH, S.; VAUDAUX, P. & SCHRENZEL, J. **A novel multiplex real-time PCR assay for rapid typing of major staphylococcal cassette chromosome *mec* elements.** J Clin Microbiol. 42: 3309-3312, 2004.

GOH, S. H.; POTTER, S.; WOOD, J. O.; HEMMINGSEN, S. M.; REYNOLDS, R. P. & CHOW, A. W. **HSP60 gene sequences as universal targets for microbial species identification: studies with coagulase-negative staphylococci.** J Clin Microbiol. 34: 818-823, 1996.

GRAF, B. & MARTIN, E. **The intensive care physician and control of antimicrobial resistance.** Int J Antimicrob Agents. 16: 511-514, 2000.

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

HANSEN, A. M.; FOSSUM, A.; MIKALSEN, J.; HALVORSEN, D. S.; BUKHOLM, G. & ERICSON J. U. **Dissemination of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in northern Norway: sequence types 8 and 80 predominate.** J Clin Microbiol. 43: 2118-2124, 2005.

HIGA, M.; KISANUKI, K.; YAMANE, N. & NAKASONE, I. **Influence of the mixed inoculum on the species-identification and antimicrobial susceptibility test results by the automated microbial system.** Rinsho Byori. 56:283-9, 2008.

HIGUSHI, W.; TAKANO, T.; TENG, L. J. & YAMAMOTO, T. **Structure and specific detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type VII.** Biochem Biophys Res Commun. 377: 752-6, 2008.

HIRAMATSU, K.; HANAKI, H.; INO, T.; YABUTA, K.; OGURI, T. & TENOVER, F.C. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility.** J Antimicrob Chemother. 40: 135-136, 1997.

HIRAMATSU, K., CUI, L., KURODA, M., ITO, T. **The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Trends Microbiol. 9: 486-493, 2001.

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

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

http://www.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature

<http://www.dadebehring.com>

<http://www.restrictionmapper.org/>

HYO, Y.; YAMADA, S. & HARADA, T. **Characteristic cell wall ultrastructure of a macrolide-resistant *Staphylococcus capitis* strain isolated from a patient with chronic sinusitis.** Med Mol Morphol. 41:160-4. Epub, 2008.

ING, M. B.; BADDOUR, L. M. & BAYER, A. S. **Bacteremia and infective endocarditis: pathogenesis, diagnosis, and complications**, p. 331–354. In K. B. Crossley and G. L. Archer (ed.), The staphylococci in human disease. Churchill Livingstone, New York, NY, 1997.

ISHIHARA S., YOKOI S., ITO M., KOBAYASHI S. & DEGUCHI T. **Pathologic significance of *Staphylococcus saprophyticus* in complicated urinary tract infections.** Urology. 57: 17-20, 2001.

IÓRIO, N. L. P.; FERREIRA, R. B. R. ; SCHUENCK, R. P. ; MALVAR, K. L.; PEREIRA, A. B.; NUNES, A. P. F.; BASTOS, C. C. R. & SANTOS, K. R. N. **Simplified and reliable scheme for species-level identification of clinical isolates of *Staphylococcus*.** J Clin Microbiol. 45: 2564 – 2569, 2007.

ITO, T.; MA, X. X.; TAKEUCHI, F.; OKUMA, K.; YUZAWA, H. & HIRAMATSU, K. **Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccr*.** Antimicrob Agents Chemother. 48: 2637-2651, 2004.

JARLOV, J. O. **Phenotypic characteristics of coagulase-negative staphylococci: typing and antibiotic susceptibility.** Acta Path Microbiol Immunol Scand. 107: 1S-42S, 1999.

KLOOS, W. E. & BANNERMAN, T. L. **Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci.** J Clin. Microbiol. 7: 117-140, 1994.

KLOOS, W. E. & BANNERMAN, T. L. ***Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Manual of Clinical Microbiology.** Murray, P. R.; Barron, E. J.; Tenover, F. C. & Tenover, R. H. (eds). 7th ed. ASM. Press. Washington, DC, 264-282, 1999.

KLOSS, W. E.; GEORGE, C. G.; OLGATE, J. S.; VAN PELT, L.; McKINNON, M. L.; ZIMMER, B. L.; MULLER, E.; WEINSTEIN, M. P. & MIRRETT, S. ***Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* subsp. nov., a novel trehalose- and N-acetyl-D-glucosamine-negative, novobiocin- and multiple-antibiotic-resistant subspecies isolated from human blood cultures.** Int J Syst Bacteriol. 3: 799-812, 1998.

KLOOS, W. E. & SCHLEIFER, K. H. **Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species.** J Clin Microbiol. 1: 82-88, 1975.

LAPORT, M. S.; CASTRO, A. C. D.; VILLARDO, A.; LEMOS, J. A. C.; BASTOS, M. C. F. & GIAMBIAGI-deMARVAL, M. **Expression of the major heat shock proteins DnaK and GroEL in *Streptococcus pyogenes*: a comparison to *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*.** Curr Microbiol. 42: 264-8, 2001.

LAEMMLI , V. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4.** Nature. 227:680–85, 1970.

LAYER, F.; GHEBREMEDHIN, B.; MODER, K. A.; KONIG, W. & KONIG, B. **Comparative study using various methods for identification of *Staphylococcus* species in clinical specimens.** J Clin Microbiol. 44: 2824–2830, 2006.

LEE, M. K. & PARK, A. J. **Rapid species identification of coagulase-negative staphylococci by rRNA length polymorphism analysis.** J. Infect. 42: 189-194, 2001.

LEE, Y.; KIM, C. K.; KIM, M.; YONG, D.; LEE, K. & CHONG, Y. **Detection of *mecA* in strains with oxacillin and ceftioxin disk tests for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus*.** Korean J Lab Med. 27:276-80, 2007.

LIVERMORE, D. M. **Antibiotic resistance in staphylococci.** Int J Microbiol Agents. 16:S3-10, 2000.

MCCANN, M. T.; GILMORE, B. F.; GORMAN, S. P. ***Staphylococcus epidermidis* device-related infections: pathogenesis and clinical management.** J Pharm Pharmacol. 60:1551-71, 2008.

MACFADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria.** Waverly Press, Baltimore, MD. 1977.

MARTINEAU, F.; PICARD, F. J.; ROY, P. H.; OUELLETTE, M. & BERGERON, M. G. **Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*.** J Clin Microbiol. 34:2888-2893, 1996.

MARTINS, A. & CUNHA, M. L. R. S. **Methicilin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects.** Microbiol Immunol. 51: 787-795, 2007.

MONSEN, T.; RÖNNMARK, M.; OLOFSSON, C. & WISTRÖM, J. **An inexpensive and reliable method for routine identification of staphylococcal species.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 17: 327-35, 1998.

MOHANASOUNDARAM, K. M. & LALITHA, M. K. **Comparison of phenotypic versus genotypic methods in the detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*.** Indian J Med Res. 127:78-84, 2008.

MONTANARO, L.; CAMPOCCIA, D. & ARCIOLA, C. R. **Advancements in molecular epidemiology of implant infections and future perspectives.** Biomaterials. 28: 5155-68, 2007.

NALMAS, S.; BISHBURG, E.; MEURILLIO, J.; KHOOBIAR, S. & COHEN, M. ***Staphylococcus capitis* prosthetic valve endocarditis: report of two rare cases and review of literature.** Heart Lung. 37:380-4, 2008.

NOUWEN, J. L.; VAN BELKUM, A. & DE MARIE, S. **Clonal expansion of *Staphylococcus epidermidis* strains causing Hickman catheter-related infections in a hemato-oncologic department.** J Clin Microbiol 36:2696–2702, 1998

NUNES, A. P. F.; TEIXEIRA, L. M.; IORIO, N. L. P.; BASTOS, C. C. R.; FONSECA, L. S.; SOUTO-PADRON, T. & SANTOS, K. R. N. **Heterogeneous resistance to vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus warneri* clinical strains: characterization of glycopeptide susceptibility profiles and cell wall thickening.** Intern J Antimicrob Agents. 27: 307-315, 2006.

OLIVEIRA, D. C.; MILHEIRIÇO, C. & DE LENCASTRE, H. **Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec* type VI.** Antimicrob Agents Chemother. 50: 3457-9, 2006.

OTTO, M. **Virulence factors of the coagulase-negative staphylococci.** Front Biosci. 9: 841-863, 2004.

PALAZZO, I. C. V.; ARAUJO, M. L. C. & DARINI, A. L. C. **First report of vancomycin-resistant staphylococci isolated from healthy carriers in Brazil.** J Clin Microb. 43: 179-185, 2005.

PATEL, M.; HOESLEY, C. J.; MOSER, S. A.; STAMM A. M.; BADDLEY, J. W. & WAITES, K. B. **Dissemination of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a tertiary care hospital.** South Med J. 101:40-5, 2008.

PENNINGTON, T. H.; HARKER, C. & THOMSON-CARTER, F. **Identification of coagulase-negative staphylococci by using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and rRNA restriction patterns.** J Clin Microbiol. 29:390-392, 1991.

PEREIRA, Eliezer Menezes. 2007. **Discriminação das espécies *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus* e detecção simultânea da resistência à oxacilina através da técnica de PCR multiplex.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia). IMPPG, Centro de Ciência e Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

PETINAKI, E.; KANELLOPOULOU, M.; DAMANI, A.; FOKA, A.; SPILIOPOULOU, I.; SKALMOUTSOU, N.; RAITSIU, B.; VALAKIS, K. & PAPAFRAGAS, E. **Linezolid-resistant *Staphylococcus cohnii*, Greece.** Emerg Inf Dis. 15:116-8, 2009.

PFALLER, M. A.; JONES, R. N.; DOERN, G. V.; SADER, H. S.; KUGLER, K. C.; BEACH, M. L. & The SENTRY Participants Group. **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.** Diagn Microbiol Infect Dis 33: 283-297, 1999.

QI, W., ENDER, M.; O'BRIEN, F.; IMHOF, A.; RUEF, C.; MCCALLUM, N. & BERGER-BÄCHI, B. **Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Zurich, Switzerland (2003): prevalence of type IV SCC*mec* and a new SCC*mec* element associated with isolates from intravenous drug users.** J Clin Microbiol. 43:5164-70, 2005.

RAMOTAR, K.; BOBROWSKA, M.; JESSAMINE, P. & TOYE, B. **Detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci initially reported as**

methicillin susceptible using automated methods. Diagn Microbiol Infect Dis. 30:267-73, 1998.

REIPERT, A.; EHLERT, K.; KAST, T. & BIERBAUM, G. **Morphological and genetic differences in two isogenic *Staphylococcus aureus* strains with decreased susceptibilities to vancomycin.** Anticrob Agents and Chemoter. 47:568–576, 2003.

RIBEIRO, J.; VIEIRA, F. D.; KING, T.; D'AREZZO, J. B. & BOYCE, J. M. **Misclassification of susceptible strains of *Staphylococcus aureus* as methicillin-resistant *S. aureus* by a rapid automated susceptibility testing system.** J Clin Microbiol. 37:1619-20, 1999.

RODRÍGUEZ-ARANDA, A.; DASKALAKI, M.; VILLAR, J.; SANZ, F.; OTERO, J. R. & CHAVES, F. **Nosocomial spread of linezolid-resistant *Staphylococcus haemolyticus* infections in an intensive care unit.** Diagn Microbiol Infect Dis. 63:398-402, 2009.

SAA, A. I.; VIVAS, J.; TINAJAS, A.; BARBEYTO, L. & RODRIGUEZ, L. A. **Evaluation of the MicroScan system for identification of staphylococci.** J Basic Microbiol. 39:373-376, 1999.

SADER, H. S.; GALES, A. C.; PFALLER, M. A.; MENDES, R. E.; ZOCCOLI, C.; BRTH, A. & JONES, R. N. **Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program.** Braz J Infect Dis. 5:200-214, 2001.

SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press. 3rd ed., 2001

SANTOS, K. R. N.; TEIXEIRA, L. M.; LEAL, G. S.; FONSECA, L. S.; & GONTIJO-FILHO, P. .P. **DNA typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: isolates and factors associated with nosocomial acquisition in two Brazilian university hospitals.** J. Med Microbiol. 48: 17-23, 1999.

SANTOS, O. C. S.; BARROS E. M.; BRITO, M. A.V. P.; BASTOS, M. C. F.; SANTOS, K. R. N. & GIAMBIAGI-deMARVAL, M. **Identification of coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis using PCR-RFLP of the *groEL* gene.** Vet Microbiol. 3922, 2007.

SANTOS, O. C. S.; LAPORT, M. S.; TEIXEIRA L. M.; GIAMBIAGI-deMARVAL, M.; IÓRIO, N. L. P. & SANTOS, K. R. N. **Reliable identification of clinically prevalent species and subspecies of staphylococci by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis analysis.** Diagn Microbiol Infect Dis. 64:1-5, 2009.

SCHMITZ, F. J.; MACKENZIE, C. R.; HOFMANN, B.; VERHOEF, J.; FINKEN-EIGEN, M.; HEINZ, H. P. & KÖHRER, K. **Specific information concerning taxonomy, pathogenicity and methicillin resistance of staphylococci obtained by a multiplex PCR.** J Med Microbiol. 46:773-8, 1997.

SCHUENCK, R. P.; PEREIRA, E. M.; IORIO, N. L. & SANTOS KR. **Multiplex PCR assay to identify methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus***. FEMS Immunol Med Microbiol. 52:431-5, 2008.

SCHWALBE, R. S.; STAPLETON, J. T. & GILLIGAN, P. H. **Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci**. N Engl J Med. 316:927–931, 1987.

SIERADZKI, K.; VILLRI, P. & TOMASZ, A. **Decreased susceptibilities to teicoplanin and vancomycin among coagulase-negative methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci**. Antimicrob Agents Chemother. 42:100-107, 1998.

SJOLUND M. & KAHLMEYER, G. **Staphylococci in primary skin and soft tissue infections in a Swedish county**. Scand J Infect Dis. 26:1-5, 2008.

SPANU, T.; RIGANTE, D.; TAMBURRINI, G.; FIORI, B.; D'INZEO, T.; POSTERARO, B. & POLICICCHIO, D.; SANGUINETTI, M. & FADDA, G. **Ventriculitis due to *Staphylococcus lugdunensis*: two case reports** J Med Case Reports. 2:267, 2008.

SWENSON, J. M.; WILLIAMS, P. P.; KILLGORE, G.; O'HARA, C. M. & TENOVER, F. C. **Performance of eight methods, including two new rapid methods, for detection of oxacillin resistance in a challenge set of *Staphylococcus aureus* organisms**. J Clin Microbiol. 39: 3785-8, 2001.

TAKAHASHI, N.; SHIMADA, T.; ISHIBASHI, Y.; YOSHITOMI, H.; SUGAMORI, T.; SAKANE, T.; SATO, H.; OYAKE, N. & MURAKAMI, Y. **The pitfall of coagulase-negative staphylococci A case of *Staphylococcus lugdunensis* endocarditis**. Int J Cardiol, 2008.

TIEMERSMA, E. W.; BRONZWAER, S. L.; LYYTIKAINEN, O.; DEGENER, J. E.; SCHRIJNEMAKERS, P.; BRUINSMA, N.; MONEN, J.; WITTE, W. & GRUNDMAN H. **European antimicrobial resistance surveillance system participants. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. 1999-2002** Emerg Infect Dis. 10:1627-34, 2004.

TIWARI, H. K. & SEN, M. R. **Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India**. BioMed Central, BMC Infectious Diseases. 6:156, 2006.

THOMSON-CARTER, F. M. & PENNINGTON, T. H. **Characterization of coagulase-negative staphylococci by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblot analyses**. J Clin Microbiol. 27:2199-2203, 1989.

TOMASZ, A.; NACHMAN, S. & LEAF, H. **Stable classes of phenotypic expression in methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci**. Antimicrob Agents Chemother. 35: 124–9, 1991.

WERNER, G.; STROMMENDER, B. & WITTE, W. **Acquired vancomycin resistance in clinically relevant pathogens**. Future Microbiol. 3:547-62, 2008.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)