

LARISSA BAIL TERASAWA

**CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA À OXACILINA EM
ESTAFILOCOCOS COAGULASE NEGATIVA ISOLADOS NO HOSPITAL
DE CLÍNICAS DE CURITIBA - PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setores de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dra. Líbera Maria Dalla Costa

CURITIBA

2006

Ao meu marido Maurício,
por todo apoio, amor e compreensão e
aos meus pais, que estiveram sempre
presente e com carinho entenderam
meus momentos de ausência.

AGRADECIMENTOS

Dra. Libera Maria Dalla Costa, pela sua dedicação ao ideal de ensinar, desempenhando seu papel de maneira extremamente competente e carinhosa.

Meus colegas de mestrado, que hoje chamo de amigos, em especial Jannaina Ferreira de Melo Vasco, Simone de Oliveira, Alexandre Walter Rosa, Mara Cristina Scheffer e Keite da Silva Nogueira. O companheirismo, o apoio e a determinação de vocês foram essenciais para o término deste trabalho.

Funcionários do setor de Bacteriologia do Hospital de Clínicas de Curitiba que colaboraram para o bom andamento da pesquisa e que muito me ensinaram durante meu período de permanência no setor.

Funcionários da Central de Preparo de Meios e Reagentes, Biologia Molecular e Imunogenética, por muitas vezes cederem seu espaço para que pudéssemos desempenhar nossas tarefas.

Núcleo de Estudos em Bacteriologia Clínica (NEBaC) por reconhecerem a importância dos projetos realizados pelos alunos de pós graduação, contribuindo financeiramente para o bom desempenho dos mesmos.

Minha irmã, Giovana Bail, pelo seu apoio, carinho e companhia nesses dois anos que convivemos juntas.

Carmen Antônia Sanches Ito, por seu grande incentivo para a realização desse meu objetivo e por sua amizade verdadeira.

Adriana Van Santen Senchechen, por entender meus momentos de ausência da bancada de trabalho. Ana Cristina Defino e Gilmara Helman Acras, pelo carinho e amizade mesmo quando estive distante.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELA	vi
LISTA DE QUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE GRÁFICOS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	13
1.1. OBJETIVOS	15
1.1.1 Objetivo principal	15
1.1.2 Objetivos secundários	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 HISTÓRICO	16
2.2 TAXONOMIA	17
2.3 PATOGÊNESE	17
2.3.1 Formação de Biofilme	17
2.3.2 Resistência Antimicrobiana	20
2.4 FATORES DE RISCO	21
2.5 EPIDEMIOLOGIA	21
2.6 IMPORTÂNCIA CLÍNICA DOS ECN	23
2.6.1 Infecções Relacionadas a Cateter	22
2.6.2 Bacteremia	26
2.6.3 Endocardite	28
2.7 IDENTIFICAÇÃO DOS ESTAFILOCOCOS COAGULASE NEGATIVA	31
2.8 RESISTÊNCIA À OXACILINA	32
2.8.1 Testes para Detecção de Resistência à Oxacilina	38
2.8.1.1 Disco difusão	38
2.8.1.2 Detecção da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	39
2.8.1.3 Teste de triagem em ágar com oxacilina	40
2.8.1.4 Teste de Aglutinação em Látex	41
2.8.1.5 Teste em Aparelhos Automatizados	43
2.8.1.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do gene <i>mecA</i>	44

3. MATERIAL E MÉTODOS	49
3.1 ORIGEM DAS AMOSTRAS	46
3.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ESTAFILOCOCOS COAGULASE-NEGATIVA	46
3.2.1 Coloração de Gram	47
3.2.2 Catalase	47
3.2.3 Coagulase	47
3.2.4 Prova da Desoxirribonuclease (DNase)	47
3.2.5 Sensibilidade à Bacitracina	48
3.3 CRIOPRESERVAÇÃO	48
3.4 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE- NEGATIVA	49
3.5 TESTES DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	49
3.5.1 Disco Difusão:	49
3.5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM):.....	50
3.5.3 Ágar de Triagem com Oxacilina:	53
3.5.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para o Gene <i>mecA</i>	54
3.5.4.1 Preparo da amostra (DNA alvo)	54
3.5.4.2 Preparo dos reagentes	54
3.5.4.3 Preparo da reação.....	55
3.5.4.4 Análise dos produtos.....	55
3.6 MÉTODOS ESTATÍSTICOS	58
3.7 AVALIAÇÃO DA IMPORTÂNCIA CLÍNICA DOS ESTAFILOCOCOS COAGULASE NEGATIVA (ECN):.....	56
4 RESULTADOS	60
5 DISCUSSÃO	77
6 CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS	86
ANEXOS E APÊNDICES	96

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PROVAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE ECN – PRIMEIRA ETAPA.....	58
TABELA 2 – PROVAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE ECN – SEGUNDA ETAPA.....	58
TABELA 3 – CIM ₅₀ , CIM ₉₀ E PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DAS ESPÉCIES DE ECN ISOLADAS	60
TABELA 4 – ANÁLISE DE DOIS PONTOS DE CORTE PARA A CIM DA CEFOXITINA E DO PONTO DE CORTE PARA A CIM DA OXACILINA EM PREDIZER RESISTÊNCIA AOS BETA-LACTÂMICOS EM ESTAFILOCOCOS COAGULASE-NEGATIVA.....	63
TABELA 5 – SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, VPP E VPN PARA DOIS PONTOS DE CORTE DA CEFOXITINA E O PONTO DE CORTE DA OXACILINA.....	65
TABELA 6 – SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, VPP E VPN PARA OS TESTES DE DISCO DIFUSÃO E ÁGAR DILUIÇÃO COM OXACILINA E CEFOXITINA	65
TABELA 7 – SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, VPP E VPN PARA OS TESTES DE TRIAGEM EM ÁGAR COM OXACILINA.....	66
TABELA 8 – ESPÉCIES DE ECN ISOLADAS E RESULTADO DO GENE <i>mecA</i>	67
TABELA 9 – AMOSTRAS COM RESULTADOS DISCREPANTES ENTRE OS TESTES PARA DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA À OXACILINA E A PCR PARA O GENE <i>mecA</i>	69
TABELA 10 – RELAÇÃO ENTRE AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO E SANGUE COLHIDO PELO CATETER PARA ANÁLISE DA DTP	70
TABELA 11 – RELAÇÃO ENTRE AMOSTRAS DE HEMOCULTURAS E CULTURAS DE PONTA DE CATETER.....	71
TABELA 12 – RELAÇÃO ENTRE O NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS POR DIA DE UM PACIENTE E O NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS PARA ECN.....	72

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – INTERPRETAÇÃO DA SENSIBILIDADE SEGUNDO O CLSI/NCCLS E DILUIÇÕES TESTADAS PARA CADA ANTIMICROBIANO	50
QUADRO 2 – DADOS DAS SOLUÇÕES-ESTOQUE PREPARADAS.....	51
QUADRO 3 – CONCENTRAÇÃO DOS REAGENTES UTILIZADOS NO PREPARO DA SOLUÇÃO-MÃE.....	55

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESQUEMA SIMPLIFICADO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME	19
FIGURA 2 – ESTRUTURA DO PEPTIDEOGLICANO EM BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS	33
FIGURA 3 – ATUAÇÃO DA PBP 2 E PBP 2A NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE ANTIMICROBIANOS BETA-LACTÂMICOS.....	34
FIGURA 4 – ORGANIZAÇÃO MOLECULAR DO COMPLEXO <i>mec</i> E SUA LOCALIZAÇÃO CROMOSSOMAL RELATIVA AOS FATORES <i>fem</i> E <i>pur-nov-his</i>	35
FIGURA 5 – ORGANIZAÇÃO GENÉTICA DO COMPLEXO GENE <i>mecA</i> EM ESTAFILOCOCOS E SUAS DIFERENTES CLASSES	36
FIGURA 6 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DO TESTE DE ÁGAR DILUIÇÃO.....	53
FIGURA 7 – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA A VANCOMICINA PELO MÉTODO DE ÁGAR DILUIÇÃO	61
FIGURA 8 – INIBIÇÃO DA CEPA CONTROLE PELA OXACILINA.....	62
FIGURA 9 – ISOLADOS DE ECN RESISTENTES À OXACILINA	62
FIGURA 10 – COMPARAÇÃO ENTRE OS DOIS PONTOS DE CORTE PARA A CEFOXITINA E O PONTO DE CORTE PARA A OXACILINA.....	64
FIGURA 11 – PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>mecA</i> OBTIDOS DE ISOLADOS CLÍNICOS DE ECN	68

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – ORIGEM E NÚMERO DE AMOSTRAS OBTIDAS DAS UNIDADES CRÍTICAS SELECIONADAS E DAS OUTRAS UNIDADES INCLUÍDAS NO ESTUDO	58
GRÁFICO 2 – DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES NO TOTAL DE 185 ECN ESTUDADOS	59
GRÁFICO 3 – SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, VPP E VPN PARA OS TESTES DE DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA À OXACILINA	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL	-	microlitro
ATCC	-	<i>American Type Culture Collection</i>
BGN	-	bacilo Gram-negativo
CGP	-	coco Gram-positivo
CIM	-	concentração inibitória mínima
CLSI	-	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CVC	-	cateter venoso central
dATP	-	dinucleotídeo adenina trifosfato
dCTP	-	dinucleotídeo citosina trifosfato
dGTP	-	dinucleotídeo guanina trifosfato
DNA	-	ácido desoxirribonucleico
DNAse	-	desoxirribonuclease
DTP	-	diferença no tempo de positividade
Dttp	-	dinucleotídeo tirosina trifosfato
ECN	-	estafilococos coagulase-negativa
EDTA:	-	ácido etilenodiaminotetracético
H ₂ S	-	ácido sulfídrico
HCl	-	ácido clorídrico
ICCRC	-	infecção da corrente circulatória relacionada a cateter
ILCR	-	infecção local relacionada a cateter
MgCl ₂	-	cloreto de magnésio
MRSA	-	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina (oxacilina) resistente
MS	-	atravessador de membrana
NaCl	-	cloreto de sódio
NCCLS	-	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
NNIS	-	Pesquisa Nacional de Infecções Nosocomiais
PBP	-	proteína ligadora de penicilina
PCR	-	reação em cadeia da polimerase
PFGE	-	eletroforese em gel de campo pulsado
PIA	-	adesina polissacarídica intercelular
PM	-	peso molecular
PS/A	-	polissacarídeo capsular/adesina
PYR	-	L-pirrolidonil-β-naftilamida
QAR	-	Quimioterapia de Alto Risco
RAPD	-	DNA polimórfico amplificado ao acaso
S.	-	<i>Staphylococcus</i>
SCC _{mec}	-	cassete cromossômico estafilocócico
SRGA	-	Grupo Sueco de referência em antimicrobianos
TGase	-	transglicosilase
TMO	-	Transplante de Medula Óssea
TPase	-	transpeptidase
TSA	-	teste de sensibilidade aos antimicrobianos
UFC	-	unidade formadora de colônia
UTI	-	Unidade de Terapia Intensiva
VPP	-	valor preditivo positivo
VPN	-	valor preditivo negativo

RESUMO

Estafilococos coagulase-negativa (ECN) são um grupo de microrganismos que constituem parte da microbiota normal da pele, embora seu significado clínico como agente causal em pacientes com materiais implantados como cateter venoso central e periférico, próteses valvulares e outras infecções envolvendo a formação de biofilme tenha aumentado nas últimas décadas. A resistência à oxacilina é uma importante característica deste grupo de bactérias e a dificuldade na detecção fenotípica desta resistência é devido à expressão heterogênea do gene *mecA* por muitos isolados. Neste estudo, foram avaliados 185 isolados de ECN de hemoculturas colhidas pelo cateter e veia periférica, cultura de ponta de cateter e cultura de válvula cardíaca. *Staphylococcus epidermidis* foi responsável por 118 episódios (63,8%). A presença do gene *mecA* foi determinada pelo método da Reação em cadeia da Polimerase (PCR) e 86,5% de todos os isolados foram *mecA* positivos. A espécie que apresentou maior resistência à oxacilina foi *S. haemolyticus* (97,91% *mecA* positivo). O método de disco-difusão mostrou os mesmos resultados para cefoxitina e oxacilina (100% de sensibilidade e 92% de especificidade). A Concentração inibitória mínima (CIM) para a oxacilina pelo método de ágar diluição demonstrou sensibilidade de 100% e especificidade de 84%. Para os dois diferentes testes de triagem avaliados, a sensibilidade e especificidade foram as seguintes: para o teste de triagem com 4 µg/mL de oxacilina, 100% e 92%, respectivamente; para o teste de triagem com 6 µg/mL de oxacilina, 97,5% e 92%, respectivamente. Os métodos fenotípicos que apresentaram melhor acurácia na detecção da resistência à oxacilina e facilidade na execução para laboratórios clínicos de rotina foram disco difusão para oxacilina e cefoxitina e o teste de triagem em ágar com 4 µg/mL de oxacilina.

Palavras-chave: estafilococos coagulase-negativa, oxacilina, gene *mecA*

ABSTRACT

Coagulase-negative staphylococci (CNS) are a group of microorganisms that constitute part of the normal skin flora, although their clinical significance like causal agents in patients with indwelling medical devices such as central and peripheral venous catheters, valvular prostheses and other infections involving biofilm formation on implanted biomaterial have increasing in the last decades. The oxacillin resistance is a important characteristic of this bacterial group and the difficulty in the detection of phenotypic oxacillin resistance is due to the heterogeneous expression of the *mecA* gene by many strains. In this study, it has been evaluated 185 CNS isolated from blood culture draw through the catheter and peripheral vein, catheter-tip culture and cardiac valve culture. *Staphylococcus epidermidis* accounted for 118 episodes (63,8%). The presence of *mecA* gene was determined by Polymerase Chain Reaction (PCR) and 86,5% of all isolates were *mecA* positive. The specie most resistant to oxacillin isolated was *Staphylococcus haemolyticus* (97,91% *mecA* positive). Disc-diffusion method showed the same results for oxacillin and cefoxitin (100% of sensibility and 92,0% of specificity). The oxacillin Minimal Inhibitory Concentration (MIC) by agar dilution method demonstrated sensibility of 100% and specificity of 84%. For the two different agar screening test evaluated, the sensibility and specificity were as follows: for the agar screening test with 4 µg of oxacillin per mL, 100% and 92,0%, respectively; for the agar screening test with 6 µg of oxacillin per mL, 97,5% and 92,0%, respectively. The phenotypical methods that showed the best accuracy to detect oxacillin resistance and facility to performance in routine clinical laboratories were disc-diffusion to oxacillin and cefoxitin and agar screening with 4 µg of oxacillin per mL.

Keywords: coagulase-negative staphylococci, oxacillin, *mecA* gene.

1 INTRODUÇÃO

Os estafilococos coagulase-negativa (ECN) são habitantes normais da pele e membranas mucosas de humanos e geralmente possuem um relacionamento benigno ou simbiótico com seu hospedeiro. No entanto, adquirem potencial patogênico se tiverem acesso ao tecido do hospedeiro através de trauma da barreira cutânea, inoculação por agulhas ou implante de materiais médicos (próteses, cateteres, válvulas cardíacas, marcapassos, etc.) (HEIKENS, 2005).

Um dos maiores problemas enfrentado pelo laboratório de microbiologia clínica e pelos médicos envolvendo os ECN está na dificuldade em distinguir isolados significantes (patogênicos) de isolados contaminantes, já que o principal contaminante dos frascos de hemocultura é também o principal patógeno em infecções envolvendo cateter e outros materiais médicos implantados (EIFF, 1998).

Vários critérios têm sido utilizados na tentativa de diferenciar bacteremia clinicamente significativa causadas por ECN e contaminantes de hemoculturas. Estes critérios incluem, entre outros, combinações de achados clínicos, fonte da amostra de sangue, e, principalmente, o número de culturas positivas. No entanto, investigações recentes utilizando técnicas de tipagem molecular revelaram que 33% de aparentes infecções da corrente circulatória causadas por ECN diagnosticadas tendo como base o número de hemoculturas positivas revelaram isolados não relacionados (OUD, 1999).

Outra alternativa utilizada para avaliar a importância clínica dos ECN é a identificação das espécies desses isolados, a qual deve ser rápida e confiável a fim de prever o mais precocemente possível o potencial patogênico e a sensibilidade aos antimicrobianos de cada isolado e esclarecer o significado clínico de cada espécie (COUTO, 2001). No entanto, esta identificação continua problemática para os laboratórios de microbiologia clínica pela necessidade de uma grande variedade de provas bioquímicas, as quais muitas vezes fornecem resultados inconfiáveis para os ECN (CARRETO, 2005).

Além de sua importância como patógeno em infecções relacionadas a cateter e da dificuldade de identificação das espécies, outra questão a ser discutida com relação aos ECN é a resistência aos antimicrobianos. Isolados hospitalares são frequentemente resistentes à oxacilina, e isso indica resistência cruzada com todas as classes de antimicrobianos β -lactâmicos incluindo as cefalosporinas (De GIUSTI,

1999). Além disso, ECN resistente à oxacilina está em grande parte relacionada com resistência a outros antimicrobianos, particularmente os aminoglicosídeos e macrolídeos (LYYTIKÄINEN, 1996).

Vários métodos de detecção de resistência à oxacilina estão sendo desenvolvidos e utilizados pelos laboratórios, já que a expressão fenotípica desta resistência é usualmente heterogênea e frequentemente influenciada pelas condições da cultura como concentração do inóculo, tempo de incubação, temperatura, pH e concentração de sal no meio (De GIUSTI, 1999).

Em 1999, o CLSI/NCCLS – *Clinical and Laboratory Standards Institute/National Committee for Clinical Laboratory Standards* (Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais) estabeleceu uma diminuição nos pontos de corte para detecção da CIM (concentração inibitória mínima) da oxacilina com o objetivo de melhorar a correlação entre a detecção da resistência e a presença do gene *mecA*. Outra mudança ocorreu em 2004, onde o documento passou a recomendar o uso da cefoxitina no teste de disco difusão como método de triagem, mas adverte que isolados outros que *S. epidermidis* apresentando resistência neste método devem ser testados para a presença do gene *mecA* pelo método da reação em cadeia da polimerase (PCR) ou detecção da proteína ligadora de penicilina 2a (PBP 2a) pelo teste de aglutinação em látex.

A ocorrência de muitos isolados resistentes à oxacilina levou a um aumento no uso da vancomicina para o tratamento das infecções causadas por ECN. No entanto, seu uso encarece o tratamento de tais infecções e favorece o surgimento de isolados resistentes à vancomicina (DOMARACHI, 1998).

A dificuldade enfrentada pelos laboratórios clínicos de rotina em identificar as espécies de ECN, caracterizar a resistência à oxacilina frequentemente por eles apresentada e em avaliar a importância clínica desses isolados, faz com que novos estudos sejam realizados e maior atenção seja dedicada às amostras clínicas positivas para essas bactérias, principalmente em pacientes imunocomprometidos.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo principal: Caracterizar a resistência à oxacilina em estafilococos coagulase-negativa isolados de amostras clínicas relevantes.

1.1.2 Objetivos secundários:

1. Avaliar um esquema para identificação fenotípica das amostras de estafilococos coagulase-negativa.

2. Determinar a prevalência das espécies de ECN isoladas.

3. Determinar, por metodologia quantitativa (concentração inibitória mínima), o perfil de susceptibilidade aos principais antimicrobianos utilizados na prática clínica.

4. Avaliar um novo ponto de corte para a determinação da concentração inibitória mínima da cefoxitina.

5. Detectar isolados resistentes à oxacilina por metodologias de triagem para o gene *mecA* (teste em ágar com oxacilina e disco difusão para oxacilina e cefoxitina).

6. Pesquisar em todas as amostras coletadas a presença do gene *mecA*, pelo método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

Durante a década de 50, os ECN foram classificados sob o título coletivo de *Staphylococcus albus*, assim nomeados devido à coloração branca de suas colônias nas placas de ágar, em contraste com a cor amarela dos *Staphylococcus aureus*. Embora fossem considerados microrganismos não patogênicos, um artigo publicado em 1958 mudou este conceito ao descrever 90 relatos de casos de bacteremia por ECN. Muitos médicos usaram *S. epidermidis* como um termo genérico e coletivo substituindo *S. albus*. *Staphylococcus saprophyticus* foi usado para designar o único ECN com o *status* de espécie separada devido à sua freqüente associação com infecções do trato urinário (PATRICK, 1990).

Em 1975, Kloos e Schleifer estenderam o esquema de classificação existente pela inclusão de sete novas espécies aos já conhecidos *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* (HUEBNER, 1999). No entanto, a importância clínica desses organismos não parecia justificar o extenso esforço microbiológico necessário para reconhecer as várias novas espécies e só nos anos de 1980 esta situação mudou radicalmente. Simultaneamente com o abrupto aumento das infecções clinicamente significantes causadas pelo ECN, houve o surgimento no mercado de “*microkits*” para a rápida identificação dessas bactérias. Esses “*kits*” consistem de painéis de testes bioquímicos em miniatura e são baseados no esquema de identificação de Kloos e Schleifer (CHRISTENSEN, 1987).

De acordo com dados do NNIS (National Nosocomial Infections Surveillance System) divulgados em 1996, os ECN representaram 11% dos microrganismos recuperados de infecções nosocomiais, e foram os principais microrganismos responsáveis por infecções nosocomiais da corrente circulatória (SILVA, 2000). Hoje já existem 32 espécies de ECN; cerca de 15 espécies são naturais de humanos, e as demais são consideradas patógenos não humanos (HUEBNER, 1999).

2.2 TAXONOMIA

Os Estafilococos são membros da família *Micrococcaceae* e classificados como cocos Gram-positivos em forma de cacho, catalase-positiva, mas podem ser divididos em dois grupos com base na produção da coagulase; as espécies coagulase-negativas são distinguidas dos *Staphylococcus aureus* (coagulase-positiva) pela sua incapacidade de coagular plasma de coelho (WHITENER, 1993).

O gênero *Staphylococcus* atualmente compreende 38 espécies. Entre seus representantes, *Staphylococcus aureus* é a espécie mais virulenta e o patógeno mais importante, mas a incidência de infecções causadas por estafilococos coagulase-negativa vem aumentando em todo o mundo (SAKAI, 2004).

2.3 PATOGÊNESE

Os fatores de virulência presentes nos ECN não estão claramente estabelecidos como em *S. aureus*. Nenhum dos principais fatores de virulência ou toxinas dos *S. aureus* têm sido encontrados com frequência em ECN, e isto deixa claro que o desenvolvimento e a persistência de infecções por ECN, que estão frequentemente associadas com corpos estranhos, são devido a mecanismos diferentes (HUEBNER, 1999).

2.3.1 Formação de Biofilme

Os ECN são um dos mais importantes patógenos nosocomiais frequentemente envolvidos em infecções associadas com corpos estranhos implantados. A aderência das bactérias ao polímero provavelmente ocorre pela contaminação com pequena quantidade de bactérias da microbiota endógena do paciente durante o implante do material (EIFF, 1999). O mecanismo pelo qual ECN ataca o material protético e forma o que hoje é conhecido como biofilme ainda está sendo compreendido. É um processo complexo e de múltiplos passos, e a relevância de cada componente principal ainda requer estudo no que diz respeito às doenças humanas (SILVA, 2002).

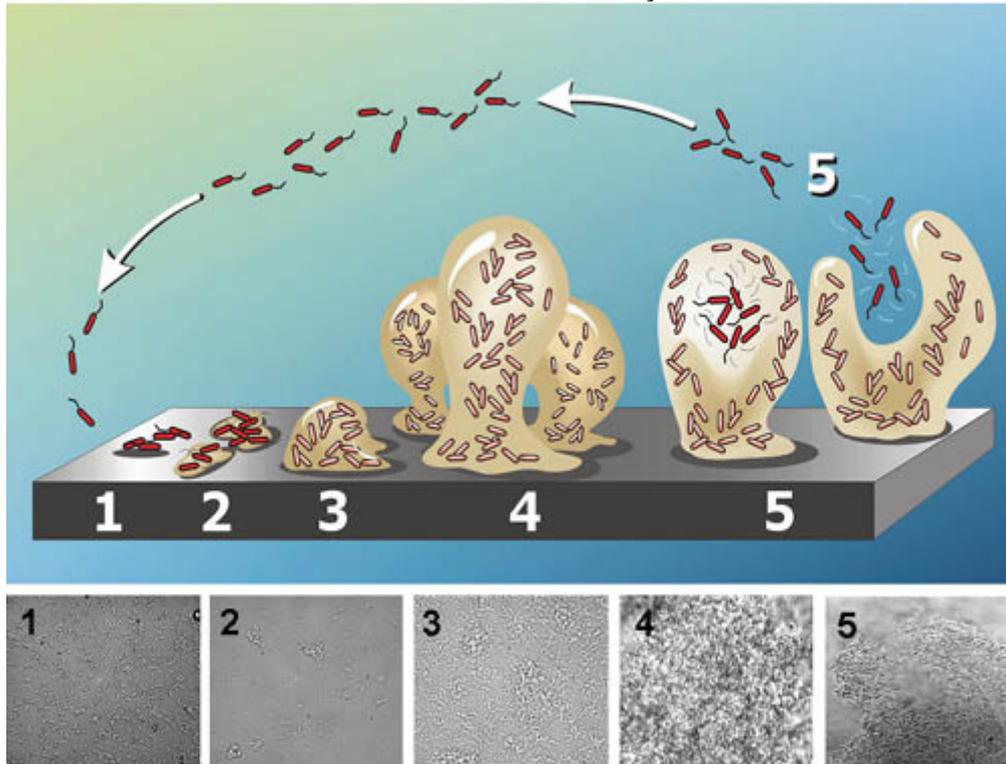
Biofilmes são formados por um material extracelular amorfo (*slime*) que consiste da complexa mistura de vários açúcares, constituintes da parede celular e proteínas extracelulares. Seu principal componente é ácido teicóico. Plasma e proteínas do tecido conectivo como fibronectina, fibrinogênio, vitronectina, trombospondina, laminina, colágeno e o fator von Willebrand têm sido descritos por estarem envolvidos nesse processo (EIFF, 1999).

O primeiro passo na formação do biofilme envolve a rápida aderência e persistência da bactéria na superfície do corpo estranho (Números 1 e 2 - FIGURA 1). Em 1988, Tojo e colaboradores caracterizaram um componente polissacarídico específico presente no *slime* amorfo. Pelo fato deste polissacarídeo fazer parte da cápsula bacteriana e mediar o ataque inicial da bactéria à superfície do polímero, ficou conhecido como PS/A – *polissacharidade capsular adhesin* (polissacarídeo capsular/adesina) (HUEBNER, 1999). O mecanismo pelo qual PS/A promove a colonização ainda não é compreendido. Embora PS/A tenha sido descoberto em um estudo molecular da identidade do *slime*, estes dois fenômenos parecem ser mutuamente independentes (CHRISTENSEN, 1994).

O segundo passo envolve a proliferação e adesão intercelular (Números 3 e 4 – FIGURA 1). Outro polissacarídeo descoberto recentemente e que está envolvido nesse estágio da formação do biofilme é o PIA – *polissacharidae intercelular adhesin* (adesina polissacarídica intercelular), produto do operon *icaADBC* (SCHULIN e VOSS, 2001). Alguns pesquisadores acreditam que o PIA está unicamente envolvido no acúmulo de estafilococos coagulase-negativa nas superfícies e é distinto do PS/A. No entanto, um trabalho recente publicado por Pier et al sugere que o locus genético *ica* codifica PS/A e é responsável pelo ataque inicial aos polímeros (HUEBNER, 1999).

Após o estabelecimento da camada de *slime*, células filhas não aderentes são capazes de escapar ou pela interrupção na produção do *slime* ou pela exaustão das condições ambientais que suportam sua produção. Estas formas não aderentes são então livres para serem levadas a novos sítios e repetirem o processo de colonização, caracterizando, assim, o estágio final da formação do biofilme (Número 5 – FIGURA 1) (CHRISTENSEN, 1994).

FIGURA 1 – ESQUEMA SIMPLIFICADO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME



FONTE: DECKER, J. **Biofilms: Microbial Communities and Infectious Disease**. Disponível em: <<http://microvet.arizona.edu/Courses/MIC438/decker/biofilms/biofilms.html>> Acesso em 28/02/2006.

O biofilme confere proteção aos microrganismos contra os mecanismos de defesa imune do hospedeiro e de agentes antimicrobianos, sendo diretamente pelo bloqueio da penetração desses na célula bacteriana ou indiretamente por mantê-la em um inativo estado de repouso. Por estas razões, a formação do biofilme é considerada o principal fator de virulência dos ECN e as mais importantes infecções causadas por estes microrganismos são infecções envolvendo corpos estranhos (CAFISO, 2004; MULDER e DEGENER, 1998; MICHELIM, 2005).

A quantidade de biofilme formada é influenciada pelas mudanças nas condições ambientais, pelo estímulo de concentrações sub-inibitórias de tetraciclina e quinopristina-dalfopristina, bem como por altas temperaturas, anaerobiose, “stress” etílico e osmolaridade. Todos estes fatores aumentam a transcrição dos genes *ica* e a formação do biofilme, facilitando a sobrevivência do microrganismo em ambientes normalmente hostis (CAFISO, 2004).

Várias metodologias foram desenvolvidas para a pesquisa da produção de *slime* pelas bactérias. A detecção qualitativa desta formação foi descrita por Freeman, Falkiner e Keane (1989), utilizando o ágar vermelho Congo, onde os

isolados PIA-positivos formam colônias negras e os PIA-negativos formam colônias vermelhas. Outro procedimento simples utilizado para demonstrar a presença de *slime* é o teste em tubo, descrito por Christensen et al. (1982), que consiste no esvaziamento do conteúdo do tubo de cultura e tingimento do filme residual aderente de bactéria.

Utilizando-se dessas técnicas descritas anteriormente, vários estudos puderam demonstrar que isolados patogênicos produzem maior quantidade de *slime* do que isolados não patogênicos de ECN, fazendo desta metodologia um instrumento de diferenciação entre infecção e contaminação (SILVA, 2002; ALCARÁZ, 2003).

2.3.2 Resistência Antimicrobiana

Outra característica dos ECN envolvida na patogênese e considerada importante fator de virulência é a alta taxa de resistência aos agentes antimicrobianos apresentada por estes microrganismos, principalmente à oxacilina, onde em alguns estudos tem sido descrita em 80% dos isolados clínicos (MICHELIM, 2005). A resistência à oxacilina indica resistência cruzada com os demais β -lactâmicos, incluindo cefalosporinas (De GIUSTI, 1999). Além disso, essa resistência em ECN está frequentemente relacionada com resistência a outros antimicrobianos, particularmente aminoglicosídeos e macrolídeos (LYYTIKÄINEN, 1996). Essas características possuem um impacto substancial nos cuidados com a saúde, afetando desfavoravelmente a morbidade e mortalidade dos pacientes (De GIUSTI, 1999).

Muitos dos ECN possuem um número de plasmídeos, alguns dos quais podem ser transferidos por conjugação entre espécies diferentes de ECN ou até mesmo entre ECN e *S. aureus*. Este mecanismo representa uma importante via de transmissão de determinantes de resistência antimicrobiana, especialmente para aminoglicosídeos e β -lactâmicos (HUEBNER, 1999).

2.4 FATORES DE RISCO

O aumento no uso de cateteres intravasculares e de hemodiálise, próteses de válvulas cardíacas e de outros materiais implantados têm favorecido o surgimento de infecções importantes causadas por ECN. Os pacientes mais vulneráveis a esse tipo de infecção são aqueles internados em unidades de terapia intensiva, unidades de transplante e oncologia, já que na maioria das vezes são submetidos a tais procedimentos. Além disso, a imunossupressão e o uso de antimicrobianos de amplo espectro tornam estes pacientes especialmente vulneráveis (AGVALD-ÖHMAN, 2004).

Em recém-nascidos, a prematuridade e o baixo peso, associados com a imaturidade do sistema imune e habilidade prejudicada em combater as infecções, a necessidade de acessos vasculares e o uso de cateteres intravasculares são considerados importantes fatores de risco em infecções causadas por ECN (RAIMUNDO, 2002).

Usuários de drogas intravenosas, particularmente aqueles que utilizam heroína, frequentemente desenvolvem endocardite, sendo *S. epidermidis* o principal microrganismo isolado (EIFF, 1998).

2.5 EPIDEMIOLOGIA

Devido à natureza ubíqua dos ECN na pele e superfícies mucosas e o seu potencial patogênico, a epidemiologia desses microrganismos tem assumido maior importância no estudo dos isolados (PATRICK, 1990).

Embora existam muitas espécies de estafilococos coagulase-negativa, 13 delas são consideradas importantes em humanos: *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saccharolyticus*, *S. caprae*, *S. xylosus*, *S. cohnii*, *S. simulans*, *S. auricularis*, *S. lugdunensis* e *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* (FORBES, 2002). Estas espécies são habitantes normais da pele e membranas mucosas em concentrações até 10^4 - 10^6 UFC/cm², e certas espécies frequentemente habitam nichos ecologicamente característicos: *S. capitis* é encontrado quase que exclusivamente na cabeça e *S. auricularis* é isolado somente no conduto auditivo externo (HUEBNER, 1999).

Com o aumento no uso de materiais implantados em quase todos os campos da medicina moderna, os ECN colonizantes da pele acabam ganhando acesso à corrente circulatória e muitas vezes desencadeando graves infecções, como a septicemia. Este fato gera grande dúvida quando se isola um ECN de hemocultura, já que um importante agente de infecção da corrente circulatória é também o principal contaminante dos frascos de hemocultura, provenientes de uma antisepsia inadequada.

Métodos para análise epidemiológica têm sido muito utilizados a fim de diferenciar infecção verdadeira de contaminação, porém, podem ser úteis clinicamente somente quando mais de uma amostra do mesmo paciente é positiva para estes microrganismos, proporcionando uma comparação entre os isolados (GARCÍA, 2004). Entre os métodos fenotípicos podemos citar a biotipagem, análise do antibiograma, tipagem sorológica, produção de *slime* e fagotipagem. Entre os métodos genotípicos, destacam-se a técnica de RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso), PFGE (eletroforese em gel de campo pulsado), ribotipagem e tipagem de plasmídeo.

2.6 IMPORTÂNCIA CLÍNICA DOS ECN

O papel das espécies de ECN como agentes causais de infecções nosocomiais tem sido reconhecido e bem documentado ao longo das duas últimas décadas, especialmente para a espécie *S. epidermidis*. O aumento no índice de infecção tem sido correlacionado com o aumento no uso de materiais implantados e com o número crescente de pacientes imunocomprometidos nos hospitais. A possibilidade de um delineamento preciso das manifestações clínicas por este grupo de bactérias e a determinação do agente etiológico nestas infecções suporta a necessidade de uma identificação precisa para os ECN (BANNERMAN, 2003).

2.6.1 Infecções Relacionadas a Cateter

Todos os anos nos Estados Unidos, hospitais e clínicas compram mais de 150 milhões de equipamentos intravasculares para a administração de líquidos, medicamentos, componentes sanguíneos e nutrição parenteral, para monitorar a hemodinâmica do paciente e para a realização de hemodiálise. Vários são os tipos

de cateteres existentes e os fatores de risco para infecções relacionadas a cateter variam de acordo com o tipo de cateter, o tamanho do hospital, unidade ou serviço, a localização do sítio de inserção e o tempo de implantação do cateter (MERMEL, 2001).

A patogênese das infecções por cateter venoso central (CVC) não tunelados está frequentemente relacionada com a colonização extraluminal do cateter por microrganismos da pele e, menos comumente, por uma infecção secundária da ponta do cateter pela via hematogênica proveniente de sítio distante, ou colonização intraluminal do eixo e lumen do CVC. Em comparação, para CVC tunelados ou instrumentos implantados, a contaminação do eixo do cateter e a infecção intraluminal é o caminho mais comum (MERMEL, 2001).

Os ECN são os microrganismos mais frequentemente isolados de cateteres, os quais foram encontrados em 64% das culturas desse material em um hospital de Madri (VIEDMA, 2000). Por esta razão, são também a causa mais comum de infecções relacionadas a cateter, entre elas a infecção da corrente circulatória. Mermel et al. (2001) acreditam que a infecção da corrente circulatória relacionada a cateter (ICCRC) pode ser resolvida apenas com a remoção do cateter e nenhuma antibioticoterapia, embora muitos estudiosos acreditem que tais infecções devem ser tratadas com antimicrobianos.

A definição de ICCRC está baseada no isolamento do mesmo organismo de uma cultura semiquantitativa ou quantitativa de um segmento de cateter e da hemocultura (colhida preferencialmente de uma veia periférica) de um paciente com sintomas clínicos de infecção da corrente circulatória sem nenhuma outra fonte aparente de infecção (SINGHAL, MISHRA e BHATNAGAR, 2005).

Para a Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA), a definição de ICCRC está baseada no isolamento simultâneo do mesmo microrganismos na hemocultura colhida de CVC e de sangue periférico, na presença de uma cultura de cateter com 15 UFC ou mais do mesmo microrganismo isolado das hemoculturas, ou hemoculturas quantitativas simultâneas onde o número de UFC isoladas do sangue colhido do CVC for de 5 colônias ou mais do que o número isolado do sangue colhido percutaneamente (RAAD, 2004).

As manifestações clínicas das infecções da corrente circulatória relacionadas a cateter, tais como febre e calafrio são sensíveis, mas não específicas para o

diagnóstico, ao passo que outras manifestações, tais como inflamação no sítio de inserção do cateter são específicas, mas não sensíveis (RAAD, 2004).

Várias metodologias têm sido propostas para o diagnóstico de infecção relacionada a cateter, já que os achados clínicos não são confiáveis para estabelecer um diagnóstico preciso, devido à baixa sensibilidade e especificidade (MERMEL, 2001). Com relação aos métodos de cultura do cateter, a técnica semiquantitativa descrita por Maki, Weise e Sarafin (1977) é amplamente utilizada pelos laboratórios de microbiologia clínica, onde um segmento de 5 cm da ponta distal do cateter é rolada sobre a superfície de um meio de cultura e as unidades formadas de colônia são contadas após uma noite de incubação. Um crescimento ≥ 15 UFC é indicativo de infecção relacionada a cateter. No entanto, esta metodologia apresenta algumas limitações. Para pacientes com baixos índices de bacteremia relacionada a cateter, o valor preditivo positivo é baixo ($< 20\%$). Além disso, infecções envolvendo apenas o lúmen do cateter podem ter resultados falso-negativos por este método, já que a técnica detecta apenas as bactérias presentes na parte externa do cateter. Como consequência, vários métodos quantitativos de cultura de cateter vêm sendo utilizados na tentativa de superar as limitações da técnica de Maki. Para obter uma cultura quantitativa, o segmento do cateter é lavado com jato e imerso em caldo ou então procedimentos como centrifugação, sonicação e utilização de vortex são realizados com o caldo onde o cateter foi imerso. O crescimento de organismos $\geq 10^3$ UFC é indicativo de infecção relacionada a cateter (SINGHAL, MISHRA e BHATNAGAR, 2005).

Para cateteres inseridos há menos de uma semana é mais provável que a colonização seja por microrganismos da pele na superfície externa do cateter, então a técnica de Maki é mais sensível na identificação de tal colonização. Para cateteres inseridos há mais de uma semana, nos quais a difusão intraluminal pelo eixo do cateter pode ser o mecanismo dominante para a colonização do cateter, a técnica de Maki é menos sensível, e métodos que obtêm amostras de ambas as superfícies internas e externas para a cultura são mais sensíveis (MERMEL, 2001).

Um estudo realizado por Sherertz, Heard e Raad (1997) comparou os métodos de cultura de cateter mais utilizados: a técnica de rolagem do cateter (técnica de Maki), sonicação e lavagem do lúmen. O achado mais importante foi que nenhum dos métodos citados teve sensibilidade superior a 58% para detectar colonização significativa do cateter individualmente. Concluíram também que o

método mais sensível para detectar colonização de cateter de lúmen triplo foi sonicação do segmento subcutâneo (58%) ou da ponta do segmento (53%) do cateter e a realização do método em conjunto para os dois segmentos teve sensibilidade de 90%.

Os métodos semiquantitativos e quantitativos necessitam da remoção do cateter para sua realização, no entanto, este procedimento nem sempre é possível (SINGHAL, MISHRA e BHATNAGAR, 2005). Com o objetivo de evitar a remoção indevida de CVC e os riscos associados com a inserção de um novo cateter em um novo sítio, outras metodologias foram desenvolvidas. A cultura pareada de amostras de sangue colhidas pelo cateter intravascular e percutânea é uma delas. Pacientes com suspeita de infecção intravascular relacionada a cateter devem ter 2 conjuntos de amostras de sangue colhidas para cultura com pelo menos 1 conjunto colhido percutaneamente. Esta metodologia apresentou um valor preditivo positivo de apenas 63% e valor preditivo negativo de 99% para a coleta realizada através do cateter, onde se pode interpretar que uma cultura com resultado positivo para a amostra colhida através do cateter requer interpretação clínica, mas um resultado negativo é útil para excluir ICCRC (MERMEL, 2001).

Uma nova metodologia foi descrita por Blot et al. (1998) para diagnosticar infecção relacionada a cateter sem a necessidade da remoção do cateter. Os pesquisadores realizaram o estudo no período de julho de 1994 a janeiro de 1996 em um hospital francês. Os dados de 64 pacientes que tiveram o mesmo microrganismo isolado em amostras de sangue colhidas de veia periférica e do CVC foram analisados e chegou-se a conclusão de que o tempo diferencial de positividade das duas amostras foi significativo em pacientes com septicemia relacionada a cateter. Esse método foi interpretado utilizando um ponto de corte de 120 minutos, ou seja, quando a hemocultura colhida através do CVC positiva 120 minutos ou mais antes da hemocultura periférica, a infecção está relacionada ao cateter. A sensibilidade apresentada foi de 100% e a especificidade de 96,4%. Em 2004, Raad e colaboradores também avaliaram esta nova metodologia em pacientes com cancer e chegaram a conclusão que a diferença no tempo de positividade (DTP) de 120 minutos ou mais é altamente sensível e específica para o diagnóstico de sepsis relacionada a cateter em pacientes com longo ou curto tempo de inserção. No entanto, este método apresentou baixa especificidade em pacientes que receberam antimicrobianos antes da obtenção das amostras de sangue pareadas.

Outra metodologia descrita é a cultura quantitativa de amostras de sangue colhidas de veia periférica e de cateter venoso central (CVC). Esta técnica está baseada na cultura quantitativa de amostras de sangue pareadas; quando o sangue obtido do CVC resultar em uma contagem de colônias com pelo menos 5-10 colônias a mais que a contagem do sangue colhido da veia periférica, o resultado é preditivo de ICCRC. Apesar da alta especificidade deste método, não é rotineiramente utilizado devido a sua relativa complexidade e custos (BLOT, 1998).

Os casos onde somente a cultura da amostra do CVC positivou foram excluídos do primeiro estudo feito por Blot et al. (1998) para a análise da sensibilidade e especificidade da técnica. No estudo feito por Seifert et al. (2003) estes casos foram considerados e a DTP apresentou sensibilidade e especificidade de 82% e 86%, respectivamente. Este estudo foi realizado em pacientes neutropênicos com câncer e a DTP foi comparada com a cultura quantitativa e a tipagem molecular epidemiológica. Os pesquisadores chegaram à conclusão que a DTP é uma ferramenta útil para o diagnóstico *in situ* de infecção da corrente circulatória relacionada a cateter nesses pacientes, evitando a retirada desnecessária do cateter, acelerando o início da antibioticoterapia caso seja necessário e melhorando os cuidados com o paciente nessa população altamente comprometida.

2.6.2 Bacteremia

A incidência dos ECN como agentes clinicamente significantes em bacteremias tem aumentado com o passar dos anos (REIMER, 1997; THYLEFORS, 1998). Um estudo realizado por Wisplinghoff e colaboradores (2004) mostrou a análise de 24.179 casos de infecções nosocomiais da corrente circulatória nos Estados Unidos, onde o isolado mais comum foi ECN (31%). A mortalidade atribuída à esses microrganismos foi estudada por Martin, Pfaller e Wenzel em 1989 durante a análise de 171 pacientes com bacteremia, e os ECN foram responsáveis por uma taxa de mortalidade de 14%.

As bacteremias causadas por ECN estão associadas com o uso de materiais implantados como cateteres venoso central, periférico e de hemodiálise e materiais prostéticos, uma característica bem estabelecida e muito estudada. (THYLEFORS, 1998).

A hemocultura é considerada um dos mais importantes testes laboratoriais realizados para o diagnóstico de bacteremias, embora ainda apresente muitos problemas com relação às suas técnicas e resultados (LARGURA, 2005). A esterilização e a escolha do sítio da punção, o volume do inóculo e o meio utilizado para a cultura são alguns dos fatores que interferem na sensibilidade e especificidade das hemoculturas (THYLEFORS, 1998).

O mais importante avanço tecnológico com relação às hemoculturas nas últimas décadas foi o desenvolvimento de sistemas de monitoramento contínuo, os quais acompanham a evidência de crescimento bacteriano geralmente em intervalos de 10 minutos. Os frascos são mantidos sob agitação e temperatura controlada. O primeiro sistema de monitoramento contínuo comercial que surgiu no mercado foi o BacT/Alert (Organon Teknika Corp.), o qual detecta a mudança de cor na base do frasco de hemocultura por um sensor sólido, quando há aumento da concentração de CO₂ no meio pela proliferação bacteriana (REIMER, 1997).

Em 1997, Weinstein e colaboradores comentaram em seu trabalho sobre o grande problema enfrentado pelos microbiologistas e clínicos com relação à interpretação das hemoculturas, já que em 85% dos casos onde se isola ECN, estes são considerados contaminantes. Os autores consideram que o fato pode ser explicado pela contaminação por microrganismos da pele no momento da coleta. Atualmente, este problema ainda é preocupante, pois as medidas de precaução para evitar a contaminação com microrganismos da pele nem sempre são aplicadas adequadamente. Outro estudo feito em dois hospitais universitários americanos observou que embora *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. hominis* representem cerca de 98% dos isolados encontrados como sendo clinicamente significantes em hemoculturas, as mesmas três espécies representaram 98% das espécies tidas como contaminantes (WEINSTEIN, 1998).

Na tentativa de diferenciar bacteremia verdadeira de contaminação, vários estudos clínicos e microbiológicos estão sendo realizados. Algumas das características utilizadas por estes manuais incluem a tipagem do microrganismo, a probabilidade dos sinais clínicos do paciente estarem associados com o provável patógeno, o número de frascos positivos, presença de múltiplos microrganismos da pele, cultura de sangue obtida durante antibioticoterapia efetiva e número de hemoculturas adicionais sem crescimento.

A ocorrência de mais de um frasco de hemocultura positivo vinha sendo utilizada como um bom parâmetro para a identificação de bacteremias verdadeiras. No entanto, publicações da última década indicaram que cerca de 34% dos pacientes com bacteremia nosocomial têm apenas uma hemocultura positiva. O uso deste parâmetro sozinho como diagnóstico pode levar a uma interpretação errada de bacteremia verdadeira (MIRRET, 2001).

Quando mais de um frasco de hemocultura está positivo, o isolamento da mesma espécie de ECN nos diferentes frascos aumenta a probabilidade de bacteremia verdadeira. No entanto, como *S. epidermidis* é a espécie mais isolada em hemoculturas e é o mais importante representante da microbiota da pele, esta estratégia é válida quando espécies outras que *S. epidermidis* são isoladas. (GARCÍA, 2004).

2.6.3 Endocardite

Os estafilococos são responsáveis por 20 a 35% dos casos de endocardite infecciosa de válvula nativa em não usuários de drogas intravenosas e, destes casos, a vasta maioria envolve *S. aureus*. Entre os ECN, *S. epidermidis* é a espécie mais freqüente e pode causar endocardite de válvula nativa e, mais comumente, endocardite de válvula protética (PATEL, 2000). Endocardite de válvula nativa por ECN é relativamente rara (não mais que 5% de todas as infecções de válvula nativa) e é caracterizada por um curso clínico indolente. Embora *S. epidermidis* seja a espécie mais comum, um número de outras espécies, como *S. warneri* e *S. lugdunensis*, tem sido encontrados. Nas endocardites de válvula protética, os ECN são responsáveis por 40 a 50% dos casos e infecções por espécies diferentes de *S. epidermidis* são raras (HUEBNER, 1999).

Sandoe e colaboradores (1999) relataram dois casos de endocardite de válvula cardíaca nativa causados por *S. capitis*. Os pacientes foram tratados com uso prolongado de vancomicina e rifampicina, não necessitando de cirurgia na fase aguda da doença. Este trabalho enfatiza o potencial dos *S. capitis* em causarem sérias infecções de válvulas cardíacas nativas em pacientes imunocompetentes com doenças valvulares.

Em 2000, Kraghsbjerg e colaboradores relataram um caso de artrite bacteriana, osteomielite vertebral, e evolução para endocardite causada por *S. lugdunensis* em

paciente de 79 anos. Foram colhidas 10 amostras (entre hemocultura e líquido de articulações) para cultura e todas apresentaram o mesmo perfil quando analisadas pela técnica de PFGE. O paciente veio a óbito após dois anos e meio de tratamento. Este caso ilustra a capacidade de *S. lugdunensis* causar endocardite e a dificuldade de controlar a infecção até quando antimicrobianos são utilizados de acordo com os resultados do TSA.

Patel et al. (2000) determinaram em seu estudo a prevalência de *S. lugdunensis* entre os isolados clínicos de estafilococos causadores de endocardite, na Clínica Mayo em Rochester, Minnessota, no período de 1980 e 1999. Foram estudados ao todo 89 estafilococos, dos quais 22 foram identificados como ECN e 4 como *S. lugdunensis*. Concluíram que esta espécie foi responsável por 18% das endocardites causadas por ECN e por 44% das endocardites de válvula nativa causadas por ECN.

2.7 IDENTIFICAÇÃO DOS ECN

Os estafilococos coagulase-negativa (ECN) foram primeiramente descritos como patógenos na década de 50, com a prática das cirurgias cardiovasculares, onde técnicas de implantação de próteses foram desenvolvidas. Os relatos de ECN até os anos 70 são escassos, já que eram quase que exclusivamente reconhecidos como contaminantes provenientes da microbiota cutânea (THYLEFORS, 1998).

Durante os últimos 20 anos, o número de documentações de infecções causadas pelos ECN aumentou significativamente, principalmente *Staphylococcus epidermidis*, a causa mais comum de infecção da corrente circulatória nosocomial primária (SILVA, 2000). Devido ao potencial patogênico dos ECN dentro do ambiente hospitalar, o interesse pela variedade de espécies relacionadas às infecções, pelo potencial toxigênico e pela virulência dessas bactérias tem sido motivo de muitos estudos e publicações (CUNHA, SINZATO e SILVEIRA, 2004).

O esquema de identificação das espécies de ECN proposto por Kloss e Schleifer (1975) e modificado por Bannerman (2003) é o método mais utilizado para a diferenciação das espécies; no entanto, este método é trabalhoso devido à quantidade de testes bioquímicos necessários para sua realização em um laboratório de rotina.

Na tentativa de facilitar a identificação das espécies de ECN, alguns sistemas comerciais foram criados; porém, estas metodologias apresentam problemas com relação ao custo e tempo de incubação, além de não serem específicas para isolados clínicos (De PAULIS, 2003).

Em 1995, Leven e colaboradores montaram um esquema de identificação composto de duas etapas. Na primeira etapa são realizados os testes de fermentação da trehalose, urease e fosfatase alcalina; na segunda etapa, realizada somente se provas complementares fossem necessárias para a identificação da espécie, são realizados os testes da descarboxilação da ornitina, crescimento em anaerobiose, susceptibilidade à novobiocina e fosfomicina. No estudo apresentado pelos autores, este novo esquema proposto identificou corretamente 97,7% dos isolados, onde 81,3% puderam ser identificados dentro de 4 horas com base nos três primeiros testes. Este esquema não inclui a identificação de *S. cohnii* e *S. xylosus*, duas espécies que apesar da baixa relevância entre os demais ECN, podem ser identificados pelos laboratórios clínicos.

O método descrito por Mulder (1995) tem como objetivo estabelecer um esquema para diferenciar *S. epidermidis* e *S. hominis* dos outros ECN. Os testes usados para esta identificação são susceptibilidade à desferroxamina, fermentação da trehalose, sacarose e manitol. Entre os ECN, somente *S. epidermidis* e *S. hominis* são inibidos pela desferroxamina. Como a espécie mais frequentemente isolada entre os ECN é *S. epidermidis* (75%), este esquema é capaz de identificar mais da metade das espécies envolvidas em infecções nosocomiais. Portanto, é considerada uma metodologia de fácil execução, baixo custo e de boa qualidade.

Outra metodologia descrita por Monsen et al (1998) propôs um esquema confiável e de baixo custo para a identificação de espécies de estafilococos coagulase-positiva e coagulase-negativa isoladas na prática clínica. Entre os testes bioquímicos utilizados estão a urease, β -galactosidade, fermentação da maltose, manose, trehalose, manitol, sacarose e ribose. Para o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos foram utilizados: furazolidona, desferroxamina, polimixina B, novobiocina e bacitracina. No trabalho apresentado pelos autores, o esquema proposto identificou 96,6% das espécies e vários isolados que tiveram problemas na identificação pelo esquema convencional de Kloss e Schleifer (1975) ou pelo sistema comercial foram identificados com a adição de testes de susceptibilidade aos antimicrobianos incluídos neste esquema.

Ainda tendo como objetivo a definição de um esquema simples, fácil e rápido para a identificação dos ECN pelos laboratórios clínicos, De PAULIS (2003) chegou ao que definiu como esquema simples de cinco testes, o qual é formado pelas seguintes provas: resistência à novobiocina, urease, fermentação da manose, L-pirrolidonil- β -naftilamida (PYR) e descarboxilação da ornitina. Estas provas definiram grupos de espécies ou a espécie propriamente dita e a adição de um ou dois testes dentro de cada grupo particular de espécies podia completar a identificação do isolado. No trabalho realizado pelos autores, o método proposto identificou 195 dos 200 ECN (97,5%) isolados, mostrando ser um método muito útil para os laboratórios de microbiologia clínica.

Um ano depois, no Brasil, nova chave de identificação foi organizada por CUNHA, SINZATO e SILVEIRA (2004). O método, que ficou conhecido como método simplificado, é dividido em duas etapas. Durante a primeira etapa, fermentação da xylose, sacarose, trehalose, maltose, manitol, produção de hemolisinas e crescimento anaeróbio em thioglicolato são testados. Os testes realizados na segunda etapa variam de acordo com os resultados obtidos na primeira etapa e são produção de urease, redução de nitrato, fermentação da β -D-frutose, descarboxilação da ornitina e resistência à novobiocina. Este método foi comparado com o método de referência proposto por Kloos e Schleifer (1975) e Bannerman (2003) e apresentou 100% de concordância na identificação correta das espécies, sendo então considerado altamente eficiente para uso na rotina devido à sua sensibilidade e especificidade, além de utilizar poucos testes e assim sendo mais econômico e rápido que o método de referência, liberando o resultado em 72 horas.

Sistemas automatizados ainda não são capazes de fazer uma diferenciação confiável entre as diferentes espécies de ECN devido à expressão variável das características fenotípicas. Isto pôde ser confirmado por Weinstein e colaboradores (1998) em um estudo com painéis do MicroScan (rápido e convencional) para a identificação de Gram-positivos. Eles chegaram à conclusão de que esta metodologia foi capaz de identificar corretamente 95,7% e 85,6% dos isolados de *S. epidermidis* pelo método rápido e convencional, respectivamente, mas apresentou problemas na identificação das outras espécies.

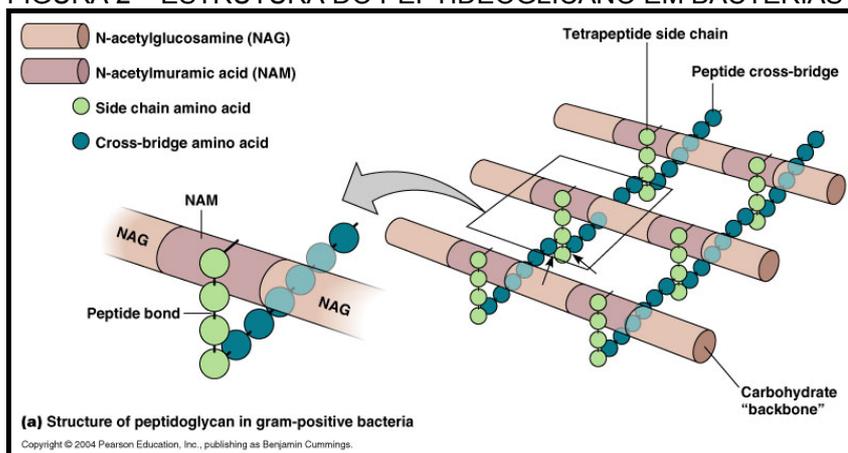
2.8 RESISTÊNCIA À OXACILINA

O aumento no número de infecções hospitalares causadas por ECN nos últimos anos e sua freqüente resistência às penicilinas resistentes às penicilinases (metecilina e oxacilina), a qual indica resistência cruzada com todas as classes de beta-lactâmicos incluindo cefalosporinas, têm sido fonte de estudo de muitos pesquisadores em todo o mundo (De GIUSTI, 1999). Embora a maioria dos isolados de ECN clinicamente significantes apresentem resistência aos beta-lactâmicos, essas drogas oferecem vantagens pelas suas propriedades farmacocinéticas favoráveis e baixo custo, sendo então recomendadas para o tratamento de isolados sensíveis (GRAHAN, 2000).

A resistência dos ECN à oxacilina está geralmente acompanhada da resistência a múltiplos agentes antimicrobianos, e este fato tem como consequência o aumento no uso de glicopeptídeos para terapia empírica e até mesmo profilaxia. No entanto, a seleção de resistência aos glicopeptídeos e a potencial transmissão de tal resistência entre espécies tem nos mostrado a necessidade do uso restrito desses antimicrobianos (De GIUSTI, 1999). Estes dados enfatizam a necessidade de realizarmos os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos e identificarmos os ECN metecilina resistentes o mais precocemente possível, para que possamos utilizar os agentes beta-lactâmicos quando estes apresentarem-se sensíveis, diminuindo, com isso, o uso desnecessário de glicopeptídeos (HUSSAIN, 2002).

O mecanismo pelo qual a oxacilina inibe o crescimento bacteriano dos *Staphylococcus* está baseado na inibição da síntese da parede celular pela ligação deste antimicrobiano à proteína ligadora de penicilina (PBP) presente na parede celular destes microrganismos. Estas proteínas possuem atividade bioquímica mecanicamente similar à das serina proteases, pois catalizam a reação de transpeptidase que faz a ligação cruzada dos peptidoglicanos da parede celular (FIGURA 2). As quatro principais PBPs são PBP 1, 2, 3 e 4 e são produzidas tanto por isolados de *Staphylococcus* sensíveis como resistentes (CHAMBERS, 1997).

FIGURA 2 – ESTRUTURA DO PEPTIDEOGLICANO EM BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS

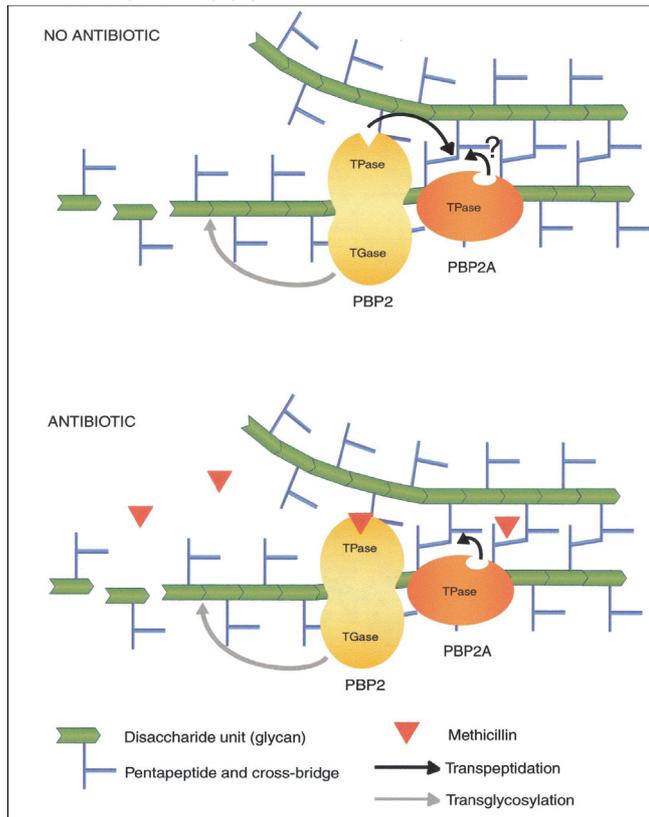


FORNE: DECKER, J. **Biofilms: Microbial Communities and Infectious Disease**. Disponível em: <<http://microvet.arizona.edu/Courses/MIC438/decker/biofilms/biofilms.html>> Acesso em 28/02/2006.

A produção de PBP 2a, uma proteína ligadora de penicilina com característica de extrema baixa afinidade aos antimicrobianos beta-lactâmicos, é, sem dúvida, o principal mecanismo responsável pela resistência à oxacilina, embora outros mecanismos tenham sido descritos, como alteração de PBPs outras que PBP 2 e a hiperprodução de beta-lactamases (JARLOV, 1997; De GIUSTI, 1999).

Em 2004, Pinho, Lencastre e Tomasz demonstraram em seu trabalho que para que ocorra uma completa expressão da resistência à oxacilina, o gene estrutural da PBP 2 possui função essencial como gene auxiliar. Como podemos observar na FIGURA 3, na ausência de antibiótico, ambos os domínios TPase (transpeptidase) e TGase (transglicosilase) da PBP 2 participam da biosíntese do peptidoglicano nos estafilococos. O que ainda não está claro é se o domínio TPase da PBP 2a (presente nos isolados oxacilina resistentes) também funciona nas ligações cruzadas do peptidoglicano na ausência de antibiótico no meio. Quando o antibiótico é adicionado, o domínio TPase da PBP 2 é acilado e não é mais capaz de realizar a ligação cruzada dos peptídeos. No entanto, as observações descritas no artigo demonstram que o domínio TGase da PBP 2 mantém-se funcional e coopera com a atividade da TPase da PBP 2a adquirida e é realmente essencial para a síntese da parede celular e crescimento bacteriano na presença de antimicrobianos beta-lactâmicos no meio. Os autores também enfatizam, com isso, a necessidade da busca de novos antimicrobianos que atuem no domínio TGase.

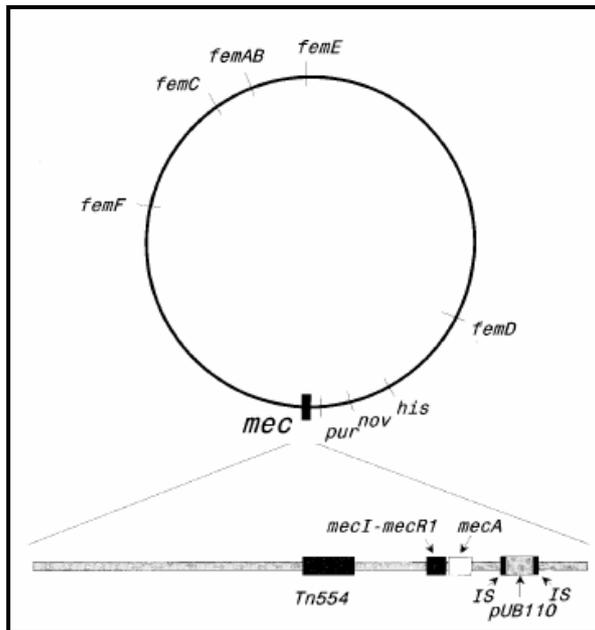
FIGURA 3 – ATUAÇÃO DA PBP 2 E PBP 2A NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE ANTIMICROBIANOS BETA-LACTÂMICOS



FONTE: PINHO, M.G.; LENCASTRE, H. e TOMASZ, A. An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococcy. *PNAS*, v. 98, n. 19, sept 2001, p. 10.886-10.891.

O determinante estrutural que codifica a proteína alterada denominada PBP 2a é chamado de *mecA* e está presente em um DNA cromossomal adicional de aproximadamente 30 a 50 kb denominado complexo *mec*, não encontrado em isolados sensíveis de estafilococos, mas presente nos isolados meticilina resistentes; é sempre encontrado próximo ao *cluster pur-nov-his* no cromossomo dos *S. aureus*. Elementos reguladores que controlam a transcrição do *mecA* também presentes são *mecl* e *mecR1* e mais 20 a 45 kb de DNA está associado ao complexo *mec* (CHAMBERS, 1997). Um número de genes denominados *fem* (fator essencial para a expressão da resistência à meticilina) foi identificado no cromossomo dos *S. aureus*, dos quais *femAB* aparecem como sendo o mais importante. A inativação deste gene restaura totalmente a susceptibilidade à meticilina nos isolados de MRSA. Genes como *femAB* também têm sido identificados nos *S. epidermidis* (FIGURA 4) (CARBON, 2000).

FIGURA 4 – ORGANIZAÇÃO MOLECULAR DO COMPLEXO *mec* E SUA LOCALIZAÇÃO CROMOSSOMAL RELATIVA AOS FATORES *fem* E *pur-nov-his*.



FONTE: CHAMBERS, H.F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 4, oct. 1997, p. 781-791.

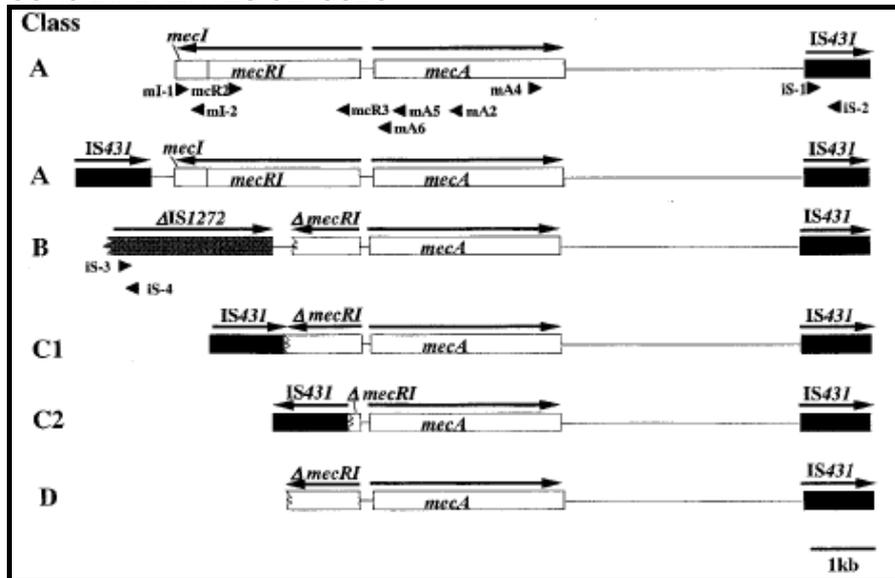
NOTA: IS indica os elementos IS431 (o mesmo que IS257) ladeando o plasmídeo de resistência à tobramicina pUB110. Tn554 é um transposon contendo o gene *ermA*, codificando resistência induzida à eritromicina.

O gene *mecR1* codifica um indutor transmembrana do *mecA* constituído dos domínios atravessador de membrana (MS) e ligador de penicilina (PB). O gene *mecI* codifica um forte repressor do *mecA*. Os genes *mecR1* e *mecI* possuem alto grau de homologia com os genes *blaR1* e *blal*, que regulam a produção de beta-lactamases e estudos têm demonstrado a capacidade do complexo *blaR1-blal* em regular a expressão do gene *mecA*. Isolados que possuem uma disfunção na região regulatória podem expressar *mecA* constitutivamente, ou podem usar os genes reguladores da beta-lactamase para melhor expressar *mecA*, já que *BlaR1* é um forte indutor do *mecA* e *Blal* é um fraco repressor (LIM, 2002).

Estudos na região *mecR1* e *mecI* têm mostrado que há uma considerável diversidade genômica no complexo *mec* (FIGURA 5). O complexo classe A possui os genes *mecR1* e *mecI* intactos. No complexo classe B o domínio PB do *mecR1* e o gene completo *mecI* estão truncados por uma cópia parcial de IS1272. O complexo classe C tem duas variantes, C1 e C2. No complexo classe C1, o domínio PB do *mecR1* e o *mecI* inteiro estão truncados pelo IS431, e no complexo classe C2, ambos os domínios MS e PB do *mecR1* bem como o *mecI* estão truncados por

IS431. No complexo classe D, *mecI* está deletado e o domínio PB do *mecR1* está truncado. O complexo *mec* é parte de uma longa região conhecida como cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) e cinco tipos de (SCC*mec*) têm sido descritos (LIM, 2002).

FIGURA 5 – ORGANIZAÇÃO GENÉTICA DO COMPLEXO GENE *mecA* EM ESTAFILOCOCOS E SUAS DIFERENTES CLASSES



FONTE: KATAYAMA, Y; ITO, T e HIRAMATSU, K. Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 7, July 2001, p. 1955-1963.

Uma característica dos *S. haemolyticus* que pode ser vista na FIGURA 5 (segundo exemplo) é a presença de uma cópia da estrutura IS431, chamada IS431L, localizada acima do complexo *mec*. A estrutura total IS431-*mecA*-IS431 lembra a estrutura de um transposon mas não há evidências para sustentar esta hipótese. O que parece mais provável é que a estrutura IS431L-complexo *mec* tenha sido construída pela inserção de uma cópia de IS431 acima do complexo *mec* após este complexo ter sido integrado no SCC para formar o SCC*mec*. Embora a estrutura seja reconhecida preferencialmente em isolados *S. haemolyticus*, não é exclusiva desta espécie, pois já foi identificada em *Staphylococcus sciuri* (KATAYAMA, 2001).

O gene *mecA* apresenta altos níveis de homologia no MRSA (*Staphylococcus aureus* metilina resistente) e nos ECN metilina/oxacilina resistentes. Sua origem ainda é obscura. Um gene *mecA* homólogo com 88% de similaridade entre os

aminoácidos com o gene *mecA* dos estafilococos oxacilina resistentes foi identificado no *Staphylococcus sciuri*. Um fato interessante é que este gene homólogo é ubíquo nesta espécie, mas seu genótipo é sensível. Este e outros dados sustentam a hipótese de que o gene *mecA* é originário de espécies de ECN, possivelmente uma espécie evolucionariamente próxima do *S. sciuri* (CHAMBERS, 1997).

Uma característica distinta da resistência à oxacilina é sua natureza heterogênea, onde o grau de resistência varia de acordo com as condições do meio de cultura e do antimicrobiano beta-lactâmico em uso. A maioria das células nos isolados heterogêneos (tipicamente 99% ou mais) são sensíveis a baixas concentrações de antimicrobianos beta-lactâmicos, p. ex. 1 a 5 µg/mL de metilicina, com somente uma pequena proporção de células (p. ex. 1 em 10⁶) crescendo em concentrações de metilicina de 50 µg/mL ou mais. A maioria dos isolados clínicos exibem este padrão heterogêneo de resistência sob condições de crescimento de rotina. Isolados heterogêneos podem, no entanto, aparecerem homogêneos (p. ex. 1% ou mais da células crescendo em 50 µg/mL) quando certas condições de cultura são alteradas, como crescimento em meio de cultura hipertônico suplementado com NaCl ou sacarose ou incubação à 30°C. A adição de EDTA (pH 5.2) ou incubação de 37 a 43°C favorece o padrão heterogêneo e pode suprimir totalmente a resistência (CHAMBERS, 1997).

A natureza heterogênea da resistência à oxacilina é uma limitação inerente da acurácia dos testes de susceptibilidade. Os métodos mais utilizados para detecção dessa resistência contam com modificações das condições de cultura para aumentar a expressão da resistência, principalmente para os ECN, onde estes métodos apresentam maiores problemas para detectar a resistência à oxacilina, em comparação com os MRSA. O CLSI/NCCLS revisa periodicamente os testes para detecção de resistência à oxacilina em estafilococos, e esta fonte deve ser consultada para utilizarmos as recomendações específicas de cada teste. Trata-se de uma instituição norte-americana na qual, pela inexistência de uma padronização brasileira, os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos são baseados neste país.

2.8.1 Testes para Detecção de Resistência à Oxacilina

2.8.1.1 Disco difusão

O teste de disco difusão é o método menos confiável para a detecção da resistência à oxacilina (YORK, 1996), embora seja o mais utilizado pelos laboratórios de microbiologia clínica por sua fácil e rápida execução e pelo baixo custo. Apresenta baixa especificidade quando comparado com outros testes, como descrito no trabalho publicado por Hussain et al. (2002), onde foi utilizado disco de 1µg de oxacilina e seguidas as recomendações do CLSI/NCCLS. A sensibilidade encontrada foi de 99,4% e a especificidade de 91,8%. O uso de discos de beta-lactâmicos outros que oxacilina, especialmente cefalosporinas, não é recomendado porque seu uso reduz a acurácia do teste. A incubação prolongada do teste pode aumentar a sensibilidade na detecção de isolados heterogêneos de ECN sem afetar consideravelmente a especificidade (CHAMBERS, 1997).

Em 2004, o CLSI/NCCLS passou a recomendar o uso do disco de cefoxitina para prever a susceptibilidade à oxacilina pelo teste de disco difusão e incluiu uma seção para o novo teste na tabela 2C em ambas as seções de disco difusão (M2) e CIM (M7) do documento M100-S14. Estas alterações foram baseadas em um estudo realizado por Swenson et al. e posteriormente publicado em 2005. O estudo foi composto de três fases, onde a sensibilidade e a especificidade para os ECN na segunda fase foram de 99% e 96%, respectivamente. Os pontos de corte utilizados foram ≤ 24 para os isolados sensíveis e ≥ 25 para os resistentes. Já na fase três a sensibilidade foi de 69%, devido à influência de isolados de *S. simulans* no grupo em estudo. Este teste foi originalmente proposto por Mougeot, Guillaumat-Taillet e Libert (2001) e posteriormente estudado por Felten e colaboradores em 2002.

Staphylococcus lugdunensis é a única espécie entre os ECN que possui pontos de corte para a oxacilina e cefoxitina iguais aos utilizados para *S. aureus*. Esta nova classificação foi incluída no documento do CLSI/NCCLS 2005, após publicação de estudos que observaram resultados discrepantes para o presença do gene *mecA* e a CIM destas espécies (HUSSAIN(a), 2000). *S. lugdunensis* apresenta algumas propriedades semelhantes aos *S. aureus*, como a enzima coagulase ligada, resultando em testes de coagulase em lâmina ou testes de aglutinação em látex positivos para alguns isolados. Dependendo do método utilizado no laboratório para

a identificação de estafilococos, *S. lugdunensis* pode ser erroneamente classificado como *S. aureus*. Além disso, a agressividade com que causam infecções e a presença de fatores de virulência semelhantes aos *S. aureus* levaram a esta nova classificação pelo CLSI/NCCLS (ANGUERA, 2005).

Em 2005, um estudo publicado por Frigatto e colaboradores mostrou cinco isolados com resultados discrepantes entre a oxacilina e a cefoxitina pelo método de disco difusão, os quais se apresentavam resistentes para a oxacilina e sensíveis para a cefoxitina. Todos os isolados foram identificados como *S. epidermidis* e apresentaram padrões distintos pela ribotipagem, descartando a possibilidade de um surto causado por um isolado com fenótipo incomum. A presença do gene *mecA* foi confirmada pela PCR em todos os isolados. Com isto, este estudo ressalta a importância de se testar o disco de oxacilina concomitantemente e utilizar técnicas moleculares para confirmar o resultado.

2.8.1.2 Detecção da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Como já foi mencionado, os estafilococos expressam a resistência à oxacilina de forma heterogênea, isto é, apenas uma em 10^4 a 10^8 das células, e isto frequentemente dificulta a identificação de isolados *mecA* positivos, principalmente em ECN (HUSSAIN(b), 2000). Esta dificuldade persiste mesmo quando utilizamos métodos para detecção da concentração inibitória mínima (CIM), a qual é definida como sendo a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microrganismo em testes de susceptibilidade por diluição em caldo ou em ágar (GRADELSKI, 2001; NCCLS, 2003).

No teste de diluição em ágar o agente antimicrobiano é incorporado ao meio e cada placa contém uma concentração diferente do agente. Já o teste de diluição em caldo pode ser feito por macrodiluição ou microdiluição, utilizando-se o caldo Mueller-Hinton. A diferença entre ambos é que o teste de macrodiluição é feito em tubos de ensaio e o teste de microdiluição envolve o uso de pequenos volumes de caldo (0,1 mL) colocados em placas de plástico estéreis, próprias para microdiluição (NCCLS, 2003).

Um estudo feito por Marshall et al. (1998) mostrou problemas com os pontos de corte para a oxacilina até então utilizados pelo CLSI/NCCLS, uma vez que a concentração ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$ que definia isolados resistentes para *S. aureus* e ECN

apresentava baixa sensibilidade e era incapaz de classificar muitos isolados de *mecA* positivos entre os ECN. Em acordo com o estudo, o CLSI/NCCLS em 1999 redefiniu os pontos de corte para os ECN, onde então organismos para os quais a CIM fosse $\geq 0,5$ $\mu\text{g/mL}$ seriam considerados resistentes e para aqueles onde a CIM fosse $\leq 0,25$ $\mu\text{g/mL}$ seriam considerados sensíveis.

Hussain e colaboradores (2000-a), correlacionaram em seu estudo a CIM para a oxacilina e a presença do gene *mecA* por PCR. Concluíram que os novos pontos de corte para a oxacilina classificaram corretamente isolados de *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. hominis* com ou sem gene *mecA* como oxacilina resistentes e oxacilina sensíveis, respectivamente. No entanto, esta nova classificação teve menor acurácia quando aplicada para espécies pouco comuns como *S. cohnii*, *S. saprophyticus*, *S. warneri*, *S. lugdunensis* e *S. xylosum*. Como na prática, a vasta maioria dos ECN clinicamente significantes são *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. hominis*, os erros de interpretação são relativamente baixos (MARSHALL, 1998).

2.8.1.3 Teste de triagem em ágar com oxacilina

O teste de triagem em ágar consiste no preparo de placas contendo ágar Mueller-Hinton acrescidas de 4% de NaCl e 6 $\mu\text{g/mL}$ de oxacilina. O inóculo bacteriano é preparado em salina segundo a escala 0,5 de McFarland (10^8 UFC/mL) e inoculado no meio com a ajuda de um *swab*.

Swenson e colaboradores (2001) também testaram quatro métodos de inoculação no ágar de triagem, sendo (1) depósito em uma área de 10 a 15 mm de diâmetro utilizando um “*swab*” embebido na suspensão e isento de excesso de líquido, (2) estriamento de um quadrante com o auxílio de um “*swab*” preparado como descrito acima, (3) depósito em uma área de 10 a 15 mm de diâmetro utilizando uma ponteira de 1 μl e (4) depósito de 10 μl utilizando uma micropipeta. O método que apresentou melhor combinação entre sensibilidade (95 a 100%) e especificidade (97%) pelos leitores do teste foi o que utiliza uma ponteira de 1 μl . Os pesquisadores chegaram à conclusão de que o uso de um inóculo maior que 1- μl ou inóculo maior que aquele alcançado com um “*swab*” não é recomendado por diminuir muito a especificidade do teste.

O método de triagem em ágar foi avaliado por Tenover et al. (1999) para a detecção de resistência à oxacilina apenas entre os ECN. Foram testados 50 isolados em 11 laboratórios e comparados seus resultados com os resultados da PCR para o gene *mecA* realizada em três laboratórios diferentes. Em contraste com alguns estudos anteriores (YORK,1996), o método apresentou baixa sensibilidade até quando um inóculo maior foi utilizado (*swab* molhado) e a placa incubada por 48 horas. Com isso, os autores sugeriram que o método de triagem em ágar fosse reservado exclusivamente para a detecção de gene *mecA* em *S. aureus* e seu uso para os ECN foi desencorajado pelo documento do CLSI/NCCLS em 1999.

Ferreira et al. (2003) avaliaram a susceptibilidade de 152 ECN à oxacilina pelos métodos de disco difusão, ágar diluição, Etest, teste de aglutinação em látex (Slidex MRSA, BioMérieux, França), PCR para o gene *mecA* e triagem em ágar realizado em placas contendo 1, 2, 4 e 6 µg/mL de oxacilina e incubação de 24 e 48 horas. Os resultados mostraram que o ágar screening com 4 µg/mL de oxacilina e incubação de 48 horas apresentou 100% de sensibilidade e 100% de especificidade, sendo este o método mais acurado para a detecção da resistência à oxacilina entre os ECN testados. Além disso, foi considerado um método barato e de fácil execução.

Em 2004, um estudo realizado em Porto Alegre (RS) testou a resistência à oxacilina em 175 ECN isolados de pacientes hospitalizados. Os métodos utilizados foram disco difusão, triagem em ágar com 0,6 µg/mL e 4 µg/mL de oxacilina e o sistema automatizado MicroScan. Os resultados foram comparados com a técnica de PCR para detecção do gene *mecA*. O teste de triagem com 4 µg/mL de oxacilina foi o método que apresentou melhor acurácia, identificando corretamente a resistência mesmo nas espécies de ECN menos comuns. Os autores consideraram este método uma opção tecnicamente simples para ser utilizada pelos laboratórios clínicos de rotina (CAIERÃO, 2004).

2.8.1.4 Teste de Aglutinação em Látex

O teste de aglutinação em látex para detecção da proteína PBP 2a, produto da expressão do gene *mecA*, foi recomendado para caracterização de isolados de ECN resistentes à oxacilina outros que não *S. epidermidis* envolvidos em infecções

de sítios estéreis no documento do CLSI/NCCLS em 2002. Essa foi a alternativa apresentada para os laboratórios que não possuem a técnica de PCR para detecção do gene *mecA*, já que os métodos descritos anteriormente não são confiáveis para detectar a resistência à oxacilina nestas outras espécies. A principal vantagem apresentada pelo teste com relação aos demais métodos fenotípicos é a de não ser influenciado pelos vários níveis de expressão da resistência, um parâmetro que torna métodos clássicos e automatizados menos acurados na detecção de cepas com alta resistência heterogênea (CAVASSINI, 1999).

A técnica de aglutinação rápida em lâmina de látex, MRSA-Screen (Denka Seiken, Japão) é de fácil execução, porém vários trabalhos vêm sendo publicados com o objetivo de melhorar sua sensibilidade e especificidade pela modificação de alguns procedimentos técnicos. Hussain e colaboradores (2000-b) avaliaram a capacidade do teste em detectar a resistência à oxacilina entre uma variedade de espécies de ECN. O teste foi realizado após a indução com disco de oxacilina 1 µg e a leitura realizada após 3, 6 e 15 minutos. O teste foi positivo dentro de 3 minutos para todos os isolados *mecA* positivos (251) após indução com oxacilina. Simultaneamente, 125 isolados *mecA* positivos conhecidos foram testados sem indução e apenas 57,6% tiveram resultado positivo e necessitaram de 3 a 15 minutos para a reação. Com isso, concluíram que para uma detecção confiável da resistência à oxacilina pelo MRSA-Screen em ECN, a indução do gene *mecA* parece ser necessária. Zbinden et al. (2001) confirmaram a importância da indução em substituição ao aumento no tempo de reação para evitar resultados falso-positivos.

Louie e colaboradores (2001) avaliaram o MRSA-Screen em 200 isolados clínicos de ECN provenientes de sítios estéreis. Os resultados foram comparados com a PCR e a aglutinação em látex mostrou-se acurada e rápida na determinação da presença do gene *mecA* em *S. epidermidis* e na maioria das espécies de ECN. Também concluíram que a indução com oxacilina pode ser desnecessária se um inóculo inicial mais pesado for usado. Horstkotte et al. (2001) preferem utilizar um inóculo mais pesado à indução com oxacilina, já que este segundo procedimento requer subcultivo e pode atrasar os resultados em 24 horas.

Em 2004, Corso e colaboradores avaliaram o MRSA-Screen para a detecção de isolados oxacilina resistentes em ECN e chegaram à conclusão de que usando um inóculo pesado ou induzindo com oxacilina, todos os isolados positivos para o gene *mecA* por PCR foram detectados como positivo pelo MRSA-Screen, e todos os

isolados negativos para o gene *mecA* permaneceram negativos no teste de aglutinação. Os dados apresentados indicaram que a detecção da resistência à oxacilina em ECN pelo MRSA-Screen é melhorada tanto pela indução da expressão do gene *mecA* com oxacilina quanto pela utilização de inóculo pesado, portanto, o teste continua sendo uma alternativa eficaz à PCR na detecção de resistência à oxacilina em ECN.

2.8.1.5 Teste em Aparelhos Automatizados

Os sistemas comerciais automatizados ou semi-automatizados são comumente utilizados como testes rápidos de sensibilidade aos antimicrobianos. O sistema Vitek 2 (bioMérieux, França) é um dos mais utilizados entre os aparelhos automatizados, pois possui monitoramento contínuo da cinética de crescimento dos microrganismos e um algoritmo que calcula a CIM (Bémer, 2005). Outro aparelho utilizado é o MicroScan (Dade Behring, Califórnia), o qual foi avaliado por Swenson e colaboradores (2001), onde compararam oito métodos para detecção de resistência à oxacilina em *S. aureus*, entre eles o MicroScan com painel convencional e o MicroScan painel rápido. A sensibilidade e especificidade encontradas para o MicroScan painel rápido foi superior a 90% e inferior a 90%, respectivamente. Já o painel convencional identificou corretamente apenas 5 dos 19 isolados *mecA* positivos.

Louie et al (2001) analisaram dois cartões utilizados no sistema automatizado Vitek para sensibilidade a antimicrobianos, GPS-SV e GPS-107. Um total de 200 isolados clínicos de ECN recuperados de hemoculturas e sítios estéreis foi selecionado para teste. Outros métodos utilizados no trabalho foram o teste de aglutinação em látex, triagem em ágar com oxacilina, determinação da CIM pelo método de *Etest* e multiplex PCR para os genes *mecA* e *nucA*. A sensibilidade e especificidade apresentadas pelo cartão GPS-SV foi de 98% e 87%, respectivamente e para o GPS-107 os resultados foram de 100% e 61%, respectivamente. Os autores concluíram que ambos os cartões foram capazes de detectar com acurácia a resistência à oxacilina em ECN quando *S. saprophyticus* e *S. lugdunensis* foram excluídos da avaliação.

Tendo como objetivo aumentar a sensibilidade e especificidade do sistema Vitek 2, um novo teste para detecção de resistência à oxacilina (OR) foi introduzido

no aparelho. A composição do Vitek 2 OR é comparável com o teste de triagem para a oxacilina. Em um estudo realizado por Horstkotte e colaboradores (2002), a detecção do gene *mecA* por PCR foi comparada com os resultados do teste OR e da determinação da CIM para a oxacilina no sistema Vitek 2 em 200 isolados de ECN. O teste OR apresentou alta sensibilidade e especificidade (97,5% e 98,7%, respectivamente). O Vitek 2 rapidamente reportou os resultados resistentes obtidos pela determinação da CIM e pelo teste OR (após 8 horas para em média 80% dos isolados). Comparado com os métodos fenotípicos convencionais que podem demorar até 48 horas, essa aceleração substancial do diagnóstico apresentada pelo Vitek 2 pode ter um impacto potencial na administração de antimicrobianos em infecções por ECN, encorajando o uso desse sistema para detecção de resistência à oxacilina nesses microrganismos.

2.8.1.6 PCR para detecção do gene *mecA*

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método genotípico rápido, sensível e específico utilizado na pesquisa de genes previamente conhecidos (VANNUFFEL, 1995); porém não é um método viável para os laboratórios clínicos de rotina por apresentar custo mais elevado e necessitar de espaço físico e equipamentos especiais (JARLOV, 1997; HORSTKOTTE, 2001).

Em 1991, Murakami e colaboradores utilizaram esta metodologia para a detecção de resistência à oxacilina em isolados de *S. aureus* e ECN. Uma região de 533 pb (pares de base) contendo o gene *mecA* foi amplificada utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (5' AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC) correspondente aos nucleotídeos 1282 a 1303, e o outro (5' AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC) complementar aos nucleotídeos 1793 a 1814. Entre os ECN, as espécies que apresentaram o gene *mecA* foram *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. sciuri*, *S. saprophyticus* e *S. caprae*, sendo que dois *S. haemolyticus* que não apresentaram gene *mecA* foram moderadamente resistentes à oxacilina, sugerindo a presença de outro mecanismo que não a produção de PBP 2a. Para os *S. epidermidis*, quatro isolados apresentaram susceptibilidade pelo método de microdiluição em caldo, porém foram gene *mecA* positivos. Em conclusão, os autores consideraram a técnica eficaz na detecção de isolados oxacilina resistentes, incluindo aqueles com resistência heterogênea.

Atualmente, a PCR para o gene *mecA* é considerada o método padrão ouro para confirmação de isolados oxacilina resistentes e por isso é utilizada em vários estudos que analisam a sensibilidade e especificidade de diversos métodos fenotípicos (LOUIE, 2001; ZBINDEN, 2001; ALCARÁZ, 2003; FERREIRA, 2003; CORSO, 2004; CAIERÃO, 2004).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ORIGEM DAS AMOSTRAS

No período de 1º de janeiro a 30 de setembro de 2005, foram armazenados 185 estafilococos coagulase-negativa isolados de hemoculturas, culturas de ponta de cateter e cultura de válvula cardíaca de pacientes internados no Hospital de Clínicas de Curitiba. Em um primeiro momento, a coleta das amostras seguiu as orientações de um protocolo elaborado pelos autores deste trabalho (APÊNDICE 1), o qual foi apresentado em 4 unidades críticas escolhidas, sendo elas UTI adulto, UTI neonatal, Transplante de Medula Óssea (TMO) e Quimioterapia de Alto Risco (QAR).

Com o decorrer do estudo, observou-se que o número de amostras coletadas conforme o protocolo enviado era reduzido. O fato pode ser explicado pela alta rotatividade de funcionários nas unidades escolhidas, sendo que alguns deles desconheciam a existência do trabalho. Por essa razão, em um segundo momento, foi utilizado novo critério para inclusão de amostras. Com isso, os pacientes com mais de uma amostra (entre elas hemoculturas e culturas de ponta de cateter) positiva para ECN foram incluídos no estudo, independente da unidade do hospital onde estivessem internados. Duas amostras de cultura de válvula cardíaca de uma paciente internada na UTI adulto também foram incluídas no estudo. O trabalho foi apresentado e aprovado pelo CEP (Comitê de Ética em Pesquisa) do Hospital de Clínicas de Curitiba (ANEXO 1).

3.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ESTAFILOCOCOS COAGULASE-NEGATIVA

Para a confirmação do gênero estafilococos e eliminação das espécies denominadas coagulase-positivas, foram realizadas as seguintes provas: coloração de Gram, catalase, coagulase em tubo, DNase e susceptibilidade à bacitracina.

3.2.1 Coloração de Gram:

Através da coloração de Gram, analisou-se as características morfo-tinturiais dos microrganismos presentes nas amostras estudadas. Foram utilizadas como controle para esta coloração as seguintes cepas: *Escherichia coli* ATCC 25922: BGN; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923: CGP (YORK, 2004). Os corantes utilizados foram da empresa Newprov.

3.2.2 Catalase:

A detecção desta enzima foi realizada como descrito por MacFaddin, 2000. Sobre uma lâmina limpa, depositamos uma alçada de cultivo bacteriano puro e adicionamos uma gota de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A formação de bolhas foi indicativa de prova positiva e a não formação de bolhas de prova negativa. Foram utilizadas como controle as seguintes cepas: *S. aureus* ATCC 25923: positiva; *Streptococcus pyogenes* ATCC 19617: negativa (YORK, 2004). O peróxido de hidrogênio utilizado foi da empresa Newprov.

3.2.3 Coagulase:

Realizamos a pesquisa da enzima coagulase através da metodologia em tubo (pesquisa da coagulase livre), utilizando plasma de coelho liofilizado da empresa Newprov. Inoculamos uma alçada da colônia pura isolada em meio de cultura não seletivo em 0,5 mL de plasma reconstituído e incubamos a 35°C. As leituras foram realizadas após 4 e 24 horas de incubação. A formação de coágulo foi indicativa de prova positiva. Utilizamos como controle as seguintes cepas: *S. aureus* ATCC 25923: positiva; *S. epidermidis* ATCC 12228, negativa (YORK, 2004).

3.2.4 Prova da Desoxirribonuclease (DNase):

A enzima DNase foi detectada semeando-se, em forma de estria densa, colônias do microrganismo em meio para DNase, preparado segundo especificações do fabricante. Após o período de incubação de 24 horas a 35°C, o teste foi revelado com a adição de algumas gotas de HCl 1N sobre o crescimento bacteriano. A formação de uma zona clara ao redor da semeadura foi considerada prova positiva,

indicando a hidrólise do DNA, já que os oligonucleotídeos são solúveis no ágar. Utilizamos como controle as seguintes cepas: *S. aureus* ATCC 25923: positiva; *E. coli* ATCC 25922, negativa (YORK, 2004; MACFADDIN, 2000).

3.2.5 Susceptibilidade à Bacitracina:

O gênero *Micrococcus* possui as mesmas características apresentadas pelos ECN com relação às provas da catalase e coagulase, o que torna necessário a utilização de provas adicionais para sua diferenciação. Neste trabalho foi utilizada a prova de susceptibilidade à bacitracina para a separação destes dois gêneros bacterianos. Para a realização desta prova, foi preparada uma suspensão bacteriana do microrganismo em estudo (turvação equivalente ao padrão 0,5 de McFarland) e semeada sobre a superfície do ágar Mueller-Hinton e em seguida colocado sobre o ágar um disco de bacitracina de 0,04U da empresa Newprov. Após incubação de 24h a 35°C, o diâmetro do halo de inibição foi medido. Os estafilococos são resistentes à bacitracina e crescem até a borda do disco, enquanto que os micrococcos são sensíveis e apresentam halo de 10 mm ou maiores (FORBES, 2003).

3.3 CRIOPRESERVAÇÃO

As amostras bacterianas primeiramente identificadas como estafilococos coagulase-negativa foram suspensas em solução para criopreservação e armazenadas a - 80°C para a realização de testes posteriores. Os microrganismos foram preparados para o congelamento por inoculação em placas de ágar-sangue e incubação até a fase estacionária de crescimento. As colônias puras desenvolvidas na superfície do ágar foram recolhidas com alça esterilizada e transferidas diretamente para um criotubo contendo ágar infuso de cérebro e coração e 15% de glicerol e emulsionadas até uma suspensão final densa (REIMER, 2003).

3.4 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE-NEGATIVA

Partindo da identificação primária que classificou os microrganismos em estudo como estafilococos coagulase-negativa, utilizou-se uma chave para identificação das espécies proposta por Cunha, Sinzato e Silveira (2004), a qual caracteriza fenotipicamente as seguintes espécies bacterianas: *S. schleiferi* subsp *schleiferi*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. warneri*, *S. hominis* subsp *hominis*, *S. hominis* subsp *novobiosepticus*, *S. simulans*, *S. lugdunensis*, *S. capitis* subsp. *capitis*, *S. capitis* subsp. *urealyticum*, *S. cohnii* subsp. *cohnii*, *S. cohnii* subsp. *urealyticum*, *S. xylosus* e *S. caprae* (ANEXO 2). As provas utilizadas para a identificação são divididas em duas etapas, onde seis espécies já são identificadas na primeira etapa através das seguintes provas: fermentação da xylose, sacarose, trehalose, maltose e manitol, crescimento anaeróbio em thioglicolato e hemólise. As demais espécies necessitam de provas adicionais que são realizadas em uma segunda etapa, da qual fazem parte os seguintes testes: redução de nitrato, produção de urease, fermentação da β -D-frutose, descarboxilação da ornitina e resistência à novobiocina (ANEXO).

3.5 TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

O perfil de susceptibilidade dos ECN aos antimicrobianos mais utilizados na clínica foi realizada pelo método de ágar diluição para determinação da CIM. Para a detecção da resistência à oxacilina, os métodos de disco difusão, ágar diluição e o teste de triagem em ágar com oxacilina foram comparados entre si para avaliar a sensibilidade e especificidade, o grau de confiabilidade e a dificuldade de realização destas provas na rotina de um laboratório de bacteriologia.

3.5.1 Disco Difusão:

A realização deste teste foi baseada nas recomendações do CLSI/NCCLS (2005), onde inicialmente preparou-se uma suspensão bacteriana com turvação equivalente à escala 0,5 de MacFarland com o auxílio de aparelho fotométrico, a qual foi inoculada na superfície do ágar Mueller-Hinton. Os antimicrobianos utilizados foram oxacilina 1 μ g e cefoxitina 30 μ g e os discos foram depositados sobre

este meio com uma pinça estéril. As placas foram incubadas a 35°C durante 24 horas. O controle de qualidade dos discos de antimicrobianos e do meio de cultura foi realizado para cada lote através da cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e os diâmetros dos halos obtidos foram comparados aos descritos na Tabela 2C, M100-S15, do documento do CLSI/NCCLS (2005).

3.5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM):

A determinação da CIM foi realizada pelo método de ágar diluição para a oxacilina, cefoxitina, eritromicina, gentamicina, vancomicina, teicoplanina, amicacina, linezolid, sulfametoxazol/trimetoprim e ciprofloxacino. A clindamicina não foi incluída no trabalho por não termos conseguido adquirir o sal e os testes realizados com o medicamento pronto para uso não tiveram êxito. As placas de ágar Mueller-Hinton foram preparadas com o número de diluições necessárias para cada antibiótico, sendo a maior diluição duas concentrações acima da resistência e a última diluição a menor concentração da cepa padrão (QUADRO 1).

QUADRO 1 - INTERPRETAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE SEGUNDO O CLSI/NCCLS E DILUIÇÕES TESTADAS PARA CADA ANTIMICROBIANO

ANTIBIÓTICO	PONTOS DE CORTE (µg/mL)		DILUIÇÕES TESTADAS (µg/mL)
	S	R	
Oxacilina	≤ 0,25	≥ 0,5	0,12 – 2
Cefoxitina	≤ 8	≥ 32	1 – 128
Eritromicina	≤ 0,5	≥ 8	0,25 – 32
Gentamicina	≤ 4	≥ 8	0,12 – 32
Vancomicina	≤ 4	*	0,5 – 16
Teicoplanina	≤ 8	≥ 32	0,25 – 128
Amicacina	≤ 16	≥ 32	1 – 128
Linezolid	≤ 4	*	1 - 16.
Sulfametoxazol/trimetoprim	≤ 2/38	≥ 8/152	0,5/9,5 - 32/608
Ciprofloxacino	≤ 1	≥ 4	0,12 – 16

NOTA: * Recomenda-se enviar para laboratório de referência se CIM > 4

S: Sensível

R: Resistente

A concentração da solução-estoque foi calculada a partir da maior concentração testada para cada antimicrobiano, do volume de ágar Mueller-Hinton utilizado nas placas e do volume final da solução-estoque (QUADRO 2). A

quantidade em mg do antimicrobiano necessária para preparar as soluções foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Vol. do Solvente (mL)} \times \text{Conc. da Solução Estoque } (\mu\text{g/mL})}{\text{Potência do antibiótico}(\mu\text{g/mL})}$$

QUADRO 2 – DADOS DAS SOLUÇÕES-ESTOQUE PREPARADAS

AGENTE ANTIMICROBIANO	CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO ESTOQUE ($\mu\text{g/ml}$)	POTENCIA ($\mu\text{g/ml}$)	SOLVENTE UTILIZADO
Oxacilina	100 $\mu\text{g/mL}$	907	Água
Cefoxitina	6400 $\mu\text{g/mL}$	1000	Água
Eritromicina	1600 $\mu\text{g/mL}$	980	Água e ácido acético glacial
Gentamicina	1600 $\mu\text{g/mL}$	1000	Água
Vancomicina	800 $\mu\text{g/mL}$	1070	Água
Teicoplanina	6400 $\mu\text{g/mL}$	1000	Água
Amicacina	6400 $\mu\text{g/mL}$	1000	Água
Linezolida	800 $\mu\text{g/mL}$	1000	Água
Sulfametoxazol/Trimetoprim	30400/1600 $\mu\text{g/mL}$	907	Água e NaOH/Água e ácido láctico
Ciprofloxacino	800 $\mu\text{g/mL}$	1000	Água

Após o preparo, as soluções-estoque foram esterilizadas por filtração em membrana Millipore® de 0,22 μm de diâmetro, aliquotadas em frascos contendo 2 mL e estocadas a 2°C, -20°C ou -70°C conforme indicado.

As diluições dos antimicrobianos foram feitas utilizando água estéril (tipo Milli Q). A solução-estoque foi a primeira diluição a ser utilizada e, a partir desta, foram feitas diluições 1:2 até atingir a menor concentração.

Para o preparo dos meios, foi pesado ágar Mueller-Hinton em quantidade suficiente para todas as diluições dos antimicrobianos, segundo especificações do fabricante. Posteriormente foi aliquotado em frascos de rosca com boca larga ou frascos Castañeda, nas quantidades de 48 mL para sulfametoxazol/trimetoprim e 49mL para os demais antimicrobianos. Os frascos foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 minutos e depois resfriados em banho-maria até atingirem a

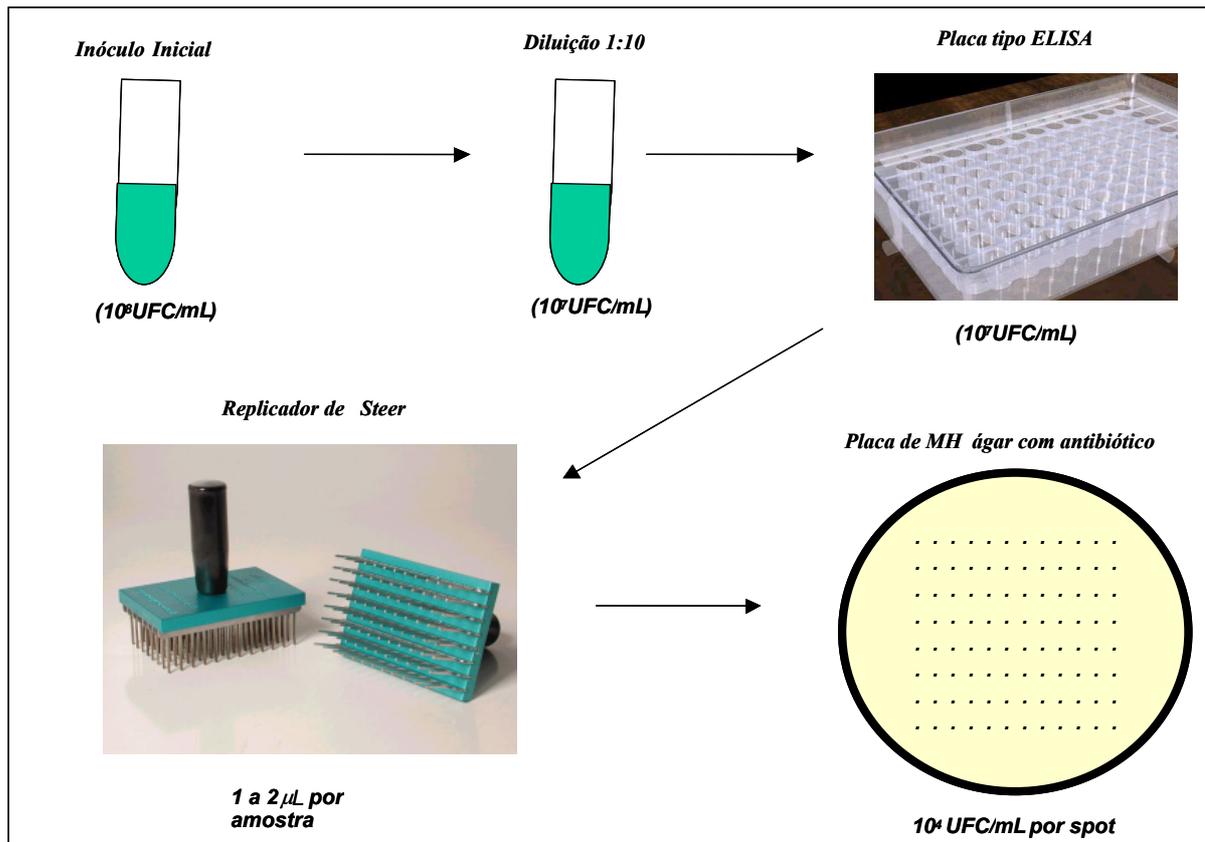
temperatura de aproximadamente 50°C. Em cada frasco foi adicionado 2 mL para sulfazotrim (1 mL de sulfametoxazol e 1 mL de trimetoprim) e 1 mL para os demais antimicrobianos, totalizando um volume de 50 mL, necessário para atingir a espessura de 4-5 mL de meio na placa. O frasco foi homogeneizado e o ágar distribuído em placa de petri de 150 mm x 15 mm. As placas foram refrigeradas e utilizadas até 48 horas após seu preparo.

Para o preparo do inóculo, uma suspensão de concentração referente ao tubo 0,5 de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) foi acertada com o auxílio de aparelho fotométrico, em absorvância de 625 nm. Como o inóculo final necessário para esta prova é de 10^4 UFC por spot de 5-8 mm de diâmetro, a suspensão bacteriana foi diluída 1:10 em solução salina estéril, com concentração final de 10^7 UFC/mL. Os inoculadores depositam 1-2 µL sobre a superfície do ágar, obtendo-se cerca de 10^4 UFC por depósito.

Foram distribuídos 100 µL de cada suspensão bacteriana em placas de ELISA de 96 poços. Com o auxílio de um multi-inoculador de 96 pinos, inoculamos as amostras primeiro em placa controle sem antibiótico para observarmos a viabilidade das amostras e na seqüência inoculamos nas demais placas com concentração crescente do antimicrobiano. No final da série de cada antimicrobiano, os isolados foram inoculados em uma placa controle sem antimicrobiano, para avaliar a contaminação e o carreamento significativo de antimicrobianos durante o procedimento. Aguardamos 30 minutos até que as placas secassem e então incubamos a 35°C por 24 horas (FIGURA 6).

Utilizou-se como controle de qualidade para este teste a cepa *S. aureus* ATCC 29213 e comparados os limites aceitáveis com aqueles apresentados na Tabela 3 do documento M7-A6 do CLSI/NCCLS (2003).

FIGURA 6 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DO TESTE DE ÁGAR DILUIÇÃO



FONTE: ITO, C. A. S. Ácido nalidíxico como marcador preditivo de susceptibilidade às fluorquinolonas em *Escherichia coli* isoladas de uroculturas. Curitiba, 2004. 100 f. **Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.**

3.5.3 Ágar de Triagem com Oxacilina:

Para o preparo do meio utilizou-se ágar Mueller-Hinton segundo especificações do fabricante, 4% de NaCl e água destilada. Aqueceu-se até ferver para dissolução do ágar, o pH foi ajustado e a esterilização realizada durante 15 minutos a 120°C . Após atingir a temperatura de aproximadamente 50°C , foi adicionado a solução de oxacilina sódica já preparada e o meio distribuído em placas de petri de 90 mm x 15 mm e conservado em geladeira até sua utilização. Para cada isolado de ECN foram testadas duas concentrações diferentes de oxacilina ($4 \mu\text{g/mL}$ e $6 \mu\text{g/mL}$). A suspensão bacteriana (escala 0,5 de MacFarland) foi inoculada por depósito com o auxílio de um *swab*. As placas foram incubadas a 35°C e a leitura realizada após 48 horas. A presença de até mesmo uma colônia foi considerada positiva (De GIUSTI, 1999).

3.6 PCR para o Gene *mecA*

3.6.1 Preparo da amostra (DNA alvo)

Os isolados testados pela técnica de PCR foram semeados em ágar não seletivo e incubados por uma noite a temperatura de 35°C. Uma suspensão bacteriana densa desses isolados foi preparada em tubos Eppendorf contendo 500 µL de água Milli-Q estéril, os quais foram fervidos por 15 minutos e centrifugados a 2000 rpm durante 5 minutos. Removemos 200 µL do sobrenadante de cada amostra, transferimos para outro tubo e estocamos à temperatura de 4°C até o momento do uso.

3.6.2 Preparo dos reagentes

A mistura de oligonucleotídeos iniciadores foi preparado pela adição de 5 µL (equivalente a 5 µg) de cada oligonucleotídeo iniciador utilizado (A1 *mecA*-1 5'CTC AGG TAC TGC TAT CCA CC 3' e A2 *mecA*-2 5'CAC TTG GTA TAT CTT CAC C 3'), ajustando o volume final da mistura em 100 µL pela adição de água Milli-Q estéril. A concentração final alcançada foi de 50 ng/µL. Os tubos foram mantidos em banho de gelo até o momento do uso e posteriormente estocados em freezer a -20°C.

A solução-mãe foi preparada pela adição de dNTPs, Taq DNA polimerase, tampão da Taq DNA polimerase, MgCl₂ e a mistura de oligonucleotídeos iniciadores em um tubo Eppendorf na ordem descrita no QUADRO 3. O volume final da solução-mãe obedeceu o número de reações a serem realizadas.

QUADRO 3– CONCENTRAÇÃO DOS REAGENTES UTILIZADOS NO PREPARO DA SOLUÇÃO-MÃE

VOLUME	100 µL	200 µL	300 µL	600 µL	1 MI
Número de reações	4	8	12	24	40
1. Água Milli-Q estéril	75	150	225	450	750
2. Tampão da Taq DNA pol. 10X	10	20	30	60	100
3. MgCl ₂ (50nM)	4	8	12	24	40
4. dATPs (10nM)	2.5	5.0	7.5	15	25
dGTPs (10nM)	2.5	5.0	7.5	15	25
dCTPs (10nM)	2.5	5.0	7.5	15	25
dTTPs (10nM)	2.5	5.0	7.5	15	25
5. PRIMER MIX	4	8	12	24	40
6. Taq DNA polimerase	0,5	1	1.5	3.0	5.0

3.6.3 Preparo da reação

Em cada tubo de reação foi distribuído 23 µL da solução-mãe e 2 µL da amostra (DNA alvo), totalizando um volume final de 25 µL. Os tubos foram transferidos para o termociclador para a realização do ciclo *mecA*, composto de 1 ciclo a 94°C por 5 minutos (desnaturação do DNA alvo), 30 ciclos a 94°C por 60 segundos (desnaturação), 52°C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 30 segundos (extensão do primer) e um ciclo a 72°C por 10 minutos (extensão final).

3.6.4 Análise dos produtos

Os produtos foram analisados em gel de agarose a 2% com tampão TBE 0,5X (adequado para análise de produtos de PCR que apresentam tamanho inferior a 1Kb) e 3% de brometo de etídio adicionado na preparação do gel. A amostra foi preparada com 8 µL de solução tampão (50 mM EDTA pH 8, 25% Ficoll e 0,25% de azul de bromofenol) e 2 µL da reação. Incluímos um Marcador de Peso Molecular (MPM) 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®). A visualização dos produtos de amplificação foi feita sob luz UV (ultravioleta) e posteriormente fotografada.

3.7 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

O cálculo da sensibilidade dos testes utilizados foi baseado no número de isolados com resultados verdadeiramente positivos dividido pelo número de isolados PCR positivos; a especificidade foi calculada pela divisão do número de isolados

com resultados verdadeiramente negativos pelo número de isolados PCR negativos. O valor preditivo positivo foi calculado pelo número de isolados com resultados verdadeiramente positivos no teste dividido pelo número total de isolados com resultados positivos no teste; já o valor preditivo negativo teve como resultado o número de isolados com resultados verdadeiramente negativos no teste dividido pelo número total de isolados com resultados negativos no teste (JEKEL, 1998).

Erro alfa foi calculado pela divisão do número de isolados falso positivos pela soma do número de isolados verdadeiramente negativos e falso positivos; erro beta pela divisão do número de resultados falso negativos pela soma dos isolados verdadeiramente positivos e falso negativos (JEKEL, 1998).

A mediana foi calculada ordenando todos os resultados e o seu valor foi aquele que deixou igual número de resultados de cada lado (DORIA FILHO, 1999).

3.8 AVALIAÇÃO DA IMPORTÂNCIA CLÍNICA DOS ECN:

As metodologias laboratoriais utilizadas para definição de infecção da corrente circulatória relacionada a cateter foram a DTP (diferença no tempo de positividade entre uma amostra de hemocultura coletada pelo cateter e outra hemocultura de sangue periférico) e a comparação entre a cultura da ponta de cateter e hemoculturas colhidas de sangue periférico.

Para a avaliação da importância clínica de ECN coletados apenas de amostras de sangue periférico avaliamos o número de amostras de hemoculturas coletadas e o número de amostras positivas por paciente por dia.

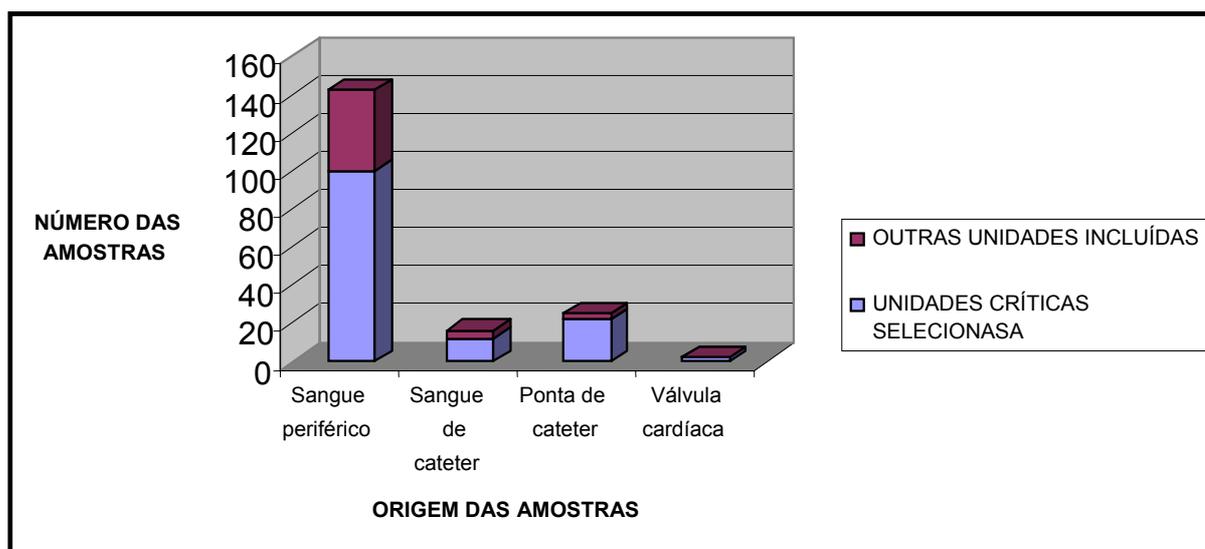
4. RESULTADOS

No período de janeiro a setembro de 2005 foram selecionados para estudo 185 isolados de ECN provenientes de amostras de hemocultura, cultura de cateter e válvula cardíaca de 94 pacientes, sendo 47 do sexo feminino e 47 do sexo masculino. A idade dos pacientes do sexo feminino variou entre 0 e 75 anos, com mediana de 45 anos; para os pacientes do sexo masculino variou entre 0 e 97 anos, com mediana de 47 anos.

Dentre as unidades críticas selecionadas para o estudo, foram testadas 136 amostras, sendo 104 da UTI-adulto, 13 da UTI-neonatal, 13 do TMO e 6 da QT de alto risco. As amostras provenientes das outras clínicas incluídas na segunda fase do estudo foram distribuídas da seguinte forma: 18 amostras da Unidade de Terapia Semi Intensiva, 1 amostra da Pediatria – emergência, 12 amostras da Hematopediatria, 9 amostras da UTI de Cirurgia Cardíaca, 2 da Cardiologia, 1 da Cirurgia de Ginecologia, 3 da Clínica Médica, 1 da Neurocirurgia e 2 do Pronto Atendimento, perfazendo um total de 49 isolados.

O número total de amostras incluídas no estudo foi obtido de hemoculturas colhidas de sangue periférico (76,21%), culturas de ponta de cateter (14,05%), hemoculturas colhidas de sangue de cateter (8,65%) e culturas de válvula cardíaca (1,08%). Os 136 ECN provenientes das unidades críticas selecionadas distribuíram-se entre os seguintes materiais: 100 (73,5%) de sangue periférico, 22 (16,18%) de ponta de cateter, 12 (8,82%) de sangue de cateter e 2 (1,47%) de válvula cardíaca. Dos 49 ECN provenientes de unidades incluídas na segunda fase, 42 (85,71%) foram de sangue periférico, 4 (8,16%) de sangue de cateter e 3 (6,12%) de ponta de cateter (GRÁFICO 1).

GRÁFICO 1 – ORIGEM E NÚMERO DE AMOSTRAS OBTIDAS DAS UNIDADES CRÍTICAS SELECIONADAS E DAS OUTRAS UNIDADES INCLUÍDAS NO ESTUDO



Para a identificação das espécies de ECN foram realizadas 13 provas, divididas em duas etapas. As provas da primeira e da segunda etapa foram realizadas para todas as bactérias, exceto a prova da hemólise, a qual foi realizada apenas para os isolados que tiveram a prova da D-trehalose positiva.

As provas de fermentação de carboidratos foram incubadas durante 5 dias para melhor definição do resultado e os resultados de todas as provas realizadas estão demonstrados nas tabelas a seguir (TABELA 1 e TABELA 2).

TABELA 1 – PROVAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE ECN – PRIMEIRA ETAPA

	PROVAS DA PRIMEIRA ETAPA							
	D-xylose	Sacarose	D-trehalose	Maltose	Manitol	Crescimento em anaerobiose	α -hemólise	β -hemólise
Número total de amostras	185	185	185	185	185	185	62	62
Número de amostras positivas (%)	0 (0%)	183 (98,9%)	62 (33,5%)	184* (99,5%)	2 (1,1%)	182 (98,4%)	0 (0%)	48 (77,4%)

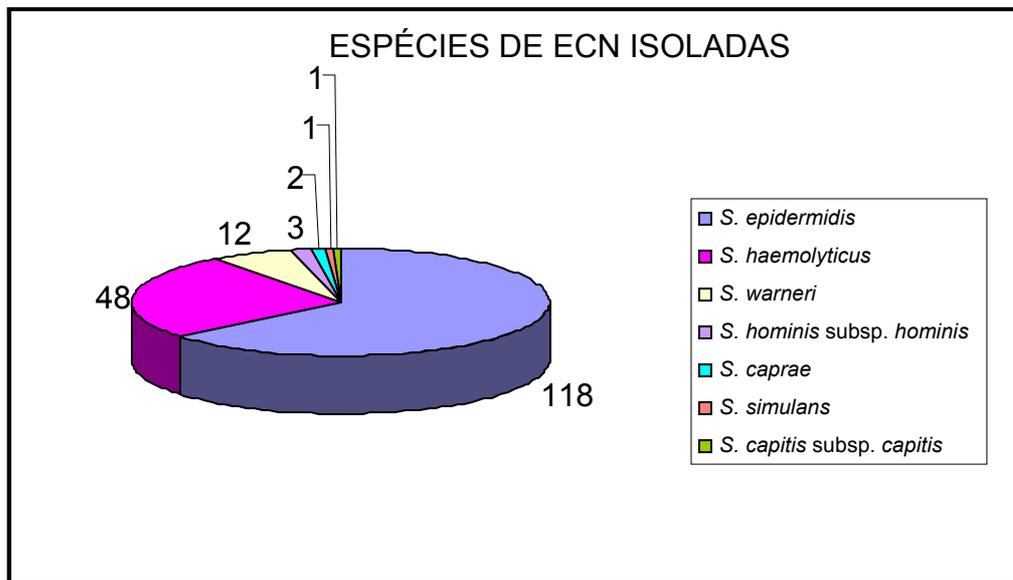
NOTA: * uma das amostras apresentou reação fracamente positiva, identificando a cepa como *S. simulans*.

TABELA 2 – PROVAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE ECN – SEGUNDA ETAPA

	PROVAS DA SEGUNDA ETAPA				
	β -D-frutose	Nitrato	Uréia	Omitina	resistência à novobiocina
Número total de amostras	185	185	185	185	185
Número de amostras positivas (%)	171 (92,4%)	174 (94,0%)	116 (62,7%)	1 (0,5%)	0 (0%)

A espécie de ECN mais isolada foi *S. epidermidis* (63,8%), seguida de *S. haemolyticus* (25,9%), *S. warneri* (6,49%), *S. hominis* subsp. *hominis* (1,62%), *S. caprae* (1,08%), *S. simulans* (0,54%) e *S. capitis* subsp. *capitis* (0,54%) (GRÁFICO 2). Não foi identificada nenhuma das seguintes espécies: *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*, *S. saprophyticus*, *S. hominis* subsp. *novobiosepticus*, *S. lugdunensis*, *S. capitis* subsp. *capitis*, *S. capitis* subsp. *urealyticum*, *S. cohnii* subsp. *cohnii*, *S. cohnii* subsp. *urealyticum* e *S. xylosus*.

GRÁFICO 2 – DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES NO TOTAL DE 185 ECN ESTUDADOS



A tabela 3 descreve o perfil de susceptibilidade, CIM₅₀ e CIM₉₀ dos antimicrobianos testados para as diferentes espécies de estafilococos coagulase negativa isoladas.

TABELA 3 – CIM₅₀, CIM₉₀ E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DAS ESPÉCIES DE ECN ISOLADAS

<i>S. epidermidis</i>			
Antibiótico	CIM; µg/mL		Sensível
	CIM ₅₀	CIM ₉₀	
Amicacina	4	128	72,88
Ciprofloxacino	8	>16	37,19
Eritromicina	>32	>32	28,81
Gentamicina	16	>32	32,2
Linezolida	1	2	100
Oxacilina	2	>2	16,1
Sulfazotrim	8/152	32/608	36,44
Teicoplanina	4	16	89,83
Vancomicina	1	2	100

<i>S. haemolyticus</i>			
Antibiótico	CIM; µg/mL		Sensível
	CIM ₅₀	CIM ₉₀	
Amicacina	4	8	93,75
Ciprofloxacino	>16	>16	8,33
Eritromicina	>32	>32	10,42
Gentamicina	>32	>32	4,17
Linezolida	1	1	100
Oxacilina	>2	>2	2,08
Sulfazotrim	8/152	>32/608	47,92
Teicoplanina	8	64	75
Vancomicina	1	2	100

<i>S. warneri</i>			
Antibiótico	CIM; µg/mL		Sensível
	CIM ₅₀	CIM ₉₀	
Amicacina	4	16	100
Ciprofloxacino	0,5	>16	50
Eritromicina	>32	>32	33,33
Gentamicina	0,25	>32	75
Linezolida	1	1	100
Oxacilina	2	>2	8,33
Sulfazotrim	jan/19	32/608	50
Teicoplanina	2	4	91,67
Vancomicina	1	2	100

<i>S. hominis subsp. hominis</i>			
Antibiótico	CIM; µg/mL		Sensível
	CIM ₅₀	CIM ₉₀	
Amicacina	4	4	100
Ciprofloxacino	0,5	8	66,67
Eritromicina	32	>32	0
Gentamicina	8	8	33,33
Linezolida	1	1	100
Oxacilina	2	>2	33,33
Sulfazotrim	8/152	>32/608	33,33
Teicoplanina	1	4	100
Vancomicina	1	1	100

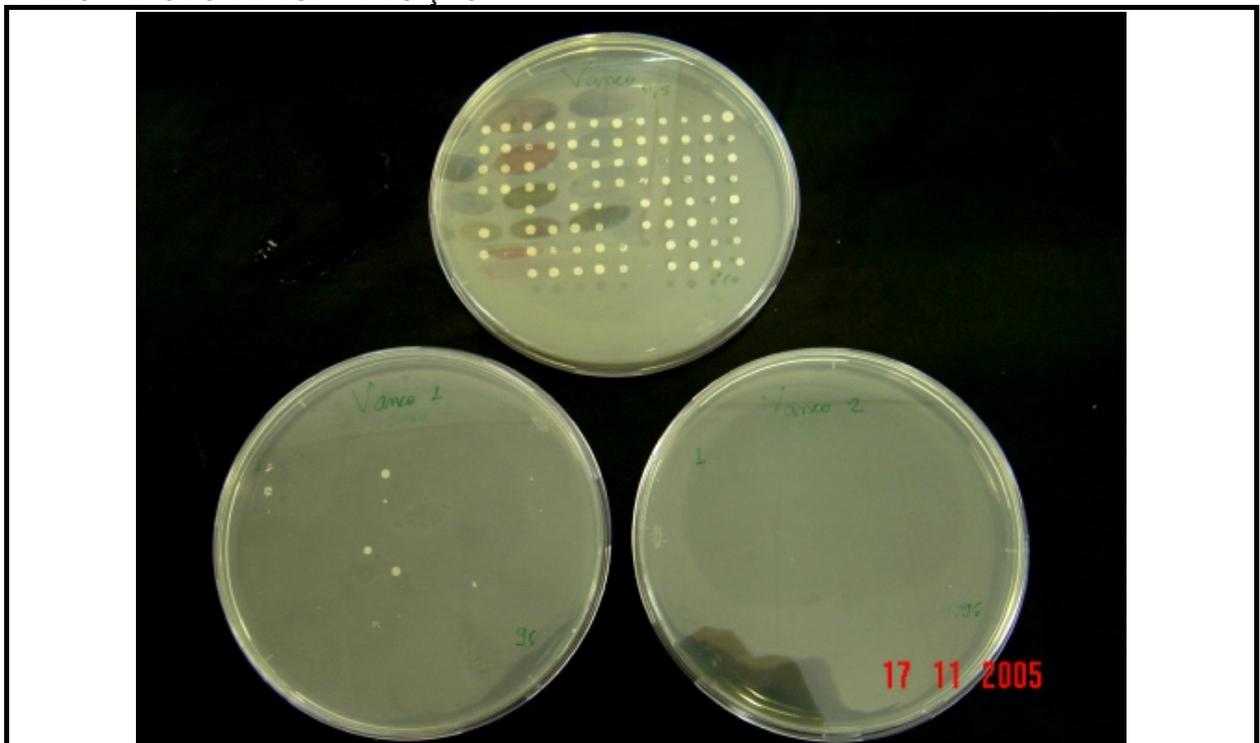
<i>S. caprae</i>			
Antibiótico	CIM; µg/mL		Sensível
	CIM ₅₀	CIM ₉₀	
Amicacina	2	16	100
Ciprofloxacino	>16	>16	0
Eritromicina	>32	>32	0
Gentamicina	32	32	0
Linezolida	1	2	100
Oxacilina	>2	>2	0
Sulfazotrim	0,5/9,5	32/608	50
Teicoplanina	1	8	100
Vancomicina	1	1	100

<i>S. simulans</i>			
Antibiótico	CIM; µg/mL		Sensível
	CIM ₅₀	CIM ₉₀	
Amicacina	2	2	100
Ciprofloxacino	1	1	100
Eritromicina	0,5	0,5	100
Gentamicina	0,5	0,5	100
Linezolida	1	1	100
Oxacilina	>2	>2	0
Sulfazotrim	fev/38	fev/38	100
Teicoplanina	1	1	100
Vancomicina	2	2	100

<i>S. capitis subsp. capitis</i>			
Antibiótico	CIM; µg/mL		Sensível
	CIM ₅₀	CIM ₉₀	
Amicacina	32	32	0
Ciprofloxacino	1	1	100
Eritromicina	1	1	0
Gentamicina	16	16	0
Linezolida	1	1	100
Oxacilina	≥ 2	≥ 2	0
Sulfazotrim	≤ 0,5/9,5	≤ 0,5/9,5	100
Teicoplanina	16	16	0
Vancomicina	2	2	100

Entre os isolados de *S. epidermidis*, somente 16,1% foram sensíveis à oxacilina, enquanto que para *S. haemolyticus* a sensibilidade foi de apenas 2,08%. A única espécie de *S. simulans* isolada apresentou resistência somente à oxacilina e sensibilidade (100%) para todos os demais antimicrobianos. A susceptibilidade à amicacina foi de 72,88% e 93,75% para *S. epidermidis* e *S. hamolyticus*, respectivamente. Todos os isolados de ECN foram sensíveis à vancomicina e linezolida, antimicrobianos de alta potência por apresentarem CIM₅₀ abaixo do ponto de corte para susceptibilidade. Na FIGURA 7 pode-se observar que para a vancomicina, a concentração de 2 µg/mL inibiu todos os isolados testados.

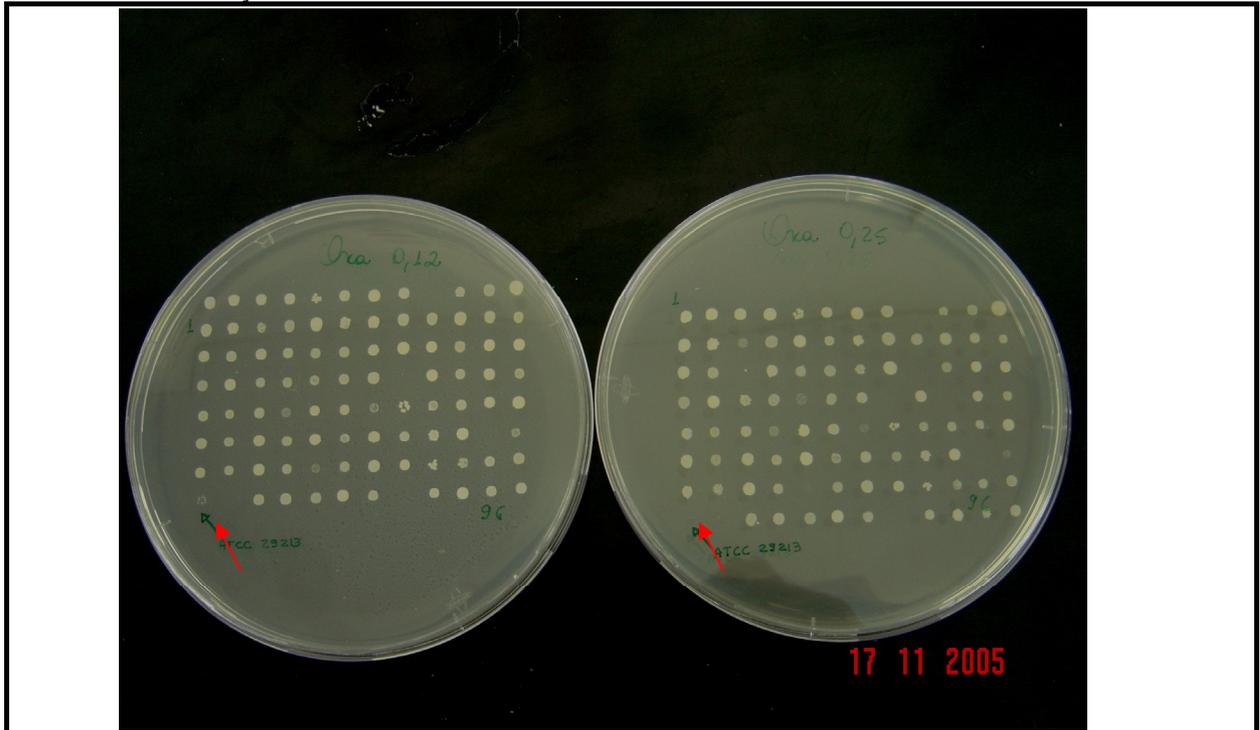
FIGURA 7 – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA A VANCOMICINA PELO MÉTODO DE ÁGAR DILUIÇÃO



LEGENDA: Na concentração 0,5 µg/mL de vancomicina quase todos os isolados apresentam crescimento. Na concentração 1 µg/mL raros isolados foram resistentes e quando utilizou-se 2 µg/mL nenhum isolado apresentou crescimento.

A cepa controle utilizada no teste de ágar diluição foi *S. aureus* ATCC 29.213, a qual apresentou inibição de crescimento dentro do limite esperado padronizado pelo CLSI/NCCLS para todos os antimicrobianos testados. A inibição do crescimento pela oxacilina pode ser vista na FIGURA 8.

FIGURA 8 – INIBIÇÃO DA CEPA CONTROLE PELA OXACILINA



LEGENDA: Placas com 0,125 µg/mL e 0,25 µg/mL de oxacilina; → inibição da cepa controle (*S. aureus* ATCC 29213) na concentração 0,25 µg/mL.

Os isolados resistentes à oxacilina apresentaram crescimento nas concentrações $\geq 0,5$ µg/mL, como pode ser visto na FIGURA 9.

FIGURA 9 – ISOLADOS DE ECN RESISTENTES À OXACILINA



LEGENDA: Placas com crescimento nas concentrações 0,5 µg/mL e 1 µg/mL de oxacilina, indicando isolados resistentes.

A determinação da concentração inibitória mínima para a cefoxitina foi comparada com o ponto de corte utilizado desde 1999 pelo CLSI/NCCLS para a oxacilina e o ponto de corte anteriormente recomendado para a cefoxitina em ECN. Os resultados estão apresentados na TABELA 4.

TABELA 4 – ANÁLISE DE DOIS PONTOS DE CORTE PARA A CIM DA CEFOXITINA E DO PONTO DE CORTE PARA A CIM DA OXACILINA EM PREDIZER RESISTÊNCIA AOS BETA-LACTÂMICOS EM ESTAFILOCOCOS COAGULASE-NEGATIVA

Espécies	T	R	Número de isolados (%) corretamente identificados como oxacilina resistentes		
			CIM OXA \geq 0,5 $\mu\text{g/mL}$	CIM CEF \geq 32 $\mu\text{g/Ml}^1$	CIM CEF \geq 8 $\mu\text{g/Ml}$
<i>S. epidermidis</i>	118	98	98 (100%)	93 (94,9%)	96 (98,0%)
<i>S. haemolyticus</i>	48	47	47 (100%)	47 (100%)	47 (100%)
<i>S. warneri</i>	12	10	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	3	2	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)
<i>S. caprae</i>	2	2	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)
<i>S. simulans</i>	1	1	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	1	0	— ²	— ²	— ²
TOTAL	185	160	160 (100%)	154 (97,2%)	158 (98,7%)

NOTA:

(1) Os isolados cefoxitina intermediários foram considerados cefoxitina resistentes

(2) Este isolado foi incluído porque mostrou-se resistente para os 3 pontos de corte testados porém o resultado da PCR foi negativo.

T: Número total de isolados

R: Número de isolados resistentes

O poder discriminatório dos 2 pontos de corte para a cefoxitina foram avaliados em comparação com o ponto de corte da oxacilina padronizado pelo CLSI/NCCLS em 1999 (84). Utilizando o ponto de corte para a cefoxitina \geq 32 para isolados resistentes e \leq 8 para os sensíveis, 7 isolados identificados como resistentes pela oxacilina mostraram-se sensíveis pela cefoxitina; 35 isolados oxacilina resistentes apresentaram resultado intermediário pela cefoxitina e 1 isolado oxacilina sensível foi classificado como cefoxitina intermediária. Quando se utilizou o ponto de corte \geq 8 para a cefoxitina, 3 isolados identificados como oxacilina resistentes foram cefoxitina sensíveis e 2 isolados oxacilina sensíveis foram cefoxitina resistentes.

FIGURA 10 – COMPARAÇÃO ENTRE OS DOIS PONTOS DE CORTE PARA A CEFOXITINA E O PONTO DE CORTE PARA A OXACILINA

OXACILINA	R	>2			1	11	10	19	9	49	
		2				10	15	11		4	
		1		1	3	9	2	1			
	S	0,5		1	1		5	2			
		0,25	6	3	3	1	1				
		≤ 0,125	2	2	3						
		≤ 1	2	4	8	16	32	64	128	>128	
				S		I		R			
CEFOXITINA											
OXACILINA	R	>2				1	11	10	19	9	49
		2					10	15	11		4
		1			1	3	9	2	1		
	S	0,5		1	1		5	2			
		0,25	6	3	3	1	1				
		≤ 0,125	2	2	3						
		≤ 1	2	4	8	16	32	64	128	>128	
				S				R			
CEFOXITINA											

A CIM $\geq 0,5$ $\mu\text{g/mL}$ para a oxacilina foi a que apresentou melhor sensibilidade e valor preditivo negativo (100% e 100%, respectivamente). O resultado da especificidade foi de 80%, 88% e 84% para a CIM ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$ e ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$ da cefoxitina e para a CIM $\geq 0,5$ $\mu\text{g/mL}$ da oxacilina, respectivamente. O valor preditivo positivo também não teve muita variação, onde o ponto de corte ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$ para a cefoxitina apresentou o melhor resultado (98,10%). Entre os resultados dos dois valores de ponto de corte para a cefoxitina, a sensibilidade e o valor preditivo negativo para o ponto de corte ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$ foi superior (98,7% e 90,9%, respectivamente), contra 96,20% e 78,6% do ponto de corte ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. (TABELA 5).

TABELA 5 – SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, VPP E VPN PARA DOIS PONTOS DE CORTE DA CEFOXITINA E O PONTO DE CORTE DA OXACILINA

TESTE DE ACURÁCIA	CEFOXITINA		OXACILINA
	CIM ≥ 8 µg/mL	CIM ≥ 32 µg/mL	CIM ≥ 0,5 µg/mL
SENSIBILIDADE	98,70%	96,20%	100%
ESPECIFICIDADE	80%	88,00%	84%
VPP	96,90%	98,10%	97,60%
VPN	90,90%	78,60%	100%
ERRO ALFA	15%	12%	16%
ERRO BETA	2%	3,75%	0%

NOTA:

VPP - Valor Preditivo Positivo

VPN - Valor Preditivo Negativo

A detecção da resistência à oxacilina foi também realizada pelo método de disco difusão para a oxacilina (1 µg) e cefoxitina (30 µg) e os halos de inibição comparados com os diâmetros recomendados pelo CLSI/NCCLS (2005). Não houve discrepâncias entre os resultados dos dois antimicrobianos, já que para todos os isolados a interpretação do teste foi a mesma. A sensibilidade e especificidade para os dois testes foram de 100% e 92%, respectivamente. O valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo para os dois antimicrobianos testados foram de 98,8% e 100%, respectivamente. Comparando os métodos de disco difusão e ágar diluição para os dois antimicrobianos, pode-se observar que o disco difusão tanto para a oxacilina quanto para a cefoxitina apresentou resultados semelhantes ou melhores do que os resultados para o ágar diluição (TABELA 6).

TABELA 6 – SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, VPP E VPN PARA OS TESTES DE DISCO DIFUSÃO E ÁGAR DILUIÇÃO COM OXACILINA E CEFOXITINA

TESTE DE ACURÁCIA	OXACILINA		CEFOXITINA	
	DD (1 µg)	CIM ≥ 0,5 µg/mL	DD (30 µg)	CIM ≥ 8 µg/mL
SENSIBILIDADE	100%	100%	100%	98,70%
ESPECIFICIDADE	92%	84%	92%	80%
VPP ¹	98,80%	97,60%	98,80%	96,90%
VPN ²	100%	100%	100%	90,90%
ERRO ALFA	8%	16%	8%	15%
ERRO BETA	0%	0%	0%	2%

NOTA:

DD – disco difusão

VPP - Valor preditivo positivo

VPN - Valor preditivo negativo

O teste de triagem em ágar com oxacilina para detecção de resistência à oxacilina foi realizado com duas concentrações diferentes do antimicrobiano: 4

$\mu\text{g/mL}$ e $6 \mu\text{g/mL}$. O teste com $4 \mu\text{g/mL}$ identificou corretamente todos os isolados gene *mecA* positivos, enquanto que a concentração de $6 \mu\text{g/mL}$ identificou apenas 156 dos 160 isolados gene *mecA* positivos. As duas concentrações identificaram corretamente 23 dos 25 isolados gene *mecA* negativos. O teste com $4 \mu\text{g/mL}$ teve 2 resultados falso-positivos e nenhum resultado falso negativo; no entanto, o teste com $6 \mu\text{g/mL}$ teve 2 resultados falso-positivos e 4 resultados falso-negativos. Os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para os dois testes estão demonstrados na TABELA 7.

TABELA 7 – SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, VPP E VPN PARA OS TESTES DE TRIAGEM EM ÁGAR COM OXACILINA

TESTE DE ACURÁCIA	OXACILINA	
	4 $\mu\text{g/mL}$	6 $\mu\text{g/mL}$
SENSIBILIDADE	100%	97,50%
ESPECIFICIDADE	92%	92%
VPP ¹	98,80%	98,70%
VPN ²	100%	85,20%
ERRO ALFA	8%	8%
ERRO BETA	0%	2,50%

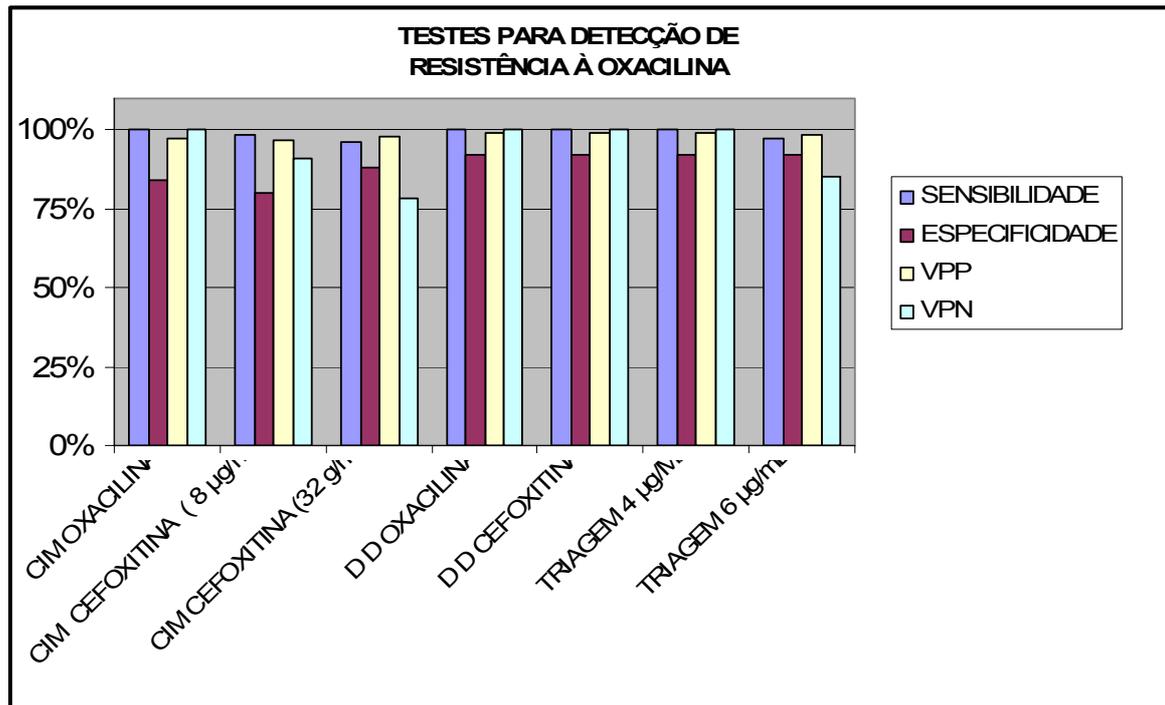
NOTA:

VPP - Valor preditivo positivo

VPN - Valor preditivo negativo

Os métodos de disco difusão para oxacilina e cefoxitina e o teste de triagem em ágar com $4 \mu\text{g/mL}$ de oxacilina apresentaram os melhores resultados de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN (100%, 92%, 98,8% e 100%, respectivamente). A CIM para a oxacilina também apresentou sensibilidade de 100%, embora a especificidade tenha sido de 84%. Os demais testes apresentaram resultados inferiores, como pode ser visto no GRÁFICO 3.

GRÁFICO 3 – SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, VPP E VPN PARA OS TESTES DE DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA À OXACILINA



A PCR para o gene *mecA* foi o método utilizado como padrão ouro para o cálculo da sensibilidade e especificidade de todos os testes realizados. Das 185 amostras analisadas, 160 foram gene *mecA* positivas e 25 gene *mecA* negativas. O percentual de amostras positivas e negativas para cada espécie está representado na TABELA 8.

TABELA 8 – ESPÉCIES DE ECN ISOLADAS E RESULTADO DO GENE *mecA*

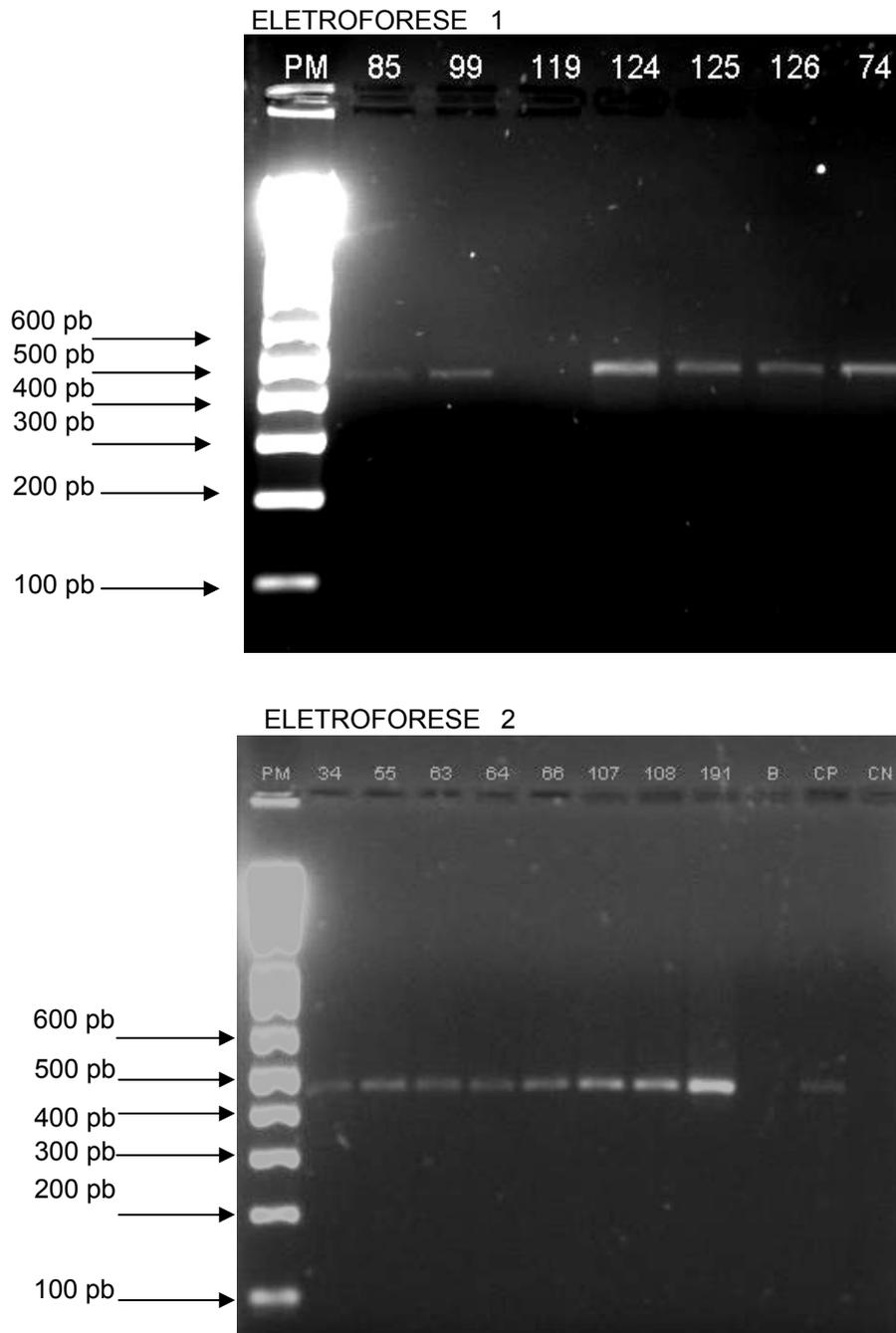
Espécie	N	PCR	
		gene <i>mecA</i> + (%)	gene <i>mecA</i> - (%)
<i>S. epidermidis</i>	118	98 (83,05%)	20 (16,95%)
<i>S. haemolyticus</i>	48	47 (97,91%)	1 (2,08%)
<i>S. warneri</i>	12	10 (83,33%)	2 (16,67%)
<i>S. hominis</i> subsp. <i>Hominis</i>	3	2 (66,66%)	1 (33,33%)
<i>S. caprae</i>	2	2 (100%)	—
<i>S. simulans</i>	1	1 (100%)	—
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	1	—	1 (100%)
TOTAL	185	160 (86,5%)	25 (13,51%)

NOTA:

N – Número total de isolados

As bandas observadas na detecção dos produtos da PCR apresentaram tamanhos correspondentes ao fragmento esperado, 449 pares de base. O resultado de uma eletroforese realizada para 7 amostras e de outra para 8 amostras, um branco, controle positivo e controle negativo está representado na FIGURA 11.

FIGURA 11 – PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE *mecA* OBTIDOS DE ISOLADOS CLÍNICOS DE ECN



A TABELA 9 resume todos os testes fenotípicos realizados para detecção da resistência à oxacilina com resultados discrepantes comparados com a PCR.

TABELA 9 – AMOSTRAS COM RESULTADOS DISCREPANTES ENTRE OS TESTES PARA DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA À OXACILINA E A PCR PARA O GENE *mecA*

Espécie	OXACILINA	CEFOXITINA	OXACILINA	OXACILINA	OXACILINA	PCR (gene <i>mecA</i>)
	DD (1µg/mL)	DD (30µg/mL)	CIM ≥ 0,5 µg/mL	TT (4µg/mL)	TT (6µg/mL)	
<i>S. epidermidis</i>	R	R	R	R	S	POSITIVA
<i>S. epidermidis</i>	R	R	R	R	S	POSITIVA
<i>S. epidermidis</i>	R	R	R	R	S	POSITIVA
<i>S. warneri</i>	R	R	R	R	S	POSITIVA
<i>S. haemolyticus</i>	R	R	R	R	R	NEGATIVA
<i>S. capitis</i> subsp <i>capitis</i>	R	R	R	R	R	NEGATIVA
<i>S. epidermidis</i>	S	S	R	S	S	NEGATIVA
<i>S. warneri</i>	S	S	R	S	S	NEGATIVA

LEGENDA:

DD: disco difusão

TT: teste de triagem

A avaliação da importância clínica dos ECN isolados em infecções relacionadas a cateter foi realizada utilizando o DTP (diferença no tempo de positividade) entre amostras coletadas de sangue periférico e de sangue colhido pelo cateter e da cultura da ponta de cateter comparada com uma ou mais amostras de hemocultura.

A TABELA 10 traz a relação de pacientes que tiveram amostras de sangue colhidas pelo cateter. Dos 94 pacientes analisados, 16 tiveram amostras de sangue colhidas pelo cateter. Dentre os 16, 6 tiveram apenas amostra de sangue colhida pelo cateter, não sendo possível comparação para diagnóstico de ICCRC. Em 4 casos, a amostra de sangue periférico coletada foi negativa. Para 3 pacientes, a amostra de sangue periférico positivou ao mesmo tempo ou antes da amostra de sangue colhida pelo cateter, não caracterizando ICCRC pela DTP. Em apenas 3 casos, a amostra de sangue do cateter positivou 120 minutos ou mais antes que a amostra de sangue periférico, sugerindo ICCRC.

TABELA 10 – RELAÇÃO ENTRE AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO E SANGUE COLHIDO PELO CATETER PARA ANÁLISE DA DTP

HEMOCULTURAS (SANGUE PERIFÉRICO X SANGUE CATETER)			
PACIENTE	Sangue cateter (data e hora)	Sangue periférico (data e hora)	Sangue periférico (data e hora)
1	S EPI (23/09 às 8:32)	S EPI (23/09 às 19:01)	não coletado
7	S EPI (18/06 às 11:41)	não coletado	não coletado
9	S HAE (13/09 às 15:07)	S HAE (12/09 às 19:47)	S HAE (13/09 às 6:37)
15	S EPI (14/04 às 12:28)	S EPI (16/04 às 9:08)	não coletado
23	S WAR (02/07 às 10:37)	não coletado	não coletado
32	S EPI (13/08 às 9:04)	não coletado	não coletado
36	S HAE (10/05 às 12:43)	negativo	não coletado
45	S EPI (05/02 às 10:07)	S EPI (05/02 às 14:37)	negativo
55	S EPI (23/05 às 12:24)	negativo	não coletado
56	S EPI (29/03 às 9:33)	negativo	não coletado
57	S EPI (04/02 às 18:54)	negativo	não coletado
61	S EPI (30/08 às 11:21)	não coletado	não coletado
66	S EPI (13/04 às 7:59)	S EPI (13/04 às 7:58)	não coletado
67	S EPI (02/05 às 17:51)	não coletado	não coletado
71	S EPI (25/01 às 13:02)	não coletado	não coletado
75	S EPI (01/06 às 3:48)	S EPI (01/06 à 1:58)	negativo

LEGENDA: Pacientes destacados em vermelho tiveram DTP \geq 120 minutos

S EPI: *Staphylococcus epidermidis*; S HAE: *Staphylococcus haemolyticus*; S WAR: *Staphylococcus warneri*

Os pacientes que tiveram cultura de ponta de cateter positiva para ECN foram avaliados para diagnóstico laboratorial de ICCRC, pela comparação do resultado da cultura da ponta de cateter com o resultado da hemocultura periférica. Dos 94 pacientes estudados, 25 apresentaram cultura de ponta de cateter positiva para ECN. Dentre os 25, 13 pacientes não tiveram mais nenhuma amostra coletada, sendo impossível comparação entre os resultados. Em 3 casos, a hemocultura periférica coletada foi negativa, indicativo de colonização do cateter. Para 2 pacientes, apenas uma amostra de sangue coletada pelo cateter foi obtida, onde uma foi positiva para a mesma espécie isolada do cateter e outra positiva para espécie diferente da isolada pelo cateter. Em sete casos a amostra de sangue periférico coletada foi positiva, embora a mesma espécie da isolada na cultura da ponta do cateter tenha sido encontrada em apenas 4 pacientes (TABELA 11)

TABELA 11 – RELAÇÃO ENTRE AMOSTRAS DE HEMOCULTURAS E CULTURAS DE PONTA DE CATETER

HEMOCULTURAS X PONTA DE CATETER				
PACIENTE	Ponta de cateter (data)	Sangue periférico (data)	Sangue periférico (data)	Sangue cateter (data)
4	S EPI (24/04)	não coletado	não coletado	não coletado
8	S EPI (23/01)	S EPI (24/01)	S HAE (24/01)	não coletado
23	S EPI (01/07)	não coletado	não coletado	S WAR (01/07)
27	S EPI (02/04)	P AER (02/04)	P AER(02/04)	não coletado
28	S EPI (05/05)	não coletado	não coletado	não coletado
31	S EPI (05/05)	não coletado	não coletado	não coletado
32	S EPI (12/08)	negativo (12/08)	não coletado	S EPI (12/08)
34	S HAE (11/03)	não coletado	não coletado	não coletado
35	S EPI + A BAU (24/05)	não coletado	não coletado	não coletado
37	S EPI (14/02)	S EPI (14/02)	S EPI (14/02)	não coletado
38	S CAP (13/05)	S EPI (11/05)	S EPI (11/05)	não coletado
41	S HAE (24/09)	negativo (23/09)	negativo (23/09)	não coletado
45	S EPI + S AUR (14/02)	S EPI (14/02)	não coletado	não coletado
50	S EPI + S HAE (21/05)	não coletado	não coletado	não coletado
58	S EPI (13/05)	não coletado	não coletado	não coletado
61	S HAE (30/08)	não coletado	não coletado	S HAE (29/08)
62	S EPI (14/09)	não coletado	não coletado	não coletado
63	S EPI + A BAU (07/04)	não coletado	não coletado	não coletado
68	S HAE (22/08)	negativo (22/08)	não coletado	S HAE (22/08)
69	S HAE (21/03)	não coletado	não coletado	não coletado
77	S EPI (21/01)	S EPI (21/01)	negativo (21/01)	não coletado
80	S EPI (03/03)	não coletado	não coletado	não coletado
87	S HAE (12/04)	não coletado	não coletado	não coletado
89	S EPI (21/03)	não coletado	não coletado	não coletado
92	S EPI + LEV (03/06)	A BAU (03/06)	negativo (03/06)	não coletado

LEGENDA: Pacientes destacados em vermelho tiveram amostras de cultura de ponta de cateter e hemocultura periférica positivas para a mesma espécie de ECN.

S EPI: *S. epidermidis*; S HAE: *S. haemolyticus*; S WAR: *S. warneri*; S CAP: *S. caprae*; S AUR: *S. aureus*; P AER: *Pseudomonas aeruginosa*; A BAU: *Acinetobacter baumannii*; LEV: leveduras

As amostras de hemocultura periférica foram avaliadas quanto ao número de amostras coletadas por dia de um paciente e o número de amostras positivas para ECN. Foram avaliados 104 casos, onde pudemos observar que em 84 deles apenas uma amostra foi positiva, em 18 duas amostras positivaram e em 2 casos as três amostras coletadas foram positivas (TABELA 12).

TABELA 12 – RELAÇÃO ENTRE O NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS POR DIA DE UM PACIENTE E O NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS PARA ECN

Nº amostras coletadas/dia	Nº de pacientes	Nº amostras positivas	Nº de pacientes	1 amostra positiva	2 amostras positivas	3 amostras positivas
1	40	1	40	40		
2	61	1	43	43		
		2	18		18	
3	3	1	1	1		
		2	0			
		3	2			2
TOTAL DE PACIENTES				84	18	2

5. DISCUSSÃO

Estafilococos coagulase-negativa são microrganismos constituintes da microbiota normal da pele em humanos, considerados de baixa virulência e sem importância clínica até algumas décadas atrás. Com o aumento no uso de corpos estranhos ao paciente como cateteres, próteses cardíacas e ortopédicas, marcapassos e outros materiais implantados que envolvam a formação de biofilme, esses microrganismos tornaram-se importante causa de infecção, principalmente hospitalar. Entre elas, destacam-se as infecções da corrente circulatória relacionada ao cateter, bacteremias e endocardite. Em um estudo realizado por Muñoz e colaboradores (2004), 34% dos microrganismos isolados de episódios de ICCRC foram causados por ECN, sendo estas bactérias as mais prevalentes. Entre os casos de bacteremia hospitalar, ECN foi isolado em 31% das amostras (BEARMAN, 2005).

Entre os pacientes com maior predisposição para desenvolverem tais infecções estão àqueles internados em unidades de terapia intensiva, pacientes imunocomprometidos, recém-nascidos prematuros, pacientes com neoplasia e transplantados, já que a prática de procedimentos invasivos em tais pacientes é freqüente (KLOOS e BANNERMAN, 1994). Por essa razão, foram incluídos em um primeiro momento pacientes que estiveram internados nas Unidades de Terapia Intensiva adulta e neonatal, no Transplante de Medula Óssea e na Quimioterapia de Alto Risco. Com o decorrer do estudo observou-se que o número de amostras coletadas conforme o protocolo enviado era reduzido. Por essa razão, em um segundo momento, foi utilizado novo critério para inclusão de amostras. Com isso, os pacientes com mais de uma amostra (entre elas hemoculturas e culturas de ponta de cateter) positiva para ECN foram incluídos no estudo, independente da unidade do hospital onde estivessem internados, totalizando 185 amostras.

A identificação das espécies de ECN, embora de difícil realização para a maioria dos laboratórios clínicos, é necessária para diferenciar o potencial patogênico e o perfil de resistência de cada espécie (De PAULIS, 2003). Várias metodologias têm sido descritas, já que o esquema proposto por Kloss e Schleifer (1975) é trabalhoso e demorado. O método de identificação utilizado neste estudo foi proposto por Cunha, Sinzato e Silveira (2004) por identificar as principais espécies

envolvidas em infecções em humanos, utilizar provas bioquímicas de fácil realização e liberar o resultado em 72 horas.

Staphylococcus epidermidis é a espécie encontrada com maior frequência nas infecções em humanos, em particular naquelas associadas com cateteres intravasculares. Além disso, é o principal agente de bacteremia nosocomial, endocardite de válvula protética, infecção relacionada à diálise peritoneal e infecções de ferida cirúrgica. A segunda espécie mais encontrada é *S. haemolyticus* e também é conhecida como causa de infecções relacionadas a cateter, septicemia, endocardite, entre outras (HEIKENS, 2005). Neste trabalho, a espécie mais isolada foi *S. epidermidis* (63,8%), seguida por *S. haemolyticus* (25,9%), *S. warneri* (6,49%), *S. hominis* subsp. *hominis* (1,62%), *S. caprae* (1,08%), *S. simulans* (0,54%) e *S. capitis* subsp. *capitis* (0,54%). Resultados semelhantes foram encontrados por Klingenberg et al. (2005) e Raimundo et al. (2002) e o fato pode ser explicado por *S. epidermidis* ser a principal espécie de ECN constituinte da microbiota normal da pele.

Staphylococcus lugdunensis difere dos demais ECN por sua natureza agressiva. Infecções por essa bactéria geralmente seguem um progresso fulminante e têm sido associadas com endocardite de válvula nativa, a qual é caracterizada por uma fraca resposta aos tratamentos antimicrobianos convencionais, com importante destruição valvular, formação de abscesso miocárdial, altas taxas de embolia periférica, aumento na mortalidade, incluindo casos de tratamento cirúrgico (FARRAG, 2001; ANGUERA, 2005). A identificação desse microrganismo pelos laboratórios de microbiologia clínica é de grande importância, já que os testes utilizados para identificação de resistência para esta espécie seguem a mesma interpretação utilizada para *S. aureus* (FARRAG, 2001). Entre os 185 isolados neste trabalho, nenhum *S. lugdunensis* foi encontrado.

Todas as recomendações para a realização do método de identificação bacteriana foram seguidas, porém foi necessário maior tempo de incubação para as provas de fermentação dos açúcares. Observou-se que as leituras realizadas com 72 horas deixavam dúvidas sobre a mudança da cor roxa para a amarela. Por essa razão, decidiu-se incubar as provas de fermentação de açúcar por mais 48 horas, totalizando 5 dias. Com esta alteração foi possível realizar com maior segurança a leitura dessas provas. O preparo do inóculo foi feito em caldo BHI, com incubação de uma noite em estufa. Contando 1 dia para o preparo do inóculo e cinco dias para

a leitura final das provas, o resultado foi liberado após seis dias do isolamento dos ECN e não em 72 horas como proposto no método utilizado.

A realização das provas de identificação bacteriana em duas etapas explica-se pelo fato de que na primeira etapa as espécies *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. xylosum*, *S. capitis* e *S. simulans* já são identificadas. Considerando-se que *S. epidermidis* é a espécie mais frequentemente encontrada, 70 a 90% das linhagens isoladas em laboratório clínico podem ser identificadas com um número reduzido de provas (CUNHA, 2004).

Na análise do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, utilizou-se o método de ágar diluição para detecção da concentração inibitória mínima. John et al., (2002) encontraram índices de resistência à oxacilina para *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* igual a 62% e 82%, respectivamente. Neste trabalho, os índices encontrados foram superiores, sendo 83,9% para *S. epidermidis* e 97,92% para *S. haemolyticus*. Resultados semelhantes foram encontrados por Pfaller e colaboradores (1999). Nos três estudos *S. haemolyticus* foi o isolado que apresentou maior índice de resistência à oxacilina. A determinação da CIM para todos os isolados neste trabalho mostrou perfil de resistência para a oxacilina de 88,1%. Para Sader e colaboradores (2001) este índice foi de 81%. *S. epidermidis*, espécie mais isolada, apresentou resistência para a gentamicina, eritromicina, sulfazotrim e ciprofloxacino acima de 60%, sendo este resultado também encontrado por Michelim e colaboradores (2005). Esta resistência elevada aos demais antimicrobianos se explica pela alta taxa de resistência à oxacilina apresentada pelos isolados, uma vez que a resistência à oxacilina indica resistência cruzada com as demais classes de antimicrobianos.

Palazzo e colaboradores (2005) relataram quatro casos de ECN resistentes à vancomicina isolados de pessoas saudáveis, sendo estes funcionários de uma escola e de um hospital em São Paulo. No presente estudo, nenhum caso de resistência à vancomicina e à linezolida foi encontrado, fato também relatado por outros autores (De GIUSTI, 1999; JOHN, 2002, MICHELIN, 2005). Resistência à vancomicina entre isolados clínicos de ECN foi relatada pela primeira vez em 1987 e desde aquela época, ao menos 5 outros casos de ECN clinicamente relevantes apresentaram susceptibilidade diminuída à vancomicina (SRINIVASAN, 2002).

Um estudo realizado em dois hospitais de Washington avaliou dados clínicos e laboratoriais de pacientes adultos com hemoculturas positivas para ECN. O

objetivo do trabalho foi fazer recomendações para aperfeiçoar a habilidade dos clínicos em reconhecer o significado dos organismos potencialmente contaminantes e aprimorar o tratamento feito a pacientes com hemoculturas positivas para ECN. Concluiu-se que ECN continua sendo o mais freqüente microrganismo isolado em hemoculturas e que representa a causa mais comum de pseudobacteremia nas instituições. Apesar dos médicos reconhecerem a contaminação, o uso inapropriado da vancomicina tem sido continuado, levando a uma progressiva resistência antimicrobiana. Por essa razão, acreditam que a educação continuada com relação à antissepsia da pele e aos métodos de coleta de hemocultura podem levar a reduções no uso indevido de agentes antimicrobianos em casos de contaminação (SOUVENIR, 1998).

A detecção da resistência à oxacilina pela utilização de métodos fenotípicos apresenta-se problemática pela expressão heterogênea do gene *mecA* por muitos isolados de ECN, onde apenas poucas células expressam o gene e são PBP 2a positivas. Várias metodologias estão sendo desenvolvidas e outras modificadas para aumentar a detecção de isolados verdadeiramente resistentes à oxacilina. Entre elas, destacam-se o teste de disco difusão, o teste de triagem em ágar e o método de diluição em ágar para determinação da CIM (HUSSAIN, 2000-b).

Métodos moleculares para detecção de resistência à oxacilina, como a PCR para o gene *mecA*, são mais sensíveis que os métodos fenotípicos e por essa razão são utilizados como padrão ouro para avaliação da sensibilidade e especificidade de outros métodos (HUSSAIN, 2000-b, FERREIRA, 2003). Esta mesma metodologia foi utilizada neste trabalho, onde foi encontrado 86,5% dos isolados gene *mecA* positivos e 13,51% dos isolados gene *mecA* negativos, valores também encontrados por outros autores (MARSHALL, 1997; PFALLER, 1999).

Em 1999, o CLSI/NCCLS modificou os pontos de corte da oxacilina para determinação da CIM entre os ECN. Gradelski e colaboradores (2001) avaliaram esta mudança e concluíram que o novo ponto de corte estabelecido classificou corretamente os isolados de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*. No entanto, para as demais espécies que foram gene *mecA* negativas, a CIM $\geq 0,5$ apresentou problemas na identificação. Neste trabalho, o método de ágar diluição com o mesmo ponto de corte identificou quatro isolados gene *mecA* negativos como oxacilina resistentes, sendo eles *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri* e *S. capitis* subsp. *capitis*. A sensibilidade, especificidade, VPP e VPN do teste foram de 100%,

84%, 97,6% e 100%, respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo realizado com ECN isolados em pacientes de diferentes hospitais brasileiros, em um período de 10 anos (FERREIRA, 2003). Ghoshal et al. (2004) encontraram sensibilidade de 84% e especificidade de 91% para o mesmo teste.

Em 2005, Swenson e colaboradores publicaram um estudo onde sugerem a mudança no ponto de corte ≥ 32 (isolados resistentes) da cefoxitina para ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$, embora a utilização da cefoxitina para determinação da CIM não esteja padronizada pelo último documento do CLSI/NCCLS para na detecção de resistência à oxacilina (CLSI, 2005). Os resultados de sensibilidade e especificidade para esse novo ponto de corte foram 98% e 97%, respectivamente. No presente estudo comparamos os dois pontos de corte e os resultados de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para o ponto de corte ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$ foram 98,7%, 80%, 96,9% e 90%, respectivamente, enquanto que para o ponto de corte ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$ quando consideramos os isolados intermediários como resistentes, os resultados foram 96,2%, 88,0%, 98,1% e 78,6%, respectivamente. Embora o ponto de corte ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$ tenha apresentado melhores resultados de sensibilidade e valor preditivo negativo, novos estudos são necessários para melhorar o desempenho do teste.

O método de disco difusão é amplamente utilizado pelos laboratórios de microbiologia clínica por ser de fácil execução e baixo custo. Para detecção de resistência à oxacilina, o CLSI/NCCLS padronizou o uso do disco de cefoxitina, por ser um forte indutor de sistema regulatório *mecA*. Baseado em um estudo brasileiro realizado no Hospital São Paulo, onde 5 isolados de ECN apresentaram-se resistentes pelo disco de oxacilina e sensíveis pelo disco de cefoxitina, sendo estes gene *mecA* positivos, o presente estudo comparou os halos de inibição para os dois antimicrobianos (FRIGATTO, 2005). Nenhum resultado discrepante foi encontrado e os dois antimicrobianos apresentaram valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo, respectivamente, de 100%, 92%, 98,8% e 100%. Resultados muito semelhantes para a sensibilidade e especificidade do disco difusão de oxacilina foram encontrados por Hussain e colaboradores (2002).

Para o Grupo Sueco de Referência em Antimicrobianos (SRGA, 2005), o teste de disco difusão para a cefoxitina também é utilizado para prever a resistência à oxacilina, porém a concentração do disco de cefoxitina utilizada é de 10 μg , o meio para inoculação é o Iso-Sensitest (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) e o ponto de corte

para isolados resistentes é < 22 mm e ≥ 27 mm para isolados sensíveis. Hederstierna-Johnsen (2005) basearam-se nestas recomendações para avaliar a resistência à oxacilina em 110 ECN. Concluíram que os diâmetros utilizados para a interpretação apresentaram 100% de sensibilidade e especificidade, embora 23 dos isolados ficaram em um grupo indeterminado (≥ 22 mm e < 27 mm), para os quais os autores sugerem testes futuros preferencialmente genômicos.

A utilização do disco de cefoxitina juntamente com o disco de oxacilina para detecção de isolados resistentes à oxacilina deve ser encorajada, pois casos discrepantes como o descrito por Frigatto e colaboradores (2005) não poderiam ser detectados com a utilização apenas do disco de cefoxitina e os isolados seriam erroneamente classificados como sensíveis. Além disso, a diferença de 1 mm na leitura dos halos de ambos os antimicrobianos pode classificar um isolado sensível como resistente ou vice-versa e a análise em conjunto dos dois antimicrobianos pode sanar dúvidas no momento da interpretação do resultado.

O teste de triagem em ágar para detecção de resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus* foi incluído pela primeira vez no documento do CLSI/NCCLS em 1990, embora a edição não revelasse detalhes de como as amostras deveriam ser inoculadas. Recomendações para o controle de qualidade do teste também não haviam sido incluídas até 1997, quando a cepa *S. aureus* ATCC 43300, *mecA*-positiva com expressão altamente heterogênea da resistência à oxacilina foi sugerida como controle de qualidade (MACKENZIE, 1995). Em 2001, Swenson e colaboradores avaliaram a cepa *S. aureus* ATCC 43300 quanto a sua adequação para o uso como um controle positivo do teste. Concluíram que sua utilização pode ajudar a detectar lotes de ágar de triagem que falham na detecção de isolados heterorresistentes.

Desde que os pontos de corte para a CIM da oxacilina foram diminuídos, o uso do teste de triagem com 6 $\mu\text{g/mL}$ para ECN não foi mais indicado pelo CLSI/NCCLS. No entanto, vários estudos observaram que esta técnica é sensível e pode ser usada como teste confirmatório para resultados obtidos pelo disco difusão (CAVASSINI, 1999; HUSSAIN, 1998; LOUIE, 2001). Ferreira e colaboradores (2003) concluíram que o teste de triagem com 4 $\mu\text{g/mL}$ de oxacilina apresentou 100% de sensibilidade e 100% de especificidade, contra 94,2% de sensibilidade e 100% de especificidade do teste de triagem com 6 $\mu\text{g/mL}$. Caierão e colaboradores (2004) avaliaram o teste de triagem com 0,6 e 4 $\mu\text{g/mL}$ de oxacilina, disco difusão e o

sistema automatizado MicroScan. Concluíram que o único teste com 100% de acurácia foi o teste de triagem com 4 µg/mL. O desempenho das duas concentrações foi analisada no presente trabalho e os resultados de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN para o teste de triagem com 4 µg/mL de oxacilina foram 100%, 92%, 98,8% e 100%, respectivamente. A especificidade não alcançou 100% como para os outros autores, mas os resultados foram melhores quando comparados ao teste de triagem com 6 µg/mL de oxacilina (97,5% de sensibilidade, 92% de especificidade, 98,7% de VPP e 85,2% de VPN).

Todos os testes fenotípicos realizados identificaram 2 isolados gene *mecA* negativos como oxacilina resistentes. A especificidade de 92% para os métodos de disco difusão para oxacilina e cefoxitina e para o teste de triagem com 4 µg/mL de oxacilina (métodos que apresentaram melhores resultados de sensibilidade e especificidade) foi atribuída a esses dois casos. O fato pode ser explicado pelo envolvimento de outro mecanismo como a hiperprodução de beta-lactamase ou alteração em outra PBP que não a PBP 2 (ALCARÁZ, 2003).

O disco de oxacilina identificou duas amostras gene *mecA* negativas como oxacilina resistentes; o mesmo resultado foi confirmado pelo disco de cefoxitina. O teste de ágar diluição para a oxacilina identificou quatro isolados gene *mecA* negativos como oxacilina resistentes. Duas amostras gene *mecA* negativas foram identificadas como resistentes pelo teste de triagem com 4 µg/mL de oxacilina e o teste de triagem com 6 µg/mL de oxacilina identificou quatro amostras gene *mecA* positivas como sensíveis e duas amostras gene *mecA* negativas como resistentes.

Embora os métodos de detecção da resistência à oxacilina em ECN continuem sendo alvo de numerosos estudos para que resultados mais sensíveis e específicos sejam alcançados, outra grande dificuldade enfrentada pelos clínicos e microbiologistas com relação a estes microrganismos está na diferenciação entre isolados significativos daqueles contaminantes de amostras clínicas. Os ECN são os microrganismos mais freqüentes isolados em hemoculturas e, embora sejam uma importante causa de infecção da corrente circulatória nosocomial, são considerados contaminantes em aproximadamente 65% dos casos (WEINSTEIN, 1998; MIRRETT, 2001). Enquanto os ECN contaminantes de hemoculturas levam a testes laboratoriais adicionais, uso desnecessário de antimicrobianos (principalmente vancomicina) e aumento do período de hospitalização, a falha em reconhecer e

tratar o verdadeiro patógeno pode levar a um aumento da morbidade e mortalidade (BEEKMANN, 2005).

As amostras clínicas deste trabalho foram obtidas de hemocultura de sangue periférico (76,21%), sangue colhido pelo cateter (8,65%), cultura da ponta de cateter (14,05%) e duas amostras de cultura de válvula cardíaca consideradas significativas (1,08%). O objetivo principal era a caracterização de amostras clínicas de ECN significativas em infecções da corrente circulatória relacionada a cateter (ICCRC).

Para definição de ICCRC, foram utilizadas duas técnicas descritas no manual da Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (MERMEL, 2001). A primeira foi a técnica da DTP, onde uma amostra de sangue foi colhida pelo cateter e outra colhida de sangue periférico. Para caracterização de infecção relacionada a cateter, a amostra de sangue colhida pelo cateter deveria positivar 120 minutos ou mais antes que a amostra colhida de sangue periférico. Na segunda, o cateter foi removido e a ponta distal enviada para cultura, juntamente com no mínimo uma amostra de sangue periférico. A contagem de colônias da ponta de cateter deveria ser superior a 15 UFC e o microrganismo isolado deveria ser o mesmo identificado em ambos os materiais.

Dos 94 pacientes, apenas 16 tiveram amostras de sangue coletadas através do cateter. Dentre os 16, em 10 casos ao menos uma amostra de sangue periférico foi colhida em conjunto e em 3 casos a DTP foi maior ou igual a 120 minutos para o mesmo microrganismo, sugerindo ICCRC. Entre os 3 casos sugestivos de ICCRC, *S. epidermidis* foi isolado em 2 casos e *S. haemolyticus* em 1 caso. O número de amostras coletadas conforme o protocolo sugerido no início do estudo foi pequeno, inviabilizando análise de sensibilidade e especificidade pelo método da DTP. Estudos futuros utilizando esta técnica devem ser realizados para que o método seja utilizado com maior frequência dentro do hospital e um número maior de casos de ICCRC possa ser elucidado.

Em um artigo publicado em 2001, Rijnders et al. sugeriram que a DTP entre a hemocultura periférica e a colhida através do cateter não era útil para o diagnóstico de bacteremia relacionada a cateter em pacientes admitidos em UTI. Os autores explicaram sua afirmação baseada na rota extraluminal de colonização do cateter, a qual predomina em cateteres de curto prazo, e em uma possível influência de antibioticoterapia prévia na DTP. Outro dado demonstrado no trabalho foi que apenas 8 dos 100 pacientes com suspeita de infecção da corrente circulatória

relacionada a cateter confirmaram o diagnóstico; isto mostra a baixa incidência desta infecção em pacientes internados em UTI, onde muitos cateteres são removidos desnecessariamente. No presente trabalho, o baixo número de casos identificados como sendo ICCRC pode ser explicado por esse fato, já que 104 das 185 amostras foram provenientes da UTI-adulto, 13 na UTI-neonatal e 18 da Unidade de Terapia Semi Intensiva.

Em 25 pacientes a amostra da cultura da ponta de cateter foi positiva para ECN. Dentre estes, 13 amostras de ponta de cateter não foram acompanhadas de amostras de sangue periférico. Em 3 casos a hemocultura periférica foi negativa e em 2 casos foi colhido apenas amostra de sangue do cateter. Para 7 pacientes foi possível a comparação entre a cultura da ponta de cateter e o sangue periférico, embora para apenas 4 pacientes a espécie isolada nos dois materiais tenha sido a mesma. Rijnders e colaboradores (2001) comentam em seu trabalho que como ECN são os principais microrganismos constituintes da microbiota da pele, para a identificação de ICCRC por ECN são necessárias 2 amostras periféricas positivas para a mesma espécie. Utilizando este critério, apenas um paciente teve a cultura da ponta de cateter e 2 amostras de sangue periférico positivas para *S. epidermidis*. O que se pôde observar é que grande parte das pontas de cateter enviadas para cultura não acompanharam amostras de sangue periférico, sendo consideradas sem valor para aplicação do método utilizado para definição de ICCRC.

Com relação às bacteremias, muito se tem pesquisado na tentativa de estabelecer diretrizes para o seu diagnóstico. As dificuldades são ainda maiores quando se trata do isolamento de ECN em amostras de hemocultura, pois um importante agente de bacteremia nosocomial é também o principal contaminante de hemoculturas. O principal critério utilizado com esta finalidade é o número de amostras de hemoculturas positivas para ECN, onde uma amostra positiva, em oposição a duas ou mais, é frequentemente considerada contaminação (FAVRE, 2005).

Neste trabalho, em 104 casos houve ao menos uma amostra de sangue periférico positiva para ECN. Em 40 dos 104 casos, apenas uma amostra de sangue foi coletada. Dentre os 40, 11 casos foram de pacientes internados na UTI-neonatal onde com frequência somente uma amostra de sangue é coletada (KREDIET, 2004; KLINGENBERG, 2005). Para 44 pacientes, mais de uma amostra de sangue periférico foi coletada, mas somente 1 foi positiva; 18 pacientes tiveram 2 amostras

coletadas sendo as 2 positivas e 2 pacientes tiveram 3 amostras coletadas e as 3 positivas. Khatib et al. (1995) analisaram o número de frascos de hemocultura positivos, o perfil de susceptibilidade, o crescimento dentro de 48 horas, febre e fonte de infecção conhecida. O estudo mostrou que o perfil de antibiograma idêntico, determinado pela CIM de dez antimicrobianos, é altamente preditivo de isolados relacionados, com sensibilidade de 100% e especificidade de 83,7%. Além disso, concluíram que a determinação das espécies de ECN isoladas de hemoculturas é raramente utilizada para prever isolados relacionados. Por essa razão, não foi realizada a comparação entre as espécies isoladas em amostras de hemoculturas positivas para ECN no presente trabalho.

Beekmann, Diekema e Doern (2005) pesquisaram diferentes algoritmos para determinar o significado clínico de ECN isolados de hemoculturas. Concluíram que o algoritmo com melhor sensibilidade e especificidade foi definido como pelo menos duas amostras de hemoculturas positivas para ECN dentro de 5 dias ou 1 hemocultura positiva com evidência clínica de infecção. Para Favre e colaboradores (2005) uma única hemocultura positiva para ECN na presença de sinais de sepsis deve ser considerada clinicamente relevante. Como no presente trabalho os dados clínicos do paciente não foram levantados, as amostras com crescimento único não puderam ser avaliadas.

García e colaboradores (2004) acreditam que o isolamento da mesma espécie de ECN em mais de uma amostra de hemocultura aumenta a probabilidade de bacteremia verdadeira. No entanto, este critério não se aplica quando o isolado é *S. epidermidis*, pois, além de ser o isolado mais freqüente em amostras de hemocultura, é também o principal representante da microbiota da pele. Para Mirret e colaboradores (2001), o número de frascos positivos em um conjunto não pode prever a probabilidade do significado clínico do ECN isolado, não podendo ser usado como critério para determinar se um isolado representa infecção verdadeira ou contaminação.

Como a importância clínica dos ECN isolados de hemoculturas gera muitas dúvidas, a realização do antibiograma para estas espécies também se tornou um fato polêmico. Em 2005, Chandran e Rennie questionaram a necessidade de se realizar o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA) para os ECN isolados de hemoculturas. Eles chegaram à conclusão de que o TSA é de baixo valor clínico, já que não se tem consenso sobre o significado clínico dos ECN em hemoculturas.

Acredita-se que o resultado do antibiograma não vai alterar as decisões de tratamentos dos clínicos, nem interromper os cuidados com o paciente, já que a taxa de resistência à oxacilina é maior do que 70% entre os ECN, não há evidências de aumento desta resistência e o uso de vancomicina não vai aumentar mais do que o esperado. Por essa razão, o TSA está sendo realizado no laboratório dos autores somente quando solicitado.

Diante de tantas controversias existentes entre diferentes autores sobre a importância clínica dos ECN isolados de hemoculturas, não foi possível separar amostras clínicas significativas das consideradas contaminantes. Acredita-se que esta diferenciação vai muito além de critérios estabelecidos dentro do laboratório, necessitando do envolvimento de em clínico para uma minuciosa avaliação do paciente e de rigorosas técnicas de antissepsia no momento da coleta das amostras para diminuir o número de contaminação com microrganismos residentes na pele.

6. CONCLUSÕES

- I. A resistência geral encontrada para a oxacilina pelo método de PCR foi de 86,5%, valor não encontrado por nenhum teste fenotípico utilizado para detecção de resistência à oxacilina.
- II. O esquema para identificação fenotípica de ECN utilizado não apresentou dificuldades em sua execução, embora as provas de fermentação de açúcares tenham necessitado de 5 dias de incubação para maior segurança nos resultados.
- III. *Staphylococcus epidermidis* foi a espécie mais isolada (63,8%) seguida por *Staphylococcus haemolyticus* (25,9%), *Staphylococcus warneri* (6,49%), *Staphylococcus hominis* subsp. *hominis* (6,49%), *Staphylococcus caprae* (1,16%), *Staphylococcus simulans* (1,08%) e *Staphylococcus capitis* subsp. *capitis* (0,54%).
- IV. Entre as duas principais espécies isoladas, *S. haemolyticus* apresentou os maiores índices de resistência, sendo apenas 2,08% dos isolados sensíveis à oxacilina.
- V. Mais de 70% dos isolados foram sensíveis à amicacina e teicoplanina. Nenhuma espécie foi resistente à vancomicina e linezolida.
- VI. O ponto de corte ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$ para a cefoxitina identificou corretamente 98,7% dos isolados como oxacilina resistentes, contra 97,2% do ponto de corte ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$.
- VII. O método de disco difusão para oxacilina e cefoxitina utilizado como triagem para isolados resistentes à oxacilina não detectou discrepâncias entre os resultados e os valores de sensibilidade e especificidade foram iguais para ambos os métodos (100% e 92%, respectivamente).
- VIII. A sensibilidade e o valor preditivo negativo para o teste de triagem com foi superior (100% e 100%, respectivamente) em relação ao teste de triagem com 6 $\mu\text{g/mL}$ de oxacilina (97,5% e 85,2%, respectivamente). A especificidade foi de 92% para as duas concentrações.
- IX. *Staphylococcus haemolyticus* também apresentou elevada resistência à oxacilina pelo método de PCR (97,91%).

- X. Os testes de disco difusão para oxacilina e cefoxitina e o teste de triagem em ágar com 4 µg/mL de oxacilina foram os métodos fenotípicos de detecção da resistência à oxacilina mais acurados, sendo seu uso indicado para laboratórios clínicos de rotina.

REFERÊNCIAS

AGVALD-ÖHMAN, C.; LUND, B.; EDLUND, C. Multiresistant coagulase-negative staphylococci disseminate frequently between intubated patients in a multidisciplinary intensive care unit. **Critical Care**, v. 8, n. 1, p.42-47, 2004.

ALCARÁZ, L. E. et al. Species identification, slime production and oxacillin susceptibility in coagulase-negative staphylococci isolated from nosocomial specimens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 45-51, 2003.

ANGUERA, I. et al. *Staphylococcus lugdunensis* infective endocarditis: description of 10 cases and analysis of native valve, prosthetic valve, and pacemaker lead endocarditis clinical profiles. **Heart**, v. 91, p. 1-7, 2005.

BANNERMAN, T. M. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: P. R. Murray (Ed.). Manual of Clinical Microbiology, Eighth Edition. Washington, DC: ASM Press, v.1, 2003, p.384-404.

BEARMAN, G. M. L.; WENZEL, R. P. Bacteremias: a leading cause of death. **Archives of Medical Research**, v. 36, p. 646-659, 2005.

BEARSON, B. L. et al. Use of quantitative antibiogram analysis to determine the lonality of coagulase-negative *Staphylococcus* species from blood culture. **Clin Microbiol Infec**, v. 10, p. 148-155, 2004.

BEEKMANN, S. E.; DIEKEMA, D. J.; DOERN, G. V. Determining the clinical significance of coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 26, n. 6, p. 559-566, 2005.

BÉMER, P. et al. Correlation of agar dilution and VITEK2 system for detection of resistance to macrolides, lincosamides and pristinamycin among *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*: association with genotypes. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, n. 8, p. 656-661, august 2005.

BLOT, F. et al. Earlier positivity of central-venous versus peripheral-blood cultures is highly predictive of catheter-related sepsis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 105-109, 1998.

CAFISO, V. et al. Presence of the *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n. 12, p. 1081-1088, 2004.

CAIERÃO, J. et al. Evaluation of phenotypic methods for methicillin resistance characterization in coagulase-negative staphylococci (CNS). **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, p. 1195-1199, 2004.

CARBON, C. MRSA and MRSE: is there an answer? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 6, suplem. 2, p. 17-22, 2000.

CARRETO, E. et al. Identification of coagulase-negative staphylococci other than *Staphylococcus epidermidis* by automated ribotyping. **Clinical Microbiology and Infection**, vol. 11, n. 3, p. 177-184, march 2005.

CAVASSINI, M. et al. Evaluation of MRSA-Screen, a simple anti-PBP 2a slide latex agglutination kit, for rapid detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1591-1594, 1999.

CHANDRAN, A. U.; RENNIE, R. Routine antimicrobial susceptibility testing of coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures: is it necessary? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, n. 12, p.1037-1040, 2005.

CRHISTENSEN, G. D. et al. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. **Infection and Immunity**, v. 37, n.1, p. 318-326, 1982.

CRHISTENSEN, G. D. et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 996-1006, 1985.

CHRISTENSEN, G. D. The confusing and tenacious coagulase-negative staphylococci. **Adv. Intern. Med.**, v. 32, p. 177-192, 1987.

CHRISTENSEN, G. D.; BALDASSARI, L.; SIMPSON, A. Colonization of medical devices by coagulase-negative staphylococci. In: **Infections Associated with Medical Devices**, Second Edition., 1994, p. 45-78.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fifteenth informational supplement, M100-S15. Wayne, PA, 2005.

CORSO, A. et al. Improvement of a latex agglutination test for the evaluation of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 50, p.223-225, 2004.

COUTO, I. et al. Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by internal transcribed spacer PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3099-3103, 2001.

CUNHA, M. L. R. S.; SINZATO, Y. K.; SILVEIRA, L. V. A. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative staphylococci. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 8, 2004.

De GIUSTI, M. et al. Phenotypic detection of nosocomial *mecA*-positive coagulase-negative staphylococci from neonates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, p. 351-358, 1999.

De PAULIS, A. N. et al. Five-test simple scheme for species-level identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 3, p.1219-1224, 2003.

DOMARACHI, B. E. et al. Increased oxacillin activity associated with glycopeptides in coagulase-negative staphylococci. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 17, p. 143-150, 1998.

EIFF, C. von; HEILMANN, C.; PETERS, G. *Staphylococcus epidermidis*: why is it so successful? **Clin Microbiol Infect**, v. 4, n. 6, p. 297-300, 1998.

EIFF, C. von; HEILMANN, C.; PETERS, G. New aspects in the molecular basis of polymer-associated infections due to staphylococci. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 18, p. 843-846, 1999.

FARBER, J. M. An introduction to the hows and whys of molecular typing. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 10, p. 1091-1101, 1996.

FARRAG, N. et al. *Staphylococcus lugdunensis* endocarditis. **Postgrad Med J**, v. 77, p. 259-260, 2001.

FAVRE, B. et al. Nosocomial bacteremia: clinical significance of a single blood culture positive for coagulase-negative staphylococci. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 26, n. 8, p. 697-702, 2005.

FELTEN, A. et al. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 8, p. 2766-2771, 2002.

FERREIRA, R. B. R. et al. Coagulase-negative staphylococci: comparison of phenotypic and genotypic oxacillin susceptibility tests and evaluation of the Agar screening test by using different concentrations of oxacillin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3609-3614, 2003.

FORBES, B. A.; SAHM, D. F.; WEISSFELD, A.S. *Staphylococcus, Micrococcus* and Similar Organisms. In:———. **Bayiley & Scott's Diagnostic Microbiology**, 11 ed. Mosby: USA, 2002.

FREEMAN, D. J. FALKINER, F.R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **J Clin Pathol**, v. 42, p. 872-874, 1989.

FRIGATTO, E. A. M. et al. Is the cefoxitin disk test reliable enough to detect oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci? **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 2028-2029, 2005.

GARCÍA, P. et al. Coagulase-negative staphylococci: clinical, microbiological and molecular features to predict true bacteremia. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, p. 67-72, 2004.

GHOSHAL, U. et al. A comparative evaluation of phenotypic and molecular methods for the detectin of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci. **J Infect Chemother**, v. 10, p. 86-89, 2004.

GRADELSKI, E. et al. Correlation between genotype and phenotypic categorization of staphylococci based on methicillin susceptibility and resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 8, p. 2961-2963, 2001.

GRAHAM, J. C. Comparison of PCR detection of *mecA* with methicillin and oxacillin disc susceptibility testing in coagulase-negative staphylococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, p. 111-113, 2000.

HEDERSTIERNA-JOHNSEN, T.; SCHONHEYDER, H. C.; PAULSEN, K. Detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci by cefoxitin disc diffusion and oxacillin Etes. **APMS**, v. 113, p. 688-692, 2005.

HEIKENS, E. et al. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2286-2290, 2005.

HORSTKOTTE, M. A. et al. Rapid detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci by a penicillin-binding protein 2a-specific latex agglutination test. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p.3700-3702, 2002.

HUEBNER, J.; GOLDMANN, D. A. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. **Annu. Ver. Med.**, v. 50, p. 223-236, 1999.

HUSSAIN, Z. et. al. Correlation of oxacillin MIC with *mecA* gene carriage in coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 2, p.752-754, 2000(a).

HUSSAIN, Z. et al. Rapid detection of *mec-A*-Positive and *mec-A*-Negative coagulase-negative staphylococci by an anti-penicillin binding protein 2^a slide latex agglutination test. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 6, p.2051-2054, 2000(b).

HUSSAIN, Z. et.al. Detection of methicillin resistance in primary blood culture isolates of coagulase-negative staphylococci by PCR, slide agglutination, disk diffusion, and a commercial method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 2251-2253, 2002.

IEVEN, M. et al. Rapid and economical method for species identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 5, p.1060-1063, 1995.

JARLOV, J. O. et al. Evaluation of different methods for the detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.40, p. 241-249, 1997.

JEKEL, F. F.; ELMORE, J. G.; KATZ, D. L. **Epidemiologia Estatística e Medicina Preventiva**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 1998.

JENSEN, M. A.; WEBSTER, J. A.; STRAUS, N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified riosomal DNA spacer polymorphisms. **Appl Environ Microbiol**, v. 59, p. 945-952, 1993.

JOHN, M. A.; PLETCH, C.; HUSSAIN, S. *In vitro* activity of quinupristin/dalfopristin, linezolid, telitromycin and comparator antimicrobial agents against 13 species of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, p. 933-938, 2002.

KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of *IS431*-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 7, p. 1955-1963, 2001.

KHATIB, R. et al. Coagulase-negative staphylococci in multiple blood cultures: strain relatedness and determinants of same-strain bacteremia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 4, p. p. 816-820, 1995.

KLINGENBERG, C. et al. Coagulase-negative staphylococcal sepsis in neonates. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 24, n. 9, p. 817-822, 2005.

KLOOS, W. E.; BANNERMAN, T.L. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, n. 1, p. 117-140, 1994.

KLOOS, W.; SCHLEIFER, K.H. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 82-85, 1975.

KRAGSBJERG, P. et al. Development of antimicrobial resistance in *Staphylococcus lugdunensis* during treatment – report of a case of bacterial arthritis, vertebral osteomyelitis and infective endocarditis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 6, n. 9, p.496-499, 2000.

KREDIET, T. G. et al. Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococci causing sepsis in a neonatal intensive care unit over as 11-year period. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p.992-995, 2004.

LARGURA, A. et al. Análise crítica da pseudosepticemia e falso negativo: valor diagnóstico das hemoculturas. **RBAC**, v. 37. n. 1, p. 11-14, 2005.

LIVESLEY, M. A. et al. Use of pulsed field gel electrophoresis to determine the source of microbial contamination of central venous catheters. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, vol. 17, p. 108-112, 1998.

LOUIE, L. et al. Evaluation of a latex agglutination test (MRSA-screen) for detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 11, p. 4149-4151, 2001.

LYYTIKÄINEN, O. et al. Increased resistance among *Staphylococcus epidermidis* isolates in a large teaching hospital over a 12-year period. . **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 15, n. 2, p.133-138, 1996.

MACFADDIN, J. F. **Biochemical Tests for identification of medical bacteria**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott, 2000, 912p.

MACKENZIE, A. M. R. et al. Evidence that the National Committee for Clinical Laboratory disk test is less sensitive than the screen plate for detection of low-expression-class methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 7, p. 1909-1911, 1995.

MAKI, D. G. et al. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 296, n. 23, 1977.

MARSHALL, S. A. et al. *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from blood stream infections: frequency of occurrence, antimicrobial susceptibility, and molecular (*mecA*) characterization in the SCOPE program. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 30, p. 205-214, 1998.

MARTIN, M.; PFALLER, M.; WENZEL, R. Coagulase negative staphylococcal bacteremia. Mortality and hospital stay. **Ann Intern Med**, v. 110, p. 9-16, 1989.

MERMEL, L. A. et al. Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, i. 9, 1249-1287, 2001.

MICHELIN, L. et al. Pathogenicity factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus epidermidis* associated with nosocomial infections occurring in intensive care units. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 17-23, 2005.

MIRRET, S. et al. Relevance of the number of positive bottles in determining clinical significance of coagulase-negative staphylococci in blood cultures. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3279-3281, 2001.

MONSEN, T. et al. Prediction of *mecA*-positive coagulase-negative staphylococci: assessment of different phenotypic methods, breakpoints, culture media and culture conditions. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p.197-200, 2002.

MONSEN, T. et al. An inexpensive and reliable method for routine identification of staphylococcal species. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 17, p. 327-335, 1998.

MOUGEOT, C.; GUILLAUMAT-TAILLET, J.; LIBERT, J. M. *Staphylococcus aureus*: nouvelle detection de la résistance intrinsèque par la méthode de diffusion. **Pathol Biol**, v. 49, p. 199-204, 2001.

MULDER, J. G. A simple and inexpensive method for the identification of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus hominis*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 14, n. 12, p. 1052-1056, 1995.

MULDER, J. G.; DEGENER, J. E. Slime-producing properties of coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 4, n. 12, p.689-694, 1998.

MUÑOZ, P. et al. Clinical-epidemiological characteristics an outcome of patients with catheter-related bloodstream infections in Europe (ESGNI-006 Study). **Clin Microbiol Infect**, v. 10, p. 843-845, 2004.

MURAKAMI, K. et al. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 10, p. 2240-2244, 1991.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard, M7-A6. Wayne, PA. 2003.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard, M2-A8. Wayne, PA. 2003.

ODD, L., et al. Role of blood culture systems in the evaluation of epidemiological features of coagulase-negative staphylococcal bloodstream infection in critically ill patients. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 18, p. 899-901, 1999.

PALAZZO, I. C. V.; ARAUJO, M. L. C.; DARINI, A. L. C. First report of vancomycin-resistant staphylococci isolated from healthy carriers in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p.179-185, 2005.

PATEL, R. et al. Frequency of isolation of *Staphylococcus lugdunensis* among staphylococcal isolates causing endocarditis: a 20 - year experience. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p.4262-4263, 2000.

PATRICK, C. C. Coagulase-negative staphylococci: pathogens with increasing clinical significance. **The Journal of Pediatrics**, v. 116, n. 4, p. 497-507, 1990.

PINHO, M. G.; LENCASTRE, H.; TOMASZ, A. Na acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci. **PNAS**, v. 98, n. 19, p. 10886-10891, 2001.

PFALLER, M. A. et al. 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**, v. 33, p. 283-297, 1999.

RAAD, I. et al. Differential time to positivity: a useful method for diagnosing catheter-related bloodstream infections. **Annals of Internal Medicine**, v. 40, n. 1, p. 18-26, 2004.

RAIMUNDO, O. et al. Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococcal bacteraemia in a newborn intensive care unit. **Journal of Hospital Infection**, v. 51, p. 33-42, 2002.

REIMER, L. G. WILSON, M. L.; WEINSTEIN, M. P. Update on detection of bacteremia and fungemia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 444-465, 1997.

REIMER, L. G.; CARROL, K.C. Procedures for the storage of microorganisms. In: P. R. Murray (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology, Eighth Edition**. Washington, DC: ASM Press, v.1, 2003. p.67-73.

RIJNDERS, B. J. A. et al. Difference in time to positivity of hub-blood versus nonhub-blood cultures is not useful for the diagnosis of catheter-related bloodstream infection in critically ill patients. **Critical Care Medicine**, v. 29.n. 7, p. 1399-1403, 2001.

SADER, H. S. et al. Resistance patterns in brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 4, p. 200-214, 2001.

SANDOE, J. A. T. et al. *Staphylococcus capitis* endocarditis: two cases and review of the literature. **Heart**, v. 82, n. 1, 1999.

SAKAI, H. et al. Simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci in positive blood cultures by real-time PCR with two fluorescence resonance energy transfer probe sets. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5739-5744, 2004.

SCHULIN T.; VOSS, A. Coagulase-negative staphylococci as a cause of infections related to intravascular prosthetic devices: limitations of present therapy. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 7, suplem 4, p.1-7, 2001.

SEIFERT, H. et al. Bloodstream infection in neutropenic cancer patients related to short-term nontunnelled catheters determined by quantitative blood cultures, differential time to positivity, and molecular epidemiological typing with pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 118-123, 2003.

SHERERTZ, R. J.; HEARD, S. O.; RAAD, I. I. Diagnosis of triple-lumen catheter infection: comparison of roll plate, sonication, and flushing methodologies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 3, p.641-646, 1997.

SILVA, G. D. I. et al. The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 382-388, 2002.

SILVA, H. L. et al. Nosocomial coagulase negative *Staphylococci* bacteremia: five years prospective data collection. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 4, n. 6, p. 271-274, 2000.

SINGHAL, A. K.; MISHRA, S.; BHATNAGAR, S. Recent advances in management of intravascular catheter related infections. **Indian Journal of Medical & Paediatric Oncology**, v. 26, n. 1, p. 31-40, 2005.

SOUVENIR, D. et al. Blood cultures positive for coagulase-negative staphylococci: antisepsis, pseudobacteremia, and therapy of patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n.7, p. 1923-1926, 1998.

SRINIVASAN, A; DICK, J. M. PERL, T. M. Vancomycin resistance in staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 3, p. 430-438, 2002.

Swedish Reference Group for Antibiotics (SRGA). Disponível em <http://www.srga.org>. Acesso em 02 mar. 2006.

SWENSON, J. M. et al. Optimal inoculation methods and quality control to the NCCLS oxacillin agar screen test for detection of oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus*.. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p. 3781-3784, 2001.

SWENSON, J. M. et al. Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 3818-3823, 2005.

TENOVER, F. C. et al. Methods for improved detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci: results of a multicenter study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 12, p. 4051-4058, 1999.

THOMSON-CARTER, F. M.; PENNINGTON, T. H. Characterization of coagulase negative-staphylococci by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblot analyses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 10, p. 2199-2203, 1989.

THYLEFORS, J. D.; HARBARTH, S. and PITTET, D. Increasing bacteremia due to coagulase-negative staphylococci: fiction or reality? **Infection Control and Hospital Epidemiology**, vol. 19, n. 8, p. 581-589, 1998.

TOJO, M.; YAMASHITA, N. e PIER, G.B. Isolation and characterization of a capsular polysaccharide adhesin for *S. epidermidis*. **J Infect Dis**, v. 157, n. 4, p. 713-122, 1988.

TOLDOS, C. M. et al. Assessment of multiple coagulase-negative staphylococci isolated in blood cultures using pulsed-field gel electrophoresis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 16, n. 8, p. 581-586, 1997.

VANNUFFEL, P. et al. Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 11, p. 2864-2867, 1995.

VIEDMA, D. G. et al. heterogeneous antimicrobial resistance patterns in polyclonal populations of coagulase-negative staphylococci isolated from catheters. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 1359-1363, 2000.

WEINSTEIN, M. P. et al. Clinical importance of identifying coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures: evaluation of MicroScan rapid and dried overnight gram-positive panels versus a conventional reference method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 7, p. 2089-2092, 1998.

WHITENER, C. et al. Endocarditis due to coagulase-negative staphylococci: microbiologic, epidemiologic, and clinical considerations. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 7, n. 1, p. 81-96, 1993.

WISPLINGHOFF, H. et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clin Infect Dis**, v. 39, p. 309-317, 2004.

YORK, M. K. et al. Comparison of PCR detection of *mecA* with standard susceptibility testing methods to determine methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 249-253, 1996.

YORK, M. K. Aerobic Bacteriology. In: H. D. Isenberg (Ed.). **Clinical Microbiology Procedures Handbook, Second Ed.** Washington, DC: ASM Press, v.1, 2004. p.3.1.1. - 3.18.2.1.

ZBINDEN, R. et al. Detection of penicillin-binding protein 2a by rapid slide latex agglutination test in coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p.412, 2001.

ANEXOS E APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Protocolo de coleta das amostras

CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA À OXACILINA EM ESTAFILOCOCOS COAGULASE-NEGATIVA ISOLADOS DE AMOSTRAS CLÍNICAS RELEVANTES

Protocolo de Coleta

I. Técnica de Coleta de Hemocultura:

1. Desinfetar a borracha dos frascos de hemocultura com álcool 70°;
2. Realizar a antissepsia no local da punção durante 1 minuto com álcool 70°;
3. Aguardar 30 segundos e não tocar mais no local da punção;
4. Colher aproximadamente 10 mL para adultos e no mínimo 1 mL para recém-natos e inocular o volume no frasco, anotando no mesmo o horário e sítio da coleta;
5. Para as amostras colhidas através do cateter, os 10 mL iniciais devem ser desprezados;
6. Caso o cateter tenha mais de uma via, colher uma amostra de cada via, anotando no frasco a cor correspondente da via coletada.

II. Procedimentos de coleta em infecções relacionadas a cateter:

1. Quando o cateter não for removido (de longa duração):

- Colher uma amostra de hemocultura de sangue periférico de local diferente do cateter;
- Colher uma amostra de hemocultura através do cateter.

IMPORTANTE: anotar no frasco de hemocultura o horário da coleta e o local da punção.

2. Quando houver suspeita de infecção relacionada a cateter e o cateter for removido:

- Enviar o segmento distal (máximo 5cm), demonstrado na figura 1; se o cateter for longo, enviar o segmento distal e o segmento transcutâneo, como demonstrado na figura 2;
- Colocar os segmentos em frascos estéreis separados (sem meio de transporte), devidamente identificados e enviá-los imediatamente ao laboratório.

IMPORTANTE: a mesma antissepsia realizada no momento da inserção do cateter deve ser realizada para sua retirada.

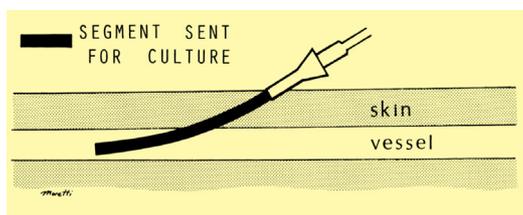


Figura 1

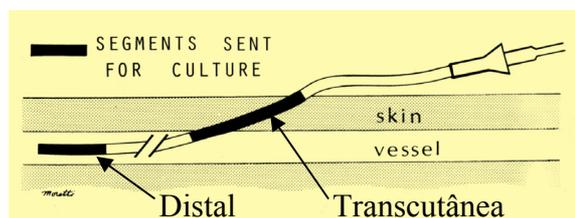


Figura 2

III. Outras situações:

1. **Infecções sistêmicas agudas:** 2 amostras de punções venosas diferentes (braço D e braço E), com intervalo máximo de 5 minutos.
2. **Febre de origem desconhecida, endocardite infecciosa, pacientes em uso de antimicrobianos:** 2-3 amostras de punções venosas diferentes, com intervalo mínimo de 1 hora. Após 24 horas de cultivo, obter mais 2-3 amostras.

Referências:

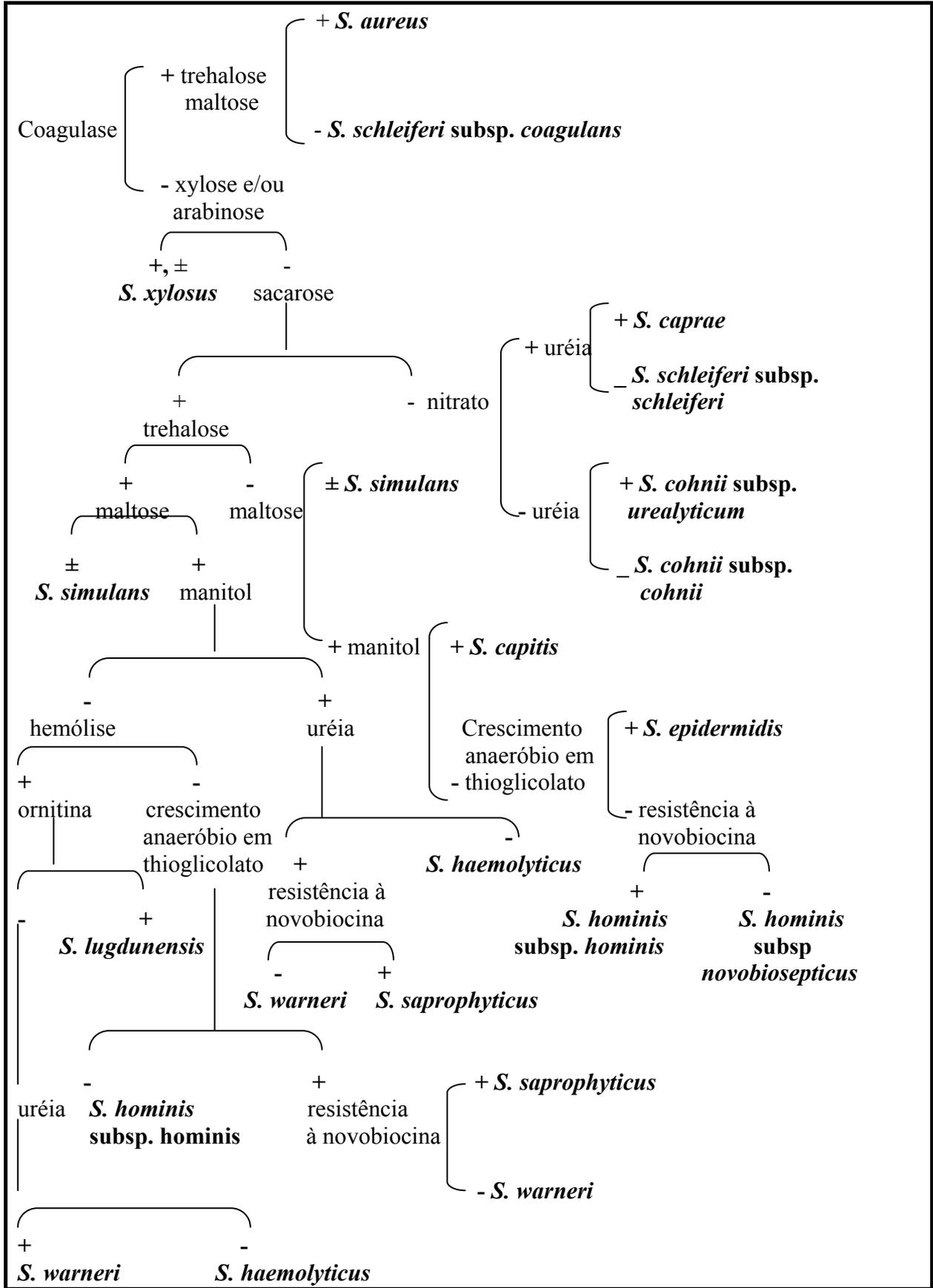
REIMER, L. G.; WILSON, M. L. and WEINSTEIN, M. P. Update on detection of bacteremia and fungemia. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 10, n. 3, p. 444-465, July 1997.

MERMEL, L. A., *et al.* Guidelines for the management of intravascular catéter-related infectious. *Clinical Infectious Diseases*, vol. 32, p.1249-1272, May 2001.

Qualquer dúvida entrar em contato com Larissa pelo telefone (42) 9102-3042, ou com o setor de bacteriologia do HC pelo telefone 360-7975, falar com Larissa, ou Keite.

ANEXO 1 – Termo de aprovação do Comitê de Ética

ANEXO 2 - Esquema de identificação para espécies de ECN



ANEXO 3 – Provas bioquímicas para identificação de ECN

PROVAS BIOQUÍMICAS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE-NEGATIVA, SEGUNDO ESQUEMA PROPOSTO POR CUNHA, SINZATO, SILVEIRA (2004)

REDUÇÃO DE NITRATO

Princípio: determinar a habilidade de um organismo em reduzir nitrato a nitrito ou gás nitrogênio.

Composição e preparo do meio:

COMPONENTES	QUANTIDADE
Extrato de carne	3,0g
Peptona	5,0g
Nitrato de Potássio, KNO ₃ 0,1%	1,0g
Água deionizada q.s.p.	1000mL
<i>pH final do caldo nitrato</i>	7,0 ± 0,2

Pesar as quantidades especificadas na fórmula e rehidratar com água deionizada. Acertar o pH. Dispensar 4,0mL em cada tubo com tampa de rosca. Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

Inoculação bacteriana: inocular no meio com uma alça calibrada 1:100 a suspensão bacteriana preparada em caldo BHI com incubação de uma noite. Incubar a 37°C por 48h.

Interpretação: as leituras são realizadas após a adição de 5 gotas de ácido sulfanílico e 5 gotas de ácido alfa-naftilamina a cada tubo teste. Agitar vagarosamente para misturar os reagentes.

Primeira etapa: as reações são interpretadas quanto à mudança de cor, a saber:

1. Desenvolvimento de cor vermelha: teste positivo.
2. Sem alteração de cor: partir para a segunda etapa.

Segunda etapa: adição de aproximadamente 20mg de zinco em pó. Aguardar de 5 a 10 minutos para a leitura:

1. Ausência de desenvolvimento de cor pela ausência de nitrato no meio, pois este já havia sido reduzido a outros produtos diferentes de nitrato, como amônia, nitrogênio molecular (desnitrificação), óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N₂O) e hidroxilamina. O teste é considerado positivo
2. Desenvolvimento de cor vermelha: os íons zinco reduzem nitrato a nitrito, com o desenvolvimento de cor vermelha, indicando a presença de nitrato que não havia sido reduzido na primeira etapa, confirmando que a reação é realmente negativa.

Cepas controle:

CONTROLE POSITIVO: *Escherichia coli* ATCC 25922

CONTROLE NEGATIVO: *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606

Referência:

KONEMAN, E.W. et. al. **Diagnostic Microbiology: Color Atlas and Testbook**. 5th ed. Lippincot: MEDSI, 2001. cap. 11, p.551-588.

MACFADDIN, J.F. **Biochemical Tests for Identifications of Medical Bacteria**. 3th ed. Lippincot, 2000.

KLOOS, W.E.; SCHLEIFER, K.H. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 82-88, 1975.

PRODUÇÃO DE UREASE

Princípio: a urease é uma enzima encontrada em muitas espécies de microrganismos e pode hidrolisar a uréia para formar amônia. A amônia reage em solução para formar carbonato de amônia, resultando na alcalinização e aumento do pH do meio.

Composição e preparo do meio:

COMPONENTES	QUANTIDADE
Fosfato de sódio dibásico	1,778g
Uréia	20g
Azida sódica (10%)	2,0mL
Vermelho de Fenol (1%)	3,0mL
Água deionizada q.s.p.	1000mL
<i>pH final do caldo uréia</i>	6,5 ± 0,2

Pesar o fosfato, dissolver na água e acertar o pH em 6,5. Separar 100mL dessa solução e acrescentar a azida sódica, o vermelho de fenol e a uréia e reservar. Esterilizar o restante da solução de fosfato por 15 minutos a 121°C. Retirar da autoclave e deixar esfriar. Quando estiver quase frio, acrescentar os 100mL da solução contendo a uréia, a azida sódica e o vermelho de fenol, através de filtração em membrana XXX. Distribuir 4,0mL em tubos com tampa de rosca estéreis.

Inoculação bacteriana: inocular no meio com uma alça calibrada 1:100 a suspensão bacteriana preparada em caldo BHI com incubação de uma noite. Incubar a 37°C por 24 horas.

Interpretação: os microrganismos que hidrolisam a uréia produzem reações positivas em 1 a 2 horas, as espécies menos ativas podem requerer 3 ou mais dias. A mudança da cor amarela para o pink indica alcalinização e hidrólise da uréia, indicando que o teste é positivo. A ausência da mudança de cor no tubo indica que o teste é negativo.

Cepas controle:

CONTROLE POSITIVO: *Proteus mirabilis* ATCC 12453

CONTROLE NEGATIVO: *Escherichia coli* ATCC 25922

Referências:

KONEMAN, E.W. et. al. **Diagnostic Microbiology: Color Atlas and Testbook**. 5th ed. Lippincot: MEDSI, 2001. cap. 11, p.551-588.

FERMENTAÇÃO DE CARBOIDRATOS

Princípio: avaliar a capacidade do microrganismo em fermentar o carboidrato em estudo, através da produção de ácido (aerobicamente) e mudança da cor roxa para amarela no pH 5,2, quando se utiliza púrpura de bromocresol como indicador.

Composição e preparo do meio:

COMPONENTES	QUANTIDADE
Extrato de carne	0,5g
Proteose Peptona n°3	5,0g
Cloreto de sódio	2,5g
Púrpura de bromocresol	0,01g
Água destilada q.s.p.	500mL
Carboidrato	1%
<i>pH final do caldo</i>	$6,8 \pm 0,2$

Misturar todos os componentes e aquecer suavemente até completa dissolução, colocando por último o púrpura de bromocresol. Ajustar o pH em $6,8 \pm 0,2$.

Solução de carboidrato: preparar uma solução a 10%.

Distribuir 3mL de caldo em tubos com tampa de rosca e autoclavar a 121°C por 15 minutos.

Inoculação bacteriana: inocular no meio com uma alça calibrada 1:100 a suspensão bacteriana preparada em caldo BHI com incubação de uma noite. Acrescentar 300µL da solução de carboidrato a 10% para que o mesmo fique com uma concentração final no caldo de 1%. Incubar a 37°C por 24 horas.

Interpretação: a bactéria será considerada fermentadora do carboidrato em estudo se a cor do meio for alterada do roxo para o amarelo e o teste será positivo. Se a cor original do meio continuar inalterada, o teste será considerado negativo.

Cepas controle:

CARBOIDRATO	CONTROLE POSITIVO	CONTROLE NEGATIVO
Sacarose	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Morganella morganii</i>
Manitol	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
Xylose	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Morganella morganii</i>
Trehalose	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Morganella morganii</i>
Maltose	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
β-D-frutose	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>

Referências:

KONEMAN, E.W. et. al. **Diagnostic Microbiology: Color Atlas and Testbook**. 5th ed. Lippincot: MEDSI, 2001. cap. 11, p.551-588.

MACFADDIN, J.F. **Biochemical Tests for Identifications of Medical Bacteria**. 3th ed. Lippincot, 2000.

KLOOS, W.E.; SCHLEIFER, K.H. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 82-88, 1975.

CRESCIMENTO ANAERÓBIO EM THIOGLICOLATO

Princípio: avaliar a capacidade da bactéria em crescer em meio anaeróbio.

Composição e preparo do meio:

COMPONENTES	QUANTIDADE
Casitone	15g
Extrato de levedura	5g
Dextrose	5,5g
Cloreto de sódio	2,5g
L-cystina	0,5g
Thioglicolato de sódio	0,5g
Ágar	2,5g
Resazurina	0,001g
Água destilada q.s.p.	1000mL
<i>pH final do meio</i>	<i>7,1 ± 0,2</i>

Rehidratar todos os componentes da fórmula e aquecer suavemente até completa dissolução. Distribuir 5mL do meio em tubos com tampa de rosca. Realizar este procedimento dentro do banho-maria para evitar solidificação do meio. Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

Inoculação bacteriana: inocular com pipeta de Pasteur em profundidade 100 µL de cultivo bacteriano em caldo BHI por uma noite. Vedar os tubos com vaselina líquida estéril. Incubar a 37°C por 72 horas

Interpretação: a presença de crescimento bacteriano na picada ou em todo o meio indica que a prova é positiva. Se não for observado crescimento bacteriano após 72 horas de incubação, o teste é considerado negativo.

Cepas controle:

CONTROLE POSITIVO: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

CONTROLE NEGATIVO: *Staphylococcus hominis* ATCC 27845

Referências:

KONEMAN, E.W. et. al. **Diagnostic Microbiology: Color Atlas and Testbook**. 5th ed. Lippincot: MEDSI, 2001. cap. 11, p.551-588.

KLOOS, W.E.; SCHLEIFER, K.H. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 82-88, 1975.

DESCARBOXILAÇÃO DA ORNITINA
(Base de Falkow)

Princípio: avaliar a habilidade enzimática de um microrganismo em descarboxilar a ornitina para a forma amina, gerando alcalinidade.

Composição e preparo do meio:

COMPONENTES	QUANTIDADE
Peptona	5g
Extrato de Levedura	3g
Dextrose	1g
Púrpura de bromocresol	0,02g
Água destilada q.s.p.	1000mL
L-ornitina	0,5%
<i>pH final do caldo</i>	<i>6,8 ± 0,2</i>

Rehidratar os componentes da fórmula e aquecer suavemente para completa dissolução. Acrescentar 0,5% de L-ornitina e acertar o pH. Distribuir 4mL em cada tubo com tampa de rosca e autoclavar a 121°C por 15 minutos.

Inoculação bacteriana: inocular no meio com uma alça calibrada 1:100 a suspensão bacteriana preparada em caldo BHI com incubação de uma noite. Cobrir os tubos com vaselina líquida estéril. Sob estas condições o oxigênio do meio é consumido pelo microrganismo, o que controla o pH. Incubar a 37°C por 72 horas.

Interpretação: a prova é considerada positiva quando se observar a cor púrpura turva à tons de púrpura amarelo apagado (produzido pela cadaverina). A cor amarelo claro e brilhante é indicativo de prova negativa (somente fermentação da glicose).

Cepas controle:

CONTROLE POSITIVO: *Enterobacter cloacae* ATCC 13047

CONTROLE NEGATIVO: *Klebsiella pneumoniae* subsp. *Pneumoniae* ATCC 10031

Referências:

MANUAL DIFCO. **Médios de cultivo desidratados y reactivos para microbiologia**. 10. ed. Madrid: Editora 1984.

TESTE DE HEMÓLISE EM ÁGA SANGUE

Princípio: avaliar a capacidade da bactéria em estudo hemolisar o ágar sangue (α ou β hemólise).

COMPONENTES	QUANTIDADE
Columbia Ágar Base	Segundo especificações do fabricante
Água destilada	1000mL
Sangue de Carneiro	5%
<i>pH final do meio</i>	Segundo especificações do fabricante

Preparar o Columbia Ágar Base segundo especificações do fabricante. Acertar o pH. Autoclavar o meio a 121°C por 15 minutos. Deixar atingir a temperatura de 45-50°C e acrescentar 5% de sangue de carneiro.ou 5% de sangue de cavalo Homogeneizar bem e distribuir em placas de 90x15mm.

Inoculação bacteriana: dividir a placa em 8 quadrantes e semear uma alçada da bactéria fazendo uma linha de 1cm na superfície do ágar. Incubar a 37°C por 24 horas, com o objetivo de detecção da hemolisina α . Para a caracterização da hemolisina β , manter as placas a 37°C por 24 horas e depois colocar na geladeira por mais 72 horas.

Interpretação: o resultado positivo é indicado pela formação de zonas de hemólise ao redor do crescimento bacteriano. Quando não se observar áreas de hemólise, o teste é considerado negativo.

Cepas controle:

CONTROLE POSITIVO: *Staphylococcus haemolyticus* ATCC 29970

CONTROLE NEGATIVO: *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305

Referências:

KLOOS, W.E.; SCHLEIFER, K.H. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 82-88, 1975.