

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Caracterização Bioquímica e Morfológica de  
*Staphylococcus aureus* Causadora de Osteomielite**

**Francielle Marques Araujo**

Monografia apresentada à Coordenação do Curso  
de Ciências Biológicas da Universidade Federal  
de Uberlândia para a obtenção do grau de  
Bacharelado em Ciências Biológicas.

**Uberlândia-MG  
Dezembro-2000**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Caracterização Bioquímica e Morfológica de  
*Staphylococcus aureus* Causadora de Osteomielite**

**Francielle Marques Araujo**

**Ms. Daise Aparecida Rossi**

Monografia apresentada à Coordenação do Curso  
de Ciências Biológicas da Universidade Federal  
de Uberlândia para a obtenção do grau de  
Bacharelado em Ciências Biológicas.

**Uberlândia-MG  
Dezembro-2000**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Caracterização Bioquímica e Morfológica de  
*Staphylococcus aureus* Causadora de Osteomielite**

**Francielle Marques Araujo**

Aprovado pela comissão examinadora em \_\_\_\_/\_\_\_\_/00

Nota: \_\_\_\_\_

---

Ms. Daise Aparecida Rossi  
(Orientadora)

---

Ms. Hudson Armando Canabrava  
(Co-Orientador)

---

Dr. Laerte Pereira de Almeida

**Uberlândia-MG  
Dezembro-2000**

*Nove participantes das Olimpíadas Especiais de Seattle, todos com deficiência mental ou física, se alinharam para a largada da corrida dos 100m rasos. Ao sinal, todos partiram, não exatamente em disparada, mas com vontade de dar o melhor de si, terminar a corrida e ganhar. Todos, com exceção de um garoto, que tropeçou no asfalto, caiu rolando e começou a chorar. Os outros oito ouviram o choro. Diminuíram o passo e olharam para trás. Então eles viraram e voltaram. Todos eles. Uma das meninas, com síndrome de Down, ajoelhou, deu um beijo no garoto e disse: "Pronto, agora vai sarar". E todos os 9 competidores deram os braços e chegaram juntos até a linha de chegada. O estádio inteiro levantou e os aplausos duraram muitos minutos. E as pessoas que estavam ali, naquele dia, continuam repetindo a história até hoje...*

## Dedicatória

### *À minha família*

O homem por detrás do balcão olhava a rua de forma distraída. Uma garotinha se aproximou da loja e amassou o narizinho contra o vidro da vitrine. Os olhos da cor do céu, brilharam quando viram um determinado objeto. Entrou na loja e pediu para ver o colar de turquesa azul.

- É para minha irmã. Pode fazer um pacote bem bonito? Diz ela.

O dono da loja olhou desconfiado para a garotinha e lhe perguntou:

- Quanto de dinheiro você tem?

Sem hesitar, ela tirou do bolso da saia um lenço todo amarradinho e foi desfazendo os nós. Colocou-o sobre o balcão e feliz, disse:

- Isso dá?

Eram apenas algumas moedas que ela exibia orgulhosa.

- Sabe, quero dar este presente para minha irmã mais velha. Desde que morreu nossa mãe, ela cuida da gente e não tem tempo para ela. É aniversário dela e tenho certeza que ficará feliz com o colar que é da cor de seus olhos.

O homem foi para o interior da loja, colocou o colar em um estojo, embrulhou com um vistoso papel vermelho e fez um laço caprichado com uma fita verde.

- Tome!, disse para a garota. Leve com cuidado

Ela saiu feliz saltitando pela rua abaixo. Ainda não acabara o dia quando uma linda jovem de cabelos loiros e maravilhosos olhos azuis adentrou a loja. Colocou sobre o balcão o já confeccionado embrulho desfeito e indagou:

- Este colar foi comprado aqui?

- Sim senhora.

- E quanto custou?

- Ah! Falou o dono da loja. O preço de qualquer produto da minha loja é sempre um assunto confidencial entre o vendedor e o cliente.

A moça continuou:

- Mas minha irmã tinha somente algumas moedas! O colar é verdadeiro, não é? Ela não teria dinheiro para pagá-lo!

O homem tomou o estojo, refez o embrulho com extremo carinho, colocou a fita e o devolveu à jovem.

- Ela pagou o preço mais alto que qualquer pessoa pode pagar. Ela deu tudo o que tinha.

## *Agradecimento Especial*

*A Deus,*

*Obrigado Senhor, porque És meu amigo*

*Porque sempre comigo Tu estás a falar...*

*Te agradeço ainda, porque na alegria*

*Ou na dor de cada dia posso Te encontrar*

*Quando a dor me consome murmuro Teu Nome*

*E mesmo sofrendo eu posso falar...*

*Obrigada Senhor!*

## *Agradecimentos*

*Daise,*

*“Não se pode ensinar tudo a alguém, pode-se apenas ajudá-lo a encontrar por si mesmo”*

*Galileu Galilei*

*Hudson,*

*“Ando devagar porque já tive pressa  
E levo esse sorriso porque já chorei demais...”*

*Almir Sater*

*Laerte,*

*Minha homenagem e gratidão pelo carinho e colaboração nesta conquista.*

*Sorinha, Odécio, Liana, Francesca, Sirlene, amigos da FUNDAPE,*

*“Passei...  
Fiz parte de uma história, de um cotidiano, de uma rotina.  
Às vezes os tornei cúmplices de momentos de apuros, frustrações, conquistas e alegrias.  
A convivência nos tornou amigos e, na partida levarei saudades.  
A vocês, a minha sincera homenagem e o meu agradecimento.”*

*Bruno, Jupyracyara, Renata, Valdirene,*

*“Após todos esses anos de convivência, é impossível crer que não viveremos para sempre em nossa mútua lembrança.  
Sejamos nobres o bastante para esquecer as mágoas que existiram.  
Lembre-mos dos momentos de alegria com gratidão e então não teremos sido apenas úteis uns aos outros, mas continuaremos a sê-lo pela vida afora.  
E que, com quantos amigos amigos possamos contar, e ainda que a distância nos afete e nos silencie, ouçamos sempre, nesse silêncio, um pouco de cada um...”*

*Paulo,*

*“Todos os que passam em nossa vida passam sozinhos, mas não vão sozinhos. Levam um pouco de nós e deixam um pouco de si mesmos. Há os que levam muito, porém nunca haverá os que não deixam nada. Esta é a mais bela realidade de nossa vida, prova evidente de que as pessoas não se encontram por acaso.”*

*Richard Bach*

*Tomaz, Lucinha, Geraldo, Zenon, Gismar,*

*A maior das virtudes é a virtude. A melhor maneira de se ter um amigo é sê-lo.  
Obrigada pela ajuda nas horas difíceis.*

*Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma colaboraram, direta ou indiretamente na realização deste trabalho.*

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	03
2.1. Osteomielite: Aspectos Gerais.....	03
2.2. Osteomielite: Histórico.....	04
2.3. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	05
2.4. Antibióticos.....	08
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1. Caracterização bioquímica e sensibilidade a antibióticos.....	11
3.1.1. Procedimentos técnicos.....	13
3.2. Inoculação em coelhos.....	14
3.3. Recuperação e contagem do <i>S. aureus</i> do osso rádio de coelhos.....	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4.1. Caracterização bioquímica e sensibilidade a antibióticos.....	17
4.2. Padronização do inóculo de <i>Staphylococcus aureus</i> e inoculação nos coelhos.....	17
4.3. Recuperação e contagem dos <i>S. aureus</i> do osso rádio de coelhos.....	20
5. CONCLUSÃO.....	22
6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	23

## Resumo

Com o objetivo de caracterizar e padronizar o inóculo de *Staphylococcus aureus*, usado para induzir experimentalmente osteomielite em coelhos, foram utilizadas provas bioquímicas, morfologia típica e teste de sensibilidade a antibióticos. Inicialmente, foi estabelecida a correlação entre unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e densidade óptica (DO<sub>490nm</sub>), que resultou em uma reta de regressão para a cepa estudada, que foi de  $Y = -0,0148 + 0,00001X$ , com  $R^2 = 0,99$ , sendo esta relação utilizada para padronizar o inóculo em  $10^6$  UFC. A cepa antes e após inoculação no osso rádio de coelho, apresentou morfologia típica de cocos agrupados, positivos na coloração diferencial de Gram, além de termonuclease, catalase, coagulase, manitol positivos. No teste de difusão em disco (antibiograma), a cepa mostrou-se sensível a vários antimicrobianos, sugerindo que o *S. aureus* inoculado foi o mesmo retirado do osso rádio dos coelhos. A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) ao antibiótico cefazolina, foram obtidas através do teste de diluição sendo a CIM de 2 mcg/mL e a CBM de 8 mcg/mL. Os halos de inibição medidos no antibiograma foram utilizados para construção de um dendrograma, que determinou que as bactérias *S. aureus* isolados dos ossos dos coelhos eram similares a anteriormente inoculada ( $p > 0,05$ ).

**Palavras-chave:** *Staphylococcus aureus*, cefazolina, osteomielite, dendrograma.

## 1. INTRODUÇÃO

A patogenia da osteomielite, segundo NORDEN (1988), tem sido explorada em vários modelos animais. Estes estudos têm demonstrado que o osso normal é altamente resistente à infecção, que só ocorre como resultado de uma grande quantidade de contaminação, trauma ou a presença de corpos estranhos (BELMATOUG *et al.*, 1996, ZIMMERLI *et al.*, 1984).

*Staphylococcus aureus* é reconhecidamente um dos mais importantes agentes de doenças em humanos e outros animais, tais como a osteomielite hematogena e traumática, bacteremias, endocardite bacteriana, pneumonia, choque séptico e gastroenterite causada por toxina estafilocócica. Segundo ARCHER (1998), foi descrito pela primeira vez em 1882 a participação destes microrganismos na formação de abscessos e em quadros de sépsis, em pacientes humanos. Hoje, mais de 100 anos depois, o *S. aureus* continua sendo um versátil e perigoso patógeno.

A frequência de infecções humanas adquiridas na comunidade e em hospitais têm crescido de forma constante e *S. aureus* só é suplantado por estafilococos coagulase negativos como causa de infecções hospitalares (ARCHER, 1998) e permanece como o microrganismo mais frequentemente isolado em todos os tipos de osteomielite (LEW & WALDVOGEL, 1997), inclusive em animais (FOSSUM & HULSE, 1992).

A terapêutica destas infecções tem se tornado mais difícil devido ao aumento, em todo o mundo, da prevalência de cepas resistentes à meticilina (ARCHER, 1998). A cefazolina, em função de seu espectro antimicrobiano útil e de seu comportamento farmacocinético, tem sido amplamente utilizada para prevenir a ocorrência de infecções pós-operatórias causadas por estafilococos.

Devido a importância do *Staphylococcus aureus* como causa de osteomielite em humanos e animais, o presente trabalho possui como objetivos:

- Caracterizar através de provas bioquímicas e susceptibilidade a antimicrobianos as cepas de *S. aureus* antes e após a inoculação no osso rádio de coelhos.
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do antibiótico cefazolina frente a cepa de *S. aureus* utilizada.
- Correlacionar o número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) de *S. aureus* e densidade óptica a 490nm ( $DO_{490nm}$ ), para padronização de inóculos para indução de osteomielite em coelhos.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Osteomielite: Aspectos Gerais

Osteomielite é definida como uma inflamação da medula óssea, córtex, e possivelmente periósteo. A causa mais comum da osteomielite é de origem bacteriana, sendo outros agentes os fungos, parasitas, vírus, corpos estranhos e corrosão de implantes metálicos (JANG *et al.*,1986; TEAGUE *et al.*,1978). Osteomielite é freqüentemente classificada como hematogênica ou pós-traumática (FOSSUM & HULSE,1992).

A freqüência de osteomielite pós-operatória em humanos tem sido estimada entre 0,5% e 1,8% (ROESGEN *et al.*,1989). O desenvolvimento da osteomielite prejudica a cicatrização da fratura, requerendo procedimentos médicos e cirúrgicos para o controle da infecção. Os mais importantes fatores na patogenicidade da osteomielite pós-traumática são a extensão da destruição do tecido e a alteração de fluxo sangüíneo, a inoculação de flora bacteriana, a estabilização do reparo da fratura e os fatores sistêmicos ou locais que afetem a vigilância do sistema imune, o metabolismo ou a vascularização local (MADER & CALHOUN, 1989, ROESGEN *et al.*, 1989).

As características clínicas da osteomielite dependem do estágio da doença. A resposta inicial do osso à infecção é uma inflamação; o tecido macio na área torna-se quente, avermelhado, inchado e doloroso. Evidências sistêmicas da infecção são indicadas pela contagem elevada de células brancas no sangue como os neutrófilos (FOSSUM & HULSE, 1992).

Osteomielite ocorre devido a infecções monomicrobiais ou polimicrobiais. Em infecções monomicrobiais, organismos gram-positivos, particularmente *S. aureus*, são comumente isolados. Outros organismos comumente identificados incluem *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Proteus* e *Pasteurella multocida*. Em grandes hospitais,

*Pseudomonas*, *Klebsiella* e *Proteus* são isolados comuns, sendo estes organismos normalmente, extremamente resistentes a várias drogas antibacterianas (PARKER, 1987).

É através de receptores (adesinas) para componentes da matriz óssea e cartilaginosa (fibronectina, laminina, colágeno e sialoglicoproteína), que os estafilococos aderem aos ossos. Recentemente, foi elucidada a participação de adesinas ligadoras de fibronectina na fixação destas bactérias à materiais metálicos implantados cirurgicamente (FISCHER *et al.*, 1996).

Os osteoblastos são capazes de internalizar estafilococos. A persistência das infecções ósseas é justificada pela sobrevivência intracelular das bactérias, algumas vezes como pequenas colônias variantes. As bactérias quando aderidas ao osso, podem expressar resistência fenotípica aos agentes antimicrobianos, o que pode explicar a elevada taxa de falha quando da terapêutica de curta duração (CHUARD *et al.*, 1991).

## 2.2. Osteomielite: Histórico

Existem motivos para acreditarmos que há 500.000 anos (pré-história) a osteomielite já acometia nossos ancestrais. Pesquisas realizadas em fósseis do “Homem de Java” e do “Homem de Neanderthal” levaram a suspeitas de incidência da doença no primeiro e identificaram vestígios da mesma no segundo (BISHOP, 1960).

Civilizações antigas, tais como egípcia, hindu e chinesa, mesmo sem conhecerem a etiopatogenia desta afecção óssea, já se preocupavam com seu tratamento. Tentavam debelar a doença através de imobilizações associadas a infusórios aplicados em forma de compressas (FRANK & ZITTER, 1971).

Com o decorrer do tempo, posteriores civilizações antigas aperfeiçoaram técnicas e conhecimentos, tais como a lavagem contínua com água de nascente (GARRISON, 1929), limpeza total das feridas, amputações, elevação do membro acometido, bandagens no século XVI, conscientização da formação de seqüestro (GILMOR, 1962) e seqüestrectomia no século XVIII.

O conhecimento nesta área ainda se fundamentava em observações vagas que só ganharam apoio sólido quando Pasteur em 1869 descobriu a bactéria. A seguir, com o reconhecimento por Lord Lister de que os microrganismos eram os responsáveis pela

infecção, e posteriormente, com a descrição da patogenicidade dos microrganismos na osteomielite aguda feita por Lexer em 1894, iniciou-se outra etapa em seu tratamento (CHEYNE, 1925).

No séc. XX, o advento do antibiótico proporcionou o mais importante progresso na terapêutica da infecção óssea.

### 2.3. *Staphylococcus aureus*

A palavra estafilococo significa “cachos de uvas” e descreve os aglomerados e agregados de cocos Gram-positivos observados na coloração pelo método de Gram. Os estafilococos produzem catalase, degradando o peróxido de hidrogênio a  $H_2O$  e  $O_2$  enquanto os estreptococos não possuem esta capacidade. Os estafilococos são imóveis e anaeróbios facultativos, característica que indica que podem crescer igualmente em condições aeróbicas e anaeróbicas. O teste da coagulase identifica exoenzimas produzida por *S. aureus*, que interagem com um fator plasmático semelhante à protrombina, convertendo o fibrinogênio em fibrina, com conseqüente coagulação do plasma. Trata-se do teste que tradicionalmente distingue a espécie *S. aureus* dos numerosos estafilococos coletivamente denominados “estafilococos coagulase-negativos” (ARCHER, 1997).

*S. aureus* é um membro da família Micrococcaceae, que pode ser distinguido de outros estafilococos com base na pigmentação dourada de suas colônias em determinados meios e resultados positivos de testes de coagulase, desoxiribonuclease e fermentação do manitol (LOWY, 1998).

O genoma do *S. aureus* consiste em um cromossoma circular, apresentando também profagos, plasmídeos e transposons. Os genes que governam a virulência e a resistência à antibióticos são encontrados tanto no cromossoma como em elementos extracromossomiais e podem ser transferidos entre cepas de *S. aureus*, para outras espécies de estafilococos e até para outros tipos de bactérias Gram positivas (SCHABERG & ZERVOS, 1986).

Para proteção e manutenção da forma todas as células bacterianas típicas têm um envoltório semi-rígido, a parede celular. Nos estafilococos a parede celular tem cerca de 50% do seu peso constituído de peptideogligano (PepG), um mucopeptídeo formado por subunidades dos polissacarídeos N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico, ligados

por uma ponte de pentaglicina, sendo que esta estrutura semi-rígida é capaz de suportar elevadas pressões internas (PELCZAR *et al.*, 1996).

Muitos estafilococos produzem microcápsulas, sendo conhecidos 11 tipos de sorotipos de polissacarídeos microcapsulares. Os tipos 5 e 8 estão presentes em 75% dos *S. aureus* isolados de infecções humanas, assim como a maioria das cepas resistentes à meticilina apresentam o primeiro sorotipo (LEE,1996).

PATTI *et al.* (1994) demonstraram que várias das proteínas de superfície deste microrganismo se ligam às moléculas da matriz extracelular, desempenhando importante papel na colonização dos tecidos por estafilococos. Estas proteínas são reconhecidas como componentes de superfície microbiana reconhecedores de moléculas de adesão da matriz (MSCRAMM).

Numerosas toxinas podem ser produzidas por estes germes, representando importantes fatores de virulência. Citocinas, como a alfa-toxina, induzem a formação de poros e alterações pró inflamatórias nas células de mamíferos, danificando-as e contribuindo para manifestações da síndrome septicêmica (BHAKDI & TRANUM-JENSEN,1991). Outros exemplos de fatores de virulência são a toxina da síndrome do choque tóxico 1 (TCST1), as toxinas esfoliativas (toxinas de epidermólise tipo A e B) e as enterotoxinas tipo A, B, C (LOWY, 1998).

Protease, lipase e hialuronidase são enzimas produzidas por estafilococos que facilitam a expansão da infecção (LOWY, 1998), enquanto as betalactamases desempenham importante papel na resistência destes germes aos antibióticos betalactâmicos, como penicilinas e cefalosporinas (CHAMBERS, 1997).

Vários produtos e um poderoso arsenal de componentes celulares podem atuar em conjunto ou isoladamente como fatores de virulência dos *S. aureus*, como: microcápsula, proteína A, proteases, hialuronidase, toxina da síndrome do choque tóxico, enterotoxinas, entre outras . Pouco se sabe sobre as interações de cada um destes fatores entre si e com o hospedeiro (LOWY,1998).

*S. aureus* é encontrado de modo assintomático nas mucosas da parte anterior das narinas, nasofaringe, vagina e/ou reto em 20% a 40% dos adultos normais e sadios sem qualquer doença subjacente. O estado de portador pode ser transitório, de várias horas a dias de duração, pode ser intermitente, por várias semanas a meses, recorrente ou crônico e persistir durante meses a anos a despeito das tentativas de erradicação. Ocorre claramente

o transporte transitório do microrganismo nas mãos, constituindo um importante meio de troca entre pacientes e equipe hospitalar (ARCHER,1997).

*S. aureus* é extremamente resistente e consegue sobreviver ao ressecamento, a extremos de temperatura ambiente, a amplas variações do pH e ao alto teor de sal. Por conseguinte, é capaz de sobreviver no ambiente hospitalar, em objetos inanimados como travesseiros, lençóis e manguitos de pressão arterial durante algum tempo. Todavia, o principal reservatório de *S. aureus* tanto em hospitais quanto na natureza é o ser humano (ARCHER,1997).

A colonização é o primeiro dos estágios na patogênese das doenças estafilocócicas, seguida da infecção, sendo que os indivíduos normais parecem ser muito resistentes a infecções locais. O epitélio escamoso cornificado intacto é normalmente uma barreira contra colonização e infecção por *S. aureus*, e mesmo a injeção de microrganismos virulentos na pele só irá produzir infecção se houver também corpos estranhos, como fios de suturas, cateteres e outros. Além disso, o soro da maioria dos adultos contém opsoninas termolábeis e termoestáveis (complemento e anticorpo específico) que se mostram altamente eficazes para mediar a fagocitose e a destruição de *S. aureus* por neutrófilos (ARCHER,1997, LOWY,1998).

A característica básica da infecção estafilocócica localizada é o abscesso, uma lesão isolada, consistindo em necrose central, liquefação, restos celulares e bactérias em multiplicação circundados por uma camada de fibrina e células fagocíticas íntegras (ARCHER,1997).

Uma pequena porcentagem de infecções localizadas, sofre disseminação quando *S. aureus* tem acesso à circulação sangüínea. A disseminação caracteriza-se por bacteremia e infecção metastática (ARCHER,1997).

O isolamento de *S. aureus* de material clínico é relativamente simples, já que o microrganismo cresce em diferentes meios de cultura líquidos e sólidos usuais em laboratórios (PELCZAR *et al*, 1996). Na padronização de inóculos para utilização em infecções experimentais, no entanto, os procedimentos são mais específicos, necessitando de métodos previamente otimizados como a correlação linear, que utiliza a densidade óptica em luz transmitida como forma de estimar a população bacteriana JORGE *et al*. (1990), propôs a leitura em luz transmitida a 490 nanômetros em diluições previamente

realizadas e a paralela contagem em placas, como forma de correlacionar e estimar a população de *S. aureus* em caldos de cultivo utilizados como inóculos.

#### 2.4. Antibióticos

Segundo o conceito original de Waskman, estabelecido em 1942, deu-se o nome de antibióticos às substâncias elaboradas por seres vivos, geralmente microscópios, dotadas de atividade antimicrobiana, atuando em pequenas concentrações como tóxicos seletivos (NETO *et al.*, 1985).

Um antibiótico tem como principais características ser sempre um produto do metabolismo de seres vivos, embora possa ser duplicado ou até já haver sido obtido por síntese química, antagonizar o crescimento e/ou a sobrevivência de uma ou mais espécies de microrganismos, ser eficaz em concentrações baixas (FONSECA, 1988).

Os antibióticos são produzidos por bactérias ou fungos, dos gêneros ascomicetos ou actinomicetos e podem ser classificados em bactericidas e bacteriostáticos. Denomina-se bacteriostático ao antibiótico que, nas concentrações habitualmente atingidas no organismo, é capaz de inibir a multiplicação dos microrganismos suscetíveis, sem todavia destruí-los, já o bactericida é capaz de, nas concentrações habitualmente atingidas, determinar a morte dos microrganismos susceptíveis (FONSECA, 1988).

Chama-se antibiograma a verificação da sensibilidade ou resistência de uma bactéria a determinados antibióticos. A determinação desta susceptibilidade pode ser feita pelo método das diluições ou pelo método da difusão. O método das diluições consiste em efetuar diluições seriadas de um antibiótico em meio de cultura adequado ao crescimento da bactéria em estudo, sendo o método mais utilizado em pesquisa científica (FONSECA, 1988).

Normalmente os resultados *in vitro* correspondem aos *in vivo*, entretanto, é preciso compreender que o antibiograma é uma técnica realizada *in vitro* para orientação clínica e aplicação *in vivo*, residindo neste fato as suas limitações. O objetivo da realização de um antibiograma é a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do antibiótico capaz de atuar sobre determinado germe (FONSECA, 1988). A CIM é definida como a mais baixa concentração do agente que inibe visivelmente o crescimento, assim é possível também determinar a concentração bactericida mínima (CBM) que é determinada pelo não

crescimento da cultura de tubos contendo o agente antimicrobiano (COLLINS *et al.*, 1995).

Com o aumento da prevalência das cepas multidrogas resistentes, a terapêutica das infecções por estafilococos tem se tornado a cada dia mais difícil e desafiadora (ARCHER,1998). Vários agentes antimicrobianos podem representar alternativas, em situações especiais, para a terapêutica de infecções por estafilococos, tais como, tetraciclina, macrolídeos, lincosamidas e clorafenicol (YUK *et al.*, 1991). Clindamicina representa uma das opções para a terapêutica da osteomielite estafilocócica (LEW & WALDVOGEL, 1997). Os agentes antimicrobianos eficazes para o tratamento das infecções por *S. aureus* são, entre outros, a penicilina G, penicilinas e cefalosporinas antiestafilocócicas e vancomicina (ARCHER,1997).

Quando a penicilina foi introduzida pela primeira vez, menos de 10% das cepas estafilocócicas isoladas de pacientes ou portadores eram resistente à esta droga. Atualmente, 60 a 90% dos estafilococos isolados de pacientes hospitalizados em todo o mundo ocidental são resistentes à penicilina G, o que está associado à ação de betalactamases, proteases que hidrolizam o anel betalactâmico e que são produzidas pela maioria dos estafilococos (ROGERS & TURCK, 1977).

A resistência à meticilina confere resistência a todas as penicilinas similares e às cefalosporinas. Este fenômeno foi identificado imediatamente após a introdução da meticilina na clínica, quando recebeu a designação de “resistência intrínseca” por não estar associada à produção de betalactamases (CHAMBERS,1997). As penicilinas semi-sintéticas similares à meticilina, tais como oxacilina e nafcilina, representam a primeira escolha para o tratamento de infecções por este patógeno, visto que a quase totalidade dos estafilococos encontrados na clínica produzem betalactamases, sendo resistentes à penicilina G. A cefazolina é uma alternativa para pacientes com alergia às penicilinas, nesta situação, também deve ser considerada a possibilidade de utilização da vancomicina (LOWY, 1998).

A cefazolina foi introduzida na prática médica em 1973, usada exclusivamente por via parenteral, não é metabolizada no fígado, sendo eliminada por filtração glomerular e secreção tubular; quase 100% são recuperados na urina, sob forma ativa. A dor local provocada pela injeção intramuscular da cefazolina é relativamente pequena e as concentrações alcançadas na bile são mais elevadas. Como a cefazolina deve ser

administrada com intervalos mais longos do que os exigidos para a cefalotina, há tendência de ser indicada com maior freqüência quando comparada à administração da cefalotina (NETO *et al.*, 1985).

Em geral, o tratamento das infecções estafilocócicas consiste na administração de agentes antimicrobianos, drenagem cirúrgica ou com cateter dos abscessos e remoção dos corpos estranhos. A duração da terapia é habitualmente de 1 a 2 semanas para infecções localizadas e drenadas, não associadas a bacteremia ou a corpo estranho. Os pacientes com osteomielite causada por *S. aureus*, necessitam de pelo menos 6 semanas de terapia (ARCHER,1997).

Quando a osteomielite se estabiliza no osso, o tratamento torna-se mais difícil. Os princípios básicos da terapia, incluem a curetagem da ferida, estabilização da fratura, drenagem e obliteração do espaço morto e administração de antimicrobianos apropriados (FOSSUM & HULSE,1992).

A administração de antibióticos é usada para complementar a terapia cirúrgica . A escolha da droga depende dos resultados das culturas aeróbicas e anaeróbicas. Numerosos estudos têm investigado a eficácia de vários tratamentos com antibióticos em modelos animais com osteomielite experimental induzida (MADER & WILSON, 1983 , GOMIS *et al.*, 1990).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

A cepa de *Staphylococcus aureus* utilizada no experimento foi previamente obtida no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC/UFU), isolada de um paciente com osteomielite. No Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada da Universidade Federal de Uberlândia, a cultura isolada foi reativada e caracterizada através de provas bioquímicas e sensibilidade a antimicrobianos.

A sequência de procedimentos adotados no presente trabalho pode ser melhor observada na Figura 1.

#### 3.1. Caracterização bioquímica e sensibilidade a antibióticos

A cultura de *S. aureus* foi inicialmente reativada em 5mL de caldo BHI (Infusão de cérebro e coração) e incubada à 35°C por 24 horas. Antes de sua caracterização, a cultura reativada foi repicada por pelo menos mais três vezes, de forma a garantir sua estabilidade. A cepa estabilizada foi então caracterizada através de provas bioquímicas e de sensibilidade a antibióticos e os resultados registrados para posterior comparação com os *S. aureus* isolados dos animais infectados, de forma a garantir que fossem os mesmos previamente inoculados. O microrganismo foi também inicialmente testado quanto a sensibilidade à cefazolina através de antibiograma, sendo considerada a sensibilidade a este antimicrobiano, condição essencial ao trabalho, já que esta foi a droga testada nos animais. A caracterização morfológica e bioquímica dos *S. aureus* isolados constou de características das colônias em ágar Baird Parker (BP), observação microscópica, teste de catalase, coagulase, tipo de hemólise em ágar sangue de carneiro e cavalo, fermentação do manitol, urease, oxidase fermentativa, DNase e antibiograma (MURRAY *et al.*, 1999).

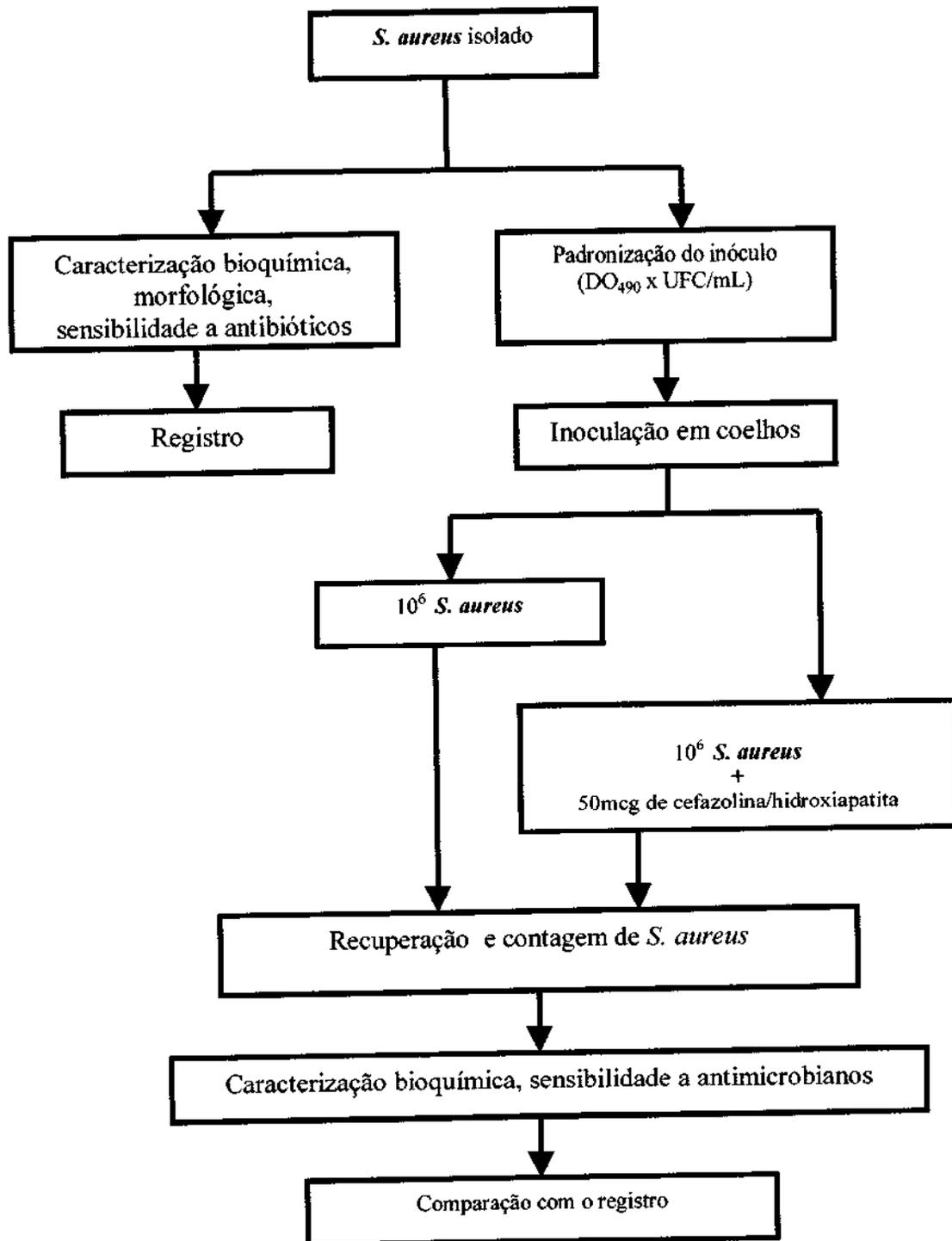


Figura 1. Sequência dos procedimentos realizados.

A sensibilidade do *S. aureus* a cefazolina constou além do teste clássico do antibiograma utilizando disco, na realização do teste da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). Para a realização dos testes CIM e CBM, o método utilizado foi o de sensibilidade a drogas antimicrobianas pelo método da diluição em caldo (COLLINS, 1995).

### 3.1.1. Procedimentos técnicos

Para execução dos testes de CIM e CBM, inicialmente, em condições assépticas, foram pesados 3,2mg do antibiótico cefazolina, que foi diluído com caldo BHI estéril em um balão volumétrico até o volume de 25mL, de forma a obter uma concentração de 128 mcg/mL do antibiótico (solução estoque). Para o teste foram utilizados uma série de 10 tubos estéreis, todos contendo 0,4mL de uma cultura recente (24horas) de *S. aureus*. O tubo 1 foi utilizado como controle e adicionado de 9,6mL de BHI estéril, sem antibiótico. Nos 9 tubos restantes (contendo 0,4mL da cultura), foram adicionados quantidade suficiente da solução estoque de forma a obter a concentração de 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 e 0.0625mcg/mL de cefazolina, respectivamente. Todos os tubos foram completados até o volume de 10mL com BHI estéril, homogeneizados e incubados a 35°C/24 horas.

Após incubação, foi observado em quais tubos houve crescimento visível (turbamento) em relação ao tubo controle. A menor concentração de antibiótico suficiente para inibir o crescimento visível foi considerada a CIM.

Dos tubos que não apresentaram turvação visível, foram transferidas 1mL para placas de Petri estéreis e adicionados 15mL de ágar BHI previamente fundido e resfriado a 45°C. Após homogeneização e solidificação, as placas foram incubadas a 35°C/24 horas, quando então, foi observado a presença ou não de crescimento. A menor concentração de antibiótico suficiente para impedir o crescimento de colônias foi considerada a CBM.

Para verificar o comportamento da cultura isolada de *S. aureus* frente a diferentes antimicrobianos foi utilizado antibiograma através do método de difusão proposto por BAUER *et al.* (1966). Para realização do teste, as amostras foram cultivadas em ágar BHI

e, posteriormente, 5 colônias foram repicadas em caldo Mueller Hinton e incubadas a 35°C/2 horas para atingir uma turvação equivalente a escala 0,5 de McFarland, correspondendo a uma concentração de  $1-2 \times 10^8$  UFC/mL. Com auxílio de um swab, a cultura foi semeada em placas de ágar Mueller Hinton de modo a obter um crescimento confluyente. Após 10 minutos, foram depositados os discos antimicrobianos (CEFAR®) das seguintes bases: amicacina (30mcg), cefoxicitina (30 mcg), ceftriaxone (30mcg), ciprofloxacina (5mcg), clindamicina (2mcg), eritromicina (15mcg), gentamicina (10µcg), imipenem (10mcg), ofloxacina (5mcg), oxacilina (1mcg), pefloxacina (5mcg), rifampicina (30mcg), trimetoprima (5mcg), teicoplanina (30mcg), vancomicina (30mcg). Após incubação a 35°C/24 horas foram medidas, com auxílio de paquímetro, as zonas de inibição, sendo o biotipo classificado como resistente, intermediário ou sensível ao antimicrobiano testado. Este teste foi realizado em dois dias diferentes, com objetivo de obter uma média de corte e de similaridade, sendo estes resultados comparados através do dendrograma, utilizando o programa Statistica Development Environment, com as cepas posteriormente recuperadas dos ossos dos coelhos infectados. Segundo BLANC *et al.*, (1994) a construção de dendrogramas baseados nas medidas dos halos de inibição, pode ser utilizado para caracterização de microrganismos, já que apresenta alta correlação positiva com a identificação através da ribotipagem.

### **3.2. Inoculação em coelhos**

Para o experimento foram utilizados 24 coelhos saudáveis, que foram inoculados com *S. aureus*. A inoculação dos animais foi realizada através de interferência cirúrgica no osso rádio, onde os microrganismos foram injetados, de modo a induzir a infecção óssea. Estes animais, foram divididos em três grupos experimentais: Grupo 1 (controle)- não receberam antibiótico; Grupo 2 - receberam cefazolina (50mcg) de forma sistêmica; Grupo 3 – receberam antibiótico local (50mcg) associado a hidroxiapatita de forma que a droga fosse lentamente liberada. Esta etapa do experimento foi realizada por outra equipe de pesquisadores, não sendo parte do presente trabalho, que trabalhou exclusivamente com o cultivo, quantificação e caracterização do *S. aureus* utilizado.

Para inoculação nos coelhos, a cultura foi padronizada quantitativamente, de modo a garantir o mesmo número de microrganismos inoculados em cada animal. Com este objetivo, através da correlação densidade óptica ( $DO_{490nm}$ ) x unidade formadora de colônia por mililitro de *S. aureus* (UFC/mL), foi construída uma equação e reta de regressão.

Os procedimentos para construção da equação e reta de regressão foram os recomendados por JORGE *et al.*, (1990). A cultura previamente reativada foi inoculada (4%) em 20mL de caldo BHI, incubada por 24 horas a 35°C e após crescimento, centrifugada a 10.000 rotações por minuto (r.p.m.) por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante desprezado e o “pellet” ressuspensionado em 9mL de água peptonada tamponada (APT). Este tubo foi considerado como a diluição  $10^{-1}$  e, a partir dele, realizadas diluições decimais consecutivas (até  $10^{-10}$ ) em APT. Todas as diluições foram inoculadas em profundidade em placas de Petri, adicionado ágar BHI, previamente fundido e resfriado a 45°C, homogeneizadas e, após solidificação, incubadas em posição invertida em estufa a 35°C/24 horas. Após incubação, foi realizada a contagem das colônias e os números obtidos multiplicados pela recíproca da diluição utilizada e o resultado registrado como UFC/mL. Paralelamente, em espectrofotômetro (GBC UV/VIS 911A), foi medida a densidade óptica em luz transmitida em comprimento de 490 nanômetros, de todas as diluições realizadas (JORGE *et al.*, 1990).

Os resultados obtidos na contagem em UFC/mL de *S. aureus* e a  $DO_{490nm}$  foram correlacionados e utilizados na construção da equação e reta de regressão, sendo o programa utilizado para os cálculos o Bio-Estat. Estes dados foram utilizados para determinar a quantidade de inóculo a ser injetado em cada coelho, de forma que cada animal fosse inoculado com  $10^6$  microrganismos. No dia da cirurgia, um cultivo era incubado até atingir  $DO_{490nm}$ , equivalente a  $10^9$  UFC/mL de *S. aureus*, retirado uma alíquota de 1mL, diluído em 9mL de APT, que era conservado em gelo até o momento da cirurgia, quando era inoculado 0,01mL/osso. Paralelamente, no laboratório, a cultura era quantificada através do método clássico em placas e o resultado anotado para comparação.

### **3.3. Recuperação e contagem do *S. aureus* do osso rádio de coelhos**

Após quatro semanas de observação, os animais teste e controle foram sacrificados e após nova intervenção cirúrgica, fragmentos do osso rádio foram levados para a análise

microbiológica. Para quantificação das UFC de *S. aureus* por grama de osso, o fragmento ósseo foi pesado em papel alumínio estéril, macerado em 1mL de APT e 0,1mL desta mistura, estriado na superfície de Baird-Parker Agar (BP). O peso do osso e o volume de APT foram utilizados para cálculo de um fator de diluição em cada osso analisado. A placa foi incubada em estufa a 35°C/24 horas e as colônias contadas. Após multiplicação do número de colônias contadas pela recíproca da diluição utilizada, o resultado foi registrado como UFC/g de osso.

Os microrganismo isolados dos ossos foram submetidos à provas bioquímicas, teste de difusão em discos para vários antibióticos, CIM e CBM para cefazolina de forma a caracterizar que o mesmo era o previamente inoculado. Todos os procedimentos de análises foram realizados em duplicata.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Caracterização bioquímica e sensibilidade a antibióticos**

A amostra proveniente do Hospital das Clínicas da UFU utilizada para inoculação dos coelhos, foi classificada como *Staphylococcus aureus*, após teste bioquímicos e morfológicos. A cepa isolada apresentou morfologia típica de cocos agrupados e coloração diferencial de Gram, termonocleuse, catalase, manitol e coagulase positivos e produção de hemolisina beta e delta.

No teste de difusão em discos, a cepa se mostrou sensível a todos os antimicrobianos testados. A medida média de duas leituras do halo de inibição em milímetros aos diferentes antimicrobianos podem ser observados na Tabela 1.

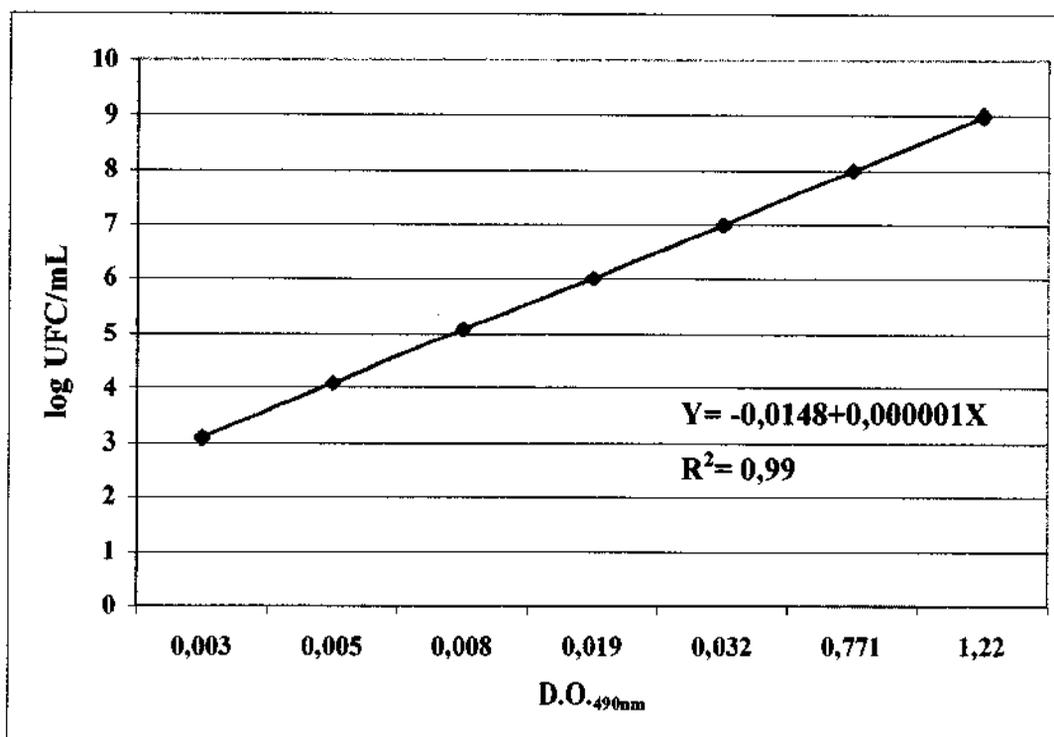
### **4.2. Padronização do inóculo de *Staphylococcus aureus* e inoculação nos coelhos**

Baseado na correlação UFC/mL x  $DO_{490nm}$  foi construída uma equação e reta de regressão (Figura 2). A análise dos resultados constatou que houve uma correlação positiva e significativa entre as variáveis.

**Tabela 1.** Susceptibilidade e halos de inibição (milímetros\*) a diferentes antimicrobianos, da cepa de *Staphylococcus aureus* utilizada para inoculação dos coelhos

<b>Antimicrobiano</b>	<b>Halos de inibição (mm)</b>	<b>Sensibilidade</b>
Amicacina	16.8	S
Cefoxitina	28.4	S
Ceftriaxone	27.3	S
Ciprofloxacina	25.1	S
Clindamicina	25.6	S
Eritromicina	18.7	I
Gentamicina	16.3	S
Imipenem	45.7	S
Ofloxacina	24.6	S
Oxacilina	22.1	S
Pefloxacina	25.4	S
Rifampicina	34.3	S
Trimetoprima	15.7	S
Teicoplanina	15.9	S
Vancomicina	19.1	S

\* média de 2 leituras.



**Figura 2.** Equação e reta de regressão da correlação log UFC/mLxD<sub>O</sub>490nm da cepa de *S. aureus* utilizada para inoculação dos coelhos.

As contagens (UFC/mL) obtidas nos inóculos após crescimento até D<sub>O</sub>490nm de aproximadamente 1,2, podem ser observadas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Contagens (UFC/mL) da cultura de *S. aureus* utilizada para inoculação dos coelhos em cada cirurgia.

Cirurgia	Data	Contagem (UFC/mL)
1	07/04/00	$2,0 \times 10^9$
2	08/04/00	$6,0 \times 10^9$
3	12/04/00	$8,0 \times 10^9$

Os resultados das contagens realizadas confirmou a correlação positiva e significativa entre a  $DO_{490nm}$  e a UFC/mL, concordando com os resultados obtidos por JORGE *et al.* (1990), garantido que os coelhos foram sempre inoculados com cerca de  $10^6$  *S. aureus* após a diluição da cultura.

#### 4.3. Recuperação e contagem dos *S. aureus* do osso rádio de coelhos

Os resultados das contagens dos microrganismos isolados dos fragmentos ósseos de cada coelho foram registrados (Tabela 3). As amostras de *S. aureus* isoladas dos animais experimentais mostraram o mesmo comportamento bioquímico e de concentração inibitória e bactericida mínima a cefazolina da cepa inoculada, o que sugere tratar-se da mesma.

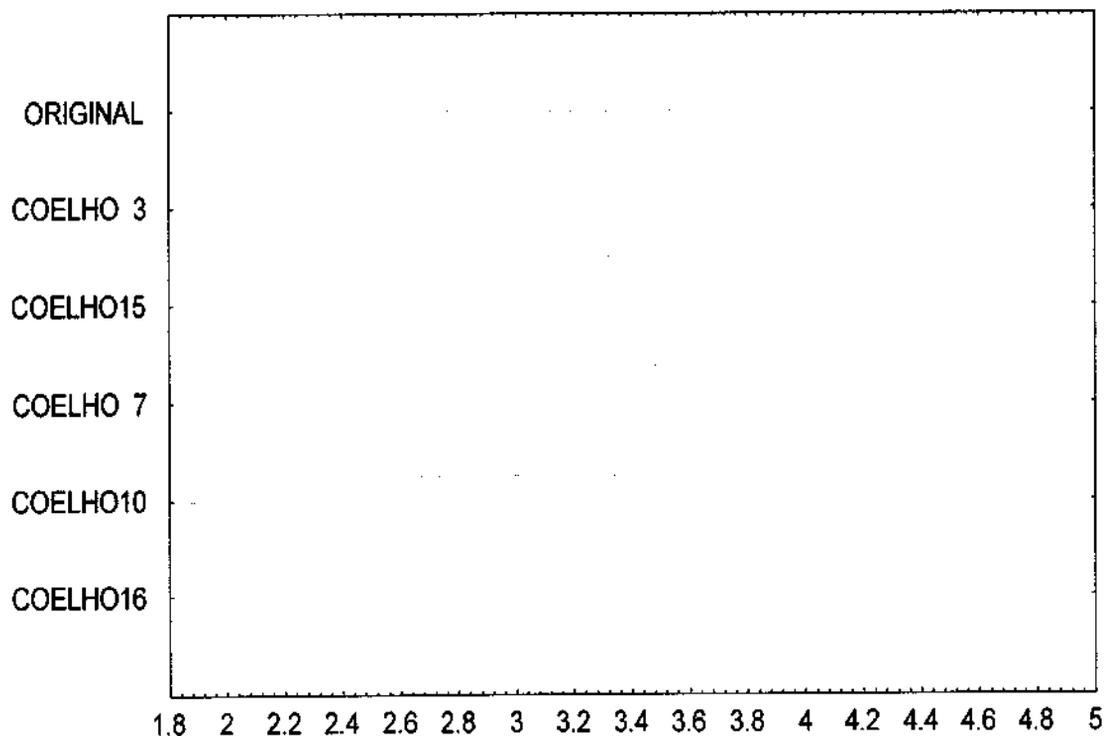
**Tabela 3. Contagem de *S. aureus* (UFC/mL) recuperado do osso rádio de coelhos.**

Cirurgia no.	Coelho	UFC/osso
1	03	$5,2 \times 10^4$
	04	A
	05	A
2	06	A
	07	$2,5 \times 10^2$
	08	$3,8 \times 10^3$
	09	A
3	10	$3,8 \times 10^2$
	12	A
	13	A
	15	$2,5 \times 10^5$
	16	$6,06 \times 10^2$

A= ausência de crescimento.

Os microrganismos inoculados não foram recuperados dos coelhos 4, 5, 6, 9, 12 e 13, provavelmente, nestes animais houve ação efetiva do antimicrobiano usado. Porém, determinar a eficiência da droga ou via de administração não era objetivo do presente trabalho, sendo os resultados somente registrados.

As medidas (em milímetros) dos halos de inibição das cepas isoladas frente a antimicrobianos foi utilizada juntamente com os resultados obtidos para cepa originalmente inoculada para a construção de um dendrograma (Figura 3).



**Figura 3.** Dendrograma obtido de análise quantitativa de antibiograma (mm de halos de inibição) de 6 isolados de *S. aureus*.

A análise do dendrograma sugere que todas as cepas de *S. aureus* isoladas dos ossos dos coelhos são similares à anteriormente inoculada, considerando 5% como máximo de distância entre as cepas estudadas. Segundo BLANC *et al.* (1994), a interpretação dos resultados do dendrograma é similar à diferenciação de cepas de *Staphylococcus aureus* por ribotipagem.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

- A correlação UFC/mLxDO<sub>490nm</sub> é adequada para quantificação de inóculos de *S. aureus*, podendo ser utilizada a equação  $Y = - 0,0148 + 0,000001X$ , com  $R^2=0,99$ , para estabelecer a correlação na cepa estudada.
- A amostra original apresentou resultados positivos para os testes de termonuclease, catalase, manitol e coagulase, morfologia típica de cocos agrupados e coloração diferencial de Gram e sensibilidade a vários antimicrobianos. A concentração inibitória e bactericida mínima (CIM, CBM) à cefazolina foi de 2 mcg/mL e 8 mcg/mL, respectivamente, sendo estes resultados os mesmos encontrados nos microrganismos recuperados dos ossos dos coelhos.
- Os halos de inibição medidos no antibiograma e utilizados para construção de um dendrograma, determinou que as cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas dos ossos dos coelhos eram similares à anteriormente inoculada ( $p>0,05$ ).

## 6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ARCHER L. G. Infecções estafilocócicas. In: BENNETT J. C., PLUM F. **Cecil Tratado de Medicina Interna**, 20<sup>a</sup> ed., Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, v. 2, cap. 279, p. 1773-78, 1997.

ARCHER L. G. *Staphylococcus aureus*: A well-armed pathogen. **Clin. Infect. Dis.**, v. 26, p. 1179-81, 1998

BAUER A. W., KIRB W. M. M., SHERRIS J. C. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BELMATOUG N., CRÉMIEUX A. C., BLETON R., VOLK A. A new model of experimental prosthetic joint infection due to methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*: a microbiologic, histopathologic, and magnetic resonance imaging characterization, **J. Infect Dis**, v. 174, n.2, Aug., p. 414-7, 1996.

BHAKDI S., TRANUM-JENSEN J. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*, **Microbiol. Rev.**, v. 55, p. 733-51, 1991.

BISHOP W. J. **The early history of sugery**, London, Hale, 1960.

BLANC D. S., LUGEON C., WENGER A., STEGRIST H. H., FRANCIOLI P. Quantitative antibiogram typing using inhibition zone diameters compared with ribotyping for epidemiological typing of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. of Clinical Microbiol.**, Oct., p. 2505-2509, 1994.

- CHAMBERS H. F. Methicilin resistance in Staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 10, n. 4, p. 781-91, 1997.
- CHEYNE, SIR W. W. **Lister and his achievement**, London, Longmans Green, 1925.
- CHUARD C., LUCET J.C., ROHNER P., HERMANN M., AUCKENTHALER R., WALDVOGEL F. A., LEW D. P. Resistance of *Staphylococcus aureus* recovered from infected foreign body *in vivo* to killing by antimicrobials. **J Infect Dis.**, v. 163, n. 6, Jun., p.1369-73, 1991.
- COLLINS C. H., LYNE P. M., GRANGE J. M. Antimicrobial susceptibility tests. **Microbiological Methods**, 7<sup>a</sup> ed., Butterworth Heinemann Oxford, 1995.
- FISCHER B., VAUDAUX P., MAGNIN M., MESTIKAWY Y., PROCTOR R. A., LEW D. P., VASEY H. A novel animal model for studying the molecular mechanisms of bacterial adhesion to bone- implanted metallic devices: role of fibronectin in *Staphylococcus aureus* adhesion. **J. Orthop. Res.**, v.14, n.6, November, p.914 -20, 1996.
- FONSECA A. L. da. **Antibióticos na clínica diária**, 3<sup>a</sup> ed., Editora Epume, Rio de Janeiro, 1988.
- FOSSUM T. W., HULSE D. Osteomyelitis. **Seminars Vet. Med. Surg.**, v. 7, n. 1, p. 85-97, 1992.
- FRANK E. & ZITTER H. **Metallische Implantate in der Knochen chirurgie**, Berlin-Heidelberg-New York, Springer, 1971.
- GARRISON F. H. **An introduction to the History of Medicine**, 4<sup>a</sup> ed., Philadelphia, Saunders, 1929.

- GILMOR W. N. Acute hematogenous osteomyelitis. **J. Bone Joint Surg. (Br)**, v.44, p.841, 1962.
- GOMIS M., HERRANZ A., APARICIO P., ALONSO M. J., PRIETO J., MARTINEZ T.;  
An experimental model of chronic osteomyelitis caused by *Eschericia coli* treated with cefotaxime. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 26, Sep., p. 15-21, 1990 (suppl A).
- JANG S.S., DORR T.E., BIBERSTEIN E.L., WONG A. Aspergillus deflectus infection in four dogs. **J Med. Vet. Mycol**, v. 24, n. 2, April, p. 95-104, 1986.
- JORGE A. O. C., VEIRA S., HOFLING J. F., ALMEIDA O. P. de. Determinação da dose letal 50% para *Staphylococcus aureus* (NCTC 8530) em camundongos portadores de tumor de Eirich. **Rev. Microbiol.**, n. 21, v. 3, p. 228-231, 1990.
- LEE L. C. The prospect for developing a vaccine against *Staphylococcus aureus*. **Trends Microbiol.**, v. 4, p. 162-6, 1996.
- LEW, D.P., WALDVOGEL, F. A. Osteomyelitis. **New Engl. J. Med.**, v. 336, n. 14, p. 999-1007, 1997.
- LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* infections. **New Engl. J. Med.**, v. 339, n. 8, p. 520-32, 1998.
- MADER J. T., WILSON K.J. Comparative evaluation of cefamandole and cephalothin in the treatment of experimental *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in rabbits. **J. Bone Joint Surg**, v. 65-A, p. 507-513, 1983.
- MADER J. T., CALHOUN J.H. Long. bone osteomyelitis. An overview. **J Am Pediatr Med. Assoc**, v. 79, p. 476-481, 1989.

- MURRAY P. R., BARON E. J., PFALLER M. <sup>a</sup>, TENOVER F. C., YOLKEN R. H.  
Manual of Clinical Microbiology. 7<sup>a</sup> ed. American Society for Microbiology.  
Washington, D. C., 1999.
- NETO V. A., LEVI G. C., LOPES H. V., MENDONÇA J. S. de, BALDY J. L. S. da.  
**Antibióticos na prática médica**, 3<sup>a</sup> ed., Editora Sarvier, São Paulo, 1985.
- NORDEN C.W. Lessons learned from animal models of osteomyelitis. **Rev. Infect Dis**, v.  
10, p. 103-10, 1988.
- PARKER R.B. Treatment of. pos-traumatic osteomyelitis. **Vet. Clin north Am Small  
Anim Pract**, v. 17, p. 841-856, 1987.
- PATTI J. M., ALLEN B.L., M.J., HOOK M. MSCRAMM-mediated adherence of  
microorganisms to host tissues. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 48, p. 585-617, 1994.
- PELCZAR J.R., MICHAEL J., CHAN E C. S., NOEL R. K. **Microbiologia Conceitos e  
Aplicações**, 2<sup>a</sup> ed., v. 1, Makron books, São Paulo, 1996.
- ROESGEN M., HIERHOLZER G, HAX PM. Post-traumatic osteomyelitis.  
Pathophysiology and management. **Arch Orthop Trauma Surg**, v. 108, p. 1-9, 1989.
- ROGERS D. E., TURCK M. Infecções estafilocócicas. In: ISELBACHER K. J., ADAMS  
R.D., BRAUNWALD E., PETERSDORF R. G., WILSON J. D. **Harrison's Principles  
of Internal Medicine** (Harrison Medicina Interna). 7<sup>a</sup> ed., Editora Guanabara Koogan  
S. A, Rio de Janeiro-R.J, v. 1, cap. 129, p. 712-17, 1997.
- SCHABERG, D. R., ZERVOS, M. J. Intergeneric and interspecies gene exchanged in  
Gram-positive cocci. **Antimicrobi. Agents Chemother.**, v. 30, p. 817-22, 1986.

TEAGUE H.D., ALSAKER R., BRADEN T.D., CAYWOOD D. D. Two cases of <sup>27</sup>  
foreing-body osteomyelitis secondary to retained surgical sponges. **Vet. Med./Small  
Anim Clin.**, v. 73, n. 10, October, p. 1279-1286, 1978.

YUK, J. H., DIGNANI M. C., HARRIS R. L. Minocycline as a antistaphylococcal agent.  
**Rev. Infect. Dis.**, v. 13, n. 5, September-October, p. 1023-24, 1991.

ZIMMERLI W., LEW P. D., WALDVOGEL F.A. Pathogenesis of foreing body infection:  
evidence for a local granulocyte defect. **J. Clin. Invest.**, v. 73, p. 191-200, 1984.