

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Identificação de *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus*  
Resistentes ou não à Oxacilina em Amostras Associadas à  
Infecção/Colonização em Pacientes do Hospital de Clínicas da Universidade  
Federal de Uberlândia**

**Juliane Cristina Ribeiro Borges**

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

Uberlândia – MG  
Dezembro - 2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Identificação de *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus*  
Resistentes ou não à Oxacilina em Amostras Associadas à  
Infecção/Colonização em Pacientes do Hospital de Clínicas da Universidade  
Federal de Uberlândia**

**Juliane Cristina Ribeiro Borges**

*Orientador: Prof. Dr. Paulo Pinto Gontijo Filho*

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

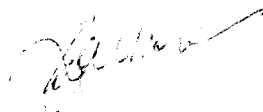
Uberlândia - MG  
Dezembro - 2003

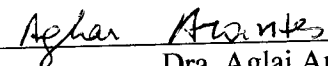
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

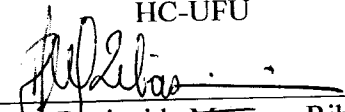
**Identificação de *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus*  
Resistentes ou não à Oxacilina em Amostras Associadas à  
Infecção/Colonização em Pacientes do Hospital de Clínicas da  
Universidade Federal de Uberlândia**

**Juliane Cristina Ribeiro Borges**

Aprovado pela Banca Examinadora em 19 / 12 / 09 Nota 93

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Paulo Pinto Gontijo Filho  
Orientador

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Aglai Arantes  
Serviço de Controle de Infecção Hospitalar  
HC-UFU


  
\_\_\_\_\_  
Dra. Rosineide Marques Ribas  
Co-orientadora

Uberlândia, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

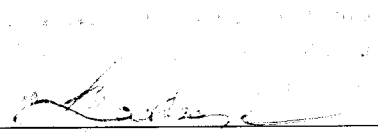
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Identificação de *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus*  
Resistentes ou não à Oxacilina em Amostras Associadas à  
Infecção/Colonização em Pacientes do Hospital de Clínicas da Universidade  
Federal de Uberlândia**

Juliane Cristina Ribeiro Borges

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Paulo Pinto Gontijo Filho (Orientador)

Homologado pela coordenação do Curso  
de Ciências Biológicas em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

  
\_\_\_\_\_  
Coordenador(a)

Uberlândia – MG  
Dezembro - 2003

“Pode-se viver no mundo uma vida magnífica quando se sabe trabalhar e amar; trabalhar pelo que se ama e amar aquilo em que se trabalha”.

(Autor desconhecido)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela vida e saúde e por se mostrar presente em todas as etapas de minha vida.

À minha família pelo apoio, carinho e por tudo o que me ensinaram.

Ao Prof. Dr. Paulo Pinto Gontijo Filho, pela orientação, apoio, incentivo e paciência, indispensáveis na conclusão deste estudo.

À Co – orientadora professora Rosineide Marques Ribas pela orientação, confiança, apoio, paciência e pelas amostras cedidas para a realização deste estudo.

Aos professores Geraldo Mello, Geraldo Sadoyama e Denise Von Dolinger de Brito, por também cederem amostras para análise e pela orientação e paciência.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia, Claudete e Ricardo, pela colaboração e pela amizade.

Aos demais colegas do Laboratório de Microbiologia: Renata, Poliana, Ana Flávia, Anderson e Maria Eugênia, pela colaboração nos experimentos, pelos momentos de descontração, convívio e amizade.

Ao meu noivo Anderson, por estar sempre ao meu lado, demonstrando seu amor, carinho e apoio, fundamentais para que eu seguisse em frente.

Às minhas amigas Ana Paula, Ana Cristina e Luciana, pelo apoio e torcida.

Aos meus amigos da 51ª Turma de Ciências Biológicas, por toda a amizade, convivência e momentos agradáveis.

Ao corpo docente, funcionários e alunos do Instituto de Ciências Biomédicas, que de alguma forma contribuíram para a execução deste estudo.

## RESUMO

Foram analisadas 63 amostras sendo excluídas sete (11,1%) pela não confirmação do gênero *Staphylococcus* e espécie. A identificação foi realizada utilizando-se um esquema simplificado com os testes: produção de catalase, coagulase livre, pirrolidonil arilamidase, urease, produção de hemólise, óxido-fermentação de glicose e fermentação de carboidratos. Foi possível a caracterização de 92,6% das amostras em seis espécies, sendo *S. epidermidis* (59,2%) e *S. haemolyticus* (22,2%) as mais representativas. A resistência à oxacilina foi determinada através dos testes de triagem em agar e de difusão em gel. As amostras apresentaram frequências elevadas de resistência à oxacilina (> 60%) em ambos os testes. A multiresistência foi frequente entre as amostras de *S. haemolyticus* e *S. epidermidis* resistentes à oxacilina, com destaque para a gentamicina (77,8%;47%), cefoxitina (77,8%) e sulfametoxazol (66,6%;58,8%), respectivamente. As frequências de resistência aos antimicrobianos foram mais altas para os isolados de *S. haemolyticus* do que para os de *S. epidermidis*. A maioria das infecções correspondeu à casos de sepse (70,1%), sendo o *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* responsáveis por 71% e 29%, respectivamente, com 80,6% destas resistentes à oxacilina.

Palavras – chave: *Staphylococcus* coagulase negativo, identificação, oxacilina

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1. Frequências de estafilococos coagulase negativo segundo a espécie, isolados de pacientes infectados e/ou colonizados no HC-UFU .....21
- TABELA 2. Distribuição das amostras das diversas espécies de SCoN segundo associação com infecção e/ou colonização em pacientes neonatos e adultos internados no HC-UFU.....21
- TABELA 3. Sítios de isolamento das amostras das diferentes espécies de estafilococos coagulase negativo.....23
- TABELA 4. Perfil de susceptibilidade/resistência aos antimicrobianos de 26 amostras de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* resistentes à oxacilina de acordo com o Teste de Difusão em Gel (NCCLS, 2000) .....22
- TABELA 5. Resistência de amostras das diferentes espécies de estafilococos coagulase negativo à oxacilina pelo Teste de Triagem em Agar (NCCLS,2000) .....24
- TABELA 6. Relação entre amostras de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* associadas à bacteremia/seps e resistência à oxacilina .....25



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>OBJETIVOS</b> .....	13
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	14
<b>RESULTADOS</b> .....	20
<b>DISCUSSÃO</b> .....	26
<b>CONCLUSÕES</b> .....	29
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	30
<b>ANEXO 1</b> .....	34

## INTRODUÇÃO

As infecções hospitalares apresentam-se como as principais causas de morbidade e mortalidade nos hospitais, elevando os custos e o tempo de internação (VIEIRA et al., 1999). Elas constituem um sério problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento, como o Brasil, onde apenas uma pequena parte dos hospitais possui comissões de controle de infecções ativas (PRADE, 1995).

Os principais patógenos relacionados com infecções hospitalares incluem: *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE – “Vancomycin Resistant Enterococci”), *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA – “Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*”) e *Staphylococcus* coagulase negativos (SCoN), entre os cocos Gram positivos; e aqueles pertencentes à família *Enterobacteriaceae* e bactérias não fermentadoras como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (MOELLERING, 1998).

Os estafilococos são cocos Gram positivos que se apresentam em forma de cachos, não formadores de esporos, imóveis e, normalmente, catalase positiva. Estes microrganismos se encontram espalhados na natureza colonizando pele, glândulas da pele e mucosas de mamíferos e aves (KLOOS; LAMBE, 1991; JARLOV, 1999).

Recentemente classificado na família *Bacillaceae*, o gênero *Staphylococcus* é composto de 35 espécies e 17 subespécies (LAMBERT et al., 1998; KLOOS; BANNERMAN, 1999; VERNIZY-ROZAND et al., 2000). *Staphylococcus aureus* é a espécie de estafilococcus coagulase-positivo de maior importância na etiologia de infecções humanas, sendo, atualmente, o patógeno mais associado com infecções hospitalares dentre as bactérias Gram-positivas, distribuídas em proporções variáveis (30-100%), dependendo do hospital, entre amostras

susceptíveis e resistentes à metilina/oxacilina (SCHABERG; CULVER; GAYNES, 1991; WENZEL et al., 1991).

Os *Staphylococcus* spp. coagulase-negativo constituem um grupo que engloba a maior parte das espécies do gênero (KLOOS; BANNERMAN, 1994). Estes microrganismos são isolados frequentemente da boca, glândulas mamárias, intestino, trato genitourinário e trato respiratório superior destes hospedeiros (KLOOS; LAMBE, 1991), sendo que as espécies *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus saccharolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus schleiferi*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus warneri* incluem representantes da microbiota humana (PATRICK, 1990; KLOOS; LAMBE, 1991; KLOOS; BANNERMAN, 1994).

Os SCoN foram considerados durante muitos anos como de baixa virulência para seres humanos, mas, atualmente, estão entre os principais agentes de infecções hospitalares, sendo considerados patógenos oportunistas importantes na etiologia de bacteremias primárias, infecções do trato urinário e infecções de sítio cirúrgico, entre outras (BOYCE, 1996).

Entre as espécies de SCoN, *S. epidermidis* é a predominante em espécimes de origem humana, representando de 37 a 95% das amostras isoladas (JARLOV, 1999). O *S. epidermidis* é o principal agente de bacteremia nosocomial em serviços oncológicos (BOYCE, 1996) e neonatais (CAMARGO et al., 1995; VILLARI; SARNATARO; IACUZIO, 2000), sendo a principal causa de infecções da corrente sanguínea, com mortalidade atribuída a este tipo de infecção variando de 10 a 34%, com custos estimados em seis mil dólares por paciente e acréscimo na hospitalização de 7 a 19 dias.

*S. haemolyticus* é a segunda espécie mais associada à infecções, incluindo bacteremias, peritonites, infecções do trato urinário e de sítio cirúrgico (KLOOS; BANNERMAN, 1994). Esta espécie de estafilococos destaca-se entre outras espécies de SCoN por apresentar as maiores taxas de resistência a antimicrobianos (PEGUES et al., 1998; DEL'ALAMO et al., 1999; FERREIRA et al., 2002).

*S. epidermidis* e *S. haemolyticus* são as espécies mais isoladas de espécimes clínicos (74,3%) e apresentam taxas de resistência à oxacilina de 79,5% e 97%, respectivamente, mais altas do que as observadas para *S. aureus* (FERREIRA, 2002; EMORY; GAYNES, 1993). Desde que a resistência à oxacilina foi relatada pela primeira vez para *S. aureus*, no início dos anos 60 (BARBER, 1961), o aumento nas taxas de resistência entre amostras de *S. aureus* e SCoN tem sido uma grande preocupação mundial. Atualmente, a resistência à oxacilina é relatada em mais de 75% de amostras clínicas de *Staphylococcus* spp. quando estudados pacientes de diferentes clínicas hospitalares (NNIS, 2000).

Portanto, a identificação nas respectivas espécies de amostras de SCoN é importante para o monitoramento destes microrganismos e análise epidemiológica de sua distribuição em infecções hospitalares (KLOOS; BANNERMAN, 1994), e pode ser realizada utilizando-se métodos convencionais, semi-automatizados, automatizados ou moleculares. A identificação convencional é realizada a partir da combinação de um grupo de testes laboratoriais, incluindo: morfologia colonial, metabolismo oxidativo/fermentativo da glicose, resistência/susceptibilidade a certos antimicrobianos, produção de hemólise, análise de várias atividades enzimáticas sobre diferentes substratos e produção de ácido a partir de diferentes carboidratos (HOLT et al., 1994; KLOOS; BANNERMAN, 1994).

A detecção da resistência à oxacilina é essencial no tratamento apropriado das infecções estafilocócicas, causadas não somente por *S. aureus*, mas também por *S. epidermidis* e *S.*

*haemolyticus*, evitando uma terapêutica ineficaz, riscos para o paciente e o uso desnecessário de vancomicina, antimicrobiano de escolha no tratamento de infecções por estafilococos resistentes à oxacilina, que é mais tóxico e exerce pressão seletiva a favor da emergência de estafilococos e enterococos resistentes à este glicopeptídeo (CHAMBERS,1993).

## OBJETIVOS

- Identificar as principais espécies de SCoN isoladas de colonização/infecção em pacientes do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia;
- Investigar as frequências de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* entre os SCoN isolados;
- Determinar as proporções de amostras resistentes à oxacilina, bem como a sua relação com sepse/bacteremia em pacientes neonatos e adultos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1- Amostras Bacterianas

Foram analisadas 61 amostras de SCoN isoladas no período de julho de 1999 a março de 2002, a partir de diversos sítios de infecção e colonização (sangue, ponta de cateter, secreção ocular, boca, intestino e pele), provenientes de pacientes do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) e que se encontravam estocadas em caldo TSB (“Trypticase Soy Broth”, Oxoid) com 20% de glicerol à -20°C (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

### 2- Identificação do gênero *Staphylococcus*

Os testes para identificação, tanto do gênero quanto das espécies, foram realizados conforme metodologias descritas por MacFaddin (1976) e Smibert, Krieg (1994) e principalmente pela utilização de um esquema simplificado para identificação (HOLT et al., 1994; KLOOS; BANNERMAN, 1999) (Anexo 1).

As amostras foram, inicialmente, semeadas em meio de agar sangue (“Blood Agar Base”, Oxoid) com 5% de sangue desfibrinado de carneiro e incubadas à 35°C por 72 hs para análise da pureza, morfologia colonial e padrão de hemólise. Para caracterização do gênero foram utilizados, posteriormente, os seguintes testes:

#### 2.1- Produção de catalase

Este teste foi realizado para a separação de bactérias dos gêneros *Streptococcus* e *Staphylococcus*. A produção da enzima catalase foi verificada após o contato em lâmina de microscopia da suspensão bacteriana com o peróxido de hidrogênio a 3%. A produção de bolhas

25923 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

### 3.2- Produção de hemólise

A observação visual do crescimento microbiano foi realizada em agar sangue desfibrinado de carneiro com leitura em 24, 48 e 72 hs à 35°C para verificar a produção de hemólise. O aparecimento de zona de hemólise intensa ao redor das colônias em até 48 hs de incubação foi indicativo de hemólise positiva, enquanto uma zona de hemólise fraca ou ausente em até 72 hs foi indicativo de hemólise fraca ou negativa, respectivamente. As amostras padrão de *Staphylococcus haemolyticus* CCM 2737 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 foram utilizadas como controle de hemólise positiva e negativa respectivamente.

Para a realização dos testes descritos a seguir, as amostras bacterianas foram semeadas em meio agar sangue de carneiro e incubadas por 48 hs à 35°C. Após o período de incubação, cerca de 5 colônias foram inoculadas em 3 mL de salina esterelizada e, posteriormente, uma gota dessa suspensão foi inoculada nos respectivos tubos teste.

### 3.3- Produção de pirrolidonil arilamidase

Foi feita uma suspensão da amostra em caldo TSB, contendo 0,01% de L-pirroglutamil- $\beta$ -naftilamina (Sigma Chemical Company) para verificar a produção da enzima pirrolidonil arilamidase. A leitura do teste foi realizada 4hs após incubação à 37°C em banho-maria, pela adição de uma gota de solução reveladora contendo dimetilaminocinamaldeído a 1% (Sigma Chemical Company) em HCl a 10% (v / v). O aparecimento de coloração rosa ou púrpura dentro



de 10 min, sob agitação leve, foi indicativo de resultado positivo. Foi utilizada a amostra padrão *Staphylococcus haemolyticus* CCM 2737, como controle positivo e como controle negativo a amostra padrão *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

#### **3.4- Produção de urease**

A produção de urease foi verificada em caldo uréia de Rustigian & Stuart (Difco Laboratories), pH 6,8, acrescido de 2% de uréia (Reagen). A leitura foi feita em 48 hs de incubação à 35°C, sendo a mudança de coloração do meio de amarela para vermelha considerada como resultado positivo. As amostras padrão de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Staphylococcus haemolyticus* CCM 2737 foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

#### **3.5- Fermentação de carboidratos**

A fermentação de carboidratos foi realizada em caldo contendo vermelho de fenol, pH 7,4, contendo 1% de cada um dos seguintes açúcares: manitol, manose e trealose (Sigma Chemical Company) e a leitura foi feita após incubação à 35°C por 72 hs. A modificação da coloração do meio de vermelho para amarelo foi considerada como resultado positivo. As amostras padrão de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Staphylococcus haemolyticus* CCM 2737 foram utilizadas como controles positivo ou negativo nestes testes.

#### **4- Avaliação da susceptibilidade à oxacilina**

##### **4.1- Teste de Triagem em Agar**

As 54 amostras clínicas que foram identificadas como *Staphylococcus* coagulase negativo foram analisadas quanto ao perfil de susceptibilidade frente à oxacilina, através da utilização do teste de triagem, de acordo com as recomendações preconizadas pelo NCCLS (2000b) para *Staphylococcus* coagulase negativo.

As amostras foram, inicialmente, cultivadas em agar sangue de carneiro, à 35°C por 48 hs. O crescimento microbiano foi suspenso em salina e inoculado em meio de agar Müeller-Hinton (Difco Laboratories) contendo 4% de NaCl e concentrações de 1, 2, 4, ou 6 µg/ mL de oxacilina (Sigma Chemical Company).

A leitura foi realizada após 24 hs e 48 hs de incubação à 35°C, e o crescimento de mais de uma colônia foi indicativo de resultado positivo. Placas contendo agar Müeller-Hinton sem oxacilina foram utilizadas como controle do crescimento bacteriano. As amostras de *S. aureus* ATCC 25923, susceptível à oxacilina, e *S. aureus* MRSA gene *mecA* positiva com MIC > 256µg/ mL para oxacilina (Coleção do Laboratório de Microbiologia) foram utilizadas como controles.

##### **4.2- Teste de Difusão em Gel**

O teste de difusão em Gel foi realizado no Laboratório de Microbiologia do HC-UFU, de acordo com as recomendações do NCCLS, 2000. Nesta avaliação, para a caracterização de resistência aos diversos antimicrobianos, foram recuperadas apenas 30 amostras.

## **5- Análise Estatística**

Foram realizadas comparações univariadas pelo Teste  $\chi^2$  e Exato de Fisher para as diferenças entre proporções, usando tabela 2x2.

## RESULTADOS

Foram analisadas inicialmente 61 amostras na sua maioria caracterizadas como *Staphylococcus* no Laboratório de Microbiologia do HC-UFU, das quais sete (11,1%) foram excluídas, três por não serem do gênero *Staphylococcus* e quatro por não serem *Staphylococcus* coagulase negativo. As outras 54 amostras de *Staphylococcus* coagulase negativo foram identificadas nas respectivas espécies através de um esquema simplificado para identificação.

Todas as amostras testadas apresentaram-se como cocos Gram positivos, agrupados em cachos, catalase positivas e coagulase livre negativas. O conjunto de testes utilizados permitiu a identificação de 50 amostras (92,6%), num total de 54 testadas. As espécies identificadas foram *S. epidermidis* (32 amostras), *S. haemolyticus* (12 amostras), *S. simulans* (2 amostras), *S. warneri* (2 amostras), *S. hominis* (1 amostra) e *S. capitis* (1 amostra). Quanto às características das 54 amostras clínicas frente aos diferentes testes, houve discordância de algumas amostras principalmente no teste para produção de hemólise: *S. epidermidis* (11 amostras atípicas/total = 32) e *S. haemolyticus* (3/12).

Na tabela 1 estão descritas as frequências de SCoN, de acordo com a espécie isolada de pacientes infectados e/ou colonizados. A maioria das amostras foi caracterizada como *S. epidermidis* (59,2%) e *S. haemolyticus* (22,2%), sendo que 11,1% corresponderam à outras espécies e 7,4% não foram identificadas em espécie.

TABELA 1- Frequências de estafilococos coagulase negativo segundo a espécie, isolados de pacientes infectados e/ou colonizados no HC-UFU

Espécies	N	%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	32	59,2
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	12	22,2
<i>Staphylococcus simulans</i>	2	3,7
<i>Staphylococcus warneri</i>	2	3,7
<i>Staphylococcus hominis</i>	1	1,9
<i>Staphylococcus capitis</i>	1	1,9
<i>Staphylococcus spp.</i>	4	7,4
Total	54	100,0

Na tabela 2 estão as frequências de distribuição das amostras segundo associação com infecção e/ou colonização em pacientes neonatos ou adultos. A maior parte das amostras foi proveniente de infecção, representando 79,6%. A presença de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* foi mais freqüente em pacientes infectados (75% e 83,3%, respectivamente) e o *S. epidermidis* foi encontrado mais freqüentemente nos pacientes colonizados. Entre as amostras não identificadas em espécie, 9,3% foram isoladas de pacientes infectados.

TABELA 2- Distribuição das amostras das diversas espécies de SCoN segundo associação com infecção e/ou colonização em pacientes neonatos e adultos internados no HC-UFU

Espécies	Neonatos (N= 14)		Adultos (N=34)*		
	Infecção N=14		Colonização N=11		Infecção N=29
	n	(%)	n	(%)	n (%)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	7	(50,0)	8	(72,7)	17 (58,6)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	4	(28,6)	2	(18,2)	6 (20,7)
<i>Staphylococcus simulans</i>	-		-		2 (6,9)
<i>Staphylococcus warneri</i>	-		1	(9,1)	1 (3,4)
<i>Staphylococcus hominis</i>	1	(7,1)	-		-
<i>Staphylococcus capitis</i>	-		-		1 (3,4)
<i>Staphylococcus spp.</i>	2	(14,3)	-		2 (6,9)

\* Foram isoladas 40 amostras de 34 pacientes adultos

As amostras analisadas foram obtidas de sangue (51,9%), ponta de cateter (22,2%), secreção ocular (5,5%), pele (13%), intestino (1,9%) e boca (5,5%). O *S. epidermidis* foi mais freqüente no sangue e ponta de cateter, correspondendo a 56,2% e 12,5%, respectivamente. A espécie *S. haemolyticus* foi mais representativa na ponta de cateter (33,4%), quando comparada com *S. epidermidis* (12,5%), entretanto sem diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) (Tabela 3).

Na tabela 4, são apresentados os perfis de susceptibilidade/resistência das amostras aos diferentes antimicrobianos, obtidos pelo teste de difusão em gel. A multiresistência foi caracterizada entre as amostras, sendo que a espécie que apresentou maior freqüência de resistência foi a *S. haemolyticus*, com 100% de resistência à oxacilina, 77,8% a gentamicina e cefoxitina e 66,6% ao sulfametoxazol. As amostras de *S. epidermidis* apresentaram uma alta susceptibilidade a maioria dos antimicrobianos, exceto a oxacilina (80,9%), sulfametoxazol (58,8%) e gentamicina (47,0%).

TABELA 4- Perfil de susceptibilidade/resistência aos antimicrobianos de 26 amostras de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* resistentes à oxacilina de acordo com o teste de difusão em gel (NCCLS, 2000)

Agentes Antimicrobianos	Espécie (% das amostras)			
	<i>S. epidermidis</i> N=17		<i>S. haemolyticus</i> N=9	
	R	S	R	S
Eritromicina	41,2	58,8	33,3	66,7
Clindamicina	35,3	64,7	33,3	66,7
Sulfametoxazol	58,8	41,2	66,6	33,4
Ciprofloxacina	29,4	70,6	44,4	55,6
Gentamicina	47,0	53,0	77,8	22,2
Ofloxacina	29,4	70,6	44,4	55,6
Cefoxitina	23,5*	76,5	77,8*	22,2
Perfloxacina	29,4	70,6	44,4	55,6
Amicacina	17,6	82,4	44,4	55,6
Tetraciclina	17,6	82,4	44,4	55,6

\*  $p=0,01$  OR=0,09 (0,01-0,79)

TABELA 3 - Sítios de isolamento das amostras das diferentes espécies de estafilococos coagulase negativo

Origem	Espécies							Total
	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. warneri</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. capitis</i>	<i>Staphylococcus</i> spp.	
sangue	18 (56,2%)	5 (41,7%)	2 (100,0%)	-	1 (100,0%)	-	2 (50,0%)	28 (51,9%)
ponta de catéter	4 (12,5%)	4 (33,4%)	-	1 (50,0%)	-	1 (100,0%)	2 (50,0%)	12 (22,2%)
secreção ocular	2 (6,3%)	1 (8,3%)	-	-	-	-	-	3 (5,5%)
pele (inserção de catéter)	5 (15,6%)	1 (8,3%)	-	1 (50,0%)	-	-	-	7 (13,0%)
intestino	1 (3,1%)	-	-	-	-	-	-	1 (1,9%)
boca	2 (6,3%)	1 (8,3%)	-	-	-	-	-	3 (5,5%)
Total	N=32 (59,2%)	N=12 (22,2%)	N=2 (3,7%)	N=2 (3,7%)	N=1 (1,9%)	N=1 (1,9%)	N=4 (7,4%)	N=54 (100,0%)

Os resultados obtidos a partir do teste de triagem em agar estão na tabela 5. No total 59,2% das amostras testadas cresceram em uma concentração de 6 µg/mL, sendo que 46,9% foram de *S. epidermidis* e 34,4% foram de *S. haemolyticus*. O *S. haemolyticus* apresentou o maior nível de resistência à oxacilina quando comparado ao *S. epidermidis* para esta concentração de oxacilina e estes dados foram estatisticamente significantes ( $p=0,01$ ).

TABELA 5- Resistência de amostras das diferentes espécies de estafilococos coagulase negativo à oxacilina pelo teste de triagem em agar (NCCLS,2000)

Espécies	Número de amostras resistentes			
	Concentrações de Oxacilina (µg/mL)			
	1	2	4	6
<i>Staphylococcus epidermidis</i> N=32	25 (78,1%)	25 (78,1%)	21 (65,6%)	15 (46,9%)*
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> N=12	12 (100,0%)	12 (100,0%)	12 (100,0%)	11 (91,7%)*
<i>Staphylococcus simulans</i> N=2	2 (100,0%)	2 (100,0%)	2 (100,0%)	2 (100,0%)
<i>Staphylococcus warneri</i> N=2	0	0	0	0
<i>Staphylococcus hominis</i> N=1	1 (100,0%)	1 (100,0%)	1 (100,0%)	1 (100,0%)
<i>Staphylococcus capitis</i> N=1	1 (100,0%)	1 (100,0%)	1 (100,0%)	1 (100,0%)
<i>Staphylococcus</i> spp. N=4	4 (100,0%)	2 (50,0%)	2 (50,0%)	2 (50,0%)
Total N=54	45 (83,3%)	43 (79,6%)	39 (72,2%)	32 (59,2%)

\* $p=0,01$  OR=0,08 (0,0-0,75)

A tabela 6 apresenta a relação entre amostras de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* associadas à bacteremia/sepsis e a resistência à oxacilina. Nessa série, a maioria das infecções corresponderam a esta síndrome infecciosa (72,1%), sendo o *S. epidermidis* e o *S. haemolyticus* responsáveis por 71% e 29%, respectivamente, com a maioria das amostras (80,6%) resistente à oxacilina.



TABELA 6 - Relação entre amostras de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* associadas à bacteremia/seps e resistência à oxacilina pelo teste de triagem em agar

Espécies	Oxacilina		Total	
	Resistente N (%)	Susceptível N (%)	N (%)	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	16 (72,7)	6 (27,3)	22	(100,0)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	9 (100,0)	0	9	(100,0)
Total	25 (80,6)	6 (19,4)	31	(100,0)

## DISCUSSÃO

As infecções adquiridas nos hospitais representam uma das principais causas de morbidade, mortalidade e custos. Os hospitais brasileiros sofrem da falta crônica de recursos humanos e financeiros, laboratórios, programas de controle de infecção e, como consequência, os pacientes estão sujeitos a um maior risco de adquirir infecções hospitalares (GAVAZZI; KRAUSE, 2002).

Considerados até pouco tempo somente como microrganismos pertencentes à microbiota da pele em seres humanos e animais, os *Staphylococcus* coagulase negativo (SCoN) vêm se tornando agentes bacterianos importantes em infecções hospitalares. A capacidade destes microrganismos de causar infecções tornou-se mais evidente a partir da crescente utilização de recursos médicos modernos como o uso de procedimentos invasivos e terapia imunossupressora. A utilização destes procedimentos, assim como a aquisição de resistência aos antimicrobianos, principalmente à oxacilina, vêm contribuindo, nos últimos anos, para o estabelecimento dos SCN como um dos principais agentes etiológicos de infecções hospitalares, ao lado do *S. aureus*, *E. coli*, *Enterococcus* spp. e *P. aeruginosa* (EMORY; GAYNES, 1993; KLOOS; BANNERMAN, 1994), além de estarem entre os principais agentes etiológicos de bacteremias primárias, ou seja, aquelas associadas à cateteres intravasculares, infecções de sítio cirúrgico e infecções urinárias (RUPP; ARCHER, 1994). A importância deste grupo de bactérias resultou do uso crescente de cateteres intravasculares centrais e de cefalosporinas em pacientes hospitalizados, considerando a presença deste patógeno na pele, portanto no sítio de inserção do cateter bem como a sua resistência à oxacilina (KARCHMER, 2000).

Os SCoN constituem a principal causa de infecções de corrente sanguínea associadas à cateteres intravasculares (bacteremias primárias) (RICHARDS et al., 1999). No presente estudo,

as amostras de SCoN foram predominantemente recuperadas de sangue/ponta de cateter (74,1%) e a proporção daqueles recuperados a partir deste espécime foi ainda maior (93%) quando consideradas apenas amostras provenientes de pacientes infectados, sendo o *S. epidermidis* responsável por 71% das infecções sanguíneas, com 72,7% destas resistentes à oxacilina. Este dado é confirmado por Rupp, Archer (1994) que relataram uma alta incidência de *S. epidermidis* associados à bacteremias.

Os SCoN compreendem mais de 30 espécies, destacando-se entre as mesmas como patógenos hospitalares *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. capitis* e *S. saprophyticus* (KLOOS; BANNERMAN, 1999; HUMBHREYS, 1997). A identificação destes microrganismos nas respectivas espécies tem importância não só no diagnóstico etiológico das infecções e permitir após a realização do antibiograma, um tratamento mais racional do processo infeccioso e o monitoramento destes microrganismos como reservatórios de genes de resistência (WENZEL; EDMOND, 1998).

A identificação bioquímica das espécies de SCoN envolve um número considerável de testes, em função das semelhanças fisiológicas entre as mesmas. No presente estudo, optou-se por um conjunto de sete testes com o objetivo de caracterizar sobretudo as duas espécies mais importantes: *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* (HOLT et al., 1994; KLOOS; BANNERMAN, 1999), através dos quais foi possível a identificação de mais de 90% das amostras analisadas em seis espécies com mais da metade (59,2%) comportando-se como *S. epidermidis*, seguindo-se *S. haemolyticus* que representou 22,2% dos isolados. Entretanto, variações nas características fenotípicas foram observadas quando da análise dos diferentes testes.

As amostras analisadas pelo teste de triagem em agar apresentaram taxas elevadas de resistência à oxacilina, de 91,7% para *S. haemolyticus* e 46,9% para *S. epidermidis*, frente à 6µg/mL deste antibiótico. Esta observação está de acordo com a literatura que aponta o *S.*

*epidermidis* como o representante de SCoN mais freqüentemente isolado de espécimes clínicos e com taxas de resistência à oxacilina mais expressivas que as encontradas para isolados de *S. aureus*, quando da comparação no mesmo hospital (DEL'ALAMO et al., 1999; EMORY; GAYNES, 1993).

No total, a freqüência de resistência à oxacilina encontrada entre as amostras de SCoN pelo teste de difusão em gel foi de 88,6%, sendo que todas as amostras de *S. haemolyticus* foram resistentes à oxacilina, assim como a maioria (80,9%) daquelas de *S. epidermidis*. Esta taxa foi semelhante àquelas encontradas por outros autores, em estudos recentes, que relatam percentuais entre 70 e 80% de resistência à oxacilina entre amostras de SCoN (PFALLER et al., 1999).

As amostras de *S. haemolyticus* e *S. epidermidis* resistentes à oxacilina pelo Teste de Difusão em Gel, apresentaram-se resistentes também aos seguintes antimicrobianos: gentamicina (77,8%), cefoxitina (77,8%) e sulfametoxazol (66,6%) e sulfametoxazol (58,8%) e gentamicina (47,0%), respectivamente. A multiresistência observada entre os isolados com fenótipo resistente à oxacilina, a exemplo do descrito para MRSA, torna a conduta terapêutica de infecções associadas a estes microrganismos mais difícil (CHAMBERS, 1997). As freqüências de resistência aos antimicrobianos usados foram usualmente mais altas para os isolados de *S. haemolyticus* resistentes à esta penicilina, em comparação àquelas observadas para o *S. epidermidis*, em que seis dos dez antimicrobianos testados mostraram taxas de resistência abaixo de 30%.

## CONCLUSÕES

Foi possível a identificação da maioria das amostras investigadas (92,6%) através de um número relativamente pequeno de testes fenotípicos, verificando-se uma predominância de representantes de *S. epidermidis* (59,2%).

A resistência à oxacilina foi predominante, com mais de 80,0% das amostras apresentando esse fenótipo.

A maioria das amostras investigadas (74%) corresponderam a patógenos associados à sepse/bacteremia. Estes dados são relevantes do ponto de vista epidemiológico e na avaliação da conduta terapêutica a ser adotada pelo clínico.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- BARBER, M. Methicillin-resistant staphylococci. **Journal of Clinical Pathology**, v. 14, p. 385-393, 1961.
- BOYCE, J. M. Coagulase-negative staphylococci. In: MAYHALL, C. G. (Ed.). **Hospital epidemiology and infection control**. Baltimore: Willians & Wilkins Company, 1996. p. 306-334.
- CAMARGO, L. F. A.; STRABELLI, T. M. V.; RIBEIRO, F. G.; IWAHASHI, E. R.; EBAID, M.; FILHO, H. H. C.; SINTO, S. I.; MENDES, C. M. F.; UIP, D. E. Epidemiologic investigation of an outbreak of coagulase-negative *Staphylococcus* primary bacteremia in a newborn intensive care unit. **Infection Control Hospital Epidemiology**, Thorofare, v. 16, n. 10, p. 595-596, 1995.
- CHAMBERS, H. F. Detection of methicillin resistant staphylococci. **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v. 7, n. 2, p. 425-433, 1993.
- CHAMBERS, H. F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, p. 781-791, 1997.
- DEL'ALAMO, L.; CEREDA, R. F.; TOSIN, I.; MIRANDA, E. A.; SADER, H. S. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci and characterization of isolates with reduced susceptibility to glycopeptides. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, New York, v. 34, n. 3, p. 185-191, 1999.
- EMORY, T. G.; GAYNES, R. P. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 6, n. 4, p. 428-442, 1993.
- FERREIRA, R. B. R. **Avaliação da susceptibilidade à oxacilina em *Staphylococcus* spp. coagulase-negativo através de diferentes metodologias**. 94 f. 2002. Dissertação ( Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2002.
- FERREIRA, R. B. R.; NUNES, A. P. F.; KOKIS, V. M.; KREPSKY, N.; FONSECA, L. S.; BASTOS, M. C.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M.; SANTOS, K. R. N. Simultaneous detection of the *mecA* and *ileS-2* genes in coagulase-negative staphylococci isolated from Brazilian hospitals by multiplex PCR. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, New York, v. 34, n. 3, p. 205-212, 2002.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 5. ed. Wayne, 2000. b v.

National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) Report. Semiannual report, aggregated data from the National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, 2000.

PATRICK, C. C. Coagulase-negative staphylococci: pathogens with increasing clinical significance. **The Journal of Pediatrics**, St. Louis, v.116, p. 497-505, 1990.

PEGUES, D. A.; COLBY, C.; HIBBERD, P. L.; COHEN, L. G.; AUSEBEL, F. M.; CALDEWOOD, S. B.; HOOPER, D. C. The epidemiology of resistance to ofloxacin and oxacillin among clinical coagulase-negative staphylococcal isolates: analysis of risk factors and strain types. **Clinical Infectious Diseases**, Boston, v. 26, n. 1, p. 72-79, 1998.

PFALLER, M. A.; JONES, R. N.; DOERN, G. V.; SADER, H. S.; KUGLER, K. C.; BEACH, M. L.; THE SENTRY PARTICIPANTS GROUPS. Survey of bloodstream 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. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, n. 4, p. 283-297, 1999.

PRADE, S. S. Estudo brasileiro da magnitude das infecções hospitalares em hospitais terciários. **Revista do Controle de Infecção Hospitalar**, v. 2, p. 11-25, 1995.

RICHARDS, M. N.; EDWARDS, J. R.; CULVER, D. H.; GAYNES, R. P. The national nosocomial infections surveillance system: nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. **Critical Care Medicine**, v. 27, p. 887-892, 1999.

RUPP, M. E.; ARCHER, G. L. Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 19, n.2, p. 231-245, 1994.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: CHS Laboratory Press, 1989. Appendix A.

SCHABERG, D. R.; CULVER, D. H.; GAYNES, R. P. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. **The American Journal of Medicine**, Denver, v. 91 (suppl. 3b), p. s72-s75, 1991.

SMIBERT, R. M.; KRIEG, N. R. Methods for general and molecular bacteriology. In: GERHARDT, P. et al. (Ed.). **Phenotypic characterization**. Washington: ASM Press, 1994. p. 611-651.

VERNOZY-ROZAND, C.; MAZUY, C.; MEUGNIER, H.; BES, M.; LASNE, Y.; FIEDLER, F.; ETIENNE, J.; FRENEY, J. *Staphylococcus fleurenttii* sp. nov., isolated from goat's milk cheeses. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, London, v. 50, 4 part 6, p. 1521-1527, 2000.

VIEIRA, L. A.; CASTRO, A. R.; DUARTE, J. L. B.; PINHEIRO, S. R.; SUASSNA, I.; PEREIRE, J. A. A. Colonização intestinal de recém-nascido por enterobactérias multiresistentes a antimicrobianos em uma unidade neonatal. **Jornal de Pediatria**, v. 75, n. 2, p. 83-90, 1999.

VILLARI, P.; SARNATARO, C.; IACUZIO, L. Molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* in a neonatal care ward over a three-year period. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 5, p. 1740-1746, 2000.

WENZEL, R. P.; NETTLEMAN, M. D.; JONES, R. N.; PFALLER, M. A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: implications for the 1990s and effective control measures. **The American Journal of Medicine**, Denver, v. 91 (suppl. 3b), p. 221-227, 1991.

WENZEL, R. P.; EDMOND, M. B. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: infection control considerations. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 27, n. 2, p. 245-251, 1998.



## ANEXO 1

Características Bioquímicas das principais espécies de *Staphylococcus* envolvidas em infecções hospitalares (HOLT et al., 1994; KLOOS; BANNERMAN, 1999)

Espécies	HEM	CG	PYR	URE	MAN	MAT	TRE
<i>S. lugdunensis</i>	+	-	+	V	+	-	+
<i>S. schleiferi</i>	-	-	+	-	+	-	V
<i>S. haemolyticus</i>	+	-	+	-	-	V	+
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	+	(+)	-	-
<i>S. saprophyticus</i>	-	-	-	+	-	V	+
<i>S. capitis</i>	-	-	-	-	+	+	-
<i>S. cohnii</i>	-	-	-	+	(V)	V	+
<i>S. hominis</i>	-	-	-	+	-	-	V
<i>S. warneri</i>	-	-	-	+	-	V	+
<i>S. sciuri</i>	-	-	-	-	(V)	+	+
<i>S. simulans</i>	-	-	+	+	+	+	+

V, 11-89% positivo; Parênteses, reação lenta; HEM - produção de hemólise; CG - produção de coagulase livre; PYR - produção de pirrolidônio arilamidase; URE - produção de urease; MAN - fermentação de manose; MAT - fermentação de manitol; TRE - fermentação de trealose