

Adriano Martison Ferreira

**Avaliação de Métodos de Identificação e Determinação do Perfil  
de Sensibilidade aos Antimicrobianos em *Staphylococcus* spp.  
Isolados de Pacientes com Infecção do Trato Urinário (ITU)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, para obtenção do Título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Botucatu - São Paulo  
2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Ferreira, Adriano Martison.

Avaliação de métodos de identificação e determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em *Staphylococcus* spp. isolados de pacientes com infecção do trato urinário (ITU). - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011.

Orientador: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Capes: 21201021

1. Infecções urinárias. 2. Estafilococos. 3. Aparelho urinário - Doenças.

Palavras-chave: Infecção do trato urinário; Métodos de identificação; Perfil de sensibilidade; *S. saprophyticus*; *mecA*.

*Epígrafe*

---

*“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite  
que ele possa ser realizado”.*

*Roberto Shinyashiki*

*Dedicatória*

---

*A meus Pais*

*Adércio e Elisabete, com carinho e gratidão, por tudo que me ensinaram e continuam ensinando até hoje.*

*À minha esposa*

*Isabel, por todo apoio, amor e compreensão.*

*Às minhas filhas*

*Bruna e Isadora, razão de tudo em minha vida.*

# *Agradecimientos*

---

*À Prof. Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha, minha orientadora, pela oportunidade, ensinamentos, compreensão e paciência... Muito obrigado!*

*À Dra. Terue Sadatsune e ao Dr. Alessandro Lia Mondelli, por toda a colaboração e apoio no desenvolvimento desse trabalho.*

*À Dra Adriana Polachini do Valle, pela permissão para a realização de parte do trabalho na Seção de Laboratórios de Análises Clínicas do HC-FMB.*

*A todos os companheiros de trabalho do Laboratório de Microbiologia do HC-FMB, Cláudia, Nice, Carina, Eneida, Angélica, Jackson, Marcos, e em especial à Ana, Reonice e Roque que muitas vezes ficaram sobrecarregados para suprir minha ausência... Obrigado!*

*Ao Prof. Dr. Augusto Cezar Montelli pelas valiosas sugestões recomendadas no exame de qualificação.*

*A todos os colegas do Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia-Imunologia do IB, Deise, Leticia, Patrícia, Eliane, Aline, Cláudia, Taíse, Eliane Pessoa, Nathalie, Danilo, André, Adilson, Marcus, e em especial à Valéria e Mariana que me auxiliaram muito na execução dos testes moleculares.*

*Ao amigo Carlos Henrique Camargo, pela amizade, sugestões, e por estar sempre à disposição nos momentos em que precisei, pessoa imprescindível na realização deste trabalho.*

*À Dra Fátima Aparecida Mazzini Amâncio, pelo apoio e incentivo prestado, desde a minha graduação até hoje.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro, processo 2009/10083-5.*

*A toda minha família, e a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.*

# *Sumário*

---

## Sumário

Lista de figuras.....	xv
Lista de tabelas.....	xviii
Resumo.....	xxi
Abstract.....	xxiv
1. Introdução.....	01
2. Objetivos.....	20
2.1. Objetivo geral.....	20
2. 2. Objetivos específicos.....	20
3. Materiais e métodos.....	23
3.1. Amostras.....	23
3.2. Critérios de inclusão.....	23
3.3. Critérios de exclusão.....	23
3.4. Cálculo amostral.....	23
3.5. Coleta.....	24
3.6. Transporte.....	25
3.7. Semeadura.....	25
3.8. Isolamento primário.....	25
3.9. Identificação fenotípica dos estafilococos.....	25
3.9.a. Prova da catalase.....	26
3.9.b. Prova da bacitracina e furazolidona.....	26
3.9.c. Prova da coagulase em tubo.....	26
3.9.d. Prova da desoxirribonuclease (meio de DNase).....	26
3.9.1. Identificação de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	27

3.9.2. Identificação de estafilococos coagulase negativa.....	27
3.10. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco-difusão.....	28
3.11. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) aos antimicrobianos pelo método de E-teste®.....	29
3.12. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) aos antimicrobianos pelo sistema Vitek I.....	30
3.13. Testes para detecção de resistência à oxacilina.....	31
3.14. Detecção da resistência induzida ao grupo MLS <sub>B</sub> (macrolídeos; lincosamidas e estreptogramina B).....	32
3.15. Teste para detecção da produção de beta-lactamase pelo disco de nitrocefina.....	32
3.16. Teste para detecção da produção de beta-lactamase pelo Vitek I.....	33
3.17. Teste para detecção de hiperprodução de beta-lactamase.....	33
3.18. Extração do ácido nucleico.....	34
3.19. Identificação genotípica de <i>Staphylococcus</i> spp. ....	34
3.20. Detecção do gene <i>mecA</i> pelo método da reação em cadeia de polimerase (PCR).....	35
3.21. Detecção do gene <i>coa</i> pelo método da reação em cadeia da polimerase (PCR).....	36
3.22. Determinação do tipo de SCC <sub>mec</sub> ( <i>staphylococcal cassette chromosome mec</i> ) para <i>S. aureus</i> .....	37
3.23. Determinação do tipo de SCC <sub>mec</sub> ( <i>staphylococcal cassette chromosome mec</i> ) para estafilococos coagulase negativa.....	38
3.24. Análise estatística.....	40
4. Resultados.....	42

4.1. Procedência das amostras encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia do HC-FMB.....	42
4.2. Idade e sexo dos pacientes com infecção do trato urinário.....	43
4.3. Comparação entre a prova de DNase, teste da coagulase em tubo e gene da coagulase (gene <i>coa</i> ).....	44
4.4. Identificação fenotípica e genotípica dos <i>Staphylococcus</i> spp.....	46
4.5. Determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos através do método de disco-difusão em ágar (Kirby-Bauer).....	51
4.6. Determinação do gene <i>mecA</i> e classificação do SCC <i>mec</i> .....	54
4.7. Determinação da sensibilidade e especificidade dos métodos fenotípicos para detecção do gene <i>mecA</i> em <i>Staphylococcus</i> spp.....	59
4.8. Detecção da resistência induzida aos antimicrobianos do grupo MLS <sub>B</sub> .....	60
4.9. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) aos antimicrobianos pelo método de E-test®. ....	61
4.10. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) aos antimicrobianos pelo Vitek I.....	63
4.11. Número de resistências e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) aos antimicrobianos em amostras MRS e MSS.....	65
4.12. Taxa de concordância da sensibilidade aos antimicrobianos.....	66
4.13. Determinação da produção de beta-lactamase.....	67
5. Discussão.....	70
6. Conclusões.....	91
7. Referências bibliográficas.....	94
Anexos .....	108

## *Lista de figuras*

---

## Lista de figuras

Figura 1. Procedência das amostras encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia do HC-FMB.....	42
Figura 2. Placa de ágar DNase com verde de metila.....	44
Figura 3. Eletroforese em gel de agarose para pesquisa do gene <i>coa</i> (117 bp) pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR).....	45
Figura 4. Amostra da espécie <i>S. saprophyticus</i> identificada pelo método bioquímico através da fermentação dos açúcares.....	46
Figura 5. Cartão de identificação para Gram positivo (GPI) do Vitek I.....	47
Figura 6. ITS-PCR (internal transcribed spacer-PCR) para identificação genotípica das espécies de <i>Staphylococcus</i> spp.....	49
Figura 7. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco-difusão em <i>Staphylococcus</i> spp.....	51
Figura 8. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco-difusão em <i>S. saprophyticus</i> . .....	52
Figura 9. Amostra de <i>S. saprophyticuss</i> resistente apenas a novobiocina e oxacilina.....	52
Figura 10. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco-difusão em <i>S. aureus</i> .....	53
Figura 11. Amostra de <i>S. aureus</i> multirresistente, mostrando sensibilidade apenas à vancomicina, linezolid, e nitrofurantoina.....	54
Figura 12. Eletroforese em gel de agarose para pesquisa do gene <i>mecA</i> (533 bp) pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR).....	56

Figura 13. PCR multiplex para detecção do tipo de SCCmec para estafilococos coagulase negativa.....	56
Figura 14. PCR multiplex para detecção do tipo de SCCmec para <i>S. aureus</i> .....	59
Figura 15. Detecção da resistência induzida aos antimicrobianos pertencentes ao grupo MLS <sub>B</sub> .....	60
Figura 16. A: D-teste positivo para detecção da resistência induzida aos antimicrobianos pertencentes ao grupo MLS <sub>B</sub> ; B: D-teste negativo.....	60
Figura 17. Amostra de <i>S. aureus</i> sensível à vancomicina e linezolida, beta-lactamase positiva e resistente a penicilina, oxacilina, clindamicina e eritromicina.....	61
Figura 18. Amostra de <i>S. saprophyticus</i> resistente à penicilina e oxacilina, beta-lactamase negativa, e sensível à clindamicina, eritromicina, linezolida e vancomicina.....	63
Figura 19. Cartão para avaliação da sensibilidade de bactérias Gram positivas (GPS-652) do Vitek I.....	64
Figura 20. Detecção da produção de beta-lactamase pelos métodos do disco de nitrocefim e Vitek I.....	67

## *Lista de tabelas*

---

## Lista de tabelas

Tabela 1. Oligonucleotídeos para detecção do cassete cromossômico estafilocócico <i>mec</i> (SCC <i>mec</i> ) em <i>Staphylococcus aureus</i> .....	38
Tabela 2. Oligonucleotídeos para detecção do cassete cromossômico estafilocócico <i>mec</i> (SCC <i>mec</i> ) em estafilococos coagulase negativa.....	39
Tabela 3. Correlação entre as espécies isoladas e a procedência das amostras.....	43
Tabela 4. Idade e sexo dos pacientes com infecção do trato urinário.....	43
Tabela 5. Comparação dos testes de coagulase e DNase com a presença do gene <i>coa</i> .....	45
Tabela 6. Teste de concordância e acurácia para os métodos de DNase e coagulase.....	45
Tabela 7. Comparação dos métodos de identificação.....	47
Tabela 8. Avaliação das provas bioquímicas que falharam na identificação das espécies.....	48
Tabela 9. Comparação da sensibilidade e especificidade entre os métodos com ITS-PCR.....	49
Tabela 10. Taxa de concordância entre o ITS-PCR e o disco de novobiocina.....	50
Tabela 11. Taxa de concordância entre o ITS-PCR e o sistema Vitek I.....	50
Tabela 12. Taxa de concordância entre o ITS-PCR e o método simplificado de provas bioquímicas.....	50
Tabela 13. Determinação pela técnica da PCR do tipo de SCC <i>mec</i> ( <i>staphylococcal cassette chromosome mec</i> ) dos estafilococos.....	55
Tabela 14. Tipo de SCC <i>mec</i> , perfil de sensibilidade pelo método de disco-difusão e origem dos isolados de estafilococos.....	57

Tabela 15. Comparação dos métodos para detecção da resistência à oxacilina utilizando-se discos de cefoxitina (30µg) e oxacilina (1µg), E-test®, vitek I e gene <i>mecA</i> .....	58
Tabela 16. Sensibilidade e especificidade dos métodos fenotípicos para detecção de resistência à oxacilina em <i>Staphylococcus</i> spp.....	59
Tabela 17. Concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de E-test® para <i>Staphylococcus</i> spp.....	62
Tabela 18. Concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de E-test® para <i>S. saprophyticus</i> .....	62
Tabela 19. Concentração inibitória mínima (CIM) pelo Vitek I para <i>Staphylococcus</i> spp.....	64
Tabela 20. Concentração inibitória mínima (CIM) pelo Vitek I para <i>S. saprophyticus</i> .....	65
Tabela 21. Concentração inibitória mínima em amostras MRS e MSS.....	65
Tabela 22. Número de resistências aos antimicrobianos em amostras MRS e MSS obtidas pelo método de disco-difusão.....	66
Tabela 23. Taxa de concordância da sensibilidade aos antimicrobianos nos três métodos utilizados.....	66
Tabela 24. Detecção da produção de beta-lactamase pelo método do disco de nitrocefim em amostras de <i>S. saprophyticus</i> .....	68
Tabela 25. Amostras hiperprodutoras de beta-lactamase.....	68

*Resumo*

---

## Resumo

A infecção do trato urinário (ITU) é uma das infecções mais comuns na prática clínica, sendo *S. saprophyticus* o segundo agente mais frequente na comunidade. Esse estudo objetivou comparar três métodos fenotípicos de identificação e avaliar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em *Staphylococcus* spp. isolados de pacientes com ITU. As 101 amostras de estafilococos isoladas foram identificadas pelo disco de novobiocina, Vitek I e método simplificado de provas bioquímicas, utilizando como referência o método genotípico ITS-PCR. A prova da DNase teve uma boa correlação com a coagulase em tubo, apresentando 100,0% sensibilidade e 97,6% de especificidade. No teste de concordância entre os métodos de identificação, o método simplificado de provas bioquímicas obteve taxas de concordância de 98,0% em relação ao ITS-PCR, enquanto que com o Vitek I foi de 81,2%, e com o disco de novobiocina de 89,1%. O maior percentual de resistência encontrado foi à oxacilina (78,0%) seguido da penicilina (73,0%), sendo todas as amostras sensíveis à vancomicina, linezolida e nitrofurantoina. Os 17 isolados de *S. aureus* encontrados foram identificados corretamente por todos os métodos e os que carregavam o SCCmec do tipo III foram os que apresentaram maior resistência aos antimicrobianos. Das 18 amostras de estafilococos *mecA* positivos encontradas neste estudo, 15 (83,3%) foram resistentes aos discos de cefoxitina e oxacilina concomitantemente, além disso foram resistentes também à oxacilina pelo E-test® e pelo Vitek I. Dos 57 *S. saprophyticus*, 7 (12,3%) foram resistentes ao disco de cefoxitina e nenhum apresentou o gene *mecA*, enquanto 56 (98,2%) demonstraram resistência ao disco de oxacilina, sendo que todos foram resistentes pelo E-teste® e pelo Vitek I e somente dois apresentaram o gene *mecA* e carregavam o SCCmec do tipo IV. Em relação aos métodos de detecção de resistência à oxacilina, a técnica de difusão com disco de oxacilina, E-test® e Vitek I apresentaram maior sensibilidade (94,4%) e menor especificidade

(28,9%, 26,5% e 24,0%, respectivamente) do que o disco de cefoxitina, que apresentou sensibilidade de 83,5% e especificidade de 85,5%. A comparação dos métodos fenotípicos de identificação de espécies de *Staphylococcus* spp. mostrou que o método simplificado apresentou maior sensibilidade e confiabilidade, sendo uma opção de baixo custo para utilização em laboratórios de rotina. Não foi encontrada outra espécie não *S. saprophyticus* resistente à novobiocina nas amostras estudadas, desta maneira o disco de novobiocina mostrou ser ainda uma alternativa viável para identificação de *S. saprophyticus* em amostras urinárias em laboratórios com recursos limitados, porém não diferencia *S. epidermidis* de outras espécies sensíveis à novobiocina. Os métodos de disco-difusão, E-test® e Vitek I não são recomendados para detecção da resistência à oxacilina em isolados de *S. saprophyticus* porque as espécies negativas para o gene *mecA* serão consideradas resistentes utilizando-se o atual *breakpoint*. A grande quantidade de isolados resistentes à oxacilina ocorreu provavelmente devido a uma alteração de outra PBP que não a PBP2a, ou ainda, que o ponto de corte preconizado pelo CLSI possa superestimar a resistência à oxacilina em *S. saprophyticus*, sugerindo que modificações são necessárias para detecção dessa resistência.

**Palavras-chaves:** Infecção do trato urinário; Métodos de identificação; Perfil de sensibilidade; *S. saprophyticus*; *mecA*.

# *Abstract*

---

## Abstract

Urinary tract infection (UTI) is one of the most common infections in clinical practice, and *S. saprophyticus* is the second most frequent agent in the community. This study aimed at comparing three phenotypic methods to identify and evaluate the sensitivity profile to antimicrobials in *Staphylococcus* spp. isolated from patients with UTI. The 101 samples of staphylococcus isolated were identified by novobiocin disks, Vitek I and the simplified method of biochemical tests, using the ITS-PCR genotypic method as reference. The DNase test showed good correlation with tube coagulase, exhibiting 100.0% sensitivity and 97.6% specificity. In the agreement test between the identification methods, the simplified method of biochemical tests showed agreement rates of 98.0% in relation to ITS-PCR, whilst with Vitek I, it was of 81.2%, and with the novobiocin disk, it was of 89.1%. The highest resistance percentage found was to oxacillin (78.0%), followed by penicillin (73.0%), and all samples were sensitive to vancomycin, linezolid and nitrofurantoin. The 17 isolates of *S. aureus* found were correctly identified by all methods, and those carrying type-III SCCmec showed the greatest resistance to antimicrobials. Of the 18 *mecA*-positive staphylococcus samples found in this study, 15 (83.3%) were concomitantly resistant to cefoxitin and oxacillin disks. Additionally, they were also resistant to oxacillin by the E-test® and by Vitek I. Of the 57 *S. saprophyticus*, 7 (12.3%) were resistant to the cefoxitin disk, and none showed the *mecA* gene, while 56 (98.2%) showed resistance to the oxacillin disk, all of them were resistant by the E-test® and by Vitek I, and only two showed the *mecA* gene and carried the type-IV SCCmec. As regards the detection methods for oxacillin resistance, the diffusion technique with oxacillin disks, E-test® and Vitek I showed greater sensitivity (94.4%) and lower specificity (28.9%, 26.5% and 24.0%, respectively) than did the cefoxitin disk, which showed 83.5% sensitivity and 85.5% specificity. The comparison of phenotypic identification

methods for *Staphylococcus* spp. species showed that the simplified method presented greater sensitivity and reliability, thus being a low-cost option for use in routine laboratories. No other novobiocin-resistant non-*S. saprophyticus* species was found in the studied samples; therefore, the novobiocin disk also showed to be a viable alternative for *S. saprophyticus* identification in urinary samples in laboratories with limited resources. However, it does not differentiate *S. epidermidis* from other novobiocin-sensitive species. The disk-diffusion methods, E-test® and Vitek I are not recommended for detection of oxacillin resistance in *S. saprophyticus* isolates because the *mecA*-negative species are considered to be resistant by using the present breakpoint. The large number of oxacillin-resistant isolates probably occurred due to an alteration of a PBP other than PBP2a, or also due to the fact that the breakpoint preconized by CLSI may overestimate oxacillin resistance in *S. saprophyticus*, thus suggesting that modifications are necessary for detecting such resistance.

**Key words:** Urinary tract infection; Identification methods; Sensitivity profile; *S. saprophyticus*; *mecA*.

# *Introdução*

---

## 1. Introdução

A infecção do trato urinário (ITU) é uma das afecções mais comuns da clínica médica<sup>1,2,3</sup>, figurando como a segunda infecção mais comum no ser humano<sup>4</sup>, sendo apenas menos frequente que as do trato respiratório<sup>5,6</sup>.

A ITU caracteriza-se por invasão e multiplicação de bactérias ou fungos nos órgãos do sistema urinário, podendo acometer as vias urinárias e/ou os rins<sup>7</sup>. O processo infeccioso pode afetar o rim, a pelve renal, os ureteres, a bexiga e a uretra, bem como as estruturas adjacentes, incluindo próstata e epidídimo, existindo possibilidades de agravamento na dependência do estado geral do paciente e da sua idade, merecendo assim, grande atenção em pesquisas e estudos nas ciências médicas<sup>8</sup>.

A incidência de ITU varia de acordo com a faixa etária, e no primeiro ano de vida é mais comum no sexo masculino, devido a um número maior de malformações congênitas nesse sexo, especialmente na válvula da uretra posterior<sup>9,10</sup>, a partir deste período, durante toda a infância e principalmente na fase pré-escolar, as meninas são acometidas por ITU 10 a 20 vezes mais do que os meninos. Na vida adulta, a incidência de ITU se eleva e o predomínio no sexo feminino se mantém, com picos de maior acometimento no início ou relacionado à atividade sexual, durante a gestação ou na menopausa, de forma que 48% das mulheres apresentam pelo menos um episódio de ITU ao longo da vida<sup>9</sup>.

A maior suscetibilidade à infecção no sexo feminino é devida às condições anatômicas, como uretra mais curta e sua maior proximidade com a vagina e ânus<sup>4,11</sup>, e ausência de propriedades antimicrobianas, como as encontradas no líquido prostático<sup>12</sup>.

No homem, o maior comprimento uretral, maior fluxo urinário e o fator antibacteriano prostático são alguns dos fatores que contribuem para a menor incidência de ITU. Entretanto, homens com mais de 50 anos tornam-se mais suscetíveis à ITU devido ao prostatismo, que é a compressão e obstrução da uretra pela próstata causada por hiperplasia prostática benigna ou

câncer de próstata<sup>13</sup>.

A infecção urinária pode comprometer somente o trato urinário baixo, o que caracteriza o diagnóstico de cistite, ou afetar simultaneamente o trato urinário inferior e o superior; neste caso, utiliza-se a terminologia infecção urinária alta, também denominada pielonefrite. A infecção urinária baixa ou cistite pode ser sintomática ou não<sup>14</sup>.

As infecções do trato urinário podem ser complicadas ou não, as primeiras tendo maior risco de falha terapêutica e sendo associadas a fatores que favorecem a ocorrência da infecção. A infecção urinária é complicada quando ocorre em um aparelho urinário com alterações estruturais ou funcionais<sup>15,16</sup>. Existem três rotas potenciais para os microrganismos atingirem os rins: difusão linfática, hematogênica e ascendente, sendo esta última via responsável por 95% das ITU<sup>17</sup>.

Habitualmente, as cistites são infecções não complicadas enquanto as pielonefrites, ao contrário, são complicadas, pois em geral resultam da ascensão de microrganismos do trato urinário inferior e estão frequentemente associadas com a presença de cálculos renais<sup>11,14,18</sup>.

Tanto a infecção urinária baixa como a alta podem ser agudas ou crônicas, e sua origem pode ser comunitária ou hospitalar<sup>19</sup>. O Ministério da Saúde define infecção hospitalar como aquela adquirida após a admissão do paciente e cuja manifestação ocorreu durante a internação ou após a alta, podendo ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares<sup>20</sup>.

As ITUs adquiridas em hospitais estão entre as infecções nosocomiais mais frequentes em todo o mundo, representando cerca de 50% do total das infecções, em custo, 14% do valor total dispendido com as infecções nosocomiais<sup>21</sup>. A frequência dos germes causadores de ITU varia na dependência de onde foi adquirida a infecção, intra ou extra-hospitalar e também difere em cada ambiente hospitalar considerado<sup>13</sup>.

Sendo a urina estéril, a simples presença de bactérias, independente de sua quantidade,

deveria indicar ITU, o que, na prática, não se demonstra<sup>12</sup>. Cerca de 10 a 20% das pacientes apresentam colonização da mucosa vaginal e da região periuretral por enterobactérias, por esta razão, além da identificação de bactérias uropatógenas, a avaliação do número de unidades formadoras de colônia por mililitro de urina (UFC/mL) tornou-se um critério importante na interpretação da urocultura, já que os microrganismos colonizantes geralmente se apresentam em baixas contagens.

Como critérios de avaliação de bacteriúria considerável, utilizam-se, na prática, dois critérios: o de Kass<sup>22</sup> e o de Stamm et al.<sup>23</sup>. Segundo Kass, são consideradas amostras compatíveis com ITU aquelas com contagem de colônias igual ou maior a 100.000 UFC/mL. Já, segundo Stamm, são consideradas amostras compatíveis com ITU aquelas com contagem de colônias entre 100 a 10.000 UFC/mL.

Qualquer microrganismo pode ser relevante, mesmo se isolado em quantidades inferiores a  $10^5$  UFC/mL, sendo importante se considerar o resultado da cultura junto ao sedimento urinário, e sempre que possível com exames anteriores de cultura de urina ou com o quadro clínico do paciente<sup>24</sup>. Além dos critérios de Stamm e o de Kass, outras preconizações são aceitas.

Os agentes etiológicos, mais frequentemente envolvidos com ITU adquirida na comunidade, são em ordem de frequência: a *Escherichia coli*, o *Staphylococcus saprophyticus*, espécies de *Proteus* spp., *Klebsiella* spp. e *Enterococcus faecalis*. A *E. coli*, sozinha, responsabiliza-se por 70,0% a 85,0% das infecções do trato urinário adquiridas na comunidade, e por 50,0% a 60,0% em pacientes idosos admitidos em instituições<sup>14,25,26</sup>. Contudo, quando a ITU é adquirida no ambiente hospitalar, os agentes etiológicos estão diversificados, predominando as enterobactérias, com redução na frequência de *E. coli* (embora ainda permaneça habitualmente como a primeira causa), e um crescimento de *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Enterococcus*

*faecalis*<sup>14,25,27</sup> e de fungos, com destaque para espécies do gênero *Candida*.

*Staphylococcus saprophyticus* é o segundo mais frequente agente de ITU aguda na comunidade depois de *E. coli*<sup>28,29</sup>, sendo principalmente isolado de urina de mulheres jovens sexualmente ativas<sup>30,31,32</sup>, apresentando sintomas indistinguíveis dos causados por *Escherichia coli*, existindo também relatos de septicemia e pielonefrite por este microrganismo<sup>33,34</sup>.

Foi demonstrado que *S. saprophyticus* causa infecções urinárias agudas e sintomáticas em crianças e adolescentes de ambos os sexos em ausência de anomalias estruturais das vias urinárias<sup>31,35</sup>.

Rupp et al.<sup>36</sup> estudaram a prevalência de colonização urogenital em 276 mulheres e observaram que o reto era o sítio mais frequente de colonização por *S. saprophyticus* (40,0%), seguido pela uretra (30,0%), urina (10,0%) e colo uterino (10,0%).

*S. saprophyticus* são raramente encontrados em pacientes hospitalizados ou como contaminantes de cultura de urina<sup>30</sup> e podem ser a causa de prostatite e uretrites em homens e mulheres<sup>37,38</sup>.

Em estudos de aderência a células epiteliais humanas de diferentes sítios, observou-se um tropismo deste microrganismo por células da uretra e área periuretral, comparadas às células da boca e da pele. Verificou-se, ainda, que *S. saprophyticus* adere em número significativamente maior a células do trato urinário que outros patógenos, tais como *E. coli*<sup>39,40</sup>.

Em diversos laboratórios clínicos de rotina, a identificação presuntiva de *S. saprophyticus* é baseada somente na resistência à novobiocina (5µg). Entretanto, tem sido reconhecido que outras espécies de estafilococos coagulase negativa (ECN), incluindo *S. cohnii*, *S. sciuri*, *S. xylosus* e *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* são também resistentes à novobiocina nessa concentração<sup>41,42</sup>.

A resistência aos antibióticos é geralmente codificada por plasmídeos, e dessa forma é

possível à transferência de genes de resistência à novobiocina entre espécies<sup>43</sup>. Em 2002, um estudo publicado por Cunha & Lopes<sup>44</sup> demonstrou seis linhagens de *S. epidermidis*, uma de *S. haemolyticus*, uma de *S. simulans* e uma de *S. xylosus* resistentes à novobiocina, confirmando a observação de Large et al.<sup>45</sup> de que outras espécies de ECN também podem apresentar resistência a essa droga. Esses resultados sugerem que provas adicionais, incluindo fermentação de carboidratos e outros testes, devem ser usadas em conjunto com a prova de sensibilidade à novobiocina para a correta identificação de espécies de ECN<sup>44</sup>.

Mctaggart & Elliott<sup>43</sup> analisaram 36 cepas resistentes à novobiocina presumivelmente de *S. saprophyticus*. As amostras foram isoladas de urina obtidas de pacientes com ITU e identificadas com API Staph-Ident e alguns outros testes adicionais. Das 36, cepas 21 (58,0%) foram identificadas como *S. saprophyticus*, três não puderam ser identificadas, nove possuíam características comuns a mais de uma espécie resistente à novobiocina e três foram identificadas respectivamente, como *S. epidermidis*, *S. hominis* e *S. simulans*.

Em pacientes hospitalizados ocorre geralmente uma prevalência de *Staphylococcus epidermidis* nos casos de ITU. Frequentemente são pacientes idosos e debilitados, que apresentaram complicações do trato urinário e tem ainda como fator predisponente a presença de sonda vesical de demora<sup>46</sup>.

Outros ECN são, geralmente, considerados de patogenicidade incerta para o trato urinário. Recentemente, no entanto, diversos pesquisadores têm avaliado a presença de algumas espécies de ECN (*Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus vitulinus* e *Staphylococcus pulvereri*) como uropatógenos. Guirguitzova et al.<sup>47</sup> observaram, no período de 1997 a 1999, na Bulgária, a presença de 229 cepas de ECN com significância clínica em infecções do trato urinário em pacientes hospitalizados. As cepas isoladas corresponderam ao *Staphylococcus haemolyticus* (47,9%), *Staphylococcus saprophyticus* (20,5%), *Staphylococcus epidermidis* (7,9%), *Staphylococcus simulans* (7,4%),

*Staphylococcus sciuri* (4,4%), *Staphylococcus capitis* (4,4%), *Staphylococcus xylosus* (2,2%), *Staphylococcus warneri* (2,2%), *Staphylococcus cohnii* (1,3%), *Staphylococcus lentus* (0,9%) e *Staphylococcus hominis* (0,9%).

Alcaráz et al.<sup>48</sup> analisaram 45 amostras de isolados clínicos e encontraram 13 cepas de ECN isoladas de urina. As cepas isoladas foram identificadas como *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus saprophyticus* (30,7% cada um), *Staphylococcus epidermidis* (15,4%), *Staphylococcus hominis* (15,4%) e *Staphylococcus lugdunensis* (7,8%).

*Staphylococcus aureus* é relativamente incomum em ITU na população em geral<sup>49</sup>. Embora o isolamento de *S. aureus* em amostras de urina seja muitas vezes secundária à bacteremia originada em outras partes<sup>50</sup>, em alguns pacientes, *S. aureus* causa colonização e infecção através da via ascendente, entretanto, a instrumentação do trato urinário e a presença de cateterização aumentam o risco de infecção do trato urinário por este microrganismo<sup>51</sup>, ocorrendo também um aumento de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) devido à maior frequência de pacientes que passam por esses procedimentos<sup>52</sup>.

O gênero *Staphylococcus* é o mais importante membro da família Staphylococcaceae, atualmente constituído de 44 espécies e 24 subespécies<sup>53</sup>. Entre seus representantes, *Staphylococcus aureus* é a espécie mais virulenta e o patógeno mais importante, entretanto a incidência de infecções causadas por ECN vem aumentando em todo o mundo<sup>54</sup>.

Em 1957, Weckman & Catlin<sup>55</sup> demonstraram haver uma correlação entre uma atividade aumentada de DNase dos *S. aureus* e uma atividade de coagulase positiva. Sugeriram que a atividade de DNase podia ser utilizada para identificar estafilococos potencialmente patogênicos. DiSalvo<sup>56</sup> confirmou esses resultados obtendo uma correlação excelente entre a atividade de coagulase e de DNase dos estafilococos isolados provenientes de amostras clínicas.

Durante a última década, considerável progresso na classificação sistemática dos

estafilococos e no desenvolvimento de métodos para a identificação do gênero, espécies e subespécies, têm permitido aos clínicos se inteirarem da variedade de ECN presentes em amostras clínicas e, assim, os considerarem como agentes etiológicos de uma série de processos infecciosos<sup>57</sup>. Atualmente, são reconhecidos como microrganismos essencialmente oportunistas, que se aproveitam de inúmeras situações para produzir graves infecções<sup>58,59</sup>. 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*<sup>60</sup>.

Os ECN podem ser facilmente diferenciados em espécies através de suas características bioquímicas<sup>61</sup>, entretanto, na maioria dos laboratórios de microbiologia clínica, tal identificação não é feita de rotina.

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 et al.<sup>62</sup> em um estudo com painéis do MicroScan (rápido e convencional) para a identificação de Gram-positivos.

Bannerman et al.<sup>63</sup> avaliaram a base atualizada do cartão de identificação GPI (Identificação de Gram-Positivo) usado com o sistema automatizado de identificação bacteriana Vitek I (Biomérieux) em 500 isolados clínicos. A concordância global entre o cartão GPI e os métodos convencionais foi de 89,0%. O cartão identificou 92,0% dos isolados de isolados de *S. epidermidis*, 95,0% de *S. haemolyticus*, 88,0% de *S. capitis* subsp. *capitis* e 100,0% de *S. saprophyticus* estudados. Os microrganismos não incluídos na base de dados, como *S. lugdunensis*, ou foram identificados erroneamente ou não foram identificados pelo cartão GPI.

Na avaliação realizada por Perl et al.<sup>64</sup>, o cartão GPI identificou corretamente apenas

67,0% de 185 isolados. Esses pesquisadores ressaltaram que o baixo rendimento do cartão GPI em seu estudo pode ter sido devido à preponderância de estafilococos “não *S. epidermidis*” entre os 227 isolados avaliados.

Em 2004 uma nova chave de identificação foi organizada por Cunha et al.<sup>65</sup>. O método que ficou conhecido como método simplificado de provas bioquímicas, é dividido em duas etapas. Durante a primeira etapa são realizadas as provas de fermentação da xilose, sacarose, trealose, maltose, manitol, produção de hemolisinas e crescimento anaeróbico em tioglicolato. 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  $\beta$ -D-frutose, ornitina descarboxilase e resistência à novobiocina. Este método foi comparado com o método de referência proposto por Kloos e Schleifer<sup>61</sup> e Bannerman<sup>66</sup> 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.

Outra técnica utilizada para identificação de estafilococos é a técnica da PCR que permite a identificação genotípica de várias espécies de estafilococos com alta sensibilidade e especificidade. A técnica de ITS-PCR permite a análise dos espaços intergênicos transcritos ou “intergenic transcribed spacers” (ITS) entre os loci gênicos 16S e 23S do rRNA, técnica usada frequentemente em PCR “fingerprint” para identificação e discriminação de linhagens bacterianas em nível de espécie e subespécie<sup>67</sup>. Em gel de poliacrilamida ou agarose, as regiões amplificadas formam um padrão de bandas específico para cada espécie. Utilizando os respectivos padrões ATCC, pode-se comparar o padrão de bandas das amostras de referência com as amostras investigadas, não restando dúvidas quanto à identificação precisa das diferentes espécies de estafilococos. Esse método foi originalmente descrito por Barry et al.<sup>68</sup>,

sendo a identificação de *Staphylococcus* também estudada por Jensen et al.<sup>69</sup>, que aplicaram a técnica com sucesso na diferenciação de linhagens de quatro espécies de estafilococos: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* e *S. warneri*.

Nos últimos dez anos, a técnica de ITS-PCR tem sido muito utilizada na tipagem de linhagens bacterianas, pois as regiões ITS possuem grande polimorfismo<sup>69,70</sup>. Esse polimorfismo é devido à presença de genes de tRNA, responsáveis pelo comprimento e sequência das regiões entre operons, semelhantes nas mesmas espécies<sup>70,71</sup>. Análises de DNA tem sido o método de preferência na identificação de microrganismos, pois possuem maior especificidade e sensibilidade. Amostras de ECN não identificadas em nível de espécie ou identificadas erroneamente por testes fenotípicos convencionais podem ser corretamente identificadas através de técnicas genotípicas, tais como a hibridização DNA-DNA<sup>72</sup> e análise dos espaços intergênicos transcritos (ITS-PCR)<sup>73</sup>. O estudo da taxa de polimorfismos das regiões intergênicas transcritas (16S e 23S do rRNA) mostrou-se útil, tanto epidemiologicamente<sup>74,75</sup> quanto taxonomicamente<sup>68,69</sup>. Jensen et al.<sup>69</sup> amplificaram as regiões 16S e 23S do rRNA utilizando os primers G1 e L1 e provaram que a técnica descrita foi uma importante ferramenta na identificação dos 220 isolados de *Staphylococcus* estudados em seu trabalho. Vários trabalhos na literatura relatam a utilidade da técnica de ITS-PCR na identificação de estafilococos<sup>76,77,78</sup>.

Quanto à identificação bioquímica dos estafilococos coagulase negativa, algumas espécies são de difícil identificação, principalmente as que são raramente isoladas<sup>62,79</sup>. Kawamura et al.<sup>72</sup> reportaram 80 isolados identificados como *S. caprae* por hibridização DNA-DNA que inicialmente tinham sido erroneamente identificados como *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. hominis* e *S. epidermidis* através de métodos convencionais ou kits comerciais. Mesmo utilizando sistemas automatizados, erros podem ser cometidos quando da identificação de ECN, particularmente *S. hominis*<sup>80</sup>, ressaltando a importância de técnicas

moleculares para a correta identificação de espécies.

Couto et al.<sup>81</sup> aplicaram a técnica de ITS-PCR para identificar 600 amostras de estafilococos originárias de diferentes hospitais, usando como controle positivo linhagens de referência de 29 das 41 espécies reconhecidas no gênero *Staphylococcus*. As 29 espécies estafilocócicas apresentaram padrão singular de ITS-PCR. As espécies que apresentaram padrões de ITS-PCR relacionados foram agrupadas em três grupos: (i) o grupo *S. saprophyticus*, que compreende além do *S. saprophyticus*, mais seis espécies (*S. chromogenes*, *S. cohnii*, *S. equorum*, *S. gallinarum*, *S. lentus* e *S. xylosus*); (ii) o par *S. schleiferi* e *S. vitulus* e (iii) o par *S. carnosus* e *S. piscifermentans*. O ITS-PCR provou ser um método rápido e seguro para identificação de estafilococos de amostras clínicas, fornecendo alta confiança, reprodutibilidade e rapidez<sup>81</sup>.

Há divergências na literatura específica sobre o significado clínico da identificação de ECN; de acordo com os dados de alguns autores<sup>82</sup>, esse procedimento não é clinicamente significativo, embora outros pesquisadores<sup>83</sup> acreditem que essa identificação seja importante na diferenciação entre contaminação e infecção. A identificação dos ECN é de grande importância para a associação de certas espécies com infecções específicas<sup>46</sup>, tendo em vista que alguns dados sugerem que além de *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*, que têm sido considerados patogênicos, algumas espécies como o *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis* e o *S. schleiferi* estão mais associados às infecções do que outras espécies<sup>84,85</sup>.

Os ECN apresentam uma alta taxa de resistência aos agentes antimicrobianos, principalmente à oxacilina, onde em alguns estudos tem sido descrita em 80% dos isolados clínicos<sup>86</sup>. Além disso, essa resistência em ECN está frequentemente relacionada com resistência a outros antimicrobianos, particularmente aminoglicosídeos e macrolídeos<sup>87</sup>. Essas características possuem um impacto substancial nos cuidados com a saúde, afetando desfavoravelmente a morbidade e mortalidade dos pacientes<sup>88</sup>.

Muitos dos ECN possuem certo 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 beta-lactâmicos<sup>89</sup>.

A presença de estafilococos resistentes aos antimicrobianos pôde ser constatada logo após a introdução da penicilina na década de 1940. Já no final desta, com o uso contínuo deste antimicrobiano, ocorreu a seleção de cepas resistentes. Esta resistência é relacionada à produção de penicilinasas, enzimas codificadas geneticamente em plasmídeos que agem clivando o anel beta-lactâmico dos antibióticos tornando-os inativos<sup>90</sup>. O fenótipo mais frequente nos estafilococos inclui resistência à penicilina e à ampicilina e seus derivados. No entanto, esta beta-lactamase é inibida por antimicrobianos, como o ácido clavulânico, tazobactan e sulbactan<sup>90,91</sup>. Atualmente, a grande maioria dos estafilococos isolada, seja coagulase positivo ou coagulase negativo, é resistente à penicilina G, como também à penicilina V, ampicilina, amoxicilina e carbenicilina.

No final da década de 1950, os estafilococos adquiriram resistência a praticamente todos os antibióticos disponíveis, tais como a eritromicina, estreptomicina e tetraciclina. Assim, para combater as infecções estafilocócicas, surgiram as penicilinas semi-sintéticas antiestafilocócicas: a oxacilina em 1959 e a meticilina em 1960, as quais não são inativadas pelas beta-lactamases estafilocócicas. No entanto, em 1961, na Europa e posteriormente em outros países<sup>90</sup>, surgiram estafilococos resistentes a estas drogas, resistência esta que envolve a produção de uma nova proteína ligadora de penicilina (PBP: Penicillin Binding Protein), a PBP2a ou PBP2', que apresenta uma diminuição de sua afinidade à maioria dos antibióticos beta-lactâmicos. A PBP2a catalisa a transpeptidação e carboxipeptidação do peptidoglicano da parede celular bacteriana, assumindo as funções das PBPs normais dos estafilococos, quando a bactéria resistente se encontra na presença de antibióticos beta-lactâmicos<sup>90</sup>.

A produção de PBP2a, 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 outras PBPs e a hiperprodução de beta-lactamases<sup>88,92</sup>.

O gene que codifica a proteína PBP2a, o gene *mecA*, juntamente com seus genes reguladores, encontra-se em um elemento genético móvel, o cassete cromossômico estafilocócico chamado SCC*mec* (*staphylococcal cassette chromosome mec*)<sup>93</sup>, composto por dois elementos genéticos: *mec*, responsável pela resistência a meticilina, e o complexo *ccr*, responsável pela integração e excisão do cassete cromossômico no genoma da bactéria<sup>94,95</sup>.

O SCC*mec* é um elemento genético móvel que serve de veículo para troca de genes de resistência entre espécies de *Staphylococcus*, e está amplamente distribuído entre as espécies de ECN e *S. aureus*<sup>96,97,98,99</sup>.

Já foram descritos pelo menos oito tipos de SCC*mec* (IWG-SCC, 2009), que diferem entre si em relação ao número de genes que carregam e em sua arquitetura gênica<sup>100,101</sup>. Alguns destes tipos são carreadores de genes de resistência determinantes para múltiplos antimicrobianos, além dos beta-lactâmicos, os macrolídeos, lincosamidas, estreptograminas, aminoglicosídeos e tetraciclina, desta forma, quando uma célula bacteriana adquire este SCC*mec*, de uma única vez adquire um fenótipo de múltipla-resistência<sup>98,100</sup>.

Os tipos de SCC*mec* foram definidos através da combinação de duas partes: o complexo *ccr* e o complexo *mec*, com três genes *ccr* filogeneticamente distintos classificados como: *ccrA*, *ccrB* e *ccrC*, além disso, há cinco classes do complexo gene *mec* (classe A, B, C1, C2 e classe D)<sup>102,103</sup>. Os diferentes tipos de SCC*mec* são classificados como: SCC*mec* tipo I (complexo gene *mec* classe B e *ccrA1B1*), SCC*mec* tipo II (complexo gene *mec* classe A e *ccrA2B2*), SCC*mec* tipo III (complexo gene *mec* classe A e *ccrA3B3*), SCC*mec* tipo IV (complexo gene *mec* classe B e *ccrA2B2*), e SCC*mec* tipo V (complexo gene *mec* classe C2 e

*ccrC*), SCC*mec* tipo VI (complexo gene *mec* classe B e *ccrA4B4*), SCC*mec* tipo VII (complexo gene *mec* classe CI e *ccrC*) e SCC*mec* tipo VIII (complexo gene *mec* classe A e *ccrA4B4*). A região restante do SCC*mec* é chamada de região J (Joining region), constituída de componentes não essenciais do cassete que podem carrear determinantes de resistência antimicrobiana adicionais<sup>103,104</sup>.

As cepas com SCC*mec* tipo I, IV e V são geralmente mais sensíveis aos antibióticos em relação aos outros tipos de SCC*mec*, pois esses tipos não contêm genes de resistência, com exceção do *mecA*<sup>104</sup>. SCC*mec* tipo I, II e III causam principalmente infecções nosocomiais e são maiores que os tipos IV e V. O SCC*mec* tipo I tem um tamanho de 34,364 pb, é menor que os outros três tipos e não carrega nenhum transposon ou plasmídeo que confira resistência a outras drogas além da meticilina e metais pesados<sup>105</sup>. O segundo cassete, chamado SCC*mec* tipo II, possui 53,017 pb, carrega o gene *mecA* e *mecR1*, que conferem resistência a meticilina, e o transposon Tn554, responsável pela resistência a eritromicina e estreptomicina<sup>96,105</sup>.

O SCC*mec* tipo III é maior dos cinco tipos, tem um tamanho de 66,896 pb, carrega os genes *mecA* e *mecR1*, os transposons Tn554,  $\Psi$ Tn554 e o plasmídeo pT181, sendo que o transposon  $\Psi$ Tn554 confere resistência ao cádmio e o plasmídeo pT181 é responsável pela resistência a tetraciclina e mercúrio.

O SCC*mec* tipo IV é responsável principalmente por infecções adquiridas na comunidade, este elemento é menor e não carrega genes de resistência com exceção do gene *mecA*. Este cassete apresenta múltiplos subtipos, sugerindo que o SCC*mec* tipo IV seja altamente transmissível<sup>102</sup>.

Embora a resistência mediada pelo gene *mecA* seja encontrada intrinsecamente em todas as células de uma população resistente, o gene pode ser somente expresso em uma pequena porcentagem de células, prejudicando a interpretação do teste, fenômeno conhecido

como resistência heterogênea. A expressão do fenótipo de resistência intrínseca à meticilina tem sido classificada em quatro classes (classes 1 a 4), sendo a classe um a mais heterogênea e a classe quatro a mais homogênea<sup>106,107</sup>.

A resistência à meticilina tem sido descrita também em espécies que não carregam o gene *mecA*, chamado de resistência *borderline*. Dois mecanismos têm sido propostos para explicar este tipo de resistência: o primeiro envolve a inativação da oxacilina mediada pela hiperprodução de beta-lactamase tipo A que resulta na hidrólise parcial do anel beta-lactâmico, estas cepas são conhecidas como BORSA (*borderline oxacillin-resistant S. aureus*), e o segundo é chamado MODSA (*modified penicillin-binding protein S. aureus*), devido a produção de PBPs modificadas com baixa afinidade pela oxacilina<sup>107,108,109,110</sup>.

O aumento no número de infecções hospitalares causadas por ECN nos últimos anos e sua frequente resistência às penicilinas resistentes às penicilinases (meticilina 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<sup>88</sup>. Embora a maioria dos isolados de ECN clinicamente significantes apresente 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<sup>111</sup>.

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 profilática. 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<sup>88</sup>.

Outro importante mecanismo de resistência em estafilococos é a resistência induzida aos antimicrobianos pertencentes ao grupo MLS<sub>B</sub>: macrolídeos (eritromicina, claritromicina,

azitromicina); lincosamida (clindamicina, lincomicina); e estreptogramina B (quinupristina e pristinomicina). Essas classes são quimicamente distintas, mas apresentam mecanismos de ação similar e atuam na ligação do ribossomo e inibição da síntese protéica. Antibióticos do grupo MLS<sub>B</sub> são opções terapêuticas ao tratamento de infecções estafilocócicas em pele e tecidos moles, além de ser uma alternativa para pacientes alérgicos a penicilina<sup>107,112</sup>.

A resistência do *Staphylococcus aureus* ao grupo MLS<sub>B</sub> é conhecida desde 1956, logo após a introdução da eritromicina na prática terapêutica. A evolução da classe dos macrolídeos ocorreu a partir de 1990, com o desenvolvimento de moléculas semi-sintéticas que apresentavam melhora da farmacocinética e tolerabilidade. No entanto, o desenvolvimento crescente de resistência aos macrolídeos em diferentes níveis tem limitado o uso dessa classe de antibióticos<sup>107</sup>.

A resistência aos macrolídeos e lincosamidas ocorre devido a três mecanismos: modificações no alvo de ligação no ribossomo: codificado pelo gene *ermA* ou *ermC* (*erythromycin ribosomal methylase*), conferindo resistência cruzada aos macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B (resistência MLS<sub>B</sub>); efluxo ativo: codificado pelo gene *mrsA* (*specific methionine sulfoxide reductase*), conferindo resistência a eritromicina aos macrolídeos e estreptogramina B; ou inativação da droga. A resistência ao MLS<sub>B</sub> pode ser constitutiva ou induzível, dependendo da exposição aos macrolídeos. Na expressão constitutiva a resistência a eritromicina e clindamicina é detectada no antibiograma. A forma induzível pode apresentar resistência a eritromicina e falsa sensibilidade a clindamicina. A detecção da resistência induzida pode ser feita pelo D-teste, um teste de disco aproximação<sup>107,112</sup>.

Com a emergência de cepas de *Staphylococcus aureus*, estafilococos coagulase negativo e outros cocos Gram-positivos resistentes aos glicopeptídeos, novas classes de drogas como as oxazolidinonas, os lipopeptídeos e as estreptograminas surgiram como opção

terapêutica para o tratamento de infecções por bactérias Gram-positivas, incluídas as cepas multirresistentes<sup>90,113</sup>. Entretanto, o uso criterioso dessas novas classes é, no entanto, imperativo para preservar essas opções terapêuticas.

Considerando que a vancomicina tem sido amplamente utilizada, e muitas vezes de maneira indiscriminada, e que essa seja a maior causa do surgimento de isolados resistentes aos glicopeptídeos<sup>114,115</sup>, torna-se importante enfatizar a necessidade de realização dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos e identificação dos estafilococos meticilina/oxacilina resistentes o mais precocemente possível, para utilizar os agentes beta-lactâmicos quando estes apresentarem-se sensíveis, diminuindo, com isso, o uso desnecessário de glicopeptídeos<sup>116</sup>.

O aumento de populações de ECN com resistência heterogênea à oxacilina é uma das causas, da grande dificuldade para detecção destas cepas em laboratórios de análises clínicas<sup>117</sup>. O teste de disco-difusão é o método menos confiável para a detecção da resistência à oxacilina<sup>118</sup>, 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.<sup>119</sup>. Um dos pontos críticos para a utilização do teste de disco-difusão é atribuída à qualidade dos discos, sendo que, o uso de discos de melhor qualidade melhora os resultados e define uma melhor terapia antimicrobiana<sup>120</sup>.

Em 2004, o NCCLS<sup>121</sup> 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 concentração inibitória mínima (M7) do documento M100-S14. Estas alterações foram baseadas em um estudo realizado por Swenson & Tenover<sup>122</sup>, posteriormente publicado em 2005.

Em 2005, Frigatto et al.<sup>123</sup> mostraram 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.

Palazzo e Darini<sup>124</sup> relataram a importância do uso dos discos de cefoxitina em conjunto com o CIM para oxacilina, para reduzir erros na detecção de resistência a meticilina. Como o gene *mecA* está presente na maioria dos *Staphylococcus* resistentes a meticilina, ele pode ser considerado como o melhor método (padrão ouro) para prever resistência a oxacilina, embora discrepâncias tenham sido relatadas em alguns ECN<sup>122</sup>.

Considerando que o tratamento de infecções causadas por estafilococos depende da resistência a meticilina<sup>125</sup> e que ela é normalmente baseada nos testes de sensibilidade aos discos de oxacilina e cefoxitina, a inconsistência de resultados pode implicar em uma terapia inadequada. É importante ressaltar que as taxas de mortalidade são maiores entre os pacientes com bacteremia que receberam antibioticoterapia inadequada<sup>126</sup> e que uma falsa resistência contribui para o aumento dos custos, necessidade de realização de um maior número de culturas e uso desnecessário de antimicrobianos, como a vancomicina<sup>125</sup>.

A identificação de *Staphylococcus* spp. e a detecção de resistência à oxacilina mediada pelo gene *mecA* continua sendo um dos maiores problemas enfrentados pelos laboratórios de microbiologia clínica, necessitando de uma identificação e detecção rápida, confiável e de baixo custo. Este estudo tem como objetivos principais comparar diferentes métodos de identificação de *Staphylococcus* spp. isolados de pacientes com infecção do trato urinário e identificar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em amostras comunitárias e

hospitalares.

# *Objetivos*

---

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo Geral

Comparar três métodos fenotípicos de identificação e avaliar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em *Staphylococcus* spp. em amostras de urina de pacientes com infecção do trato urinário encaminhadas a Seção Técnica de Laboratórios e Análises Clínicas – Setor de Microbiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Correlacionar as espécies isoladas com o sexo, idade e procedência dos pacientes.
- Avaliar a utilização da prova de desoxirribonuclease (meio de DNase) para identificação de *Staphylococcus aureus* em amostras de urina, correlacionando com o teste da coagulase em tubo e o gene da coagulase (gene *coa*).
- Comparar três métodos de identificação fenotípica para estafilococos encontrados em amostras de urina: método simplificado de provas bioquímicas, prova de sensibilidade ao disco de novobiocina e sistema automatizado de identificação bacteriana Vitek I com a identificação genotípica através da técnica de ITS-PCR (Internal Transcribed Spacer-PCR).
- Determinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos através do método de disco-difusão em ágar (Kirby-Bauer), e a concentração inibitória mínima (CIM) aos antimicrobianos pelo método de E-teste® e pelo Vitek I.
- Detectar resistência induzida aos antimicrobianos pertencentes ao grupo MLS<sub>B</sub> (macrolídeos; lincosamidas e estreptogramina B) pelo método de disco aproximação (D-teste).
- Determinar a produção de beta-lactamase pelo disco de nitrocefina e pelo Vitek I.

- Pesquisar em todas as amostras a presença do gene *mecA*, e o tipo de SCC*mec* (*staphylococcal cassette chromosome mec*) nas amostras positivas.
- Comparar a detecção da resistência à oxacilina pelo método de difusão em ágar, utilizando-se discos de cefoxitina (30µg), oxacilina (1µg), E-test® e Vitek I.

## *Materials e métodos*

---

### **3. Materiais e métodos**

#### **3.1. Amostras**

Foram utilizadas no estudo 101 amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas da urina de diferentes pacientes. As amostras foram enviadas ao Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HC-FMB) no período de 10 de março a 14 de novembro de 2008, e eram procedentes de enfermarias, ambulatórios, pronto socorro e vários centros de saúde de Botucatu e região.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP (Of.-416/08-CEP) (Anexo A).

#### **3.2. Critérios de inclusão**

Foram incluídos indivíduos de ambos os sexos e de todas as idades, que tiveram uroculturas positivas para *Staphylococcus* spp., consideradas compatíveis com ITU, com contagem de colônias igual ou superior a 100.000 unidades formadoras de colônias por mililitro de urina ( $\geq 10^5$  UFC/mL) segundo os critérios de avaliação de Kass<sup>22</sup>.

#### **3.3. Critérios de exclusão**

Foram excluídas amostras coletadas de sonda vesical, punção suprapúbica, uroculturas positivas com contagem de colônias inferior a 100.000 unidades formadoras de colônias por mililitro de urina ( $< 10^5$  UFC/mL).

#### **3.4. Cálculo amostral**

A determinação do tamanho amostral foi calculada pela fórmula de Fisher & Belle<sup>127</sup>, utilizando-se um intervalo de confiança de 95,0% e uma precisão de 5,0% para a prevalência

esperada de pacientes com ITU, utilizando-se como base a proporção de pacientes com ITU causada por *Staphylococcus* spp. que foi de 5,0% em estudo realizado no Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HC-FMB).

Fórmula de Fisher & Belle:

$$N = \frac{Z^2 \alpha / 2 \cdot p \cdot q}{d^2}$$

Onde:

N= Tamanho amostral

$Z^2 \alpha / 2$  = Valor relativo à tabela de distribuição normal para intervalo de confiança de 95,0% = 1,96

p= Proporção de pacientes com ITU causada por *Staphylococcus* spp. = 5,0%

q= Proporção de pacientes sem ITU por *Staphylococcus* spp. = 95,0%

d= Precisão = 5,0%

$$N = \frac{1,96^2 \times 0,05 \times 0,95}{0,05^2}$$

N = 73 amostras

Apesar do cálculo amostral ter sido realizado, foram utilizadas todas as amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas no período de 10 de março a 14 de novembro de 2008, que estavam de acordo com critérios de inclusão e exclusão.

### 3.5. Coleta

Os pacientes foram orientados a coletar a urina de jato médio, com higiene prévia da região genital. Foi desprezado o primeiro jato e colhido o jato médio em frasco estéril apropriado sendo o restante da micção desprezado. Em crianças e recém-nascidos a amostra foi obtida com auxílio de saco coletor colocado de maneira asséptica. O coletor foi trocado a cada 45 minutos à 1 hora, repetindo a higiene para evitar contaminação fecal.

### **3.6. Transporte**

As amostras coletadas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina foram transportadas em temperatura ambiente (20 a 25°C) e processadas no máximo em até 1 hora. As amostras coletadas nos centros de saúde foram transportadas em caixas térmicas sob-refrigeração e processadas logo após a chegada ao laboratório.

### **3.7. Semeadura**

A urina foi homogeneizada e semeada com alça descartável (0,001 mL ou 1µL), sem centrifugação. A alça foi imersa na urina de forma vertical e a semeadura realizada através da técnica de esgotamento, utilizada para quantificação, sendo os resultados reportados em unidades formadoras de colônias por mililitro de urina (UFC/mL).

### **3.8. Isolamento primário**

As amostras foram semeadas em placas contendo meio de ágar Cled (Cysteine Lactose Electrolyte-Deficient Medium) e ágar MacConkey (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra). As placas foram incubadas em estufa por 18 a 24 horas, à temperatura de 35°C e após esse período foi realizado a contagem do número de colônias.

### **3.9. Identificação fenotípica dos estafilococos**

Os isolados foram semeados em ágar Sangue com 5,0% de sangue de carneiro (isolamento secundário) e corados pelo método do Gram, objetivando-se sua pureza e a observação de sua morfologia e coloração específica. Após a confirmação dessas características, as linhagens foram submetidas às provas de catalase, DNase e coagulase em tubo (padrão ouro), para distinção das espécies de *Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase negativa, conforme preconizado por Koneman et al.<sup>42</sup>.

### **3.9.a. Prova da catalase**

O teste foi realizado utilizando-se peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) sobre uma cultura de 24 horas em caldo BHI (brain-heart infusion) (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), sendo que a imediata produção de efervescência indica a conversão de  $H_2O_2$  em água e oxigênio gasoso<sup>42</sup>.

### **3.9.b. Prova da bacitracina e furazolidona**

O gênero *Staphylococcus* foi diferenciado de *Micrococcus*, com base na prova de resistência à bacitracina (0,04 U) (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), indicada pela ausência de halo de inibição, ou formação de halo de até 9 mm, e pela sensibilidade à furazolidona (100  $\mu$ g) (Cecom, São Paulo, Brasil), caracterizada por halos de inibição >15 mm de diâmetro<sup>128</sup>.

### **3.9.c. Prova da coagulase em tubo**

A coagulase detectada por esse método é secretada extracelularmente (coagulase livre) e reage com uma substância presente no plasma denominado “fator de reação com coagulase (CRF)” para formar um complexo que, por sua vez, reage com o fibrinogênio, formando fibrina (formação de coágulos)<sup>42</sup>.

Foi colocado 0,5 mL de uma cultura “overnight” de *Staphylococcus* spp. em caldo BHI, em um tubo contendo 0,25 mL de plasma de coelho. Os tubos foram incubados a 35°C, e as leituras realizadas com 1, 4 e 24 horas.

### **3.9.d. Prova de desoxirribonuclease (meio de DNase)**

A prova da desoxirribonuclease tem elevada correlação com a produção da coagulase, sendo que *S. aureus* produz DNase e endonuclease termoestável, ambas as enzimas hidrolisam ácido nucleico (DNA)<sup>42</sup>.

Foi utilizado ágar DNase com verde de metila (Difco, Sparks, USA), onde foi

realizado um inóculo denso de forma circular. A placa foi incubada por 24 horas a 35 °C e a prova foi considerada positiva quando ocorreu a formação de um halo claro ao redor do crescimento bacteriano onde o DNA foi degradado.

Foram utilizados como controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591) e controle negativo (*S. epidermidis* ATCC 35983).

### **3.9.1. Identificação de *Staphylococcus aureus***

Os estafilococos coagulase positiva, além das provas descritas anteriormente foram submetidos à prova de fermentação da trealose, para diferenciar as espécies de *Staphylococcus aureus* de *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*<sup>65</sup>.

Para identificação com aparelho de automação Vitek I (Biomérieux, Durham, USA) os resultados das provas de catalase e coagulase foram informadas por marcações externas realizadas nos cartões de identificação.

### **3.9.2. Identificação de estafilococos coagulase negativa**

Os estafilococos coagulase negativa foram identificados através do método simplificado de provas bioquímicas descritas por Cunha et al.<sup>65</sup>, o qual é dividido em duas etapas. Durante a primeira etapa foram realizadas as provas de fermentação da xylose, sacarose, trealose, maltose, manitol, produção de hemolisinas e crescimento anaeróbico em tioglicolato. As provas realizadas na segunda etapa variam de acordo com os resultados obtidos na primeira etapa e incluem produção de urease, redução de nitrato, fermentação da  $\beta$ -D-frutose, descarboxilação da ornitina e resistência à novobiocina.

Além da identificação pelo método simplificado as amostras foram identificadas pelo aparelho de automação Vitek I. O cartão GPI (Identificação de Gram-Positivo) contém 30 poços, dos quais 29 poços contêm substratos onde são realizadas as provas de: sensibilidade à

bacitracina, sensibilidade à optoquina, tolerância ao cloreto de sódio a 6,0%, tolerância à bile 10,0%, tolerância à bile 40,0%, hidrólise da esculina, arginina, uréia, tetrazólio vermelho, sensibilidade à novobiocina, hemicelulase, dextrose, lactose, manitol, rafinose, salicina, sorbitol, sacarose, trealose, arabinose, piruvato, pululano, inulina, melibiose, celobiose, ribose, xilose, base de peptona e um caldo de controle negativo.

Um swab de algodão estéril foi utilizado para colher colônias recentes (24 horas) da placa de ágar Sangue (5,0%) para preparação de uma suspensão padronizada de acordo com a escala 0,5 de MacFarland (zona vermelha no colorímetro Vitek I), utilizando 1,8 mL de solução salina estéril (0,45% a 0,5%) em tubo de ensaio 12 x 75 mm, descartável, transparente e estéril. O cartão de identificação foi acoplado ao tubo, na seção de apoio de tubo do suporte de enchimento e levado até a câmara de vácuo do aparelho, onde o cartão foi preenchido.

A prova de catalase foi informada pela marcação externa realizada nos cartões de identificação, sendo então selados e colocados no suporte do Leitor/Incubadora Vitek I onde foram realizadas as leituras. O software analisa e guarda automaticamente os testes bioquímicos liberando os resultados após um período de incubação de 2 a 15 horas.

Foi realizada ainda uma identificação presuntiva de *Staphylococcus saprophyticus* com base na resistência à novobiocina (5 µg) (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) e ausência de hemólise. O resultado foi considerado resistente quando foram observados halos de até 12 mm ou ausência de halo, e amostras sensíveis apresentaram halos >16 mm<sup>42</sup>. As amostras resistentes foram identificadas como *Staphylococcus saprophyticus* e as sensíveis foram consideradas como espécies de *Staphylococcus epidermidis*<sup>129</sup>.

### **3.10. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco-difusão**

Foram avaliados o perfil de sensibilidade e o percentual de resistência aos

antimicrobianos para oxacilina 1 µg, cefoxitina 30 µg, cefalotina 30 µg, gentamicina 10 µg, linezolida 30 µg, norfloxacin 10 µg, penicilina G 10 UN, sulfametoxazol/trimetoprim 25 µg, vancomicina 30 µg, nitrofurantoina 300 µg, amoxicilina/ácido clavulânico 30 µg, eritromicina 15 µg e clindamicina 2 µg (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), conforme critérios recomendados pelo CLSI<sup>130</sup> 2008 (Anexo B).

Para o preparo dos inóculos foi utilizada uma suspensão direta das colônias (cultura pura com até 24 horas) em solução salina a 0,9% (Fresenius Kabi, Aquiraz, Brasil), equivalente à solução padrão de turbidez da escala 0,5 de MacFarland. Após homogeneização desta suspensão foi realizada a semeadura introduzindo um swab estéril que foi comprimido na parede interna do tubo para retirada do excesso do inóculo e semeado em quatro direções diferentes na superfície do ágar Mueller-Hinton (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra). As placas foram deixadas por 5 a 15 minutos, a temperatura ambiente, para que o inóculo fosse completamente absorvido pelo ágar antes de aplicar os discos. As placas foram incubadas em estufa por 24 horas, à temperatura de 35°C, sendo os halos de inibição aferidos após este período. Para todos os estafilococos a leitura dos halos de oxacilina, vancomicina e linezolida foi realizada com o uso de luz transmitida (placa vista de contraluz) para verificar crescimento de colônias dentro dos halos de inibição (heteroresistência), sendo que para os demais antimicrobianos as leituras foram realizadas usando luz refletida.

### **3.11. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) aos antimicrobianos pelo método de E-teste<sup>®</sup>**

A concentração inibitória mínima (CIM) dos isolados de *S. aureus* e estafilococos coagulase negativa foi determinada por tiras de E-test<sup>®</sup> (AB Biodisk, Solna, Suécia) para os seguintes antimicrobianos e intervalo de CIM em µg/mL respectivamente: penicilina G (0,002 a 32), eritromicina (0,016 a 256), clindamicina (0,016 a 256), oxacilina (0,016 a 256),

linezolida (0,016 a 256) e vancomicina (0,016 a 256).

O E-test<sup>®</sup> é um método quantitativo usado para avaliar a sensibilidade de microrganismos aos antimicrobianos. Consiste de uma fita de plástico inerte, transparente, medindo 5,5 mm de largura por 60 mm de comprimento. De um lado da fita está impressa uma escala da CIM em  $\mu\text{g/mL}$ , e do outro lado existe um gradiente exponencial do antimicrobiano, seco e estabilizado. A concentração varia de 0,016 a 256  $\mu\text{g/mL}$  ou 0,002 a 32  $\mu\text{g/mL}$ , dependendo do antimicrobiano distribuído ao longo da fita<sup>24</sup>.

O preparo dos inóculos, semeadura e a incubação foram os mesmos descritos para o método de disco-difusão. A leitura foi realizada pela verificação, na escala da parte anterior da fita, do valor correspondente à intersecção da zona de elipse de inibição do crescimento bacteriano. Os resultados do estudo das CIMs das diversas drogas foram expressos por meio de: CIM<sub>50%</sub> (Concentração de droga necessária para inibição de 50,0% da população bacteriana); CIM<sub>90%</sub> (Concentração necessária para inibição de 90,0% da população bacteriana); a faixa de variação das CIMs e proporção de amostras sensíveis a cada droga foi determinada, segundo CLSI<sup>130</sup> 2008 (Anexo B).

### **3.12. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) aos antimicrobianos pelo sistema Vitek I**

O cartão GPS (sensibilidade de Gram-Positivo) foi concebido para ser utilizado em simultâneo com o cartão GPI num modo interativo. Os cartões foram inoculados com a mesma suspensão do microrganismo e assinalados com números de amostra e marcações de reação a catalase e coagulase idênticos.

O Vitek I obtém o resultado da CIM utilizando os dados do crescimento a partir do cartão GPS e a identificação do microrganismo do cartão GPI.

Os princípios do cartão GPS, adaptado a uma técnica automatizada, baseiam-se na

técnica de microdiluição da concentração inibitória mínima relatada por Maclowry & Marsh<sup>131</sup> e Gerlach<sup>132</sup>. O cartão é essencialmente uma versão miniaturizada e abreviada da técnica de dupla diluição para as CIM determinadas pelo método de microdiluição<sup>133</sup>.

O cartão GPS contém 45 poços, sendo que o poço de controle positivo determina a forma como o microrganismo se desenvolve sem inibição bacteriana.

Cada um dos poços restantes contém alíquotas, o equivalente a porções pré-medidas e pesadas individualmente, de um agente antimicrobiano específico combinado com meios de cultura microbiológicos.

O cartão GPS realiza para estafilococos os testes dos seguintes antimicrobianos e intervalo de CIM em µg/mL, respectivamente: ampicilina ( $\leq 0,12$  a  $\geq 16$ ), cefazolina ( $\leq 8$  a  $\geq 32$ ), ciprofloxacina ( $\leq 0,5$  a  $\geq 4$ ), clindamicina ( $\leq 0,5$  a  $\geq 8$ ), eritomicina ( $\leq 0,5$  a  $\geq 8$ ), gentamicina ( $\leq 2$  a  $\geq 16$ ), linezolidina ( $\leq 2$  a  $\geq 16$ ), oxacilina ( $\leq 0,25$  a  $\geq 8$ ), penicilina G ( $\leq 0,003$  a  $\geq 16$ ), rifampicina ( $\leq 0,25$  a  $\geq 4$ ), tetraciclina ( $\leq 1$  a  $\geq 16$ ) e vancomicina ( $\leq 0,5$  a  $\geq 32$ ).

O software determina a altura na qual um poço demonstra crescimento (positivo), com base na atenuação da luz, que é medida pelo leitor óptico de acordo com a alteração na turbidez e cor dos poços.

### **3.13. Testes para detecção de resistência à oxacilina**

Foram utilizados discos de oxacilina 1 µg e cefoxitina 30 µg (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) para predizer a resistência a oxacilina mediada pelo gene *mecA*. O diâmetro da zona de inibição foi interpretado de acordo com CLSI<sup>130</sup>, documento M100-S18 (2008) (Anexo B), considerando como ponto de corte para *Staphylococcus aureus* e *S. lugdunensis* um diâmetro  $\leq 12$  mm para oxacilina e  $\leq 21$  mm para cefoxitina.

Para estafilococos coagulase-negativa exceto *S. lugdunensis* foi considerado como

ponto de corte  $\leq 17$  mm para oxacilina e  $\leq 24$  mm para cefoxitina.

### **3.14. Detecção da resistência induzida ao grupo MLS<sub>B</sub> (macrolídeos; lincosamidas e estreptogramina B)**

Este teste foi realizado pela colocação do disco de eritromicina próximo ao disco de clindamicina (15 mm a 26 mm) na placa de antibiograma, e com a difusão da eritromicina através do ágar a resistência à clindamicina é induzida, resultando em um achatamento da zona de inibição, adjacente ao disco de eritromicina, com a forma da letra D (efeito D).

O resultado foi interpretado como negativo quando o halo de inibição ao redor do disco de clindamicina foi circular, e positivo quando o halo de inibição ao redor do disco de clindamicina sofreu um achatamento<sup>107</sup>.

### **3.15. Teste para detecção da produção de beta-lactamase pelo disco de nitrocefim**

A produção de beta-lactamase foi detectada pelo uso de discos impregnados com nitrocefim (cefalosporina cromogênica) (Becton Dickinson, Sparks, USA). O teste é baseado na liberação de um radical cromogênico, que ocasiona uma mudança de cor quando o anel beta-lactâmico é rompido pela ação da beta-lactamase.

O disco foi umedecido com uma a duas gotas de água destilada estéril e depositado próximo à fita de E-test® de oxacilina, sobre uma cultura previamente incubadas por 24 horas, à temperatura de 35°C em placa de ágar Mueller-Hinton. Os discos foram analisados após cinco minutos, e a reação positiva foi evidenciada pelo desenvolvimento de uma coloração vermelha, e a negativa, pela não alteração de cor. Para as linhagens beta-lactamases negativas, a reação foi reexaminada após uma hora, conforme recomendações do fabricante.

Foram utilizados como controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591) e controle negativo (*S. xyloso* ATCC 29979).

### 3.16. Teste para detecção da produção de beta-lactamase pelo Vitek I

A determinação da produção de beta-lactamase pelo Vitek I foi realizada com o cartão GPS-652 inoculado conforme descrito no ítem 3.12. Quando uma penicilina entra em contato com uma bactéria produtora de beta-lactamase, ela será degradada e a beta-lactamase irá romper o anel beta-lactâmico presente na estrutura das penicilinas, assim as bactérias poderão crescer no poço do cartão do Vitek I que contém penicilina.

Em estafilococos, a resistência é induzida, por isso, para revelar a presença da enzima é utilizado um indutor (oxacilina) em baixa concentração (0,03 µg/mL) no poço contendo penicilina (1,15 µg/mL). Em outro poço, temos somente à penicilina em baixa concentração (0,03 µg/mL), porque, se a produção de penicilinase for baixa, pode acontecer um resultado de falsa sensibilidade, se a concentração da droga for muito alta.

O Vitek I mede a taxa de crescimento nos dois poços: se a taxa de crescimento é superior a 45,0% no primeiro, o teste de beta-lactamase foi positivo; se o limite não for atingido, o aparelho irá avaliar o próximo poço para confirmação, se a taxa de crescimento for superior a 55,0% o teste de beta-lactamase é considerado positivo.

Quando o limite não foi alcançado em nenhum dos poços, o teste de beta-lactamase foi considerado negativo.

### 3.17. Teste para detecção de hiperprodução de beta-lactamase

As amostras foram testadas com um disco de amoxicilina/ácido clavulânico 30 µg (20 µg amoxicilina e 10 µg de ácido clavulânico), sendo que o ponto de corte para sensibilidade foi a formação de um halo de inibição  $\geq 20$  mm após 24 horas de incubação a 35°C<sup>134</sup>.

Foram consideradas hiperprodutoras de beta-lactamase as amostras que foram *mecA* negativas, sensíveis ao disco de amoxicilina/ácido clavulânico, resistentes a oxacilina e/ou cefoxitina e beta-lactamase positiva em ambos os métodos utilizados (Vitek I e disco de

nitrocefina).

### 3.18. Extração do ácido nucleico

O ácido nucleico total foi extraído a partir de linhagens de *Staphylococcus* cultivadas em ágar sangue e inoculadas individualmente em caldo BHI e incubadas a 37°C por 24 horas.

A extração foi realizada com o Kit Illustra (GE Healthcare, Chalfont, Inglaterra) que consiste na digestão inicial das células de estafilococos com lisozima (10 mg/mL) e proteinase K (20 mg/mL). A seguir 500 µL da solução de extração foi adicionada à mistura e centrifugada a 5.000 x g por um minuto. Em seguida o sobrenadante foi transferido para a coluna e centrifugado a 5.000 x g por um minuto. O líquido coletado foi descartado e 500 µL de solução de extração foi adicionado novamente à coluna. Após a centrifugação e descarte do líquido coletado, 500 µL da solução de lavagem foi adicionada à coluna e esta submetida à centrifugação a 14.000 x rpm por três minutos. A seguir, a coluna foi transferida para um tubo de 1,5 mL onde foram adicionados 200 µL de água Milli Q aquecida a 70°C que foi utilizada para a eluição. As amostras foram centrifugadas a 5000 x g por um minuto, e a coluna desprezada. O DNA extraído foi guardado sob-refrigeração a -20°C.

### 3.19. Identificação genotípica de *Staphylococcus* spp.

As amostras de *Staphylococcus* spp. foram submetidas à identificação genotípica usando *primers* de sequências conservadas adjacentes aos genes 16S e 23S. Este método descrito por Barry et al.<sup>68</sup> e Couto et al.<sup>81</sup> é conhecido como ITS-PCR (Internal Transcribed Spacer-PCR).

A técnica foi realizada conforme descrito por Couto et al.<sup>81</sup> usando os *primers* G1 (5'-GAAGTCGTAACAAGG) e L1 (5'-CAAGGCATCCACCGT). A amplificação foi constituída de uma etapa de desnaturação a 94°C por quatro minutos e 25 ciclos de amplificação,

sendo cada um desses com um minuto a 94°C, dois minutos de rampa a 55°C, sete minutos a 55°C, dois minutos de rampa a 72°C, dois minutos a 72°C, seguidos por uma etapa de extensão adicional de sete minutos a 72°C<sup>81</sup>. Para controle dos resultados, foram utilizadas as seguintes linhagens de referência internacional: *S. auricularis* (ATCC 33753), *S. capitis* subsp. *capitis* (ATCC 27843), *S. capitis* subsp. *urealyticus* (ATCC 49325), *S. caprae* (ATCC 35538), *S. cohnii* (ATCC 49330), *S. cohnii* subsp. *cohnii* (ATCC 29974), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *S. epidermidis* (ATCC 35983), *S. haemolyticus* (ATCC 29970), *S. hominis* (ATCC 27844), *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* (ATCC 700237), *S. lentus* (ATCC 700403), *S. lugdunensis* (ATCC 700328), *S. saprophyticus* (ATCC 15305), *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* (ATCC 43808), *S. sciuri* subsp. *sciuri* (ATCC 29062), *S. simulans* (ATCC 27851), *S. xyloso* (ATCC 29979), *S. warneri* (ATCC 10209) e *S. aureus* (ATCC 29213).

A eficiência das ampliações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose metagen 3,0% (Agargen, Madri, Espanha) preparado em tampão 1,0 X TBE e corado com SYBR<sup>®</sup> Safe (Invitrogen, Eugene, USA). O tamanho dos produtos amplificados foi comparado com o padrão de 100 pb (Norgen, Thorold, Canada) e posteriormente fotografados sob transiluminação UV.

### **3.20. Detecção do gene *mecA* pelo método da reação em cadeia de polimerase (PCR)**

As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 mL em volumes totais de 25 µL contendo 10 pM de cada *primer* (*mecA1*: 5 AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG e *mecA2*: 5 AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG), 10 U de Taq polimerase, 100 µM de desoxiribonucleotídeos trifosfatados, 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> e 5 µL da amostra. A incubação foi realizada em termociclador PTC-100<sup>™</sup> (MJ Research, Watertown, USA), empregando os parâmetros descritos por Murakami et al.<sup>135</sup>, que consistem de: 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos *primers* a 55,5°C por 30

segundos e extensão a 72°C por um minuto. Após completar os 40 ciclos, os tubos foram incubados a 72°C por cinco minutos antes de resfriar à 4°C. O resultado positivo foi indicado pela observação da presença de fragmentos de DNA de 533 bp. Em todas as reações realizadas foram utilizadas linhagens de referência para *mecA* positivo (*S. aureus* ATCC 33591) e negativo (*S. aureus* ATCC 25923).

A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose Ultrapure™ 1,5% (Invitrogen, Carlsbad, USA) preparado em tampão 1,0 X TBE e corado com SYBR® Safe. O tamanho dos produtos amplificados foi comparado com o padrão de 100 bp e posteriormente fotografados sob transiluminação ultravioleta.

### **3.21. Detecção do gene *coa* pelo método da reação em cadeia de polimerase (PCR)**

Para a reação de amplificação, foi adicionado 1 µL da amostra de DNA em 49 µL da mistura de reação contendo MgCl<sub>2</sub> 4 mM, 200 µM de cada dNTP, 15 pM de cada *primer* (*coa1*: 5 GTA GAT TGG GCA ATT ACA TTT TGG AGG 3 e *coa2*: 5 CGC ATC AGC TTT GTT ATC CCA TGT A 3) e 1 U de Taq DNA polimerase.

A amplificação foi realizada em termociclador PTC-100™, empregando os parâmetros descritos por Kearns et al.<sup>136</sup>, que consistiram de: um minuto a 94°C, seguido por 15 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 68°C e 30 segundos a 72°C. Após, seguiram-se mais 20 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C e 30 segundos a 72°C, e uma extensão adicional de dois minutos a 72°C. O resultado positivo foi indicado pela observação da presença de fragmentos de DNA de 117 bp. Como controles foram utilizados linhagens de referência para *coa* positivo (*S. aureus* ATCC 29213) e negativo (*S. epidermidis* ATCC 35983).

A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose Ultrapure™ 3,0% preparado em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5 X. Como

padrão foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 bp. O DNA foi corado com SYBR<sup>®</sup> Safe e posteriormente fotografados sob transiluminação ultravioleta.

### **3.22. Determinação do tipo de SCCmec (*staphylococcal cassette chromosome mec*) para *S. aureus***

A determinação do tipo de SCCmec foi realizada utilizando-se o método de reação de PCR Multiplex, conforme descrito por Oliveira & de Lencastre<sup>137</sup> e atualizado por Milheiriço et al.<sup>138</sup>.

Foram utilizados 10 pares de *primers* descritos na Tabela 1, selecionados com base nas sequências do elemento *mec* descritas previamente por Ito et al.,<sup>96</sup> e Oliveira et al.,<sup>114</sup>.

Como controle para a tipagem do SCCmec foram utilizadas as cepas COL para SCCmec tipo I; N315 para SCCmec tipo IA; PER34 para o SCCmec tipo II; AN546 para o SCCmec tipo III; HU25 para o SCCmec tipo IIIA e MW2 para o SCCmec tipo IV.

Para a reação de amplificação foi utilizada a seguinte mistura: tampão de reação da Taq 1 U, 200 µM de cada dNTP, 400 nM dos primers CIF2 F2, CIF2 R2, MECI P2, MECI P3, RIF5 F10, RIF5 R13, PUB110 R1 e PT181 R1, 800 nM dos primers DCS F2, DCS R2, MECA P4, MECA P7 e IS431 P4, 200 nM dos primers KDP F1, KDP R1, RIF4 F3, RIF4 R9, 1,25 U de Taq polimerase e 20 ng de DNA. A amplificação foi realizada em termociclador PTC-100<sup>TM</sup>, empregando os parâmetros descritos por Oliveira e de Lencastre<sup>137</sup>, que consistiram de: quatro minutos a 94°C, seguidos por 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 53°C e um minuto a 72°C. O programa finalizou com uma extensão adicional de quatro minutos a 72°C.

Tabela 1. Oligonucleotídeos para a detecção do cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) em *Staphylococcus aureus*.

Primer	Sequência de nucleotídeos 5'a 3'	SCC <i>mec</i> /R <sup>(a)</sup>	TPA <sup>(b)</sup>
dcs F2 dcs R1	5' – CATCCTATGATAGCTTGGTC – 3' 5' – CTAAATCATAGCCATGACCG – 3'	I, II, IV e VI, região J3	342
<i>mecA</i> P4 <i>mecA</i> P7	5' – TCCAGATTACAACCTTCACCAGG – 3' 5' – CCACTTCATATCTTGTAACG – 3'	Controle interno positivo	162
cif2 F2 cif2 R2	5' – TTCGAGTTGCTGGATGAAGAAGG – 3' 5' – ATTTACCACAAGGACTACCAGC – 3'	I, região J1	495
<i>mecI</i> P2 <i>mecI</i> P3	5' – ATCAAGACTTGCATTCAGGC – 3' 5' – GCGGTTTCAATTCACCTTGTC – 3'	II e III, complexo <i>mec</i>	209
rif5 F10 rif5 R13	5' – TTCTTAAGTACACGCTGAATCG – 3' 5' – GTCACAGTAATTCCATCAATGC – 3'	III, região J3	414
ccrC F2 ccrC R2	5' - GTACTCGTTACAATGTTTGG – 3' 5' – ATAATGGCTTCATGCTTACC – 3'	V, complexo ccr	449
kdp F1 kdp R1	5' – AATCATCTGCCATTGGTGATGC – 3' 5' – CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG – 3'	II, região J1	284
SCC <i>mec</i> V J1 F SCC <i>mec</i> V J1 R	5' - TTCTCCATTCTTGTTTCATCC – 3' 5' – AGAGACTACTGACTTAAGTGG – 3'	V, região J1	377
ccrB2 F2 ccrB2 R2	5' – AGTTTCTCAGAATTCGAACG – 3' 5' – CCGATATAGAAWGGGTTAGC – 3'	II and IV, complexo ccr	311
SCC <i>mec</i> III J1 F SCC <i>mec</i> III J1 R	5' – CATTGTGAAACACAGTACG – 3' 5' – GTTATTGAGACTCCTAAAGC – 3'	III, região J1	243

a: Tipo de SCC*mec*/região; b: Tamanho do produto amplificado.

Fonte: Oliveira & de Lencastre<sup>137</sup>; Milheiro et al.<sup>138</sup>.

A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose Ultrapure<sup>TM</sup> 2,0% preparado em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5 X. Como padrão foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 bp. O DNA foi corado com SYBR<sup>®</sup> Safe e posteriormente fotografado sob transiluminação ultravioleta.

### 3.23. Determinação do tipo de SCC*mec* (*staphylococcal cassette chromosome mec*) para estafilococos coagulase negativa

A determinação do tipo de *SCCmec* foi realizada utilizando o método de reação PCR Multiplex com quatro pares de primers para o locus A, B, D e E, descritos na Tabela 2 (Oliveira & de Lencastre<sup>137</sup>; modificado por Machado et al.<sup>139</sup>).

Para a reação de amplificação foi utilizada a seguinte mistura: tampão de reação 1 X, 1,25U Taq polimerase, 200 µM de cada dNTP, 10 pM dos *primers* CIF2 F2, CIF2 R2, 6 pM dos primers KDP F1 e KDP R1 e 5 pM dos primers RIF4 F3 e RIF4 R9 e 10 µL do DNA extraído. A amplificação foi realizada em termociclador PTC-100<sup>TM</sup>, empregando os parâmetros descritos por Oliveira & de Lencastre<sup>137</sup> modificados por Machado et al.<sup>139</sup>, que consistiram de: três minutos a 92°C, seguidos por 30 ciclos de um minuto a 92°C, um minuto a 56°C e 1,5 minutos a 72°C.

A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose Ultrapure<sup>TM</sup> 2,0% preparado em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5 X. Como padrão foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 bp. O DNA foi corado com SYBR<sup>®</sup> Safe e posteriormente fotografados sob transiluminação ultravioleta.

Tabela 2. Oligonucleotídeos para a detecção do cassete cromossômico estafilocócico *mec* (*SCCmec*) em estafilococos coagulase negativa.

Primer	Sequência de nucleotídeos 5'a 3'	<i>SCCmec</i> /R <sup>(a)</sup>	TPA <sup>(b)</sup>
CIF2 F2 CIF2 R2	5' – TTCGAGTTGCTGGATGAAGAAGG – 3' 5' – ATTTACCACAAGGACTACCAGC – 3'	I, região J1	495
KDP F1 KDP R1	5' – AATCATCTGCCATTGGTGATGC – 3' 5' – CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG – 3'	II, região J1	284
DCS F2 DCS R1	5' – CATCCTATGATAGCTTGGTC – 3' 5' – CTAAATCATAGCCATGACCG – 3'	I, II, IV região J3	342
RIF4 F3 RIF4 R9	5' – GTGATTGTTTCGAGATATGTGG – 3' 5' – CGCTTTATCTGTATCTATCGC – 3'	III região J3	414

a: Tipo de *SCCmec*/região; b: Tamanho do produto amplificado.  
Fonte: Oliveira & de Lencastre<sup>137</sup>; Machado et al.<sup>139</sup>.

### 3.24. Análise estatística

Para avaliação da acurácia das provas de coagulase e DNase, dos métodos fenotípicos de identificação para *Staphylococcus* spp. (disco de novobiocina, método simplificado de provas bioquímicas e sistema Vitek I) e dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos (disco-difusão, E-test® e Vitek I) foram aplicados testes para a avaliação da sensibilidade e especificidade segundo Fletcher et al.<sup>140</sup>, utilizando a pesquisa do gene *coa*, o ITS-PCR e a detecção do gene *mecA* como padrão ouro, respectivamente.

# *Resultados*

---

## 4. Resultados

### 4.1. Procedência das amostras encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia do HC-FMB.

Das 101 amostras de estafilococos estudadas, 50 (49,6%) eram de pacientes dos Centros de Saúde de Botucatu e região, 30 (29,7%) de pacientes ambulatoriais, 17 (16,8%) de enfermaria e 4 (3,9%) foram atendidos no Pronto Socorro (Figura 1).

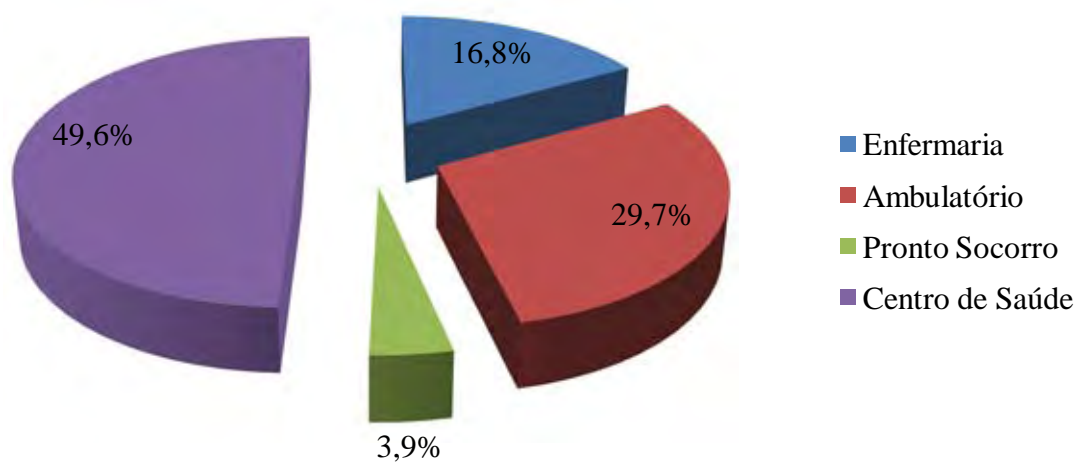


Figura 1. Procedência das amostras encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia do HC-FMB.

A Tabela 3 demonstra a correlação entre as espécies isoladas e a procedência das amostras, enfatizando que 54 (94,8%) das 57 amostras de *S. saprophyticus* eram de pacientes não hospitalizados, e dos 17 *S. aureus* isolados somente 4 (23,5%) eram procedentes de enfermaria.

Tabela 3. Correlação entre as espécies isoladas e a procedência das amostras.

Espécies	Procedência									
	Total		Enfermaria		Ambulatório		C S <sup>(a)</sup>		P S <sup>(b)</sup>	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>S. saprophyticus</i>	57	56,4	3	5,2	16	28,1	35	61,5	3	5,2
<i>S. aureus</i>	17	16,9	4	23,5	6	35,3	7	41,1	0	0,0
<i>S. epidermidis</i>	16	15,9	7	43,8	4	25,0	4	25,0	1	6,2
<i>S. haemolyticus</i>	8	7,9	2	25,0	3	37,5	3	37,5	0	0,0
<i>S. warneri</i>	2	1,9	0	0,0	1	50,0	1	50,0	0	0,0
<i>S. lugdunensis</i>	1	1,0	1	100	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Total	101	100	17	16,8	30	29,7	50	49,6	4	3,9

a: Centro de Saúde; b: Pronto Socorro

#### 4.2. Idade e sexo dos pacientes com infecção do trato urinário.

Analisando a idade e sexo dos pacientes, 27 (26,8%) eram do sexo masculino e 74 (73,2%) do feminino, sendo que 56 (55,4%) das mulheres tinham entre 15 e 44 anos de idade e 13 (48,1%) dos homens tinham mais de 55 anos (Tabela 4).

Tabela 4. Idade e sexo dos pacientes com infecção do trato urinário.

Idade (anos)	Masculino	Feminino	Total (%)
< 1	2	3	5 (4,9)
1 a 4	1	6	7 (6,9)
15 a 30	1	38	39 (38,6)
31 a 44	5	18	23 (22,8)
45 a 54	5	6	11 (10,9)
> 55	13	3	16 (15,9)
Total (%)	27 (26,8)	74 (73,2)	101 (100)

### 4.3. Comparação entre a prova de DNase, teste da coagulase em tubo e gene da coagulase (gene *coa*).

Entre as 101 amostras estudadas, todos os 17 *S. aureus* foram positivos para coagulase, DNase (Figura 2) e gene *coa* (Figura 3), entretanto, dos 84 isolados de ECN dois apresentaram DNase positiva, porém foram negativos para coagulase e gene *coa*, sendo que as 82 amostras restantes foram negativas para coagulase, DNase e gene *coa* (Tabela 5). A prova da DNase apresentou uma sensibilidade de 100,0% e especificidade de 97,6% e a coagulase obteve valores iguais ao método genotípico de referência (gene *coa*) com sensibilidade e especificidade de 100,0% e taxas de concordância de 98,0% para DNase e 100,0% para coagulase (Tabela 6).

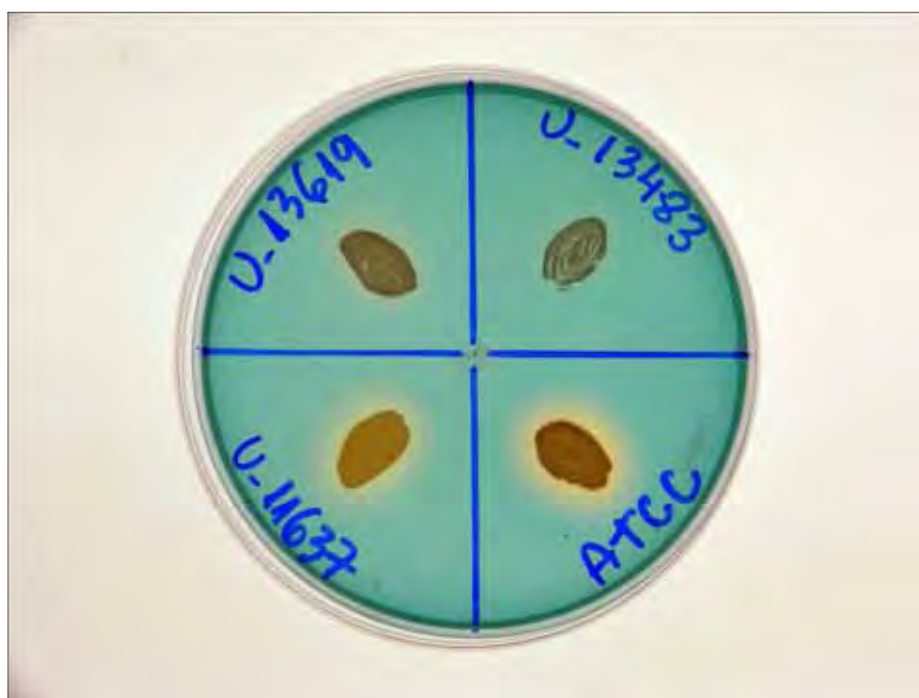


Figura 2. Placa de ágar DNase com verde de metila. Amostra U-13619: *S. warneri*; U-13483: *S. epidermidis*; U-11637: *S. aureus*; Controle positivo: *S. aureus* ATCC 25923.



Figura 3. Eletroforese em gel de agarose para pesquisa do gene *coa* (117 bp) pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Canaleta 1: marcador de peso molecular (100bp); 3, 6, 7 e 16: amostras positivas; 2, 4, 5 e 8 ao 15: amostras negativas; 17: Controle positivo; *S. aureus* ATCC 29213; 18: Controle negativo; *S. epidermidis* ATCC 35983; 19: H<sub>2</sub>O.

Tabela 5. Comparação dos testes de coagulase e DNase com a presença do gene *coa*.

Espécies	DNase +	DNase -	Coagulase +	Coagulase -	Gene <i>coa</i> +	Gene <i>coa</i> -
<i>S. aureus</i>	17	0	17	0	17	0
ECN <sup>(a)</sup>	2	82	0	84	0	84
Total	19	82	17	84	17	84

a: Estafilococos coagulase negativa.

Tabela 6. Teste de concordância e acurácia para os métodos de DNase e coagulase.

Teste de Acurácia	Métodos	
	DNase	Coagulase
Sensibilidade (%)	100,0	100,0
Especificidade (%)	97,6	100,0
VPP <sup>(a)</sup> (%)	89,4	100,0
VPN <sup>(b)</sup> (%)	100,0	100,0
Concordância (%)	98,0	100,0

a: valor preditivo positivo; b: valor preditivo negativo.

#### 4.4. Identificação fenotípica e genotípica dos *Staphylococcus* spp.

Em relação à identificação, utilizando-se o disco de novobiocina foram identificados 57 *S. saprophyticus* e 27 *S. epidermidis*, o método simplificado de provas bioquímicas identificou 57 isolados como *S. saprophyticus* (Figura 4), 15 *S. epidermidis*, sete *S. haemolyticus*, quatro *S. warneri* e um *S. lugdunensis*, enquanto o Vitek I identificou 48 *S. saprophyticus*, 12 *S. epidermidis*, nove *S. haemolyticus* e quatro *S. warneri* (Figura 5). Pelo ITS-PCR (Figura 6) foram identificados 57 *S. saprophyticus*, 16 *S. epidermidis*, oito *S. haemolyticus*, dois *S. warneri* e um *S. lugdunensis*, entretanto seis amostras de *S. auricularis*, quatro de *S. simulans* e um *S. xylosus* foram identificadas somente pelo Vitek I. Os 17 *S. aureus* encontrados foram identificados por todos os métodos (Tabela 7).

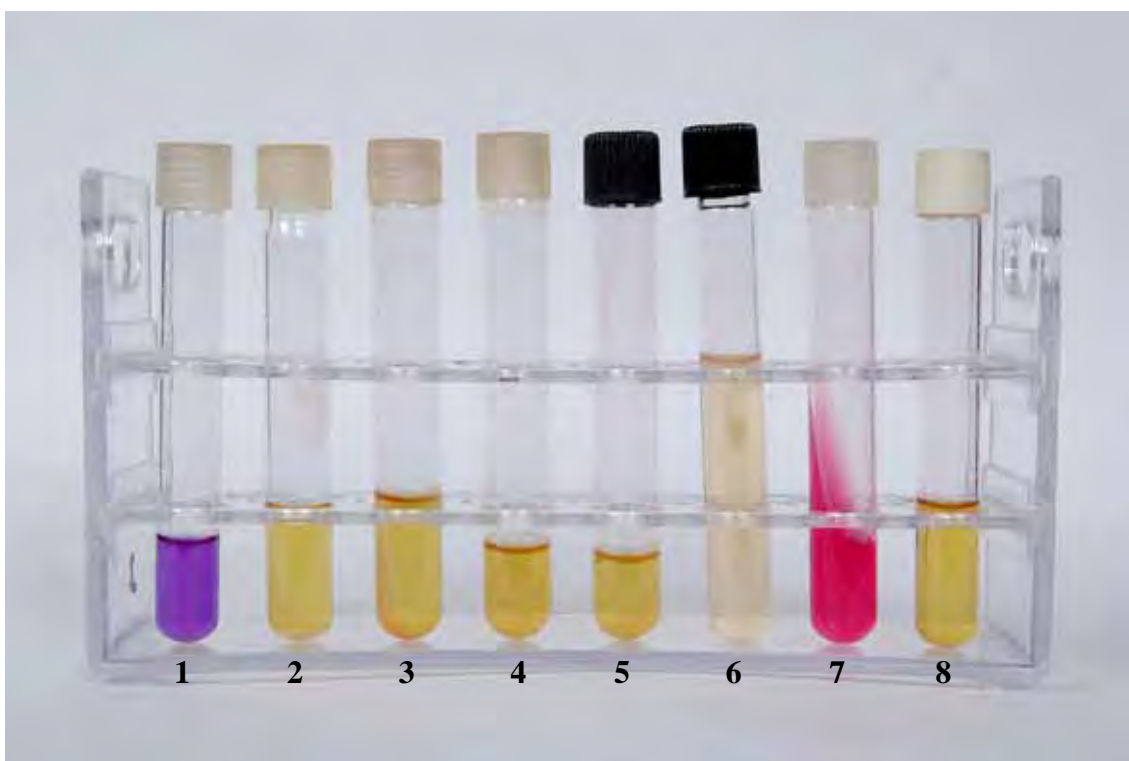


Figura 4. Amostra da espécie *S. saprophyticus* identificada pelo método bioquímico através da fermentação dos açúcares: (1) xilose negativa, (2) sacarose, (3) trealose, (4) maltose, (5) manitol e (8) frutose positivos, (6) crescimento anaeróbico em meio tioglicolato e (7) urease positivos.



Figura 5. Cartão de identificação para Gram positivo (GPI) do Vitek I

Tabela 7. Comparação dos métodos de identificação.

Espécies	Métodos de identificação							
	Novobiocina		Vitek I		Simplificado		ITS-PCR	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>S. saprophyticus</i>	57	56,4	48	47,6	57	56,4	57	56,4
<i>S. aureus</i>	17	16,9	17	16,9	17	16,9	17	16,9
<i>S. epidermidis</i>	27	26,7	12	11,9	15	14,9	16	15,9
<i>S. haemolyticus</i>	0	0,0	9	8,9	7	6,9	8	7,9
<i>S. auricularis</i>	0	0,0	6	5,9	0	0,0	0	0,0
<i>S. simulans</i>	0	0,0	4	3,9	0	0,0	0	0,0
<i>S. warneri</i>	0	0,0	4	3,9	4	3,9	2	1,9
<i>S. lugdunensis</i>	0	0,0	0	0,0	1	1,0	1	1,0
<i>S. xylosus</i>	0	0,0	1	1,0	0	0,0	0	0,0
Total	101	100	101	100	101	100	101	100

A principal falha na identificação dos *S. saprophyticus* pelo Vitek I foi a não detecção da resistência à novobiocina, que ocorreu em seis dos nove isolados, seguido do teste de arginina positivo (cinco isolados), sendo que quatro isolados apresentaram ambas as provas discordantes. Os cinco *S. epidermidis* identificados como *S. auricularis* pelo Vitek I foram sacarose negativos, e os dois *S. warneri* tiveram prova da urease negativa. Em relação às duas espécies identificadas erroneamente pelo método simplificado de provas bioquímicas, o *S. haemolyticus* apresentou resultado incorreto para prova de urease e o *S. epidermidis* para prova da trealose (Tabela 8).

Tabela 8. Avaliação das provas bioquímicas que falharam na identificação das espécies.

Nº	ITS-PCR	Método Simplificado		Sistema Vitek I	
	Identificação	Identificação	Prov. incor.	Identificação	Prov. incor.
1	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	-	<i>S. warneri</i>	Arg +; Rib +
1	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	-	<i>S. warneri</i>	Arg +; Nov S
1	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	-	<i>S. warneri</i>	Rib +
1	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	-	<i>S. warneri</i>	Nov S
2	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	-	<i>S. simulans</i>	Arg +; Nov S
1	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	-	<i>S. simulans</i>	Nov S
1	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	-	<i>S. xylosus</i>	Xil +
1	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	-	<i>S. haemolyticus</i>	Arg +; Nov S; Ara +
4	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	-	<i>S. auricularis</i>	Sac -
1	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	-	<i>S. simulans</i>	Man +; Tre +
1	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. warneri</i>	Tre +	<i>S. auricularis</i>	Sac -
1	<i>S. warneri</i>	<i>S. warneri</i>	-	<i>S. haemolyticus</i>	Ure -
1	<i>S. warneri</i>	<i>S. warneri</i>	-	<i>S. auricularis</i>	Ure -
1	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. warneri</i>	Ure +	<i>S. epidermidis</i>	Ure +; Arg -; Tre -
1	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. lugdunensis</i>	-	<i>S. epidermidis</i>	Lac -; Tre -

+ : positivo; - : negativo; S: sensível; Prov. incor.: provas incorretas; Arg: arginina; Rib: ribose; Nov: novobiocina; Xil: xilose; Ara: arabinose; Sac: sacarose; Man: manitol; Tre: trealose; Ure: urease; Lac: lactose. Os resultados das provas bioquímicas foram comparadas as tabelas de identificação descritas por Koneman et al., 2001.

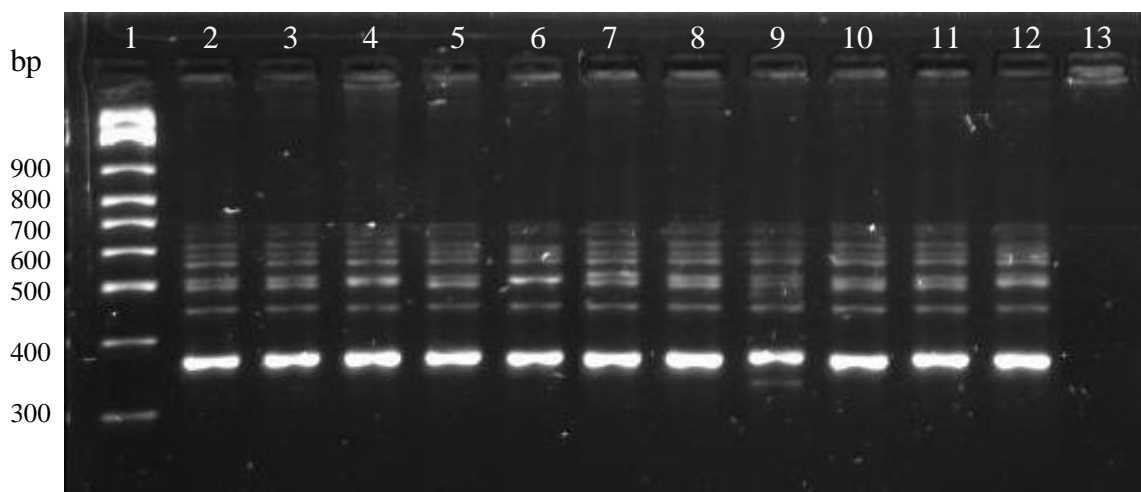


Figura 6. ITS-PCR (Internal Transcribed Spacer-PCR) para identificação genotípica das espécies de *Staphylococcus* spp. Canaleta 1: marcador de peso molecular (100bp); 2: *S. saprophyticus* ATCC 15305; 3 ao 12: isolados de *S. saprophyticus*; 13: controle negativo (H<sub>2</sub>O).

Em relação à comparação da sensibilidade e especificidade entre os métodos de identificação para todas as espécies estudadas, o disco de novobiocina obteve sensibilidade de 89,1% e especificidade de 89,1%, sendo que para Vitek I a sensibilidade e especificidade foram de 81,2% e 92,0% respectivamente, e para o método simplificado de provas bioquímicas a sensibilidade e especificidade foram de 98,0% (Tabela 9).

As Tabelas 10, 11 e 12 apresentam os resultados dos testes de concordância entre os métodos de identificação fenotípica e o ITS-PCR.

Tabela 9. Comparação da sensibilidade e especificidade entre os métodos com ITS-PCR.

Espécies	Sensibilidade (%)			Especificidade (%)		
	Novobiocina	Vitek I	Simplificado	Novobiocina	Vitek I	Simplificado
<i>S.aureus</i>	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
<i>S.epidermidis</i>	100,0	62,5	93,7	87,0	97,6	100,0
<i>S. warneri</i>	0,0	0,0	100,0	0,0	95,9	97,9
<i>S. haemolyticus</i>	0,0	87,5	87,5	0,0	97,8	100,0
<i>S. lugdunensis</i>	0,0	0,0	100,0	0,0	100,0	100,0
<i>S. saprophyticus</i>	100,0	84,2	100,0	100,0	100,0	100,0
Total (%)	89,1	81,2	98,0	89,1	92,0	98,0

Tabela 10. Taxa de concordância entre o ITS-PCR e o disco de novobiocina.

Novobiocina	ITS-PCR						Total
	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S. warneri</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. saprophyticus</i>	
<i>S.aureus</i>	17	0	0	0	0	0	17
<i>S.epidermidis</i>	0	16	2	8	1	0	27
<i>S. saprophyticus</i>	0	0	0	0	0	57	57
Total	17	16	2	8	1	57	101
Concordância	100,0%	100,0%	0%	0%	0%	100,0%	89,1%

Tabela 11. Taxa de concordância entre o ITS-PCR e o sistema Vitek I.

Vitek I	ITS-PCR						Total
	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S. warneri</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. saprophyticus</i>	
<i>S.aureus</i>	17	0	0	0	0	0	17
<i>S.epidermidis</i>	0	10	0	1	1	0	12
<i>S. warneri</i>	0	0	0	0	0	4	4
<i>S. haemolyticus</i>	0	0	1	7	0	1	9
<i>S. lugdunensis</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. saprophyticus</i>	0	0	0	0	0	48	48
<i>S. auricularis</i>	0	5	1	0	0	0	6
<i>S. simulans</i>	0	1	0	0	0	3	4
<i>S. xylosum</i>	0	0	0	0	0	1	1
Total	17	16	2	8	1	57	101
Concordância	100,0%	62,5%	0%	87,5%	0%	84,2%	81,2%

Tabela 12. Taxa de concordância entre o ITS-PCR e o método simplificado de provas bioquímicas.

Simplificado	ITS-PCR						Total
	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S. warneri</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. saprophyticus</i>	
<i>S.aureus</i>	17	0	0	0	0	0	17
<i>S.epidermidis</i>	0	15	0	0	0	0	15
<i>S. warneri</i>	0	1	2	1	0	0	4
<i>S. haemolyticus</i>	0	0	0	7	0	0	7
<i>S. lugdunensis</i>	0	0	0	0	1	0	1
<i>S. saprophyticus</i>	0	0	0	0	0	57	57
Total	17	16	2	8	1	57	101
Concordância	100,0%	93,7%	100,0%	87,5%	100%	100,0%	98,0%

#### 4.5. Determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos através do método de disco-difusão em ágar (Kirby-Bauer).

Considerando o total de cepas estudadas, o maior percentual de resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus* spp. foi à Oxacilina (76,2%) seguido da Penicilina (72,2%). Todas as amostras foram sensíveis à vancomicina, linezolida e nitrofurantoina (Figura 7).

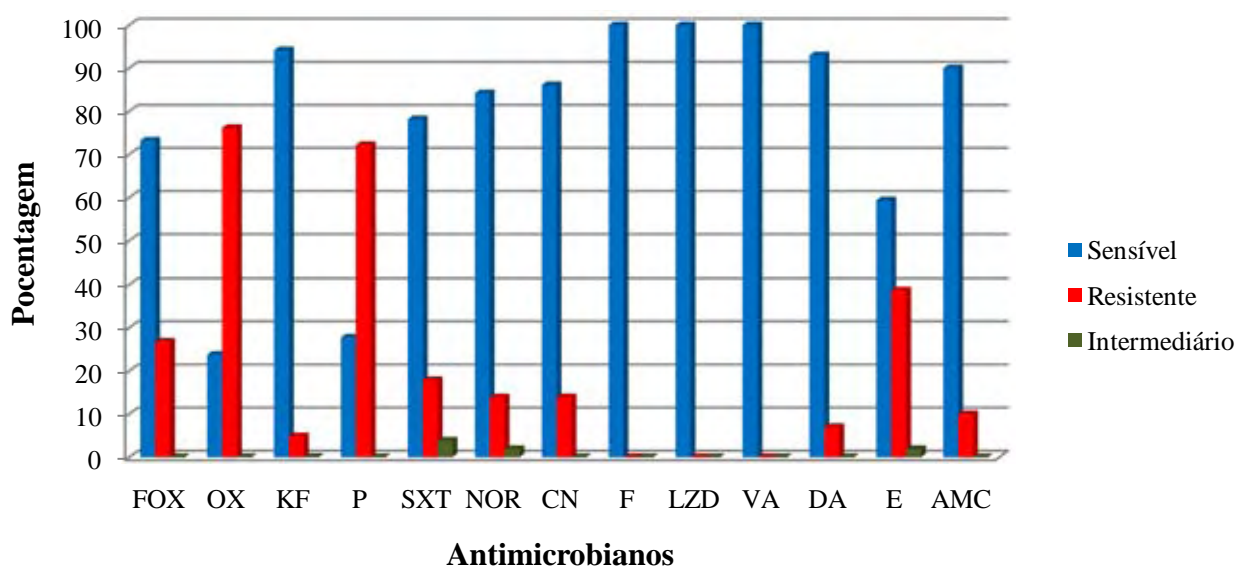


Figura 7. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco-difusão em *Staphylococcus* spp. Antimicrobianos: FOX (cefoxitina), OX (oxacilina), KF (cefalotina), P (penicilina), SXT (sulfametoxazol/trimetoprin), NOR (norfloxacina), CN (gentamicina), F (nitrofurantoina), LZD (linezolida), VA (vancomicina), DA (clindamicina), E (eritromicina) e AMC (amoxicilina/ácido clavulânico).

Os percentuais de resistência aos antimicrobianos em *S. saprophyticus* foram: oxacilina 98,2%, penicilina 63,2%, eritromicina 31,6%, sulfametoxazol/trimetoprin 12,3%, cefoxitina 12,2%, gentamicina e clindamicina 1,8%. Foram encontrados também 5,3% das amostras com resultado intermediário para sulfametoxazol/trimetoprin. Todas as amostras foram sensíveis à cefalotina, amoxicilina/ácido clavulânico, norfloxacina, vancomicina, linezolida e nitrofurantoina (Figuras 8 e 9).

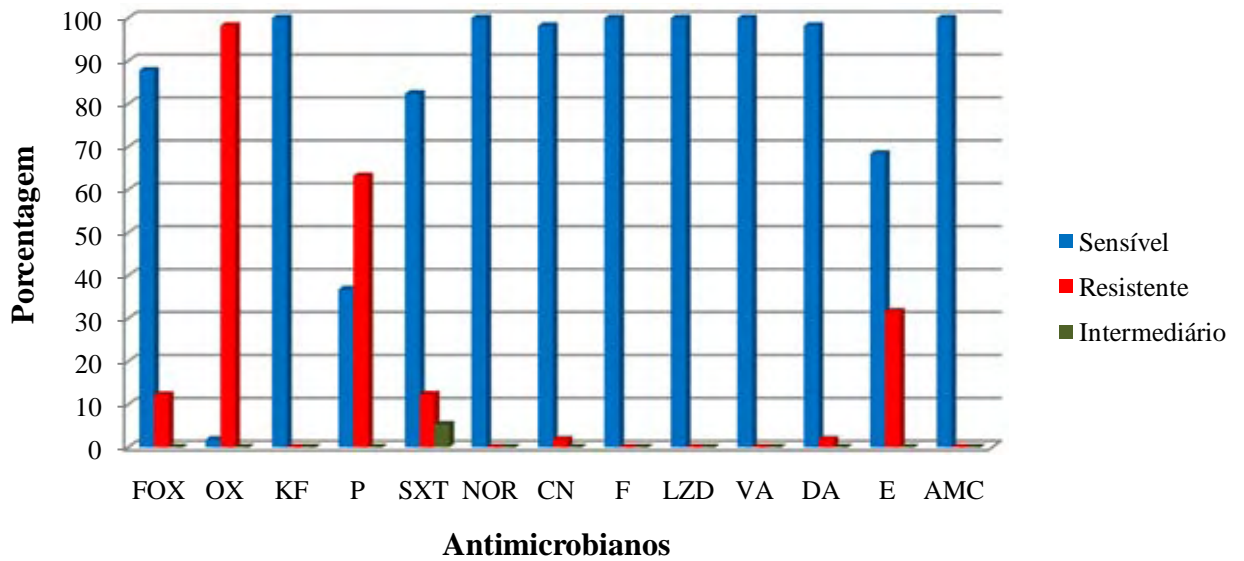


Figura 8. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco-difusão em *S. saprophyticus*. Antimicrobianos: FOX (cefoxitina), OX (oxacilina), KF (cefalotina), P (penicilina), SXT (sulfametoxazol/trimetoprin), NOR (norfloxacina), CN (gentamicina), F (nitrofurantoina), LZD (linezolida), VA (vancomicina), DA (clindamicina), E (eritromicina) e AMC (amoxicilina/ácido clavulânico).

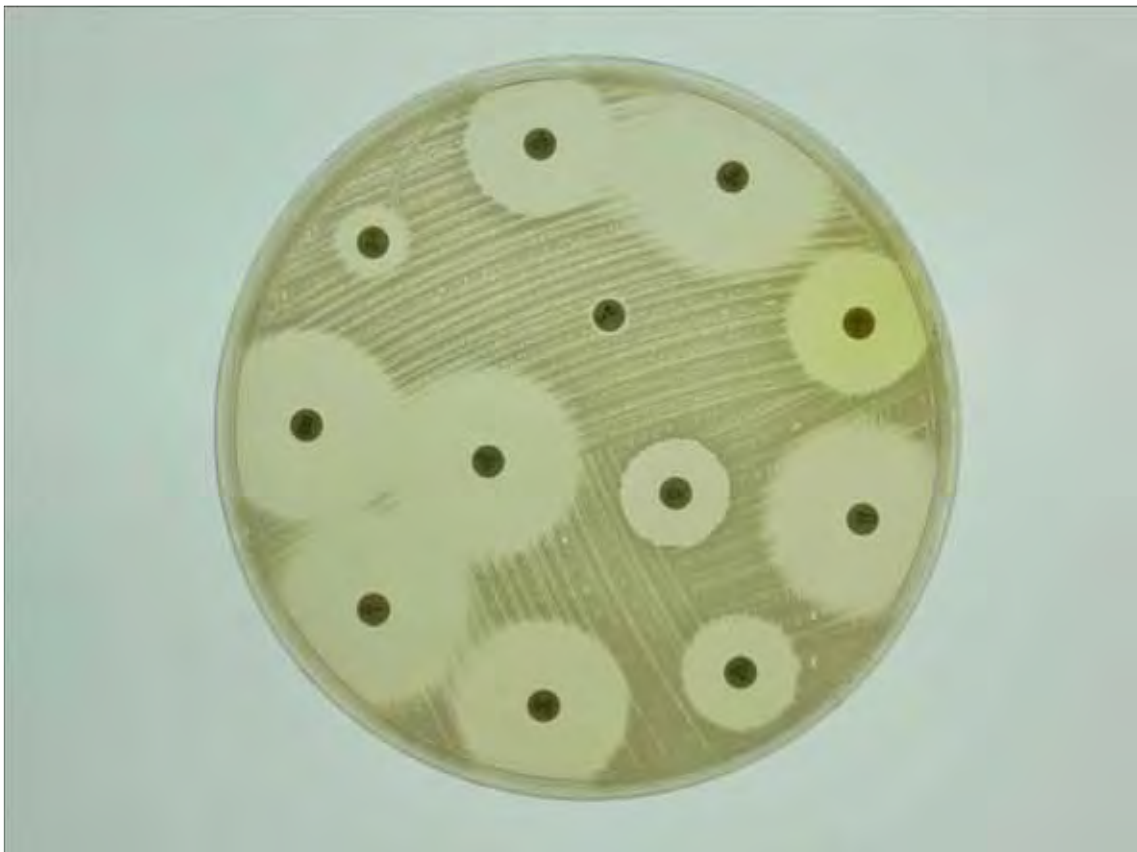


Figura 9. Amostra de *S. saprophyticus* resistente apenas a novobiocina e oxacilina, mostrando sensibilidade a todos os demais antimicrobianos testados.

Em relação à Figura 10 os percentuais de resistência aos antimicrobianos em *S. aureus* foram: penicilina 82,4%, eritromicina 53,0%, cefoxitina e amoxicilina/ácido clavulânico 29,4%, oxacilina, cefalotina, norfloxacina e clindamicina 23,5%, gentamicina e sulfametoxazol/trimetoprin 11,8%. Foram encontrados também 5,9% das amostras com resultado intermediário para norfloxacina e 11,8% para eritromicina. Todas as amostras foram sensíveis à vancomicina, linezolida e nitrofurantoina (Figuras 11).

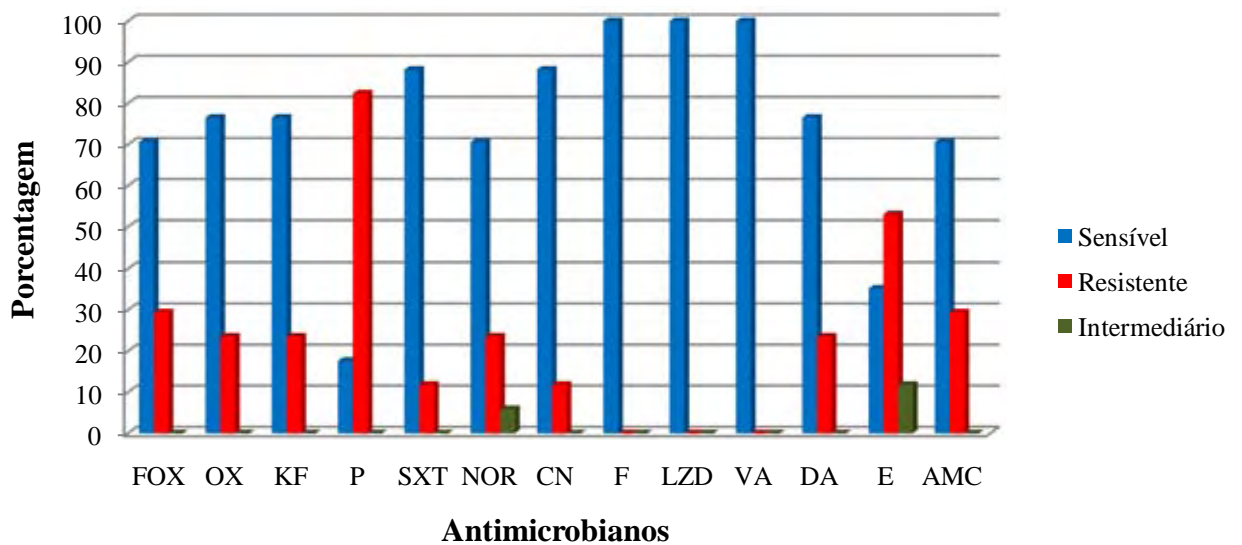


Figura 10. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco-difusão em *S. aureus*. Antimicrobianos: FOX (cefoxitina), OX (oxacilina), KF (cefalotina), P (penicilina), SXT (sulfametoxazol/trimetoprin), NOR (norfloxacina), CN (gentamicina), F (nitrofurantoina), LZD (linezolida), VA (vancomicina), DA (clindamicina), E (eritromicina) e AMC (amoxicilina/ácido clavulânico).



Figura 11. Amostra de *S. aureus* multirresistente, mostrando sensibilidade apenas à vancomicina, linezolida, e nitrofurantoina e resistência a todos os demais antimicrobianos testados, os outros dois discos sensíveis são novobiocina e furazolidona utilizados para identificação.

#### 4.6. Determinação do gene *mecA* e classificação do SCC*mec*

Dentre as 101 amostras estudadas foram encontrados 18 estafilococos *mecA* positivos (Figura 12 e Tabela 14), sendo seis *S. epidermidis*, dos quais três possuíam SCC*mec* tipo III e três do tipo IV; quatro *S. aureus*, dois do tipo III e dois do tipo II (Figuras 13 e 14); cinco *S. haemolyticus*, dois do tipo II e três não tipáveis, um *S. warneri* do tipo III e dois *S. saprophyticus*, ambos do tipo IV (Tabela 13 e Figura 13).

Dos *S. aureus mecA* positivos quatro foram isolados de pacientes de enfermaria, dois possuíam o SCC*mec* tipo II, e tinham o mesmo perfil de sensibilidade, e os outros dois carregavam o SCC*mec* tipo III, e também possuíam o mesmo perfil (Tabela 14). Dois isolados de *S. haemolyticus* carregavam o SCC*mec* tipo II, sendo um de paciente de enfermaria e outro de ambulatório; três *S. epidermidis* com SCC*mec* tipo III, sendo um de paciente de

ambulatório e dois de enfermaria; um *S. warneri* do tipo III de um paciente ambulatorial, e três *S. epidermidis* com SCCmec tipo IV, sendo um de paciente do pronto socorro, um do centro de saúde e um de ambulatório (Tabela 14).

Foram encontrados ainda dois *S. saprophyticus* com SCCmec tipo IV, isolados de pacientes dos centros de saúde, sendo que ambos possuíam o mesmo perfil de sensibilidade (Tabela 14).

A comparação dos testes para detecção da resistência à oxacilina revelou que, dos 18 estafilococos *mecA* positivos, 15 (83,3%) foram resistentes aos discos de cefoxitina e oxacilina concomitantemente, dois foram sensíveis a cefoxitina e resistente a oxacilina (*S. saprophyticus*) e um foi sensível a ambos os discos (*S. epidermidis*). Dos 57 *S. saprophyticus* estudados, 7 (12,2%) foram resistentes ao disco de cefoxitina e nenhum apresentou o gene *mecA*, enquanto 56 (98,2%) demonstraram resistência ao disco de oxacilina e somente 2 (3,5%) apresentaram o gene *mecA* (Tabela 15).

Tabela 13. Determinação pela técnica da PCR do tipo de SCCmec (*staphylococcal cassette chromosome mec*) dos estafilococos.

SCCmec	Total	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. warneri</i>	<i>S. haemolyticus</i>
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Tipo II	4 (22,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (11,1)	0 (0,0)	2 (11,1)
Tipo III	6 (33,3)	0 (0,0)	3 (16,7)	2 (11,1)	1 (5,5)	0 (0,0)
Tipo IV	5 (27,8)	2 (11,1)	3 (16,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Não tipável	3 (16,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (16,7)
Total	18 (100)	2 (11,1)	6 (33,4)	4 (22,2)	1 (5,5)	5 (27,8)

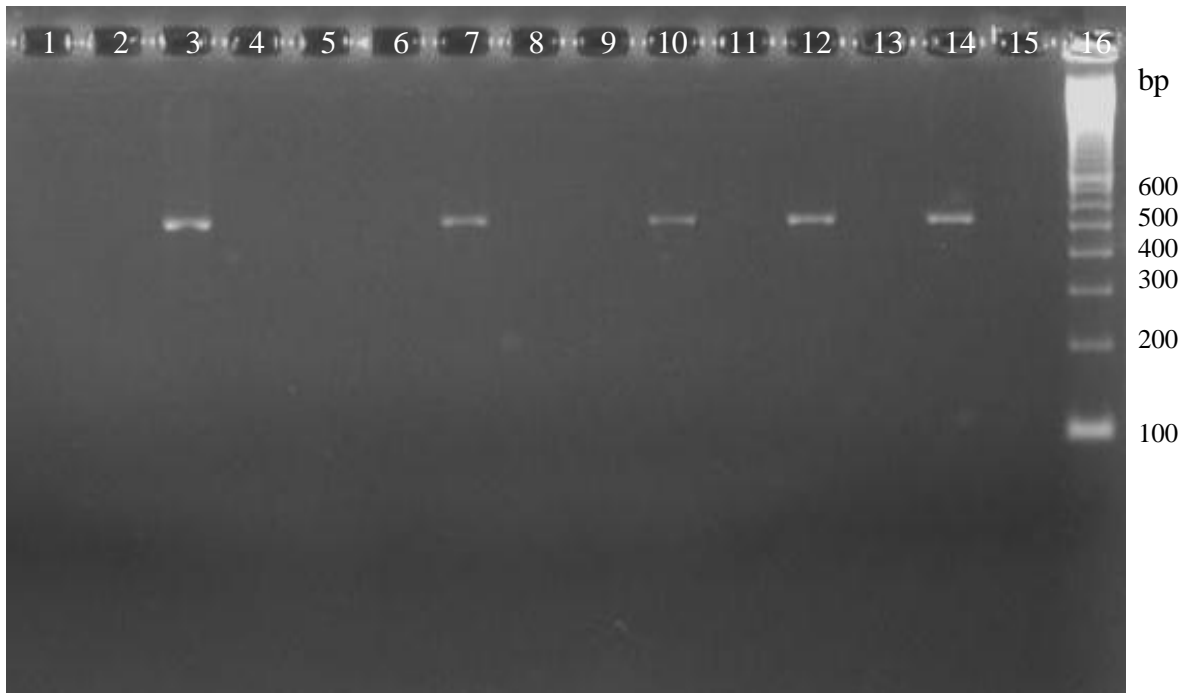


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose para pesquisa do gene *mecA* (533 bp) pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Canaleta 3, 7, 10 e 12: amostras positivas; 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9 e 11: amostras negativas; 13: Controle negativo *S. aureus* ATCC 29213; 14: Controle positivo *S. aureus* ATCC 33591; 15: H<sub>2</sub>O e 16: marcador de peso molecular (100bp).

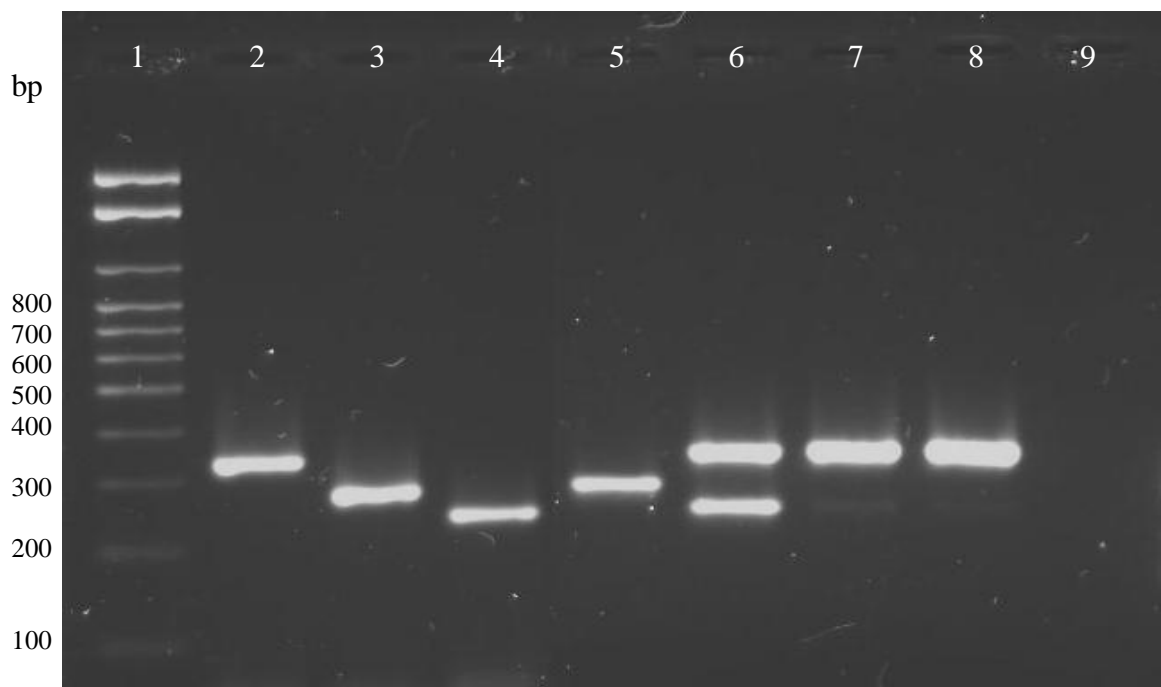


Figura 13. PCR multiplex para detecção do tipo de SCCmec para estafilococos coagulase negativa. Canaleta 1: marcador de peso molecular (100bp); 2: *S. saprophyticus* apresentando SCCmec tipo IV; 3: *S. epidermidis* SCCmec tipo III; 4: amostra não tipável (*S. haemolyticus*); 5: *S. warneri* SCCmec tipo III; 6: *S. haemolyticus* SCCmec tipo II; 7 e 8: *S. epidermidis* SCCmec tipo IV; 9: controle negativo (H<sub>2</sub>O).

Tabela 14. Tipo de SCCmec, perfil de sensibilidade pelo método de disco-difusão e origem dos isolados de estafilococos.

Tipo de SCCmec	Espécies	Antimicrobianos														Local	N
		FOX	OX	KF	P	SXT	NOR	CN	F	LZD	VA	DA	E	AMC			
II	<i>S. aureus</i>	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	ENF <sup>(a)</sup>	2	
	<i>S. haemolyticus</i>	R	R	I	R	S	R	R	S	S	S	R	R	R	AMB <sup>(b)</sup>	1	
	<i>S. haemolyticus</i>	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	ENF	1	
III	<i>S. aureus</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	ENF	2	
	<i>S. epidermidis</i>	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	AMB	1	
	<i>S. epidermidis</i>	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	ENF	1	
IV	<i>S. epidermidis</i>	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	ENF	1	
	<i>S. warneri</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	AMB	1	
	<i>S. saprophyticus</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	CS <sup>(c)</sup>	2	
Não Tipável	<i>S. epidermidis</i>	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	PS <sup>(d)</sup>	1	
	<i>S. epidermidis</i>	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	CS	1	
	<i>S. epidermidis</i>	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	AMB	1	
Total	<i>S. haemolyticus</i>	R	R	S	R	S	R	R	S	S	R	R	R	R	ENF	1	
	<i>S. haemolyticus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	AMB	1	
	<i>S. haemolyticus</i>	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	CS	1	
Total																18	

a: Enfermaria; b: Ambulatório; c: Centro de saúde; d: Pronto socorro ;R: resistente;S: sensível.

Antimicrobianos: FOX (cefotaxima), OX (oxacilina), KF (cefalotina), P (penicilina), SXT (sulfametazol/trimetoprim), NOR (norfloxacina), CN (gentamicina), F (nitrofurantoina), LZD (linezolida), VA (vancomicina), DA (clindamicina), E (eritromicina) e AMC (amoxicilina/ácido clavulânico).

Tabela 15. Comparação dos métodos para detecção da resistência à oxacilina utilizando-se discos de cefoxitina (30µg) e oxacilina (1µg), E-test®, Vitek I e gene *mecA*.

Espécies	PCR	Métodos fenotípicos															
		Disco-difusão						E-test <sup>(a)</sup>									
		Oxacilina			Cefoxitina			Oxacilina			Vitek I						
		S	%	R	S	%	R	S	%	R	S	%	R				
<i>S. saprophyticus</i>	<i>mecA</i> + (N=2)	0	0,0	2	100	2	100	0	0,0	0	0,0	2	100	0	0,0	2	100
	<i>mecA</i> - (N=55)	1	1,8	54	98,2	48	87,2	7	12,8	0	0,0	55	100	0	0,0	55	100
<i>S. aureus</i>	<i>mecA</i> + (N=4)	0	0,0	4	100	0	0,0	4	100	0	0,0	4	100	0	0,0	4	100
	<i>mecA</i> - (N=13)	13	100	0	0,0	12	92,3	1	7,7	12	92,3	1	7,7	12	92,3	1	7,7
<i>S. epidermidis</i>	<i>mecA</i> + (N=6)	1	16,7	5	83,3	1	16,7	5	83,3	1	16,7	5	83,3	1	16,7	5	83,3
	<i>mecA</i> - (N=10)	7	70,0	3	30,0	8	80,0	2	20,0	7	70,0	3	30,0	7	70,0	3	30,0
<i>S. haemolyticus</i>	<i>mecA</i> + (N=5)	0	0,0	5	100	0	0,0	5	100	0	0,0	5	100	0	0,0	5	100
	<i>mecA</i> - (N=3)	1	33,3	2	66,7	1	33,3	2	66,7	1	33,3	2*	66,7	0	0,0	3	100
<i>S. warneri</i>	<i>mecA</i> + (N=1)	0	0,0	1	100	0	0,0	1	100	0	0,0	1	100	0	0,0	1	100
	<i>mecA</i> - (N=1)	1	100	0	0,0	1	100	0	0,0	1	100	0	0,0	1	100	0	0,0
<i>S. lugdunensis</i>	<i>mecA</i> + (N=0)	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	<i>mecA</i> - (N=1)	1	100	0	0,0	1	100	0	0,0	1	100	0	0,0	1	100	0	0,0
Total	<i>mecA</i> + (N=18)	1	5,6	17	94,4	3	16,7	15	83,3	1	5,6	17	94,4	1	5,6	17	94,4
	<i>mecA</i> - (N=83)	24	28,9	59	71,1	71	85,5	12	14,5	22	26,5	61	73,5	20	24,1	63	75,9

a: \*um isolado de *S. haemolyticus* teve resultado intermediário para oxacilina pelo E-test®, entretanto, na tabela foi considerado como resistente.

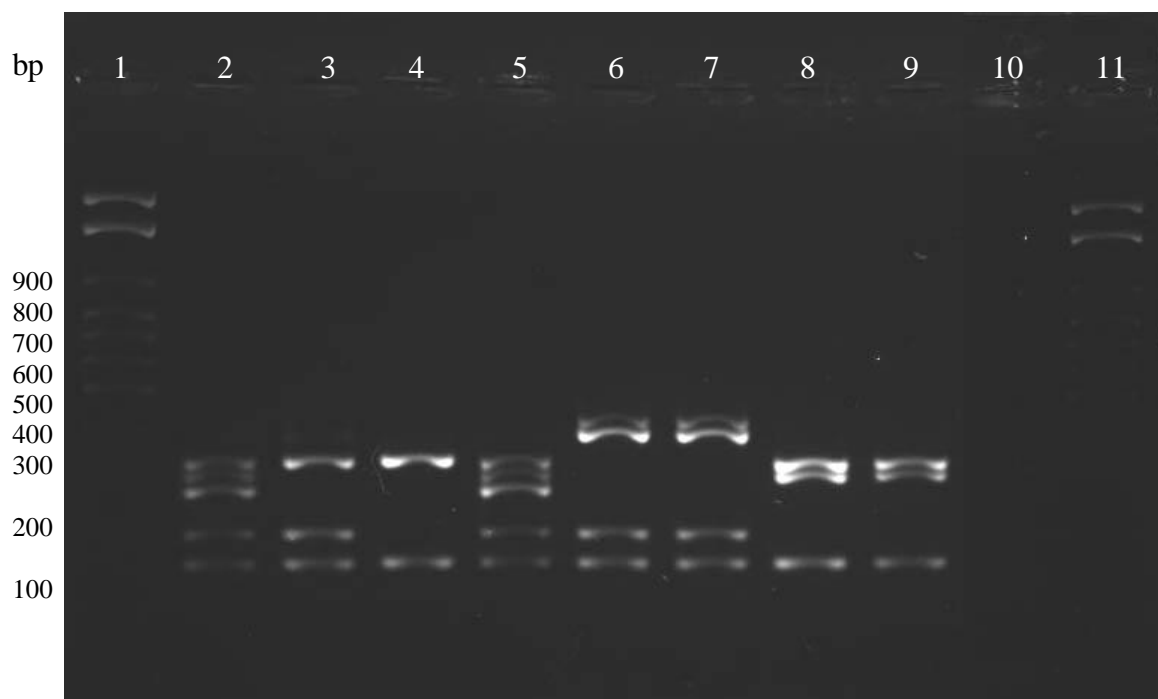


Figura 14. PCR multiplex para detecção do tipo de SCCmec para *S. aureus*. Canaleta 1 e 11: marcador de peso molecular (100bp); 2: amostra de *S. aureus* apresentando SCCmec tipo II; 3: cepa Col (tipo I); 4: cepa Per (tipo IA); 5: cepa N315 (tipo II); 6: cepa AN546 (tipo III); 7: cepa HU25 (tipo IIIA); 8: cepa USA300 (tipo IV); 9: amostra de *S. aureus* SCCmec tipo IV (não incluída no estudo); 10: controle negativo (H<sub>2</sub>O).

#### 4.7. Determinação da sensibilidade e especificidade dos métodos fenotípicos para detecção de resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp.

O método de difusão com disco de oxacilina, E-test® e Vitek I apresentaram sensibilidade de 94,4%, porém com baixa especificidade (Tabela 16), enquanto que a cefoxitina teve uma sensibilidade de 83,3% e especificidade de 85,5%.

Tabela 16. Sensibilidade e especificidade dos métodos fenotípicos para detecção de resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp.

Teste de Acurácia	Cefoxitina (disco)	Oxacilina (disco)	Oxacilina (E-test®)	Oxacilina (Vitek I)
Sensibilidade (%)	83,3	94,4	94,4	94,4
Especificidade (%)	85,5	28,9	26,5	24,0

#### 4.8. Detecção da resistência induzida aos antimicrobianos do grupo MLS<sub>B</sub>.

A prova para detecção da resistência induzida aos antimicrobianos (D-teste) pertencentes ao grupo MLS<sub>B</sub> (macrolídeos; lincosamida e estreptogramina B) foi positiva em 10 (9,9%) isolados: 6 (60%) *S. saprophyticus*, 3 (30%) *S. aureus* e em 1 (10%) *S. haemolyticus* (Figura 15 e 16).

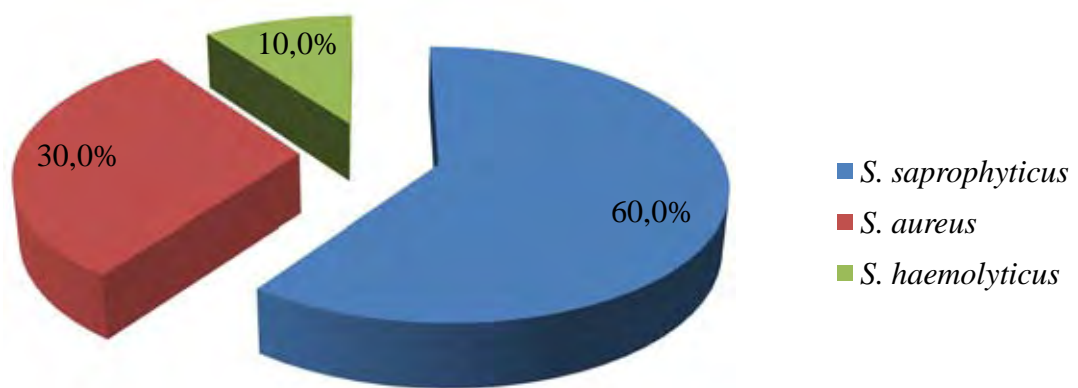


Figura 15. Detecção da resistência induzida aos antimicrobianos pertencentes ao grupo MLS<sub>B</sub>.

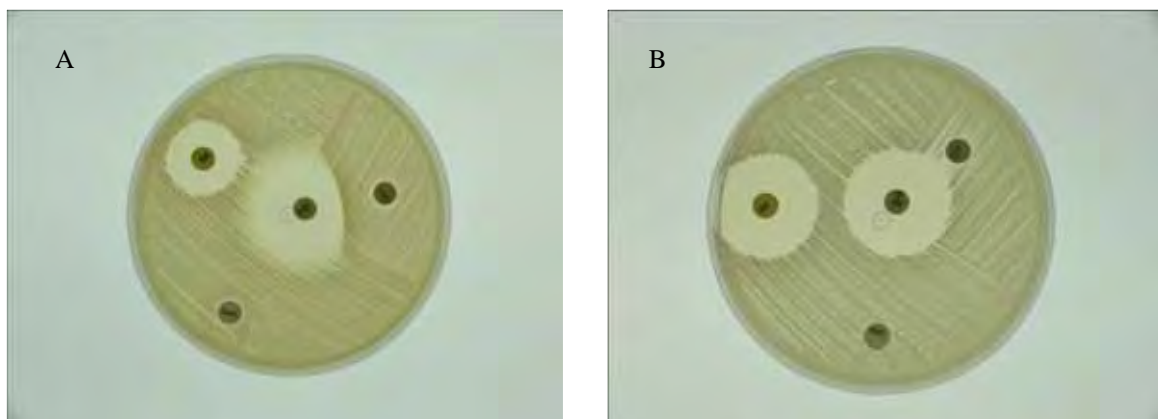


Figura 16. A: D-teste positivo para detecção da resistência induzida aos antimicrobianos pertencentes ao grupo MLS<sub>B</sub>, apresentando resistência ao disco de eritromicina e o achatamento do halo da clindamicina; B: D-teste negativo.

#### 4.9. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) aos antimicrobianos pelo método de E-test®.

Do total dos *Staphylococcus* spp. submetidos ao E-test®, 77 (76,3%) foram resistentes a oxacilina, com a CIM<sub>50</sub> de 0,75 µg/mL e CIM<sub>90</sub> ≥ 8,0 µg/mL, entretanto somente 18 isolados foram positivos para pesquisa do gene *mecA* e 85 (84,1%) apresentaram resistência à penicilina G, com a CIM<sub>50</sub> de 0,25 µg/mL e CIM<sub>90</sub> > 32,0 µg/mL. Todos os isolados foram sensíveis a linezolida com a CIM<sub>50</sub> de 0,75 µg/mL e a CIM<sub>90</sub> de 1,0 µg/mL, e a vancomicina (Figura 17) com a CIM<sub>50</sub> de 1,0 µg/mL e a CIM<sub>90</sub> de 1,5 µg/mL (Tabela 17).



Figura 17. Amostra *S. aureus* sensível à vancomicina e linezolida, beta-lactamase positiva e resistente à penicilina, oxacilina, clindamicina e eritromicina.

Tabela 17. Concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de E-test® para *Staphylococcus* spp.

Antimicroniano	Sensível	Intermediário	Resistente	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	CIM <sub>mínimo</sub>	CIM <sub>máximo</sub>
	N (%)	N (%)	N (%)	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL
Oxacilina	23 (22,8)	1 (0,9)	77 (76,3)	0,75	≥8,0	0,094	>256
Penicilina G	16 (15,9)	0 (0,0)	85 (84,1)	0,25	>32	0,012	>32
Linezolida	101 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,75	1,0	0,25	1,0
Vancomicina	101 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	1,0	1,5	0,5	2,0
Clindamicina	94 (93,1)	0 (0,0)	7 (6,9)	0,125	0,19	0,064	>256
Eritromicina	61 (60,4)	0 (0,0)	40 (39,6)	0,25	>256	0,094	>256

Em relação aos 57 *S. saprophyticus* avaliados pelo método do E-test® todos foram resistentes a oxacilina com a CIM de 0,5 a 3,0 µg/mL e a CIM<sub>50</sub> de 0,75 µg/mL e CIM<sub>90</sub> 1,0 µg/mL (Figura 18), porém somente dois isolados foram *mecA* positivo e 48 (84,2%) apresentaram resistência à penicilina G, com a CIM<sub>50</sub> de 0,19 µg/mL e CIM<sub>90</sub> 0,38 µg/mL. Todos os isolados foram também sensíveis a linezolida, com a CIM<sub>50</sub> de 0,75 µg/mL e a CIM<sub>90</sub> de 1,0 µg/mL e a vancomicina com CIM<sub>50</sub> de 1,0 µg/mL e a CIM<sub>90</sub> de 1,0 µg/mL respectivamente (Tabela 18).

Tabela 18. Concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de E-test® para *S. saprophyticus*.

Antimicroniano	Sensível	Resistente	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	CIM <sub>mínimo</sub>	CIM <sub>máximo</sub>
	N (%)	N (%)	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL
Oxacilina	0 (0)	57 (100)	0,75	1,0	0,5	3,0
Penicilina G	9 (15,8)	48 (84,2)	0,19	0,38	0,19	1,5
Linezolida	57 (100)	0 (0,0)	0,75	1,0	0,5	1,0
Vancomicina	57 (100)	0 (0,0)	1,0	1,0	0,5	1,5
Clindamicina	56 (98,2)	1 (1,8)	0,125	0,19	0,094	>256
Eritromicina	39 (68,4)	18 (31,6)	0,25	>256	0,19	>256



Figura 18. Amostra de *S. saprophyticus* resistente à penicilina e oxacilina, beta-lactamase negativa, e sensível à clindamicina, eritromicina, linezolida e vancomicina.

#### 4.10. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) aos antimicrobianos pelo Vitek I.

Das 101 amostras avaliadas pelo sistema Vitek I, 81 (80,2%) foram resistentes a oxacilina, com a  $CIM_{50}$  de  $0,5 \mu\text{g/mL}$  e  $CIM_{90} \geq 8,0 \mu\text{g/mL}$ , 98 (97,1%) dos isolados foram resistentes à penicilina, com a  $CIM_{50}$  e  $CIM_{90} \geq 16,0 \mu\text{g/mL}$ . Nesse sistema todos os isolados também foram sensíveis à vancomicina e linezolida, sendo a  $CIM_{50}$  e  $CIM_{90}$  de  $2,0 \mu\text{g/mL}$  para vancomicina, e a  $CIM_{50}$  de  $\leq 2,0 \mu\text{g/mL}$  e a  $CIM_{90}$  de  $4,0 \mu\text{g/mL}$  para linezolida (Tabela 19 e Figura 19).

Tabela 19. Concentração inibitória mínima (CIM) pelo Vitek I para *Staphylococcus* spp.

Antimicrobiano	Sensível	Intermediário	Resistente	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	CIM <sub>mínimo</sub>	CIM <sub>máximo</sub>
	N (%)	N (%)	N (%)	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL
Oxacilina	20 (19,8)	0 (0,0)	81 (80,2)	0,5	≥8,0	≤0,25	≥8,0
Penicilina G	3 (2,9)	0 (0,0)	98 (97,1)	≥16	≥16	≤0,03	≥16
Linezolida	101 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	≤2,0	4,0	≤2,0	4,0
Vancomicina	101 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	2,0	2,0	≤0,5	2,0
Clindamicina	95 (94,1)	0 (0,0)	6 (5,9)	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≥8,0
Eritromicina	62 (61,4)	4 (3,9)	35 (34,7)	≤0,5	>256	≤0,5	≥8,0

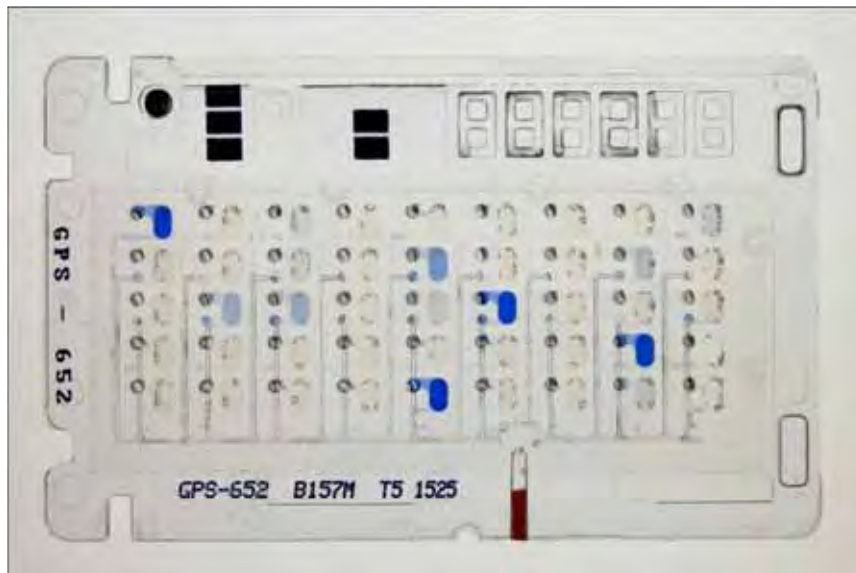


Figura 19. Cartão para avaliação da sensibilidade de bactérias Gram positivas (GPS-652) do Vitek I.

Todos os *S. saprophyticus* avaliados pelo sistema Vitek I foram resistentes à oxacilina com a CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> de 0,50 µg/mL e à penicilina G com a CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> ≥ 16,0 µg/mL, entretanto somente dois isolados foram *mecA* positivo. Todos os isolados foram também sensíveis a linezolida, com a CIM<sub>50</sub> ≤ 2,0 µg/mL e a CIM<sub>90</sub> de 4,0 µg/mL e a vancomicina com CIM<sub>50</sub> e a CIM<sub>90</sub> de 2,0 µg/mL (Tabela 20).

Tabela 20. Concentração inibitória mínima (CIM) pelo Vitek I para *S. saprophyticus*.

Antimicrobiano	Sensível	Intermediário	Resistente	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	CIM <sub>mínimo</sub>	CIM <sub>máximo</sub>
	N (%)	N (%)	N (%)	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL
Oxacilina	0 (0,0)	0 (0,0)	57 (100)	0,5	0,5	0,5	4,0
Penicilina G	0 (0,0)	0 (0,0)	57 (100)	≥16	≥16	≥16	≥16
Linezolida	57 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	≤2,0	4,0	≤2,0	4,0
Vancomicina	57 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	2,0	2,0	1,0	2,0
Clindamicina	56 (98,2)	0 (0,0)	1 (1,8)	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≥8,0
Eritromicina	39 (68,4)	2 (3,6)	16 (28,0)	≤0,5	≥8,0	≤0,5	≥8,0

#### 4.11. Número de resistências e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) aos antimicrobianos em amostras MRS e MSS.

A concentração inibitória mínima em amostras de *Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina/oxacilina (MRS) apresentaram CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> mais elevadas pelo método do E-test® e Vitek I, para oxacilina, penicilina e clindamicina, entretanto outras drogas não apresentaram diferenças como a vancomicina e eritromicina. Para a linezolida os resultados da CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> foram mais baixos em *Staphylococcus* spp. sensíveis a meticilina/oxacilina (MSS) que em MRS pelo método de E-test®, entretanto foram iguais pelo Vitek I (Tabela 21).

Tabela 21. Concentração inibitória mínima em amostras MRS e MSS.

Drogas	E-test®				Vitek I			
	CIM <sub>50</sub> (µg/mL)		CIM <sub>90</sub> (µg/mL)		CIM <sub>50</sub> (µg/mL)		CIM <sub>90</sub> (µg/mL)	
	MRS N=18	MSS N=83	MRS N=18	MSS N=83	MRS N=18	MSS N=83	MRS N=18	MSS N=83
OX	8,0	0,75	>256	1,0	≥8,0	0,5	≥8,0	4,0
P	16	0,25	≥32	0,75	16	≥16	≥32	≥16
LDZ	0,38	0,75	0,5	1,0	≤2,0	≤2,0	4,0	4,0
VA	1,0	1,0	1,5	1,5	2,0	2,0	2,0	2,0
DA	0,094	0,125	>256	0,19	≤0,5	≤0,5	≥8,0	≤0,5
E	0,25	0,25	>256	>256	≤0,5	≤0,5	≥8,0	≥8,0

Antimicrobianos: OX (oxacilina), P (penicilina), LZD (linezolida), VA (vancomicina), DA (clindamicina), E (eritromicina).

Em relação ao número de resistências às drogas em amostras MRS e MSS, os isolados MRS foram na grande maioria multirresistentes, apresentando resistência a múltiplos antimicrobianos de várias classes, sendo que 12 (66,6%) dos 18 isolados possuíam de 5 a 10 resistências. Por outro lado 71 (85,5%) dos isolados MSS apresentaram somente três ou menos resistências (Tabela 22).

Tabela 22. Número de resistências aos antimicrobianos em amostras MRS e MSS obtidas pelo método de disco-difusão.

Nº de Resistência	MRS		MSS	
	N	%	N	%
0 Resistência	0,0	0,0	3,0	3,6
1 Resistência	3,0	16,7	21,0	25,3
2 Resistências	0,0	0,0	33,0	39,8
3 Resistências	1,0	5,6	14,0	16,8
4 Resistências	2,0	11,1	7,0	8,5
5 a 7 Resistências	6,0	33,3	5,0	6,0
8 a 10 Resistências	6,0	33,3	0,0	0,0
Total	18,0	100,0	83,0	100,0

#### 4.12. Taxa de concordância da sensibilidade aos antimicrobianos

No teste de concordância entre os três métodos utilizados para avaliar a sensibilidade aos antimicrobianos, as maiores taxas de concordância foram para a linezolida e vancomicina (100%), enquanto que as menores taxas encontradas foram para a penicilina G e ficaram entre 76,2% e 87,1% (Tabela 23).

Tabela 23. Taxa de concordância da sensibilidade aos antimicrobianos nos três métodos utilizados.

Antimicrobiano	Taxa de concordância (%)		
	Disco X E-test®	Disco X Vitek	E-test X Vitek
Oxacilina	96,0	95,0	97,0
Penicilina G	79,2	76,2	87,1
Linezolida	100,0	100,0	100,0
Vancomicina	100,0	100,0	100,0
Clindamicina	100,0	99,0	99,0
Eritromicina	96,0	89,1	93,0

#### 4.13. Determinação da produção de beta-lactamase

O teste de beta-lactamase pelo disco de nitrocefim foi positivo somente em 37 (36,6%) amostras, entretanto pelo Vitek I foram encontradas 88 (87,1%) amostras positivas (Figura 20).

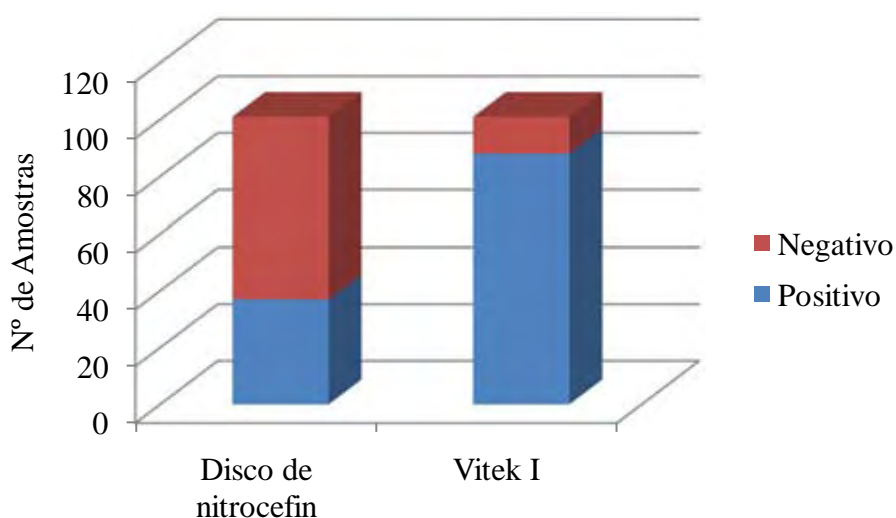


Figura 20. Detecção da produção de beta-lactamase pelos métodos do disco de nitrocefim e Vitek I.

Utilizando o disco de nitrocefim para detecção da produção de beta-lactamase, dos 57 *S. saprophyticus* encontrados, 52 (91,2%) foram beta-lactamase e *mecA* negativos, outros três foram  $\beta$ -lactamase positivos e *mecA* negativos, e os dois restantes foram  $\beta$ -lactamase negativos e *mecA* positivos (Tabela 24), enquanto que pelo Vitek I somente 5 (8,8%) foram beta-lactamase negativos.

Tabela 24. Detecção da produção de beta-lactamase pelo método do disco de nitrocefim em amostras de *S. saprophyticus*.

Espécie	N (%)	<i>mecA</i>	Disco-difusão			E-test®	Vitek I	β-lactamase
			OX	FOX	AMC	OX	OX	Nitrocefim
<i>S. saprophyticus</i>	44 (77,1)	Neg.	R	S	S	R (0,5-1,5)	R (0,5-4,0)	Negativo
<i>S. saprophyticus</i>	7 (23,3)	Neg.	R	R	S	R (0,75-3,0)	R (0,75-4,0)	Negativo
<i>S. saprophyticus</i>	1 (1,8)	Neg.	S	S	S	R (0,5)	R (0,5)	Negativo
<i>S. saprophyticus</i>	3 (5,2)	Neg.	R	S	S	R (0,75-1,0)	R (0,5-4,0)	Positivo
<i>S. saprophyticus</i>	2 (3,6)	Pos.	R	S	S	R (0,75-1,0)	R (0,5)	Negativo

S: sensível; R: resistente.

Antimicrobianos: OX (oxacilina), FOX (cefotitina) e AMC (amoxicilina/ácido clavulânico).

Sete amostras foram consideradas hiperprodutoras de beta-lactamase, pois foram negativas na detecção do gene *mecA*, resistentes ao disco de oxacilina e/ou cefotitina, sensíveis ao disco de amoxicilina/ácido clavulânico e beta-lactamase positiva em ambos os métodos utilizados, sendo que 3 (43,0%) foram identificadas como *S. saprophyticus*, 2 (28,5%) *S. epidermidis*, e 2 (28,5%) *S. haemolyticus*. Os três *S. saprophyticus* foram resistentes a oxacilina com a CIM entre 0,75 e 1,0 µg/mL pelo E-test® e de 0,5 a 1,0 µg/mL pelo Vitek I e sensíveis a cefotitina, os dois *S. epidermidis* e os dois *S. haemolyticus* foram resistentes à oxacilina e cefotitina concomitantemente com a CIM para oxacilina entre 1,0 e 2,0 µg/mL pelo método do E-test® e de 4,0 a ≥ 8,0 µg/mL pelo Vitek I, porém um *S. haemolyticus* teve uma CIM com valor intermediário para oxacilina (0,38 µg/mL) pelo método do E-test®, mas foi resistente pelo disco-difusão e pelo Vitek I (Tabela 25).

Tabela 25. Amostras hiperprodutoras de beta-lactamase.

Espécie	<i>mecA</i>	Disco (mm)			E-test® (µg/mL)	Vitek I (µg/mL)	β-lactamase	
		OX	FOX	AMC	OX	OX	Nitrocefim	Vitek I
<i>S. saprophyticus</i>	Neg.	R (16)	S (28)	S (26)	R (0,75)	R (4,0)	Positivo	Positivo
<i>S. saprophyticus</i>	Neg.	R (14)	S (28)	S (22)	R (1,0)	R (0,5)	Positivo	Positivo
<i>S. saprophyticus</i>	Neg.	R (12)	S (25)	S (30)	R (0,75)	R (0,5)	Positivo	Positivo
<i>S. epidermidis</i>	Neg.	R (0)	R (10)	S (27)	R (1,0)	R (4,0)	Positivo	Positivo
<i>S. epidermidis</i>	Neg.	R (0)	R (15)	S (27)	R (1,0)	R (≥8,0)	Positivo	Positivo
<i>S. haemolyticus</i>	Neg.	R (10)	R (17)	S (21)	R (2,0)	R (≥8,0)	Positivo	Positivo
<i>S. haemolyticus</i>	Neg.	R (11)	R (20)	S (26)	I (0,38)	R (≥8,0)	Positivo	Positivo

S: sensível; I: intermediário; R: resistente.

Antimicrobianos: OX (oxacilina), FOX (cefotitina) e AMC (amoxicilina/ácido clavulânico).

## *Discussão*

---

## 5. Discussão

A infecção do trato urinário (ITU) é uma das doenças infecciosas mais comuns na prática clínica, figurando como a segunda infecção mais frequente no ser humano, sendo sua incidência apenas inferior as do trato respiratório.

Os agentes etiológicos, mais frequentemente envolvidos com ITU são as enterobactérias, não fermentadores, fungos, enterococos e os estafilococos. Dentre as espécies de estafilococos as mais comuns e as mais importantes em relação às ITUs são os *S. aureus* e *S. saprophyticus*, porém, outras espécies de estafilococos coagulase negativa vem adquirindo importância nos últimos anos.

*Staphylococcus saprophyticus* é o segundo agente etiológico mais frequente de ITU na comunidade e raramente é isolado de pacientes hospitalizados ou como contaminantes de cultura de urina<sup>30</sup>, entretanto em nosso estudo foram isolados 3 *S. saprophyticus* de pacientes internados e com infecção urinária, sendo que, duas destas pacientes estavam na enfermaria da obstetrícia, e uma na enfermaria da urologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP (HC-FMB), porém, após análise dos prontuários desses pacientes, as infecções não foram consideradas nosocomiais, devido não estarem relacionadas a procedimentos hospitalares, e a manifestação clínica de infecção se apresentou antes de 72 horas após a admissão.

Segundo Nicolle<sup>9</sup> e Vieira<sup>10</sup> a incidência de ITU varia de acordo com a faixa etária e no primeiro ano de vida é mais comum no sexo masculino, entretanto em nosso estudo, apesar do pequeno número de amostras de crianças com menos de um ano, a incidência foi semelhante em ambos os sexos nessa faixa etária, onde foram encontrados dois pacientes do sexo masculino e três do sexo feminino.

Avaliando a idade e sexo dos pacientes, 74 (73,2%) eram do sexo feminino, sendo que 56 (55,4%) das mulheres tinham entre 15 e 44 anos de idade. Braoios et al.<sup>141</sup> relataram em

seu estudo que a maioria dos pacientes com ITU pertencia ao sexo feminino (69,1%) e tinham entre 20 a 49 anos (52,9%), deste modo nossos dados corroboram os achados desses autores, demonstrando que, na vida adulta, a incidência de ITU aumenta e ocorre um predomínio no sexo feminino, com picos de maior acometimento no início ou relacionado à atividade sexual.

Dos 16 pacientes com idade superior a 55 anos, 13 (81,2%) eram homens e somente 3 (18,8%) eram mulheres, evidenciando que os homens com mais de 50 anos tornam-se mais suscetíveis à ITU, como relatado por Heilberg & Schor<sup>13</sup>. Em relação à espécie *S. saprophyticus*, não foi encontrado nenhum isolado em homens com mais de 50 anos, entretanto, 43 (75,4%) eram de mulheres que tinham entre 15 e 44 anos.

Dados da literatura demonstram que *S. saprophyticus* causa infecções urinárias agudas e sintomáticas em crianças e adolescentes de ambos os sexos em ausência de anomalias estruturais das vias urinárias (Abrahamsson et al.<sup>31</sup>; Tolaymat & Aliayousi<sup>35</sup>). Higashide et al.<sup>142</sup> isolaram *S. saprophyticus* de dois pacientes do sexo masculino, um deles estava internado, sendo que os dois isolados eram *mecA* positivos, deste modo, o autor sugere que as ITUs causadas por *S. saprophyticus* em homens podem estar associadas com internação, conforme relatado anteriormente (Nicolle et al.<sup>143</sup>). Neste estudo foi encontrada apenas uma amostra de *S. saprophyticus* (*mecA* negativo) isolada de uma criança de seis anos de idade, do sexo masculino, atendida no posto de saúde de Porangaba, região de Botucatu, confirmando a observação de Hovelius & Mardh<sup>144</sup> de que UTI por *S. saprophyticus* em homens pode ocorrer em qualquer idade.

A comparação da prova da coagulase com a produção de DNase revelou que todas as amostras identificadas como *S. aureus* pela prova da coagulase em tubo, foram também DNase positivas. Rao et al.<sup>145</sup> relataram quatro isolados de MRSA com prova negativa para DNase, que foram confirmados como *S. aureus* com a prova de aglutinação em látex para detecção do fator “Clumping”, coagulase em tubo, identificação pelo kit Rapid ID32 Staph e

tipados pelo PFGE (pulsed-field gel electrophoresis), sendo identificados como subtipos variantes do EMRSA-15 (epidemic methicillin-resistant *S. aureus*), ainda não descritos anteriormente, entretanto em nosso estudo não foi encontrada nenhuma amostra DNase negativa identificada como sendo *S. aureus*.

Kateete et al.<sup>146</sup> avaliaram ainda a sensibilidade e especificidade do teste de DNase onde observaram sensibilidade de 75,0% e especificidade de 96,0%, valores inferiores aos obtidos neste estudo, que foram de 100,0% de sensibilidade e 97,6% especificidade, resultados semelhantes também aos encontrados por Bello & Qahtani<sup>147</sup>, onde a sensibilidade e especificidade foram de 93,0% e 96,0% respectivamente. Os mesmos autores encontraram entre os 180 *S. aureus* analisados, 7 (3,9%) isolados produtores de fibrinolisinase que lisaram o coágulo dentro de quatro horas, mostrando a importância da leitura dessa prova após 1, 4 e 24 horas para prevenir erros de identificação, porém apesar do número menos expressivo de amostras avaliadas, nesse estudo não foi verificado a lise do coágulo em nenhum dos isolados de *S. aureus*, sugerindo que nenhuma amostra foi produtora de fibrinolisinase.

Cunha et al.<sup>148</sup> encontraram em 59 amostras de ECN clinicamente significantes, sete amostras produtoras de DNase, sendo três *S. epidermidis*, três *S. lugdunensis* e um *S. haemolyticus*, relatando que a concentração da enzima é importante para a detecção da mesma, podendo ser melhorada pelo método de cultura em saco de diálise. Neste estudo não foi utilizada metodologia para concentração da enzima, pois a prova de DNase foi um dos testes empregados com objetivo de distinguir as espécies de *S. aureus* dos ECN. Mesmo sem a utilização da concentração foram encontradas entre as 84 amostras de ECN, 2 (2,3%) amostras positivas para o teste da DNase, confirmando a produção dessa enzima por espécies de ECN, portanto, essa prova deve ser utilizada com cautela para esse objetivo, já que pode identificar amostras de ECN como *S. aureus* ou *S. aureus* como ECN como relatado em outros estudos (Rao et al.<sup>145</sup>; Kateete et al.<sup>146</sup>; Bello & Qahtani<sup>147</sup>).

Alcaráz et al.<sup>48</sup> analisaram 92 amostras de ECN, sendo 45 isoladas de materiais clínicos e 47 de ambiente, identificadas pelos sistemas ID 32 Staph e API Staph (Biomérieux). Entre os isolados clínicos 13 cepas de ECN eram de amostras urinárias, entre as quais foram encontradas 4 (30,7%) *S. saprophyticus*, 4 (30,7%) *S. haemolyticus*, 2 (15,4%) *S. epidermidis*, 2 (15,4%) *S. hominis* e um *S. lugdunensis* (7,8%). Esse achado sugere que apesar de não ter sido avaliado um grande número de amostras, deve existir uma ampla variedade de espécies de ECN associadas com infecção urinária, além de *S. saprophyticus*, entretanto, nossos resultados revelaram que a grande maioria das espécies isoladas foi de *S. saprophyticus* (56,4%), porém outras espécies foram encontradas com menor frequência: *S. aureus* (16,9%); *S. epidermidis* (15,9%); *S. haemolyticus* (7,9%); *S. warneri* (1,9%) e um *S. lugdunensis* (1,0%).

*Staphylococcus aureus* é relativamente incomum em ITU na população em geral (Barrett et al.<sup>49</sup>), todavia em alguns pacientes, causa colonização e infecção através da via ascendente, outros fatores de risco como a instrumentação do trato urinário e a presença de cateterização aumentam o risco de ITU por este microrganismo (Coll et al.<sup>51</sup>). Neste estudo *S. aureus* foi a segunda espécie mais encontrada em isolados de origem hospitalar (23,5%) sendo apenas menos frequente que *S. epidermidis* (41,1%), entretanto, também foi encontrada uma alta taxa de *S. aureus* (16,2%) em amostras não hospitalares (ambulatorios e centros de saúde).

A resistência aos antibióticos é geralmente codificada por plasmídios, e dessa forma é possível à transferência de genes de resistência à novobiocina inter e entre espécies. Neste estudo não foi encontrada nenhuma outra espécie não *S. saprophyticus* resistente à novobiocina, porém, vários autores relataram a resistência à novobiocina em outras espécies de ECN não *S. saprophyticus* (Cunha & Lopes<sup>44</sup>; Large et al.<sup>45</sup>; D'Azevedo et al.<sup>149</sup>), incluindo amostras isoladas de pacientes com ITU (McTaggart & Elliott<sup>43</sup>; Higashide et al.<sup>142</sup>).

Trabulsi et al.<sup>129</sup> sugeriram que as três principais espécies de interesse clínico poderiam ser identificadas pelo teste da coagulase e sensibilidade à novobiocina (*S. aureus*: coagulase positiva e sensível à novobiocina; *S. epidermidis*: coagulase negativa e sensível à novobiocina e *S. saprophyticus*: coagulase negativa e resistente a novobiocina). Em nossa avaliação todos os *S. aureus* e *S. saprophyticus* foram identificados corretamente utilizando somente os resultados da prova da coagulase e resistência à novobiocina, porém entre as 27 amostras coagulase negativa sensíveis a novobiocina identificadas como *S. epidermidis*, foram encontradas outras espécies, sendo que 11 amostras foram identificadas incorretamente utilizando somente esses parâmetros, deste modo, torna-se necessário a realização de provas adicionais para uma correta identificação.

Em nosso estudo a concordância entre o ITS-PCR e o Vitek I foi de 81,2%. O Vitek I identificou 100% dos *S. aureus*, 84,2% dos *S. saprophyticus*, 62,5% dos *S. epidermidis* e 87,5% dos *S. haemolyticus*, porém não identificou os isolados de *S. warneri* e *S. lugdunensis*. Bannerman et al.<sup>63</sup> compararam o Vitek I (Biomérieux) com testes bioquímicos convencionais em 500 isolados clínicos, obtendo 89,0% de concordância. O Vitek I identificou corretamente 92,0% dos isolados de *S. epidermidis*, 95,0% de *S. haemolyticus*, 88,0% de *S. capitis* subesp. *capitis* e 100,0% de *S. saprophyticus*; encontraram ainda três isolados de *S. warneri* que foram identificados como *S. epidermidis*, *S. simulans*, e *S. conhii*; uma cepa de *S. simulans* foi erroneamente identificada como sendo *S. warneri* ou *S. hominis*. Dos 37 isolados de *S. hominis*, sete foram identificados de maneira incorreta, sendo 3 (43,0%) como *S. epidermidis*, 3 (43,0%) *S. saprophyticus* e 1 (14,0%) *S. warneri*. Em nossa avaliação o Vitek I identificou incorretamente seis amostras de *S. epidermidis*, sendo cinco como *S. auricularis* e um *S. simulans*; os dois *S. warneri* encontrados pelo ITS-PCR foram identificados de maneira incorreta pelo Vitek I, um como *S. haemolyticus* e outro *S. auricularis*, não ocorrendo nenhuma concordância entre os métodos; dos oito *S. haemolyticus* um foi identificado como

*S. epidermidis*; dos 57 *S. saprophyticus* o Vitek I identificou nove isolados de maneira incorreta, quatro como *S. warneri*, três *S. simulans*, um *S. haemolyticus* e um *S. xylosum*.

Caierão et al.<sup>150</sup> compararam 94 isolados de ECN pelo método bioquímico convencional (Bannerman et al.<sup>63</sup>) com o sistema Vitek I, constatando que 20 isolados foram identificados incorretamente, sendo que 11 eram *S. hominis*. O sistema automatizado Vitek I conseguiu caracterizar corretamente 74 dos 94 isolados (78,7%), resultados similares aos obtidos neste estudo, onde o Vitek I identificou corretamente 82 (81,1%) dos 101 isolados, porém um pouco inferior aos resultados encontrados por Bannerman et al.<sup>63</sup> que identificaram corretamente 454 dos 500 isolados (90,8%).

O método simplificado de provas bioquímicas descrito por Cunha et al.<sup>65</sup> apresentou uma concordância de 98,0% com o ITS-PCR, com taxas de 93,7% para *S. epidermidis*, 87,5% para *S. haemolyticus* e 100% para *S. aureus*, *S. warneri*, *S. lugdunensis* e *S. saprophyticus*. Um dos grandes desafios na identificação dos ECN está ligado à expressão dos genes, que podem muitas vezes não ser expressos dificultando a identificação de determinadas cepas dentro de uma mesma espécie. Além disso, isolados de pacientes submetido à terapia prolongada com antimicrobianos podem alterar suas características bioquímicas típicas, sendo então o ITS-PCR uma ferramenta para identificação de fenótipos raros e espécies aberrantes.

Em relação ao teste de acurácia, o método simplificado de provas bioquímicas e a prova de sensibilidade a novobiocina tiveram sensibilidade e especificidade de 100,0% para identificação de *S. saprophyticus*, sendo que o Vitek I apresentou 84,2% de sensibilidade e 100,0% de especificidade. Apesar da rápida identificação (2 a 15 horas) e do grande número de provas bioquímicas (29 provas) o Vitek I falhou em identificar as espécies de ECN mais encontradas em amostras de urina (*S. saprophyticus*), devido principalmente a não detecção da resistência a novobiocina em alguns isolados (6/9), e *S. epidermidis* o segundo ECN mais frequente em amostras urinárias e o primeiro em outros materiais clínicos, pela falha na prova

da sacarose (5/5). Em relação às duas espécies identificadas erroneamente pelo método simplificado de provas bioquímicas, o *S. haemolyticus* apresentou resultado incorreto para prova de urease, sendo que o mesmo isolado também foi urease positiva no Vitek I, sugerindo que raras espécies de *S. haemolyticus* possam apresentar urease positiva, e o *S. epidermidis* apresentou prova da trealose positiva, podendo ter ocorrido uma possível contaminação do açúcar, visto que o mesmo isolado foi trealose negativa no Vitek I.

O método simplificado mostrou-se superior na identificação, devido ao fato do Vitek I não realizar algumas provas essenciais para identificação de determinadas espécies, e pela necessidade de um tempo mais prolongado de incubação para algumas provas de fermentação de açúcares (72 horas) como observado por Cunha et al.<sup>65</sup>. As espécies mais difíceis de identificar, foram *S. warneri* e *S. haemolyticus*, dificuldade relatada também por outros autores (Bannerman et al.<sup>63</sup>; Cunha et al.<sup>65</sup> e Ieven et al.<sup>151</sup>), sendo que este achado pode ser explicado pela falta de testes complementares e essenciais como a produção de hemolisinas.

Kim et al.<sup>152</sup> compararam os resultados de 120 amostras clínicas de ECN identificadas pelo Vitek 2 e pelo Microseq 500 system (Applied Biosystems Inc. [ABI], Foster City, CA, USA) um sistema comercial para análise do gene 16S rRNA. O Vitek 2 identificou corretamente 105 (87,5%) dos isolados, e incorretamente 6 (5,0%), e quando o resultado com baixo nível de discriminação e a correta identificação foram consideradas em conjunto, o índice de concordância foi de 95,0% (114/120). Portanto, mesmo quando foram utilizados um aparelho mais atual e um software atualizado, as taxas de concordância entre o método genotípico de identificação e a automação, foram inferiores as taxas de concordância entre o método simplificado de provas bioquímicas (98,0%) e o método genotípico, encontrados em nosso estudo, confirmando que, os sistemas automatizados apesar de mais rápidos, ainda não são capazes de fazer uma diferenciação confiável entre as diferentes espécies de ECN.

O método simplificado de provas bioquímicas obteve taxas de concordância de 98,0% em relação ao ITS-PCR, enquanto que o Vitek I apresentou 81,2% e o disco de novobiocina 89,1% de concordância com o ITS, ressaltando que a baixa concordância do Vitek I deve-se principalmente a identificação de nove *S. saprophyticus* identificados como sendo de outras espécies, enquanto a melhor correlação do disco de novobiocina com o ITS, foi justamente por ter identificado todos os *S. saprophyticus* e não ter sido isolado entre as amostras estudadas nenhuma outra espécie de ECN resistente à novobiocina além de *S. saprophyticus*. É importante enfatizar que nesse método todas as espécies que foram sensíveis a novobiocina foram identificadas como *S. epidermidis*, assim quando analisamos a concordância com o ITS-PCR temos uma falsa impressão de que seria um bom método para identificação de *S. epidermidis* (100,0% de concordância), porém as outras espécies sensíveis a novobiocina (oito *S. haemolyticus*, dois *S. warneri* e um *S. lugdunensis*) seriam identificadas como *S. epidermidis* se somente esse teste fosse realizado, com a especificidade do disco de novobiocina para esta espécie de 87,0%. Deste modo, em laboratórios que não possuem automação, ou onde não são realizadas as provas bioquímicas para identificação das espécies, a melhor recomendação seria liberar esses resultados como ECN, evitando-se assim erros de identificação.

O disco de novobiocina mostrou ser ainda uma alternativa viável para identificação de *S. saprophyticus* em amostras urinárias em laboratórios com recursos limitados, sendo que o ITS-PCR e o método simplificado de provas bioquímicas mostraram maior confiabilidade que o sistema automatizado para a identificação de estafilococos. Apesar da diminuição dos preços das técnicas moleculares nos últimos anos, esse método ainda continua apresentando um custo muito elevado para ser utilizado na rotina em laboratórios de microbiologia clínica, porém o método bioquímico simplificado proposto por Cunha et al.<sup>65</sup> é uma alternativa viável, já que apresenta menor custo, é de fácil execução e apresenta resultados confiáveis, sendo que

o tempo para identificação ainda pode ser reduzido com a realização das provas de urease e novobiocina logo na primeira etapa para identificação de *Staphylococcus* spp. em amostras urinárias.

Embora as infecções do trato urinário por *S. saprophyticus* tenham sido bem documentadas, a resistência antimicrobiana e a disseminação desta espécie não são bem estudadas. Segundo o documento M100-S20 (2010) do CLSI<sup>153</sup> não é recomendado realizar testes rotineiros de sensibilidade em isolados urinários de *S. saprophyticus*, porque esses microrganismos são normalmente sensíveis aos agentes antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções agudas não complicadas do trato urinário (nitrofurantoína, sulfametoxazol/trimetoprin ou uma fluoroquinolona). Entretanto nossos resultados apresentaram cepas resistentes à sulfametoxazol/trimetoprin, com taxas de resistência de 17,6%, podendo levar à falha terapêutica quando utilizada de modo empírico para tratamento de ITU. A resistência aos antimicrobianos tem se tornado emergente também em espécies de *S. saprophyticus*, assim como em outras espécies de ECN, necessitando, além de uma correta identificação, a realização do teste de sensibilidade aos antimicrobianos.

Kahlmeter<sup>154</sup> realizou um projeto (ECO·SENS) em 252 centros de saúde de 17 países, para avaliar a sensibilidade aos antimicrobianos de patógenos isolados de ITU comunitária não complicada em mulheres. Foram avaliadas 3278 culturas positivas e os percentuais de sensibilidade encontrados para *S. saprophyticus* foram: gentamicina 95,7%, amoxicilina/ácido clavulânico 98,3%, sulfametoxazol/trimetoprin e nitrofurantoina 100,0%, sendo que em nosso estudo as taxas de sensibilidade à gentamicina (98,2%) e amoxicilina/ácido clavulânico (100,0%) foram discretamente maiores, em relação à sulfametoxazol/trimetoprin a taxa de sensibilidade foi menor (87,7%) e para nitrofurantoina os resultados foram iguais, com 100% de sensibilidade.

Em outro estudo multicêntrico realizado por Gupta et al.<sup>155</sup>, foram isolados 855 *S. saprophyticus* e 1762 *S. aureus* de mulheres com ITU comunitária, sendo que 94,0% foram sensíveis à sulfametoxazol/trimetoprin para ambos os microrganismos, 96,5% dos *S. saprophyticus* e 98,5% dos *S. aureus* foram sensíveis a nitrofurantoina. Comparando os resultados com os desses autores, o índice de sensibilidade ao sulfametoxazol/trimetoprin também foi menor, 87,7% para *S. saprophyticus* e 88,2% para *S. aureus*, enquanto a nitrofurantoina apresentou melhores resultados com 100% de sensibilidade para ambas as espécies de estafilococos estudadas.

Neste estudo, para *S. saprophyticus* os resultados da determinação da sensibilidade para amoxicilina/ácido clavulânico, cefalotina, norfloxacin, nitrofurantoina foi de 100%, e gentamicina 98,2%, resultados semelhantes aos encontrados por Camargo et al.<sup>156</sup> e Braoios et al.<sup>141</sup> que avaliaram o perfil de sensibilidade em amostras comunitárias desta espécie no interior do Estado de São Paulo, com exceção de sulfametazol/trimetoprin que foi um pouco inferior (87,7%).

Braoios et al.<sup>141</sup> relataram índice de resistência à oxacilina em *S. saprophyticus* de apenas 8,6% pelo método de disco-difusão, contrastando com o deste estudo (98,2%), não havendo uma explicação para essa grande variação, sendo que para os outros antimicrobianos não foram observadas diferenças significativas.

Para *S. aureus* as taxas de sensibilidade encontradas foram de 76,5% para cefalotina, clindamicina e norfloxacin; 70,6% para amoxicilina/ácido clavulânico e 88,2% gentamicina e sulfametazol/trimetoprin, resultados semelhantes aos de Braoios et al.<sup>141</sup>. Os resultados para nitrofurantoina foram iguais aos desses pesquisadores, tanto para *S. saprophyticus* quanto para *S. aureus* (100,0%). Entretanto, encontramos maiores taxas de resistência para penicilina (82,4%), eritromicina (53,0%) e para oxacilina (23,5%), podendo este fato estar relacionado aos quatro *S. aureus* multirresistentes isolados de pacientes internados no HC-FMB.

Nossos resultados mostraram resistência induzida à clindamicina em 10 (9,9%) isolados (seis *S. saprophyticus*, três *S. aureus* e um *S. haemolyticus*) detectados pelo D-teste. Devemos ressaltar ainda que o Vitek I não consegue detectar esse tipo de resistência, porém emite no laudo resultados para clindamicina e eritromicina. Nossos dados demonstraram que dos 10 isolados com D-teste positivo, todos apresentaram sensibilidade à clindamicina pelo Vitek I, enfatizando a necessidade de realizar sua detecção pelo teste de disco aproximação, ou que esses resultados não sejam liberados para o clínico. A clindamicina não é um antimicrobiano normalmente utilizado no tratamento de ITU, podendo eventualmente ser usada em alguns casos específicos, portanto a não constatação desse tipo de resistência pode levar a uma falha terapêutica, além disso, a clindamicina e eritromicina são marcadores importantes em alguns tipos de SCCmec.

A nitrofurantoina é um antimicrobiano específico do trato urinário, com poucos efeitos colaterais, baixa toxicidade e baixo custo, surgindo em nosso estudo como uma boa alternativa terapêutica até mesmo para os *S. aureus* multiresistentes, os quais foram sensíveis somente à vancomicina e linezolida entre todos os antimicrobianos testados.

Normalmente os isolados de ITU hospitalares apresentam maior resistência aos agentes antimicrobianos, e a maioria dos trabalhos sobre a sensibilidade dos patógenos urinários refere-se a isolados de ITU nosocomiais, necessitando assim de estudos que reúnam dados epidemiológicos e demonstrem a real situação em diferentes locais e regiões.

Higashide et al.<sup>148,157</sup> investigando a sensibilidade de 101 isolados de *S. saprophyticus*, também, verificaram que todos apresentaram resistência ao disco de oxacilina (1 µg) e mostraram CIM na faixa de resistência ( $\geq 0,5$  µg/mL) pelo método de diluição em ágar, 93 isolados tiveram CIM na faixa de 0,5 a 4 µg/mL e foram todos *mecA* negativos, enquanto os oito isolados com CIM superiores a 64 µg/mL foram *mecA* positivos com a CIM<sub>50</sub> de 0,5 µg/mL e CIM<sub>90</sub> de 1,0 µg/mL para oxacilina.

Em nossa pesquisa, dos 57 *S. saprophyticus* encontrados 56 (98,2%) demonstraram resistência ao disco de oxacilina apresentando zona de inibição  $\leq 16$  mm em 47 (82,4%) isolados, sendo que todos foram resistentes pelo E-teste® e pelo Vitek I com a CIM de 0,5 a 3,0  $\mu\text{g/mL}$  e 0,5 a 4,0  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente, e somente 2 (3,5%) apresentaram o gene *mecA*, corroborando os resultados relatados por Higashide et al.<sup>157</sup>. Por outro lado um dos isolados *mecA* positivo apresentou CIM de 0,5 e outro de 1  $\mu\text{g/mL}$ , discordando dos resultados elevados (CIM  $\geq 64\mu\text{g/mL}$ ) encontrados por esses autores nas amostras *mecA* positivas. Dados similares foram observados por Ramotar et al.<sup>158</sup> em estudo com 83 amostras de *S. saprophyticus*, sendo que todas foram *mecA* negativas e resistentes a oxacilina com diâmetro de inibição  $\leq 17$  mm pelo método de disco-difusão, 77 resistentes pelo método de microdiluição em caldo, 73 pelo método de diluição em ágar e todos os 83 resistentes pelo Vitek I com a CIM de 0,5  $\mu\text{g/mL}$ .

No estudo de Higashide et al.<sup>157</sup>, o disco de cefoxitina (30  $\mu\text{g}$ ) apresentou diâmetro de inibição  $\leq 16$  mm para *mecA* positivo e de 22 a 33 mm para *mecA* negativo. Considerando o atual *breakpoint* quatro isolados *mecA* negativos foram resistentes pelo disco de cefoxitina, portanto, o autor recomenda um *breakpoint* de 19 mm para caracterizar corretamente a resistência mediada pelo gene *mecA* em *S. saprophyticus*. Em nosso estudo 7 (12,2%) dos 57 *S. saprophyticus* foram resistentes a cefoxitina com diâmetro de inibição de 23 a 24 mm, com exceção de um isolado que apresentou diâmetro de 16 mm e nenhum foi *mecA* positivo, deste modo utilizando o *breakpoint* recomendado pelos autores somente um isolado seria resistente.

Uma vez que o disco de cefoxitina (30  $\mu\text{g}$ ) pode ser usado como uma alternativa ou em conjunto com a oxacilina para melhorar a detecção do gene *mecA*, em nossa avaliação encontramos dois *S. saprophyticus* que foram *mecA* positivos e apresentaram diâmetro do halo de inibição de 27 e 28 mm (sensíveis) para cefoxitina e de 12 e 17 mm (resistentes) para

oxacilina, demonstrando que mesmo se reconsiderarmos o ponto de corte para cefoxitina como proposto por Higashide et al.<sup>157</sup>, ainda é possível encontrar resultados inconsistentes para ECN, como *S. saprophyticus*.

Neste estudo, os resultados da sensibilidade obtidos pelo método de E-test® e pelo Vitek I foram inferiores aos encontrados por Higashide et al.<sup>142</sup> para eritromicina, sendo que pelo E-test® 39 (68,4%) das amostras foram sensíveis e 18 (31,6%) resistentes com a CIM de 0,19 a  $\geq 256$   $\mu\text{g/mL}$  e pelo Vitek I 62 (61,4%) foram sensíveis, enquanto 35 (34,7%) foram resistentes e 4 (3,9%) apresentaram resultados intermediários com a CIM de  $\leq 0,5$  a  $\geq 8$   $\mu\text{g/mL}$ , entretanto como observado também por Higashide et al.<sup>142</sup> todos os isolados foram sensíveis a linezolida, com a CIM<sub>50</sub> de 0,75  $\mu\text{g/mL}$  e a CIM<sub>90</sub> de 1,0  $\mu\text{g/mL}$  e à vancomicina com CIM<sub>50</sub> e a CIM<sub>90</sub> de 1,0  $\mu\text{g/mL}$ .

Palazzo & Darini<sup>124</sup> relataram a importância do uso dos discos de cefoxitina em conjunto com o CIM de oxacilina, para reduzir erros na detecção de resistência a meticilina, embora discrepâncias tenham sido observadas em alguns ECN<sup>120,122</sup>. Das 18 cepas de estafilococos *mecA* positivos encontradas neste estudo, 15 (83,3%) foram resistentes aos discos de cefoxitina e oxacilina concomitantemente, além disso foram resistentes também à oxacilina pelo E-test® e pelo Vitek I. Um isolado de *S. epidermidis* foi sensível a ambos os discos, sensível também pelo E-test® e pelo Vitek I à oxacilina com a CIM de 0,125  $\mu\text{g/mL}$  e  $\leq 0,25$   $\mu\text{g/mL}$  respectivamente, e dois isolados de *S. saprophyticus mecA* positivos foram sensíveis a cefoxitina e resistentes a oxacilina, sendo que a resistência à oxacilina foi confirmada pela CIM no E-test® e Vitek I. Em 2005, Frigatto et al.<sup>123</sup> mostraram cinco isolados *S. epidermidis* com resultados discrepantes entre a oxacilina e a cefoxitina pelo método de disco-difusão, os quais eram resistentes à oxacilina e sensíveis à cefoxitina. Swenson & Tenover<sup>122</sup> também sugeriram que o disco de cefoxitina mostra resultados inconsistentes na detecção de isolados *mecA* positivos entre os ECN incluindo *S.*

*saprophyticus*, indicando que o correto ponto de corte para o disco de cefoxitina deva ser reconsiderado.

Em relação à detecção de resistência à oxacilina, o método de difusão com disco de oxacilina, E-test® e Vitek I apresentaram melhor sensibilidade (94,4%) do que o disco de cefoxitina (83,5%), porém com baixa especificidade (28,9%, 26,5% e 24,0% respectivamente), devido principalmente a grande quantidade de *S. saprophyticus* (57/101), enquanto que o disco de cefoxitina obteve uma melhor especificidade (85,5%). Alguns autores<sup>110,124,159</sup> tem relatado sensibilidade de 92,5 a 94,5% e especificidade de 96,0 a 98,8% para o disco de oxacilina e sensibilidade e especificidade de 92,5 a 100% e 90,7 a 98,8%, respectivamente para o disco de cefoxitina, entretanto nesses estudos havia nenhuma ou uma ínfima quantidade de isolados de *S. saprophyticus*, justificando desta maneira a baixa especificidade encontrada em nosso estudo.

Um dos pontos críticos para a utilização do teste de disco-difusão é atribuída à qualidade dos discos, sendo que, o uso de discos de melhor qualidade melhora os resultados e define uma melhor terapia antimicrobiana<sup>120</sup>, porém neste estudo foram utilizados discos de uma das melhores marcas disponíveis no mercado, e mesmo assim tivemos três isolados *mecA* positivos que foram sensíveis a cefoxitina.

A partir de 2009 o documento M100-S19 do CLSI<sup>160</sup> não relata mais os pontos de corte para disco-difusão para oxacilina, sendo necessária a realização da CIM, dificultando ainda mais a detecção desses isolados principalmente em laboratórios de pequeno porte, onde não existem aparelhos de automação e o custo para determinação da CIM pela tira de E-test® ainda é muito elevado.

A distribuição da CIM entre *mecA* positivo e negativo demonstrada por Higashide et al.<sup>157</sup> é claramente distinguível, sendo que todos os isolados *mecA* positivos apresentaram uma CIM entre 64 a 256 µg/mL e os *mecA* negativos tiveram uma CIM entre 0,5 a 4,0 µg/mL

sugerindo que a CIM poderia ser utilizada para prever resistência a oxacilina se o atual ponto de corte for reconsiderado. Porém em nosso estudo os dois isolados *mecA* positivos tinham CIM para oxacilina de 0,75 µg/mL e 1,0 µg/mL, bem abaixo dos valores encontrados por Higashide et al.<sup>157</sup>, demonstrando que um aumento no valor da CIM, pode também não detectar alguns isolados.

Em resumo, os métodos de disco-difusão, E-test® e Vitek I não são recomendados para detecção da resistência à oxacilina em isolados de *S. saprophyticus* porque as espécies negativas para o gene *mecA* serão consideradas resistentes utilizando-se o atual *breakpoint*, o que implica em resultados superestimados de resistência à oxacilina. Resultados similares foram observados por Ramotar et al.<sup>158</sup> para os métodos de microdiluição em caldo, diluição em ágar, Vitek I e disco-difusão, e também por Higashide et al.<sup>148,157</sup> pelos métodos de diluição em ágar e disco-difusão.

Em relação à susceptibilidade aos antimicrobianos, foi relatado anteriormente a prevalência da resistência aos beta-lactâmicos em isolados de *S. saprophyticus* no Japão<sup>135</sup>, posteriormente no Canadá<sup>116</sup>, Estados Unidos<sup>122</sup> e Brasil<sup>161</sup>, porém existem poucos relatos sobre a resistência mediada pelo gene *mecA* em *S. saprophyticus* principalmente em isolados urinários.

A prevalência de *S. saprophyticus mecA* positivo encontrada em nosso estudo foi de 3,5% (2/57), inferior a relatada anteriormente por Higashide et al.<sup>157</sup> 7,9% (8/101) dos isolados. A frequência de isolamento de *S. saprophyticus* não tem sido reportada até agora, sugerindo que a prevalência de resistência à oxacilina esteja aumentando em isolados clínicos, e a rápida e correta detecção de resistência é imperativa para o tratamento de ITU por esse microrganismo, sendo necessários mais estudos para dimensionar o aumento da resistência e a presença de isolados *mecA* positivos.

O CLSI não recomenda a realização do teste de sensibilidade para *S. saprophyticus*,

porém nos locais onde o teste é realizado, está ocorrendo um dos problemas mais graves em relação à detecção da resistência em *S. saprophyticus*, onde o resultado da resistência à oxacilina está sendo superestimada. De acordo com o CLSI, quando essa resistência é detectada, todos os beta-lactâmicos devem ser reportados como resistentes, deste modo os aparelhos de automação como o Vitek I já emitem esses resultados corrigidos em seus laudos, diminuindo dessa maneira o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em *S. saprophyticus* e aumentando o uso desnecessário de antimicrobianos de maior espectro.

O aumento de populações de ECN com resistência heterogênea à oxacilina é uma das causas, que dificultam sua detecção em laboratórios de análises clínicas<sup>117</sup>, entretanto não foi observada neste estudo nenhuma amostra de estafilococos expressando resistência heterogênea visível, tanto pelo método de disco-difusão quanto pelo E-test®, ao contrário de vários outros relatos de ECNs isolados de outros materiais clínicos. Entretanto, um isolado de *S. epidermidis* foi *mecA* positivo e apresentou sensibilidade à oxacilina em todos os métodos utilizados e ao disco de cefoxitina, sugerindo que este isolado apresente resistência heterogênea.

Apesar do método de disco-difusão apresentar algumas desvantagens em relação ao E-test® e aos métodos automatizados, como a não determinação da CIM, apresenta como vantagem, principalmente o custo, muito inferior aos métodos citados, sendo que quando realizado corretamente apresentou uma ótima correlação com o E-test® e com o Vitek I para todos os antimicrobianos testados, com exceção da penicilina que também não demonstrou boa correlação quando comparamos o E-test® com o Vitek I.

Em 2009, Soderquist & Berglund<sup>162</sup> encontraram na Suécia oito isolados de *S. saprophyticus mecA* positivos de diversas origens, que carregavam pelo menos três diferentes tipos de SCC*mec*. Foram caracterizados cinco isolados com SCC*mec* tipo III os quais foram indistinguíveis ou estreitamente correlacionados pelo PFGE, e 3 isolados não puderam ser

tipados. Entretanto em nosso estudo os dois *S. saprophyticus mecA* positivos encontrados foram caracterizados como sendo do tipo IV, os dois foram isolados de pacientes de centros de saúde e possuíam o mesmo perfil de sensibilidade, sendo resistentes somente a oxacilina e sensíveis a todos os outros antimicrobianos testados. O SCCmec do tipo IV não carrega outros genes de resistência a não ser o gene *mecA*, sendo responsável principalmente por infecções adquiridas na comunidade e pode apresentar múltiplos subtipos. Segundo Ito et al.<sup>102</sup>, como o SCCmec do tipo IV é um elemento menor, pode ser adquirido mais frequentemente porque a eficiência da transferência é maior quanto menor o DNA, sugerindo que a prevalência de doenças causadas por clones que contém o SCCmec do tipo IV tende a aumentar, desta maneira, são necessários mais estudos com espécies isoladas de urina.

Foram isolados também três *S. epidermidis* com SCCmec tipo IV, sendo um de paciente do ambulatório, um do centro de saúde e um do pronto socorro, porém esses isolados mostraram uma maior resistência aos antimicrobianos, sendo os três resistentes a cefoxitina, oxacilina, penicilina, sulfametazol/trimetoprim e norfloxacina, e dois foram ainda resistentes a gentamicina e amoxicilina/ácido clavulânico.

Os demais isolados *mecA* positivos foram identificados e caracterizados como: três *S. epidermidis* com SCCmec tipo III; quatro *S. aureus*, dois do tipo III e dois do tipo II; cinco *S. haemolyticus*, dois do tipo II e três não tipáveis e um *S. warneri*, do tipo III. De acordo com a literatura, isolados que possuem o SCCmec tipo III contêm um grande número de genes de resistência<sup>96</sup>, e nossos resultados mostraram que todos os isolados com SCCmec tipo II e III foram resistentes a cefoxitina e oxacilina, e apresentaram maior resistência aos antimicrobianos, com exceção de um *S. epidermidis* do tipo III resistente somente a penicilina, além de um *S. haemolyticus* do tipo II que foi resistente somente a oxacilina, cefoxitina, penicilina e intrigantemente sensível a eritromicina, uma vez que o SCCmec tipo II carrega o transposon Tn554, responsável pela resistência a essa droga.

Um dos pontos mais relevantes é que os SCCmec tipo II e III possuem um grande número de genes de resistência, e essa informação é importante epidemiologicamente, principalmente para o controle de infecção hospitalar. Em relação ao número de resistências às drogas pelo método de disco-difusão, os isolados MRS foram na grande maioria multirresistentes, apresentando resistência a múltiplos antimicrobianos de várias classes, com 66,6% apresentando cinco a dez resistências comparados com 6,0% nas amostras MSS. Por outro lado 85,5% dos isolados MSS apresentaram somente três ou menos resistências

Até a data da realização desse estudo já foram publicados oito tipos de SCCmec, sendo que o SCCmec tipo V já foi descrito em ECN, particularmente em *S. haemolyticus*<sup>102</sup>, sugerindo que provavelmente os três *S. haemolyticus* que foram caracterizados como não tipáveis podem eventualmente apresentar esse tipo de SCCmec, o qual não estava no protocolo utilizado neste estudo.

O teste de beta-lactamase realizado pelo disco de nitrocefina (cefina) foi positivo somente em 37 (36,6%) das amostras de *Staphylococcus* spp. estudadas, entretanto Cunha & Lopes<sup>44</sup> estudaram ECN isolados de recém-nascidos internados na unidade neonatal do HC-FMB e relataram que 71,8% das amostras de ECN estudadas foram produtoras de beta-lactamase, ressaltando que todas as amostras eram de origem hospitalar. Hovelius e Mardh<sup>144</sup> verificaram que a cefalosporina cromogênica (nitrocefina) não detecta a produção de beta-lactamase em *S. saprophyticus*, entretanto Latham et al.<sup>163</sup> avaliaram 67 isolados de *S. saprophyticus* e 50 (75,0%) produziram beta-lactamase pelo método da cefalosporina cromogênica.

McDougal e Thornsberry<sup>108</sup> avaliaram a produção de beta-lactamase em 66 amostras de *S. aureus* utilizando o disco de nitrocefina, e todas as cepas foram positivas, porém quando o CIM da penicilina foi baixo ( $\leq 16\mu\text{g/mL}$ ) a mudança de cor foi fraca. Nesse estudo, todas as amostras de *S. saprophyticus* negativas para o disco de nitrocefina apresentaram valores da

CIM para penicilina entre 0,125 e 0,38  $\mu\text{g/mL}$ , com exceção de uma amostra com CIM de 0,94  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto que das três amostras positivas, duas tiveram CIM mais elevado (1,0 e 1,5  $\mu\text{g/mL}$ ) e uma apresentou uma CIM de 0,19 $\mu\text{g/mL}$ .

Mais recentemente, Pitkala et al.<sup>164</sup> utilizaram como método de referência a detecção do gene *blaZ* por PCR, para avaliar vários métodos comerciais para detecção da produção de beta-lactamase em *Staphylococcus* ssp., incluindo o disco de nitrocefim, e encontraram 19 amostras com reação muito fraca para nitrocefim, das quais 15 foram positivas para pesquisa do gene *blaZ*. Diferentes beta-lactamases apresentam diferenças em especificidades de substrato, o que pode explicar a mudança parcial na reação de cor, podendo ocorrer um aumento de falsos-negativos para todos os testes baseados nesse princípio<sup>163</sup>. Apesar do nitrocefim ser um dos melhores testes para detecção de beta-lactamase, as reações enzimáticas podem ser incompletas, levando a um grande número de resultados falso-negativos, podendo ser este o motivo da grande quantidade de beta-lactamase negativa para espécies de *S. saprophyticus* encontrada em nosso estudo, entretanto seria necessário avaliar se realmente essa espécie normalmente não é produtora de beta-lactamase, necessitando da confirmação genotípica pela pesquisa pela PCR do gene *blaZ*.

Quando comparamos os resultados positivos da beta-lactamase (36,6%) pelo disco de nitrocefim com o Vitek I (87,1%) foi observado uma maior detecção pelo último método, portanto o Vitek I apresentou uma melhor correlação com os resultados da CIM da penicilina pelo método do E-test®, onde foram encontradas 84,1% de amostras resistentes, porém algumas discrepâncias foram observadas.

Sete amostras foram consideradas hiperprodutoras de beta-lactamase, pois foram negativas na detecção do gene *mecA*, resistentes ao disco de oxacilina e/ou cefoxitina, sensíveis ao disco de amoxicilina/ácido clavulânico e beta-lactamase positiva pelo disco de nitrocefim e Vitek I, sendo que 3 (42,8%) foram identificadas como *S. saprophyticus*, 2

(28,5%) *S. epidermidis*, e 2 (28,5%) *S. haemolyticus*. Os 3 *S. saprophyticus* foram resistentes a oxacilina com a CIM entre 0,75 e 1,0 µg/mL pelo E-test® e de 0,5 a 1,0 µg/mL pelo Vitek I e sensíveis a cefoxitina, os 2 *S. epidermidis* e os 2 *S. haemolyticus* foram resistentes à oxacilina e cefoxitina concomitantemente com a CIM para oxacilina entre 1,0 e 2,0 µg/mL pelo método do E-test® e de 4,0 a ≥ 8,0µg/mL pelo Vitek I, porém um *S. haemolyticus* teve uma CIM com valor intermediário para oxacilina (0,38 µg/mL) pelo método do E-test®, mas foi resistente pelo disco-difusão e pelo Vitek I.

A grande quantidade de isolados resistentes à oxacilina ocorreu provavelmente devido a uma alteração de outra PBP que não a PBP2a, ou ainda, que o ponto de corte preconizado pelo CLSI possa superestimar a resistência a oxacilina em *S. saprophyticus*, sugerindo que modificações são necessárias para detecção dessa resistência.

*Conclusões*

---

## 6. Conclusões

- Dos pacientes com ITU a maioria era mulher e tinha entre 15 e 44 anos de idade. Das infecções causadas por *S. saprophyticus* 94,8% ocorreram em pacientes não hospitalizados, e o restante não foi caracterizado como infecção nosocomial. Somente 23,5% dos *S. aureus* foram procedentes de enfermaria e as espécies *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* foram isoladas tanto de pacientes hospitalizados como ambulatoriais.
- A prova da DNase demonstrou uma boa correlação com a prova da coagulase e com a pesquisa do gene *coa* para identificação de *Staphylococcus aureus*, entretanto essa prova deve ser utilizada com cautela para esse objetivo, já que pode identificar amostras de ECN como *S. aureus* ou *S. aureus* como ECN.
- O método simplificado de provas bioquímicas mostrou maior confiabilidade que o sistema automatizado Vitek I para a identificação de estafilococos e o disco de novobiocina mostrou ser ainda uma alternativa viável para identificação de *S. saprophyticus* em amostras urinárias em laboratórios com recursos limitados.
- O maior percentual de resistência encontrado pelo método de disco-difusão foi à Oxacilina (78,0%) seguido da Penicilina (73,0%), sendo que todas as amostras foram sensíveis à vancomicina, linezolida e nitrofurantoina. O método de disco-difusão apresentou uma ótima correlação com o E-test® e Vitek I.
- O teste de resistência induzida à clindamicina (D-teste) deve ser realizado em *Staphylococcus* spp. sempre que a sensibilidade a clindamicina for relatada, porque a não detecção desse tipo de resistência pode levar a uma falha terapêutica.
- A detecção de beta-lactamase com disco de nitrocefim não apresentou concordância com o Vitek I principalmente para a espécie de *S. saprophyticus*, entretanto foi observada uma maior detecção e uma melhor correlação do Vitek I com os resultados

da CIM da penicilina pelo método do E-test®.

- Foram encontrados 18 estafilococos *mecA* positivos, sendo 6 *S. epidermidis*, dos quais 3 possuíam *SCCmec* tipo III e 3 do tipo IV; 4 *S. aureus*, 2 do tipo III, um do tipo II e um não tipável; 4 *S. haemolyticus*, 2 do tipo II e 2 não tipáveis; 2 *S. warneri*, um do tipo III e o outro não tipável e 2 *S. saprophyticus*, os dois do tipo IV (comunitário), e os que carreavam o *SCCmec* do tipo III (hospitalar) foram os que apresentaram maior resistência aos antimicrobianos.
- O método de difusão com disco de oxacilina, E-test® e Vitek I apresentaram sensibilidade de 94,4%, porém com baixa especificidade (28,9%, 26,5% e 24,0% respectivamente), devido ao grande número de espécies de *S. saprophyticus*, enquanto que a cefoxitina teve uma boa sensibilidade (83,3%) e uma melhor especificidade (85,5%) para detecção da resistência à oxacilina.
- Os métodos de E-test®, disco-difusão e o Vitek I não são recomendados para detecção da resistência à oxacilina em isolados de *S. saprophyticus* porque as amostras negativas para o gene *mecA* são consideradas resistentes utilizando-se o atual *breakpoint*.

## *Referências bibliográficas*

---

## 7. Referências bibliográficas \*

1. Stamm WE & Hooton TM. Management of urinary tract infections in adults. *N Engl J Med.* 1993;329:1328-34.
2. Warren JW, Abrutyn E, Hebel JR, Johnson JR, Schaeffer AJ, Stamm WE. Guidelines for antimicrobial treatment of uncomplicated acute bacterial cystitis and acute pyelonephritis in women. *Infectious Diseases Society of América (IDSA). Clin Infect Dis.* 1999;29:745-58.
3. Lopes HV & Tavares W. Diagnóstico das infecções do trato urinário. *Rev Assoc Med Bras.* 2005;51(6):301-12.
4. Valiquette L. Urinary tract infections in women. *Can J Urol* 2001;8:6-12.
5. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), acesso dia 27/01/2011 ([http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/microbiologia/mod\\_1\\_2004.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/microbiologia/mod_1_2004.pdf)).
6. Hörner R, Vissotto R, Mastella A, Salla A, Meneghetti B, Dal Forno NLF, Righi RA, Oliveira LO. Prevalência de microrganismos em infecções do trato urinário de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria. *Rev Bras Anal Clin.* 2006; 38(3):147-50.
7. Guidoni EBM & Toporovski J. Infecção urinária na adolescência. *J Ped.* 2001;77(2):165-9.
8. Kunin CM. *Urinary tract infections.* 5ª ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997.
9. Nicolle LE. Epidemiology of urinary tract infection. *Infect Med.* 2001;18:153-62.
10. Vieira NOM. Infecção do trato urinário. *Medicina (Ribeirão Preto).* 2003;36:365-9.
11. Hooton TM. Pathogenesis of urinary tract infections: an update. *J Antimicrob Chemother.* 2000;46:1-7.
12. Camargo ILBC, Maschieto A, Salvino C, Darini ALC. Diagnóstico bacteriológico das infecções do trato urinário - Uma revisão técnica. *Medicina (Ribeirão Preto).* 2001;34:70-8.
13. Heilberg IP & Schor N. Abordagem diagnóstica e terapêutica na infecção do trato urinário - ITU. *Rev Assoc Med Bras.* 2003;49(1):109-16.
14. Hooton TM & Stamm WE. Diagnosis and treatment of uncomplicated urinary tract infection. *Infect Dis Clin North Am.* 1997;11:551-81.
15. Ronald AR & Harding GK. Complicated urinary tract infections. *Infect Dis Clin North Am.* 1997;11:583-92.

---

\* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: sample references [Internet]. Bethesda: U. S. National Library of Medicine; 2009 [update 2009 May 12; cited 2009 Set 10]. Available from: [http://www.nlm.nih.gov/bsd.uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd.uniform_requirements.html)

16. Naber KG. Treatment options for acute uncomplicated cystitis in adults. *J Antimicrob Chemother.* 2000;46:23-7.
17. Tolckoff-Rubin NE, Cotran RS, Rubin RH. Urinary tract infection, pyelonephritis, and reflux nephropathy, in Brenner & Rector's *The Kidney*, 6th ed, edited by Brenner BM, Philadelphia, WB Saunders; 2000. p 1449-1506.
18. Fihn, S.D. Clinical practice. Acute uncomplicated urinary tract infection in women. *N Engl J Med.* 2003;349:259-66.
19. Stamm WE & Norrby SR. Urinary tract infections: disease panorama and challenges. *J Infect Dis.* 2001;183(1):1-4.
20. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria nº 2.616/MS/GM, de 12 de maio de 1998, acesso dia 31/01/2011 ([http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/2616\\_98.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/2616_98.htm)).
21. Pewitt EB & Schaeffer AJ. Urinary tract infection in urology, including acute and chronic prostatitis. *Infect Dis Clin North Am.* 1997;11:623-46.
22. Kass EH. Assymptomatic infections of the urinary tract. *Trans Assoc Am Phys.* 1956;69: 56-64.
23. Stamm WE, Counts GW, Running KR, Fihn S, Turck M, Holmes KK. Diagnosis of coliform infection in acutely dysuric women. *N Engl J Med.* 1982;307:463-8.
24. Oplustil CP, Zoccoli CM, Tobouti NR, Sinto SI. *Procedimentos básicos em microbiologia clínica.* 2ª ed. rev. e ampl. São Paulo: Sarvier, 2004.
25. Bishara J, Leibovici L, Huminer D, Drucker M, Samra Z, Konisberger H. Five-year prospective study of bacteraemic urinary tract infection in a single institution. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1997;16:563-7.
26. Gupta K, Hooton TM, Stamm WE. Increasing antimicrobial resistance and the management of uncomplicated community-acquired urinary tract infections. *Ann Intern Med.* 2001; 135:41-50.
27. Carton JA, Gomez MB, Gonzalez LB, Maradona JA, de Diego I. Nosocomially acquired infection of the urinary tract. *Enferm Infec Microbiol Clin.* 1989;7:408-14.
28. Henry D, Ellison W, Sullivan J, Mansfield DL, Magner DJ, Dorr MB. Talbot for The Sparfloxacin Multi Center UUTI Study Group. Treatment of community-acquired acute uncomplicated urinary tract infection with sparfloxacin versus ofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42:2262-6.
29. Gupta K, Scholes D, Stamm WE. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among uropathogens causing acute uncomplicated cystitis in women. *JAMA.* 1999;281:736-8.
30. Jordan PA, Irvani A, Richard GA, Baer H. Urinary tract infection caused by *Staphylococcus saprophyticus*. *J Infect Dis;* 1980;142:510-15.

31. Abrahamsson K, Hansson S, Jodal U, Lincoln K. *Staphylococcus saprophyticus* urinary tract infections in children. Eur J Pediatr. 1993;152:69-71.
32. Svanborg C & Godaly G. Bacterial virulence in urinary tract infections. Infect Dis Clin N Am. 1997;11:513-29.
33. Colledge C.L. *Staphylococcus saprophyticus* bacteremia. J infect Dis. 1989;157:215.
34. Lee W, Carpenter RJ, Phillips LE, Faro S. Pyelonephritis and sepsis due *S. saprophyticus*. J infect Dis. 1987;155:1079.
35. Tolaymat A & Aliayousi Z. *Staphylococcus saprophyticus* urinary tract infections in male children. Child Nephrol Urol. 1991;11:100-2.
36. Rupp ME, Soper DE, Archer GL. Colonization of the female genital tract with *Staphylococcus saprophyticus*. J Clin Microbiol. 1992;30:2975-9.
37. Goldenring JM. Urinary tract infection with *Staphylococcus saprophyticus*. J Adolesc Health Care. 1986;6:417-18.
38. Bergman B, Wedren H, Holm SE. *Staphylococcus saprophyticus* in males with symptoms of chronic prostatitis. Urology. 1989;5:241-5.
39. Colleen S, Hovelius B, Winslander A, Mardh PA. Surface properties of *S. saprophyticus* and *S. epidermidis* as studied by adherence test and two-polymer, aqueous phase systems. Acta path microbial Immunol Scand. 1979;87b:321-8.
40. Mardh PA, Colleen S, Hovelius B. Attachment of bacteria to exfoliated cells from the urogenital tract. Invest Urol. 1979;16:322-6.
41. Hussain Z, Stoakes L, Stevens DL, Schieven BC, Lannigan R and Jones C. Comparison of the MicroScan system with the "API Staph-Ident" system for species identification of coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol. 1986;23:126-8.
42. Konemann EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Diagnóstico microbiológico: texto e Atlas colorido. 5ª ed. Medsi, 2001.
43. McTaggart LA & Elliott TSJ. Is resistance to novobiocin a reliable test for confirmation of the identification of *Staphylococcus saprophyticus*?. J Med Microbiol. 1989;30:253-66.
44. Cunha MLRS, Lopes CAM. Estudo da produção de beta-lactamase e sensibilidade às drogas em linhagens de estafilococos coagulase-negativos isolados de recém-nascidos. J Bras de Patol e Med Laboratorial. 2002;38(4):281-90.
45. Large M, Stubbs E, Benn R, Beard-Pegler MA, Harbour C, Vickery AM. A study of coagulase-negative staphylococci isolated from clinically significant infections at an Australian teaching hospital. Pathology. 1989;21:19-22.
46. Rupp ME & Archer GL. Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. Clin Infect Dis. 1994;19:231-45.

47. Guirguitzova B, Chancova D, Zozikov B. The Staphylococci as uropathogens, frequency of isolation in hospitalized patients and sensitivity to antimicrobiol agents. *Ann Urol* 2002;36(5):341-7.
48. Alcaráz LE, Satorres SE, Lucero RM, Puig de Centorbi ON. Species identification, slime production and oxacillin susceptibility in coagulase-negative Staphylococci isolated from nosocomial specimes. *Braz J Microbiol.* 2003;34(1):45-51.
49. Barrett SP, Savage MA, Rebec MP, Guyot A, Andrews N, Shrimpton SB. Antibiotic sensitivity of bacteria associated with community acquired urinary tract infection in Britain. *J Antimicrob Chemother.* 1999;44:359-65.
50. Lee BK, Crossley K, Gerding DN. The association between *Staphylococcus aureus* bacteremia and bacteriuria. *Am J Med.* 1978;65:303-6.
51. Coll PP, Crabtree BF, O'Connor PJ, Klenzak S. Clinical risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteriuria in a skilled-care nursing home. *Arch Fam Med.* 1994;3:357-60.
52. Araki M, Kariyama R, Monden K, Tsugawa M, Kunon H. Molecular epidemiological studies of *Staphylococcus aureus* in urinary tract infection. *J Infect Chemother.* 2002;8:167-74.
53. Euzéby J. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *Int. J Syst Evol Microbiol.* 2010;60:469-72
54. Sakai H, Procop GW, Kobayashi N, Togawa D, Wilson DA, Borden L, Krebs V and Bauer TW. 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. *J clin microbiol.* 2004;42(12):5739-44.
55. Weckman, BG & Catlin BW. Deoxyribonuclease activity of micrococci from clinical sources. *J Bacteriol.* 1957;73:747-53.
56. DiSalvo, JW. Deoxyribonuclease and coagulase activity of micrococci. *Med Tech Bull U S Armed Forces Med.* 1958;9:191.
57. Kloos WE & Bannerman TL. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* 1994;7:117-40.
58. Kloos WE & Bannerman TL. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In PR Murray, EJ Baron, MA Tenover, FC Tenover, RH Tenover, RH Tenover (eds), *Manual of Clinical Microbiology*, American Society Microbiology, Washington; 1995. p. 282-98.
59. Lark RL, Chenoweth C, Saint S, Zemencuk JK, Lipsky BA, Plorde JJ. Four year prospective evaluation of nosocomial bacteremia: epidemiology, microbiology, and patient outcome. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2000;38:131-40.
60. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld A. S. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and Similar Organisms. In: Bayiley & Scott's *Diagnostic Microbiology*, 11 ed. Mosby: USA, 2002.

61. Kloos WE & Schleifer KH. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol.* 1975;1:82-8.
62. Weinstein MP, Mirrett S, Pelt LV, Mckinnon M, Zimmer L, Kloos W and Reller LB. Clinical importance of identifying coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures: evaluation of MicroScan rapid and dried overnight gram-positive panels versus a conventional reference method. *J of Clinical Microbiol.* 1998;36(7):2089-92.
63. Bannerman TL, Kleeman, KT, Kloos WE. Evaluation of the Vitek Systems gram-positive identification card for species identification of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol.* 1993;31:1322-5.
64. Perl T M, Rhomberg PR, Bale MJ, et al. Comparasion of identification systems for *S. epidermidis* and other coagulase-negative staphylococcus species. *Diag Microbiol Infect Dis.* 1994;18:151-5.
65. Cunha MLRS, Sinzato YK, Silveira LVA. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative staphylococci. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99(8):855-60.
66. Bannerman TL. *Staphylococcus, Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In PR Murray, EJ Baron, JH Jorgensen, MA Pfaller, RH Tenover, R Tenover (eds), *Manual of Clinical Microbiology*, American Society Microbiology, Washington, 2003 p. 384-404.
67. Daffonchio D, Cherif A, Brusetti L, Rizzi A, Mora D, Boudabous A, Borin S. Nature of Polymorphisms in 16S-23S rRNA Gene Intergenic Transcribed Spacer Fingerprinting of *Bacillus* and Related Genera. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69:5128-37.
68. Barry T, Colleran G, Glennon M, Dunican LK, Gannon F. The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods Appl.* 1991;1:51-6.
69. Jensen MA, Webster JA, Straus N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA polymorphism. *Appl Environ Microbiol.* 1993;59:945-52.
70. Gürtler V & Stanisich VA. New approaches to typing and identification of bacteria using 16S–23S rDNA spacer region. *Microbiology.* 1996;142:3-16.
71. Gürtler V. The role of recombination and mutation in 16S-23S rDNA spacer rearrangement. *Gene.* 1999;238:241-52.
72. Kawamura Y, Hou XG, Sultana F, Hirose H, Miyake M, Shu S, Ezaki T. Distribution of *Staphylococcus* species among human clinical species and emended description of *Staphylococcus caprae*. *J Clin Microbiol.* 1998;36:2038-42.
73. Maes N, De Gheldre Y, De Ryck R, Vaneechoutte M, Meugnier H, Etienne J, Struelens MJ. Rapid and accurate identification of *Staphylococcus* species by rRNA intergenic spacer length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol.* 1997;35:2477-81.

74. Kostman JR, Edlind TD, LiPuma JJ, Stull TL. Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. J Clin Microbiol. 1992;30:2084-7.
75. Gürtler V. Typing of *Clostridium difficile* strains by PCR-amplification of variable length 16S-23S rDNA spacer regions. J Gen Microbiol. 1993;139:3089-97.
76. Mendoza M, Meugnier H, Bes M, Etienne J, Freney J. Identification of *Staphylococcus* species by 16S-23S rDNA intergenic spacer PCR analysis. Int J Syst Bacteriol. 1998;48:1049-55.
77. Shittu A, Lin J, Morrison D, Kolawole D. Isolation and molecular characterization of multiresistant *Staphylococcus sciuri* and *Staphylococcus haemolyticus* associated with skin and soft-tissue infections. J Med Microbiol. 2004;53:51-5.
78. Fujita SI, Senda Y, Iwagami T, Hashimoto T. Rapid Identification of Staphylococcal Strains from Positive-Testing Blood Culture Bottles by Internal Transcribed Spacer PCR followed by Microchip Gel Electrophoresis. J Clin Microbiol. 2005;43:1149-57.
79. Grant CE, Sewell DL, Pfaller M, Bumgardner RV, Williams JA. Evaluation of two commercial systems for identification of coagulase-negative Staphylococci to species level. Diagn Microbiol Infect Dis. 1994;18:1-5.
80. Spanu T, Sanguinetti M, Ciccagione D, D'Inzeo T, Romano L, Leone F, Fadda G. Use of the VITEK 2 system for rapid identification of clinical isolates of staphylococci from bloodstream infections. J Clin Microbiol. 2003;41:4259-63.
81. Couto I, Pereira S, Miragaia M, Sanches IS, Lencastre H. Identification of Clinical Staphylococcal Isolates from Humans by Internal Transcribed Spacer PCR. J Clin Microbiol. 2001;39:99-103.
82. Oren I & Merzbach D. Clinical and epidemiological significance of species identification of coagulase-negative staphylococci in a microbiological laboratory. Isr J Med Sci. 1990;26:125-8.
83. Lowy FD & Hammer SM. *Staphylococcus epidermidis* infections. Ann Intern Med. 1983;99:834-9.
84. Herchline TE & Ayers LW. Occurrence of *Staphylococcus lugdunensis* in consecutive clinical cultures and relationship of isolation. J Clin Microbiol. 1991;29:419-2.
85. Low DE, Schmidt BK, Kirpalani HM, Moodie R, Kreiswirth B, Matlow A. An endemic strain of *Staphylococcus haemolyticus* colonizing and causing bacteremia in neonatal intensive care unit patients. Pediatrics. 1992;89:696-700.
86. Michelin L, Michelim L, Lahude M, Araújo PR, Giovanaz DSH, Müller G, Delamare APL, Costa SOP, Echeverrigaray S. Pathogenicity factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus epidermidis* associated with nosocomial infections occurring in intensive care units. Braz J Microbiol. 2005;36:17-23.

87. Lyytikäinen O, Vaara M, Järviluoma E, Rosenqvist K, Tiittanen L, Valtonen V. Increased resistance among *Staphylococcus epidermidis* isolates in a large teaching hospital over a 12-year period. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1996;15(2):133-8.
88. De Giusti M, et al. Phenotypic detection of nosocomial *mecA*-positive coagulase-negative staphylococci from neonates. *J Infect Chemother*. 1999;44:351-8.
89. Huebner J & Goldmann DA. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annu Ver Med*. 1999;50:223-36.
90. Tavares W. Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Anti-infecciosos. 3<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atheneu, 2001.
91. Medeiros AA. Evolution and dissemination of  $\beta$ -lactamases accelerated by generations of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Clin Infec Dis*. 1997;24 (1):19-45.
92. Jarlov JO, Sorensen CB, Espersen F, Mortensen I, Hougaard DM and Rosdahl VT. Evaluation of different methods for the detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *J Antimicrob Chemother*. 1997;40:241-9.
93. Enrigh MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *PNAS*. 2002;99(11):7687-92.
94. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44:1549-55.
95. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Louie T, Conly JM. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clinical Microbiol*. 2005;43:5026-33.
96. Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43:1449-58.
97. 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*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:1955-63.
98. Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist Updat*. 2003;6:41-52.
99. Hiramatsu, K., Watanabe, S., Takeuchi, F., Ito, T. & Baba, T. Genetic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. 2004: Vaccine 22 (Suppl. 1), S5–S8.

100. McCulloch JA. Avaliação da funcionalidade do locus accessory gene regulator (*agr*) em cepas de *Staphylococcus aureus* brasileiras com suscetibilidade reduzida aos glicopeptídeos. [Tese de Doutorado] São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP; 2006.
101. Hiramatsu K, Longzhu CUI, Kuroda M, Ito K. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends in Microbiol. 2001;9(10):486-93.
102. Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K, Takeuchi F. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48:2637-51.
103. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*): Guidelines for Reporting Novel SCC*mec* Elements. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53:4961-67.
104. Hanssen A & Sollid JUE. SCC*mec* in staphylococci: genes on the move. FEMS Immunol Med Microbiol. 2006;46:8-20.
105. Shore A, Rossney AS, Keane CT, Enrigh MC, Coleman DC. Seven novel variants of the staphylococcal chromosomal cassette *mec* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Ireland. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:2070-83.
106. Tomasz A, Nachman S, Leaf H. Stable classes of phenotypic expression in methicillin resistant clinical isolates of staphylococci. Antimicrob Agents Chemother. 1991;35:124-9.
107. Rossi F & Andreazzi DB. Resistência bacteriana: Interpretando o antibiograma. São Paulo: Editora Atheneu, 2005
108. McDougal LK & Thornsberry, C. The role of the  $\beta$ -lactamases in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. J Clin Microbiol. 1986;23:832-9.
109. Tomasz A, Drugeon HB, Lencastre HM, Jabes D, McDougal LK, Bille J. New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. Antimicrob Agents Chemother. 1989;33:1869-74.
110. Caierão J, Musskopf M, Superti S, Roesch E, Dias CG, d'Azevedo PA. Evaluation of phenotypic methods for methicillin resistance characterization in coagulase-negative Staphylococci (CNS). J Med Microbiol. 2004;53:1195-9.
111. Graham JC. Comparison of PCR detection of *mecA* with methicillin and oxacillin disc susceptibility testing in coagulase-negative staphylococci. J Antimicrob Chemother. 2000;45:111-13.
112. Fiebelkorn KR, Crawford SA, McElmeel ML and Jorgensen JH. Practical Disk Diffusion Method for Detection of Inducible Clindamycin Resistance in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci. J Clin Microbiol. 2003;41:4740-44.

113. Quetglas EG, Perea JRA, Rada BSD, Aldea IG. Farmacologia de antimicrobianos utilizados em el tratamiento de las infecciones graves por bacterias gram positivas. Rev Esp Quimioterap. 2003;16(3):277-88.
114. Oliveira GA, Faria JB, Levy CE, Mamizuka EM. Characterization of the Brazilian endemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from hospitals throughout Brazil. Braz J Infect Dis. 2001;4(5):163-70.
115. Nunes APF, Teixeira LM, Iorio NLP, Bastos CCR, Fonseca LS, Souto-Padrón T, Santos KRN. Heterogeneous resistance to vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus warneri* clinical strains: characterization of glycopeptide susceptibility profiles and cell wall thickening. Int J Antimicrob Agents. 2006;27:307-15.
116. Hussain Z, Stoakes L, John MA, Garrow S and Fitzgerald V. Detection of methicillin resistance in primary blood culture isolates of coagulase-negative staphylococci by PCR, slide agglutination, disk diffusion, and a commercial method. J Clin Microbiol. 2002;40(6):2251-53.
117. Cauwelier B, Gordts B, Descheemaeker VAN, Landuyt H. Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30 µg) for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Eur J Clin Microbiol. 2004;6:389-92.
118. York MK, Gibbs L, Chehab F and Brooks GF. Comparison of PCR detection of *mecA* with standard susceptibility testing methods to determine methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. J of Clinical Microbiol. 1996;34(2):249-53.
119. Hussain Z, Stoakes L, Massey V, Diagre D, Fitzgerald V, Sayed SE and Lannigan R. Correlation of oxacillin MIC with *mecA* gene carriage in coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol. 2000;38(2):752-54.
120. Antunes ALS, Secchi C, Reiter KC, Perez LRR, Freitas ALP, d'Azevedo PA. Evaluation of oxacillin and cefoxitin disks for detection of resistance in coagulase-negative staphylococci. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102(6):719-23.
121. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) 2004. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing, 14th information supplement. M100-S14. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
122. Swenson JM. & Tenover FC. Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp. J Clin Microbiol. 2005;43(8):3818-23.
123. Frigatto EAM, Machado AMO, Pignatari ACC, Gales AC. Is the cefoxitin disk test reliable enough to detect oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci? J Clin Microbiol. 2005;(4):2028-29.
124. Palazzo ICV & Darini ALC. Evaluation of methods for detecting oxacillin resistance in coagulase-negative Staphylococci including cefoxitin disc diffusion. FEMS Microbiol Lett. 2006;257:299-305.

125. Chandran AU, Rennie R. Routine antimicrobial susceptibility testing of coagulase-negative Staphylococci isolated from blood cultures: is it necessary? *Clin Microbiol Infect Dis.* 2005;11:1037-40.
126. Weinstein MP, Towns ML, Quartey SM, Mirret S, Reimer LG, Parmigiani G, Reller LB. The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s: a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults. *Clin Infect Dis.* 1997;24:584-602.
127. Fisher LD & Belle GV. *Biostatistics: a methodology for health science.* New York: John Wiley; 1993. p. 991.
128. Baker, J.S. Comparison of various methods for differentiation of staphylococci and micrococci. *J Clin Microbiol.* 1984;19:875-9.
129. Trabulsi, LR, Castro AFP, Ceballos BSO, Jaramillo HF, Candeias JAN, Cornejo LCZ. *Microbiologia.* 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1989.
130. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2008. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing, 18th information supplement. M100-S18. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
131. MacLowry JD & Marsh HH. Semi-automatic microtechnique for antibiotic sensitivity testing in the clinical laboratory. *J Lab Clin Med.* 1968;72:685-7.
132. Gerlach EH. Microdilution, a comparative study: current techniques for antibiotic susceptibility testing. Balows A, editor. Springfield (II): Charles C. Thomas; 1974. p. 63-76.
133. Barry AL. *The antimicrobial susceptibility test, principles and practices.* Philadelphia (PA): Lea and Febiger; 1976.
134. Ghoshal U, Prasad KN, Singh M, Tiwari DP, Ayyagari A. A comparative evaluation of phenotypic and molecular methods for the detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *J Infect Chemother.* 2004;10:86-9.
135. Murakami K, Minamide K, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1991;29:2240-44.
136. Kearns AM, Seiders PR, Wheeler J, Freeman R, Steward M. Rapid detection of methicillin-resistant Staphylococci by multiplex PCR. *J Hosp Infect.* 1999;43:33-7.
137. Oliveira D.C. & de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(7):2155-61.
138. Milheiro C, Oliveira DC, de Lencastre H. Update to the Multiplex PCR Strategy for Assignment of *mec* Element Types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:3374-7.

139. Machado ABMP, Reiter KC, Paiva RM, Barth AL. Distribution of staphylococcal cassette chromosome *mec* (*SCCmec*) types I,II,III, and IV in coagulase-negative staphylococci from patients attending a tertiary hospital in southern Brazil. *J of Medical Microbiol.* 2007;56:1328-33.
140. Fletcher RH, Fletcher SW, Wagner EH, Diagnóstico. In: Fletcher, R.H., Fletcher, SW, Wagner, EH, eds., *Epidemiologia Clínica*, Porto Alegre: Artes Médicas, 3, 1991, p.68-107.
141. Braoios A, Turatti TF, Meredija LCS, Campos TRS, Denadai FHM. Infecções do trato urinário em pacientes não hospitalizados: etiologia e padrão de resistência aos antimicrobianos. *J Bras Patol Med Lab.* 2009;45(6):449-6.
142. Higashide M, Kuroda M, Omura CTN, Kumano M, Ohkawa S, Ichimura S, Ohta T. Methicillin-Resistant *Staphylococcus saprophyticus* Isolates Carrying Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Have Emerged in Urogenital Tract Infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:2061-68.
143. Nicolle LE, Hoban SA, Harding GK. Characterization of coagulase-negative staphylococci from urinary tract specimens. *J Clin Microbiol.* 1983;17:267-71.
144. Hovelius B & Mardh P. *Staphylococcus saprophyticus* as a Common Cause of Urinary Tract Infections. *Rev infect dis.* 1984;6(3):328-37.
145. Rao JG, Qamruddin AO, Hassan IA, Burnie JP, Ganner M: Cluster of clinical isolates of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (EMRSA) with a negative deoxyribonuclease (DNase) test-implications for laboratory diagnosis and infection control. *J Hos Infec.* 2002;51(3):238-9.
146. Kateete D, Kimani CN, Katabazi FA, Okeng A, Okee MS, Nanteza A, Joloba ML, Najjuka FC. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2010; 9:23.
147. Bello CSS & Qahtani A. Pitfalls in the routine diagnosis of *Staphylococcus aureus*. *Afr J Biotechnol.* 2005;4:83-6.
148. Cunha MLRS, Rugolo LMSS, Lopes CAM. Study of virulence factors in coagulase-negative staphylococci isolated from newborns. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101(6):661-8.
149. D'Azevedo PA, Souza AG, Santos AF, Sales T, Neto TC, Pignatari AC. Suscetibilidade à novobiocina na identificação de amostras de *Staphylococcus* coagulase negativos (SCoN) isolados de hemoculturas. *Rev Bras Anal Clin.* 2007;39(4):303-4.
150. Caierão J, Muskopf M, Superti S, Dias CG, d'Azevedo PA. Automated systems in the identification and determination of methicillin resistance among coagulase negative staphylococci. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101(3):277-9.
151. Ieven M, Verhoeven J, Pattyn SR, Goossens H. Rapid and Economical Method for Species Identification of Clinically Significant Coagulase-Negative Staphylococci. *J clin microbiol.* 1995;33(5):1060-3.

152. Kim M, Heo SR, Choi SH, Kwon H, Park JS, Seong MW, Lee DH, Park KU, Song J, Kim EC. Comparison of the MicroScan, VITEK 2, and Crystal GP with 16S rRNA sequencing and MicroSeq 500 v2.0 analysis for coagulase-negative Staphylococci. *Bio Med Central Microbiology*. 2008;8:233.
153. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2010. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing, 20th information supplement. M100-S20. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
154. Kahlmeter, G. An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO.SENS project. *J Antimicrob Chemother*. 2003;51:69-76.
155. Gupta K, Sahm DF, Mayfield D, Stamm WE. Antimicrobial Resistance among Uropathogens That Cause Community-Acquired Urinary Tract Infections in Women: A Nationwide Analysis. *Clin Infect Dis*. 2001;33:89-94.
156. Camargo CBS, Pedro CC, Lourenço DS, Gironi RHA, Martinez R. Infecção de vias urinárias na comunidade de Ribeirão Preto-SP: Etiologia, sensibilidade bacteriana a antimicrobianos e implicações terapêuticas. *Medicina (Ribeirão Preto)*. 2002;35:173-8.
157. Higashide, M., M. Kuroda, S. Ohkawa, and T. Ohta. 2006. Evaluation of a cefoxitin disk diffusion test for the detection of *mecA*-positive methicillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus*. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;27:500-4.
158. Ramotar K, Woods W, Toye B. Oxacillin susceptibility testing of coagulase-negative staphylococci using the disk diffusion method and the Vitek GPS-105 card. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002;42:291-4.
159. Pereira VP, Martins A, Rugolo and Cunha MLRS. Detection resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from the neonatal and pediatric units a brazilian teaching hospital. *Clin Med Ped*. 2009;3: 23-31.
160. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing, 19th information supplement. M100-S19. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
161. Souza AL, Secchi C, Reiter KC, Rodrigues Perez LR, Peixoto de Freitas AL, Alves d'Azevedo P. Evaluation of oxacillin and cefoxitin disks for detection of resistance in coagulase negative staphylococci. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007;102:719-23.
162. Soderquist B & C. Berglund C. Methicillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus* in Sweden carries various types of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*). *Eur Soc of Clin Microbiol Infect Dis*. 2009;15:1170-91.
163. Latham RH, Zeleznik D, Minshew BH, Schoenknecht FD, Stamm WE. *Staphylococcus saprophyticus*  $\beta$ -Lactamase Production and Disk Diffusion Susceptibility Testing for Three  $\beta$ -Lactam Antimicrobial Agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 1984;26:670-2.

164. Pitkala A, Salmikivi L, Bredbacka P, Myllyniemi AL, Koskinen MT. Comparison of Tests for Detection of  $\beta$ -Lactamase-Producing Staphylococci. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2031-33.

*Anexos*

---

## Anexos

## Anexo A



Universidade Estadual Paulista  
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.  
CEP: 18.618-870  
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143  
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br  
e-mail coordenação: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de abril de 1997

Botucatu, 06 de outubro de 2008

Of. 416/08-CEP

Ilustríssima Senhora

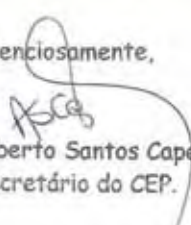
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria de Lourdes Ribeiro de Souza Cunha  
Departamento de Micro/Imuno do  
Instituto de Biociências de Botucatu.

Prezada Dr<sup>a</sup> Maria de Lourdes,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa "Comparação de métodos de identificação e perfil de resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus ssp* isolados de pacientes com infecção do trato urinário (ITU)", a ser conduzido por Adriano Martison Ferreira, orientado por Vossa Senhoria, recebeu do relator parecer favorável aprovado em reunião de 06 de outubro de 2.008.

Situação do Projeto: **APROVADO**. Apresentar Relatório Final de Atividades ao final da execução deste projeto.

Atenciosamente,

  
Alberto Santos Capelluppi  
Secretário do CEP.

January 2008

Vol. 28 No. 1

**Table 2C. Zone Diameter Interpretive Standards and Equivalent Minimal Inhibitory Concentration (MIC) Breakpoints for *Staphylococcus* spp.**

Testing Conditions		Minimal QC Recommendations (See Table 3 for acceptable QC ranges.)
<b>Medium:</b> Mueller-Hinton agar	Direct colony suspension, equivalent to a 0.5 McFarland standard	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923 <i>Escherichia coli</i> ATCC® 35218 (for $\beta$ -lactam/β-lactamase inhibitor combinations)
<b>Inoculum:</b> 35 ± 2 °C; ambient air; 16 to 18 hours; 24 hours for oxacillin, methicillin, nafcillin, and vancomycin. Testing at temperatures above 35 °C may not detect MRS.		
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® BAA-977 and <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® BAA-976 (for quality assessment of the clindamycin induction test)

#### General Comments

- (1) Historically, resistance to the penicillinase-stable penicillins (see Glossary 1) has been referred to as "methicillin resistance"; thus, the acronyms MRSA (for "methicillin-resistant *S. aureus*") or MRS (for "methicillin-resistant staphylococci") are still commonly used, even though methicillin is no longer the agent of choice for testing or treatment. In this document, resistance to these agents may be referred to using several terms (eg, "MRS," "methicillin resistance," or "oxacillin resistance").
- (2) Measure the diameter of the zones of complete inhibition (as judged by the unaided eye), including the diameter of the disk. Hold the petri plate a few inches above a black, nonreflecting background illuminated with reflected light, except for linezolid, oxacillin, and vancomycin, which should be read with transmitted light (plate held up to light source). The zone margin should be considered the area showing no obvious, visible growth that can be detected with the unaided eye. Ignore faint growth of tiny colonies that can be detected only with a magnifying lens at the edge of the zone of inhibited growth. With trimethoprim and the sulfonamides, antagonists in the medium may allow some slight growth; therefore, disregard slight growth (20% or less of lawn of growth) and measure the more obvious margin to determine the zone diameter. Any discernable growth within the zone of inhibition is indicative of oxacillin, linezolid, or vancomycin resistance.
- (3) For oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci, results for parenteral and oral cephalosporins, β-lactam/β-lactamase inhibitor combinations, and carbapenems, if tested, should be reported according to the results generated using routine interpretive criteria. See comment (4) for reporting β-lactam results on oxacillin-resistant strains.
- (4) **WARNING:** For oxacillin-resistant *S. aureus* and coagulase-negative staphylococci (MRS), other β-lactam agents, ie, penicillins, β-lactam/β-lactamase inhibitor combinations, cephalosporins, and carbapenems, may appear active *in vitro*, but are not effective clinically. Results for these drugs should be reported as resistant or should not be reported. This is because most cases of documented MRS infections have responded poorly to β-lactam therapy, or because convincing clinical data have yet to be presented that document clinical efficacy for those agents.
- (5) Detection of oxacillin resistance: Tests for *mecA* or the protein expressed by *mecA*, the penicillin-binding protein 2a (PBP 2a, also called PBP2'), are the most accurate methods for prediction of resistance to oxacillin and can be used to confirm disk test results for isolates of staphylococci from serious infections. Isolates of staphylococci that carry the *mecA* gene, or that produce PBP 2a (the *mecA* gene product), should be reported as oxacillin resistant. Isolates that do not carry *mecA* or do not produce PBP 2a should be reported as oxacillin-susceptible. Because of the rare occurrence of resistance mechanisms other than *mecA*, if MIC tests are performed in addition to disk diffusion, isolates for which oxacillin MICs are  $\geq 4$  μg/mL and are *mecA* negative or PBP 2a negative should be reported as oxacillin resistant. These isolates may test as susceptible to ceftiofur by disk diffusion.

- (6) Routine testing of urine isolates of *S. saprophyticus* is not advised, because infections respond to concentrations achieved in urine of antimicrobial agents commonly used to treat acute, uncomplicated urinary tract infections (eg, nitrofurantoin, trimethoprim ± sulfamethoxazole, or a fluoroquinolone).
- (7) For some organism/antimicrobial agent combinations, the absence or rare occurrence of resistant strains precludes defining any results categories other than "susceptible." For strains yielding results suggestive of a "nonsusceptible" category, organism identification and antimicrobial susceptibility test results should be confirmed. Subsequently, the isolates should be saved and submitted to a reference laboratory that will confirm results using a CLSI reference dilution method.
- (8) For screening tests for beta-lactamase production, oxacillin resistance, *mecA*-mediated oxacillin resistance using cefoxitin, reduced susceptibility to vancomycin, and inducible clindamycin resistance, refer to Appendix B for *Staphylococcus aureus* group and Appendix C for coagulase-negative staphylococci.

NOTE: Information in boldface type is considered tentative for one year.

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter, Nearest Whole mm		Equivalent MIC Breakpoints (µg/mL)			Comments
			R	S	R	R	S	
<b>PENICILLINS</b>								
A	Penicillin	10 units	≤ 28	≥ 29	β-lactamase	≤ 0.12		<p>(9) Penicillin-susceptible staphylococci are also susceptible to other penicillins, β-lactam/β-lactamase inhibitor combinations, cepheems, and carbapenems approved for use by the FDA for staphylococcal infections. Penicillin-resistant, oxacillin-susceptible strains are resistant to penicillinase-labile penicillins but susceptible to other penicillinase-stable penicillins, β-lactam/β-lactamase inhibitor combinations, relevant cepheems, and carbapenems. Oxacillin-resistant staphylococci are resistant to all currently available β-lactam antibiotics. Thus, susceptibility or resistance to a wide array of β-lactam antibiotics may be deduced from testing only penicillin and oxacillin. Routine testing of other penicillins, β-lactam/β-lactamase inhibitor combinations, cepheems, and carbapenems is not advised.</p> <p>See comment (4).</p> <p>(10) Penicillin-resistant, oxacillin-susceptible strains of <i>Staphylococcus aureus</i> produce β-lactamase, and the testing of the 10-unit penicillin disk instead of the ampicillin disk is preferred. Penicillin should be used to test the susceptibility of all β-lactamase-labile penicillins, such as ampicillin, amoxicillin, azlocillin, carbenicillin, mezlocillin, piperacillin, and ticarcillin. Likewise, a positive β-lactamase test (see M2-A9, Section 13.2) predicts resistance to these agents. For oxacillin-resistant staphylococci, report penicillin as resistant or do not report.</p>

Table 2C  
*Staphylococcus* spp.  
M2-Disk Diffusion

Table 2C. (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter, Nearest Whole mm			Equivalent MIC Breakpoints (µg/mL)		Comments
			R	I	S	R	S	
PENICILLINS (Continued)	Oxacillin	30 µg cefoxitin	≤ 21	-	≥ 22	≥ 4 (oxacillin)	≤ 2	For <i>S. aureus</i> and <i>S. lugdunensis</i> . For <i>S. aureus</i> . (11) For <i>S. aureus</i> , the cefoxitin disk test is comparable to the oxacillin disk test for prediction of <i>mecA</i> -mediated resistance to oxacillin; however, the cefoxitin disk test is easier to read and thus is the preferred method. For <i>S. lugdunensis</i> , only the cefoxitin disk test should be used. In this case, cefoxitin is used as a surrogate to report oxacillin. Based on the cefoxitin result, report oxacillin as susceptible or resistant (see Appendix B). (12) If oxacillin intermediate results are obtained for <i>S. aureus</i> , perform testing for <i>mecA</i> or PGP 2a; the cefoxitin disk test, an oxacillin MIC test, or the oxacillin-salt agar screening test. Report the result of the alternative test rather than the intermediate result. For coagulase-negative staphylococci except <i>S. lugdunensis</i> . For coagulase-negative staphylococci except <i>S. lugdunensis</i> .
		1 µg oxacillin	≤ 10	11-12	≥ 13	≥ 4	≤ 2	
		30 µg cefoxitin	≤ 24	-	≥ 25	≥ 0.5 (oxacillin)	≤ 0.25	(13) The cefoxitin disk test is the preferred method for testing coagulase-negative staphylococci. Although oxacillin interpretive criteria for coagulase-negative staphylococci correlate with the presence or absence of the gene encoding methicillin/oxacillin resistance ( <i>mecA</i> ) in <i>S. epidermidis</i> , these interpretive criteria may overcall resistance for other coagulase-negative staphylococci (eg, <i>S. saprophyticus</i> ). The cefoxitin disk test has higher specificity and equal sensitivity to the oxacillin disk test for coagulase-negative staphylococci. In this case, cefoxitin is used as a surrogate to report oxacillin. Based on the cefoxitin result, report oxacillin as susceptible or resistant (see Appendix C). (14) If a penicillinase-stable penicillin is tested, oxacillin is the preferred agent and results can be applied to the other penicillinase-stable penicillins, cloxacillin, dicloxacillin, and flucloxacillin. Oxacillin is more resistant to degradation in storage and is more likely to detect heteroresistant staphylococcal strains. Cloxacillin disks should not be used, because they may not detect oxacillin-resistant <i>S. aureus</i> . Cefoxitin may be tested instead of oxacillin. See comments (11), (12), (13), and (15).
		1 µg oxacillin	≤ 17	-	≥ 18	≥ 0.5	≤ 0.25	
							(15) For all staphylococci, read the oxacillin disk for light growth within the zone of inhibition using transmitted light (plate held up to light); any discernable growth within the zone of inhibition is indicative of oxacillin resistance. Read the cefoxitin disk using reflected light.	

Table 2C. (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter, Nearest Whole mm			Equivalent MIC Breakpoints (μg/ml)			Comments
			R	I	S	R	I	S	
<b>PENICILLINS (Continued)</b>									
O	Ampicillin	10 μg	≤ 28	-	≥ 29	β-lactamase			(16) Class representative for ampicillin and amoxicillin (17) For oxacillin-resistant staphylococci, report as resistant or do not report.
O	Methicillin	5 μg	≤ 9	10-13	≥ 14	≥ 16			(18) Disk diffusion breakpoints are for use with <i>S. aureus</i> only. See comment (14).
O	Nafcillin	1 μg	≤ 10	11-12	≥ 13	-			(19) Disk diffusion breakpoints are for use with <i>S. aureus</i> only. See comment (14).
<b>β-LACTAMASE INHIBITOR COMBINATIONS</b>									
O	Amoxicillin-clavulanic acid	20/10 μg	≤ 19	-	≥ 20	≥ 8/4			See comments (4) and (9).
O	Ampicillin-sulbactam	10/10 μg	≤ 11	12-14	≥ 15	≥ 32/16			(20) For oxacillin-resistant staphylococci, report as resistant or do not report.
O	Piperacillin-tazobactam	100/10 μg	≤ 17	-	≥ 18	≥ 16/4			
O	Ticarcillin-clavulanic acid	75/10 μg	≤ 22	-	≥ 23	≥ 16/2			
<b>CEPHEMS (PARENTERAL) (Including cephalosporins I, II, III, and IV. Please refer to Glossary I.)</b>									
O	Cefamandole	30 μg	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 32			See comments (4) and (9).
O	Cefazolin	30 μg	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 32			(21) For oxacillin-resistant staphylococci, report as resistant or do not report.
O	Cefepime	30 μg	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 32			
O	Cefmetazole	30 μg	≤ 12	13-15	≥ 16	≥ 64			
O	Cefonicid	30 μg	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 32			
O	Cefoperazone	75 μg	≤ 15	16-20	≥ 21	≥ 64			
O	Cefotaxime	30 μg	≤ 14	15-22	≥ 23	≥ 64			
O	Cefotetan	30 μg	≤ 12	13-15	≥ 16	≥ 64			
O	Ceftazidime	30 μg	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 32			
O	Ceftiozone	30 μg	≤ 14	15-19	≥ 20	≥ 32			
O	Ceftiozone (parenteral)	30 μg	≤ 13	14-20	≥ 21	≥ 64			
O	Cefuroxime (parenteral)	30 μg	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 32			
O	Cephalothin	30 μg	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 32			
O	Moxalactam	30 μg	≤ 14	15-22	≥ 23	≥ 64			
<b>CEPHEMS (ORAL)</b>									
O	Cefaclor	30 μg	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 32			See comments (4) and (9).
O	Cefdinir	5 μg	≤ 16	17-19	≥ 20	≥ 4			(22) For oxacillin-resistant staphylococci, report as resistant or do not report.
O	Cefpodoxime	10 μg	≤ 17	18-20	≥ 21	≥ 8			
O	Cefprozil	30 μg	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 32			
O	Cefuroxime (oral)	30 μg	≤ 14	15-22	≥ 23	≥ 32			
O	Loracarbef	30 μg	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 32			

Table 2C  
*Staphylococcus* spp.  
M2-Disk Diffusion

Table 2C  
Staphylococcus spp  
M2-Disk Diffusion

Table 2C. (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter, Nearest Whole mm			Equivalent MIC Breakpoints (µg/mL)			Comments
			R	I	S	R	I	S	
<b>CARBAPENEMS</b>									
O	Ertapenem	10 µg	≤ 15	16-18	≥ 19	≥ 8		≤ 2	See comment (9). (23) For oxacillin-resistant staphylococci, report as resistant or do not report.
O	Imipenem	10 µg	≤ 13	14-15	≥ 16	≥ 16		≤ 4	
O	Meropenem	10 µg	≤ 13	14-15	≥ 16	≥ 16		≤ 4	
<b>GLYCOPEPTIDES</b>									
B	Vancomycin	30 µg	*	*	≥ 15			≤ 2	(24) All staphylococcal isolates for which vancomycin zone diameters are 14 mm or less should be tested by a reference MIC method. The disk diffusion procedure will not differentiate strains with reduced susceptibility to vancomycin (MICs 4 to 8 µg/mL) from susceptible strains (MIC range 0.5 to 2 µg/mL) even when incubated for 24 hours. Additionally, vancomycin-resistant <i>S. aureus</i> (VRSA) strains (MICs ≥ 16 µg/mL) may produce only subtle growth around a vancomycin disk. A BHI vancomycin agar screen plate containing 6 µg/mL of vancomycin may be inoculated to enhance the sensitivity of detecting vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant strains of <i>S. aureus</i> (see Appendix B).
						≥ 32		≤ 8	
<b>AMINOGLYCOSIDES</b>									
Inv.	Teicoplanin	30 µg	≤ 10	11-13	≥ 14	≥ 32		≤ 8	
<b>C</b>									
	Gentamicin	10 µg	≤ 12	13-14	≥ 15	≥ 8		≤ 4	
	Amikacin	30 µg	≤ 14	15-16	≥ 17	≥ 32		≤ 16	
O	Kanamycin	30 µg	≤ 13	14-17	≥ 18	≥ 25		≤ 6	
O	Neostimicin	30 µg	≤ 12	13-14	≥ 15	≥ 32		≤ 12	
O	Tobramycin	10 µg	≤ 12	13-14	≥ 15	≥ 8		≤ 4	
<b>MACROLIDES</b>									
A	Azithromycin or clarithromycin or erythromycin	15 µg	≤ 13	14-17	≥ 18	≥ 8		≤ 2	(25) Not routinely reported on isolates from the urinary tract.
A		15 µg	≤ 13	14-17	≥ 18	≥ 8		≤ 2	
O	Dithromycin	15 µg	≤ 13	14-22	≥ 23	≥ 8		≤ 0.5	
<b>KETOLIDES</b>									
B	Telithromycin	15 µg	≤ 15	16-18	≥ 19	≥ 8		≤ 2	
			≤ 18	19-21	≥ 22	≥ 4		≤ 1	

Table 2C. (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk	Zone Diameter, Nearest Whole mm			Equivalent MIC			Comments
			S	I	S	R	S		
B	Tetracycline	30 µg	≤ 14	15-18	≥ 19	≥ 16	≥ 16	≤ 4	(26) Organisms that are susceptible to tetracycline are also considered susceptible to doxycycline and minocycline. However, some organisms that are intermediate or resistant to tetracycline may be susceptible to doxycycline or minocycline or both.
	Doxycycline	30 µg	≤ 12	13-15	≥ 16	≥ 16	≥ 16	≤ 4	
	Minocycline	30 µg	≤ 14	15-18	≥ 19	≥ 16	≥ 16	≤ 4	
<b>FLUOROQUINOLONES</b>									
C	Ciprofloxacin or levofloxacin or ofloxacin	5 µg	≤ 15	16-20	≥ 21	≥ 4	≥ 4	≤ 1	
		5 µg	≤ 15	16-18	≥ 19	≥ 4	≥ 4	≤ 1	
C	Moxifloxacin	5 µg	≤ 20	21-23	≥ 24	≥ 2	≥ 2	≤ 0.5	
U	Lomefloxacin	10 µg	≤ 18	19-21	≥ 22	≥ 8	≥ 8	≤ 2	
U	Norfloxacin	10 µg	≤ 12	13-16	≥ 17	≥ 16	≥ 16	≤ 4	
O	Enoxacin	10 µg	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 8	≥ 8	≤ 2	(28) FDA-approved for <i>S. saprophyticus</i> and <i>S. epidermidis</i> (not <i>S. aureus</i> ).
O	Gatifloxacin	5 µg	≤ 19	20-22	≥ 23	≥ 2	≥ 2	≤ 0.5	
O	Grepafloxacin	5 µg	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 4	≥ 4	≤ 1	
O	Sparfloxacin	5 µg	≤ 15	16-18	≥ 19	≥ 2	≥ 2	≤ 0.5	
Inv.	Fleroxacin	5 µg	≤ 15	16-18	≥ 19	≥ 8	≥ 8	≤ 2	
<b>NITROFURANTOINS</b>									
U	Nitrofurantoin	300 µg	≤ 14	15-16	≥ 17	≥ 128	≥ 128	≤ 32	

Table 2C  
*Staphylococcus* spp.  
M2-Disk Diffusion

*Staphylococcus* spp.  
M2-Disk Diffusion

Table 2C. (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter, Nearest Whole mm			Equivalent MIC Breakpoints (µg/mL)			Comments
			R	I	S	R	S		
<b>LINCOSAMIDES</b>									
A	Clindamycin	2 µg	≤ 14	15-20	≥ 21	≥ 4	≤ 0.5	(29) Macrolide-resistant isolates of <i>S. aureus</i> and coagulase-negative <i>Staphylococcus</i> spp. may have constitutive or inducible resistance to clindamycin (methylation of the 23S rRNA encoded by the <i>erm</i> gene also referred to as MLS <sub>B</sub> [macrolide, lincosamide, and type B streptogramin] resistance) or may be resistant only to macrolides (efflux-mechanism encoded by the <i>mecA</i> gene). Inducible clindamycin resistance can be detected using a disk approximation test by placing a 2-µg clindamycin disk from 15 mm to 26 mm away from the edge of a 15-µg erythromycin disk as part of the normal disk diffusion procedure. Following incubation, organisms that do not show flattening of the clindamycin zone should be reported as clindamycin susceptible. Organisms that show flattening of the clindamycin zone adjacent to the erythromycin disk (referred to as a "D" zone) indicate inducible clindamycin resistance. Such isolates should be reported as "clindamycin resistant." <b>Organisms that show hazy growth throughout the zone of inhibition around the clindamycin disk should be reported as clindamycin resistant, whether or not they show a D-zone.</b> A comment that "This isolate is presumed to be resistant based on detection of inducible clindamycin resistance. Clindamycin may still be effective in some patients." may be included. For quality control/quality assessment recommendations, refer to Table 3.	
<b>FOLATE PATHWAY INHIBITORS</b>									
A	Trimethoprim-sulfamethoxazole	1.25/23.75 µg	≤ 10	11-15	≥ 16	≥ 8/152	≤ 2/38	See comment (25).	
U	Sulfonamides	250 or 300 µg	≤ 12	13-16	≥ 17	≥ 350	≤ 100	(30) The sulfisoxazole disk can be used to represent any of the currently available sulfonamide preparations.	
U	Trimethoprim	5 µg	≤ 10	11-15	≥ 16	≥ 16	≤ 4		
<b>PHENICOLS</b>									
C	Chloramphenicol	30 µg	≤ 12	13-17	≥ 18	≥ 32	≤ 8	See comment (25).	
<b>ANSAMYCINS</b>									
B	Rifampin	5 µg	≤ 16	17-19	≥ 20	≥ 4	≤ 1	(31) Rx: Rifampin should not be used alone for antimicrobial therapy.	
<b>STREPTOGRAMINS</b>									
C	Quinupristin-dalfopristin	15 µg	≤ 15	16-18	≥ 19	≥ 4	≤ 1		
<b>OXAZOLIDINONES</b>									
B	Linezolid	30 µg	-	-	≥ 21	-	≤ 4	See comment (7). (32) When testing linezolid, disk diffusion zones should be examined using transmitted light. Organisms with nonsusceptible results should be confirmed using an MIC method.	