

Detecção da produção de slime por estafilococos coagulase-negativa isolados de cateter venoso central.

Bernardi, A.C.A.^{1*}; Pizzolitto, E.L.²; Pizzolitto, A.C.²

¹Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde. Bacteriologia Clínica, Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, SP, Brasil.

²Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, SP, Brasil.

Recebido 24/05/07 / Aceito 23/08/07

RESUMO

A produção de *slime* é um importante fator de virulência dos estafilococos coagulase-negativa, permitindo-lhes aderir sobre as superfícies lisas de biomateriais, e por isso, é associada aos processos de infecção de implantes. No presente estudo a produção de *slime* em 27 cepas de estafilococos coagulase-negativa foi investigada por cultura em ágar vermelho Congo (77,7% de positividade), método espectrofotométrico ou da microplaca (81,4% de positividade) e microscopia eletrônica de varredura (88,9% de positividade). Foi também avaliada a resistência de estafilococos coagulase-negativa a vários antimicrobianos usando a técnica do disco difusão. A porcentagem de resistência à penicilina G, oxacilina, eritromicina, clindamicina e gentamicina em estafilococos produtores de *slime* foi respectivamente de 88,9%; 70,4%; 81,5%; 66,7% e 59,2%; todos os estafilococos coagulase-negativa foram vancomicina sensíveis. As cepas isoladas de cateter venoso central foram identificadas por método convencional e sistema API Staph. Os 27 estafilococos coagulase-negativa foram identificados como: *S. saprophyticus* (3,7%), *S. xylosus* (7,4%), *S. haemolyticus* (14,8%), *S. epidermidis* (37,0%), *S. warneri* (14,8%), *S. lugdunensis* (7,4%), *S. hominis* (7,4%), *S. schleiferi* (3,7%) e *S. chromogenes* (3,7%). Pode-se concluir que entre a maioria das espécies *Staphylococcus* coagulase-negativa houve associação entre a produção de *slime*, origem nosocomial das cepas e reduzida sensibilidade aos antimicrobianos, sugerindo potencial patogênico no ambiente hospitalar.

Palavras-chave: estafilococos coagulase-negativa; *slime*; fatores de virulência; polissacarídeo extracelular; biofilme; sensibilidade aos antimicrobianos.

INTRODUÇÃO

Os estafilococos coagulase-negativa representam o maior componente da microbiota cutânea e por viverem em equilíbrio com esse ecossistema foram descritos como

protótipo de microrganismos avirulentos (Menichetti, 2005). Os estafilococos coagulase-negativa podem ser divididos em dois grupos de acordo com a sensibilidade ou resistência a novobiocina; os estafilococos sensíveis incluem: *Staphylococcus epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* e *S. lugdunensis*; entre os resistentes: *S. saprophyticus* e *S. xylosus* (Heilmann & Peters, 2000; von Eiff et al., 2002). Considerados por longo tempo como contaminantes inofensivos, recentemente, emergiram como capazes de causar várias infecções humanas, que freqüentemente conduzem a uma infecção persistente, principalmente após cirurgia de implantes; também, são responsáveis por doenças em pacientes imunocomprometidos (Vandenesch et al., 1995; Arciola et al., 2002; Costerton et al., 1999; Costerton et al., 2005). Algumas espécies produzem um muco ou *slime* (polissacarídeo extracelular) que permite a bactéria aderir às superfícies, sendo importante para a colonização. A produção de *slime* é considerado um fator de virulência (Tenover et al., 1988; Veenstra et al., 1996; Vuong & Otto, 2002). O *slime* pode reduzir também a resposta imune aos fagócitos, interferindo com os mecanismos de defesa do hospedeiro.

Vários estudos mostraram que os estafilococos coagulase-negativa produzem esta substância extracelular durante crescimento sobre superfícies inertes, como biomateriais, facilitando a aderência e a formação do biofilme (Christensen et al., 1982; Pfaller et al., 1988; Costerton et al., 1999; Vuong & Otto, 2002). A formação do biofilme pode ser determinada por diferentes métodos, sendo com mais freqüência demonstrada pelo da microplaca, que avalia espectrofotometricamente o filme bacteriano corado. Outro método utiliza o ágar vermelho Congo (Christensen et al., 1982; Baselga et al., 1993), para identificar estafilococos produtores de *slime*, o qual baseia-se no cultivo de estafilococos sobre um meio de ágar sólido, suplementado com o corante vermelho Congo, sendo os estafilococos classificados como produtores ou não produtores de *slime*. Ainda, pode-se avaliar a habilidade dos microrganismos em produzir biofilme sobre superfície abiótica, por meio do microscópio eletrônico de varredura (Pizzolitto, 1997). Este método permite observar os microrganismos agrupados sobre

*Autor correspondente: Adilson A. C. Bernardi - Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde. Bacteriologia Clínica - Centro Universitário de Araraquara, UNIARA - Rua Voluntários da Pátria, 1309 - Caixa Postal 68 - CEP: 14801-320 - Araraquara - SP, Brasil - Telefone: (16) 3301-7100 - E-mail: acabernardi@uniara.com.br

a superfície do biomaterial, após cultura em meio líquido.

Os objetivos deste estudo foram identificar os estafilococos coagulase-negativa isolados de cateter venoso central, investigar a produção de *slime* usando três diferentes métodos, determinar o padrão de resistência destes microrganismos contra diferentes antimicrobianos e estabelecer uma provável relação entre estes fatores e a produção do *slime*.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepas bacterianas

Foram examinadas 27 cepas de estafilococos coagulase-negativa isoladas de cateter venoso central removido de pacientes que receberam atendimento em Unidade de Terapia Intensiva de um hospital no interior do Estado de São Paulo. Este estudo teve a permissão do Comitê de Ética daquele hospital (ProcF300903).

Os estafilococos foram identificados, de acordo com o método modificado por Kloos & Bannerman (1999); adaptado por Bernardi et al. (2001), Murray et al. (2003) e MacFaddin (2000), observando-se as características morfotintoriais da colônia (coloração de Gram) e as provas bioquímico-fisiológicas (produção da catalase; resistência a bacitracina, novobiocina e polimixina; teste da coagulase livre e ligada; atividade de *pyrrolidonyl-naphthylamide*-PYR e a utilização dos carboidratos: sacarose, manose, trealose, manitol, celobiose, maltose e xilose); seguindo-se confirmação pelo sistema *API Staph* (bio-Mérieux-Jacarépagua, Rio de Janeiro-RJ, Brasil). Para realização deste estudo foram incluídas cepas padrão de estafilococos (*S. epidermidis* - ATCC 35984) produtor de slime e (*S. epidermidis* - ATCC 12228) não produtor de *slime*.

Detecção da produção de *slime*

Os estafilococos coagulase-negativa foram avaliados quanto à produção do slime concomitantemente por três métodos:

Ágar vermelho Congo

No método desenvolvido por Freeman et al. (1989) o meio de cultura denominado ágar vermelho Congo é constituído de caldo infusão cérebro-coração 37g/L, sacarose 50g/L, ágar 10g/L e corante vermelho Congo 0,8g/L. O corante vermelho Congo foi preparado como solução aquosa concentrada, autoclavado separadamente a 121°C por 15 minutos, sendo adicionado ao ágar quando este atingiu a temperatura de 55°C. Os estafilococos coagulase-negativa foram semeados sobre o meio por esgotamento com alça bacteriológica, incubados em aerobiose a 35-37°C por 24 horas e após, deixados em temperatura ambiente por mais 18 horas. Os estafilococos que produziram colônias negras foram considerados *slime* positivo, enquanto que as colônias

que mostraram cor vermelha foram consideradas *slime* negativo.

Espectrofotométrico

A determinação quantitativa foi realizada por método espectrofotométrico, descrito por Christensen et al. (1985), usando placas de cultura de tecidos com 96 poços e fundo em U. As cepas de estafilococos coagulase-negativa foram inoculadas em tubos contendo 3,0mL de caldo triptona soja complementado com 0,25% de glicose e incubados a 35-37°C, em estufa bacteriológica, por uma noite. Após este período esta cultura foi diluída e padronizada no mesmo meio para conter 10⁵ unidades formadoras de colônias por mL. A seguir, alíquotas de 0,2mL desta suspensão foram transferidas para cada um dos poços da placa de poliestireno esterilizada e estas foram incubadas por 18 horas a 37°C. Após este período, o conteúdo de cada poço foi aspirado com uma pipeta automática multicanal e foram lavadas quatro vezes com 0,2mL de tampão fosfato salina pH 7,2. A secagem da placa foi realizada em estufa a 60°C por uma hora. A seguir, os poços foram corados com solução de Cristal Violeta de Gram por um minuto, lavados com água de torneira e a seguir, adicionada solução a 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS). A densidade óptica (D.O.) dos biofilmes bacterianos aderidos e corados foi lida com o auxílio de um leitor para ELISA em comprimento de onda de 570nm. Caldo triptona soja (TSB) esterilizado foi usado como controle negativo. As leituras foram realizadas em triplicata e os valores da densidade óptica foram tomados como a média das leituras.

A intensidade de cor azul nos poços da placa de poliestireno, indicou aderência bacteriana e foi agrupada em três categorias sendo classificadas de acordo com a reação de aderência em: não aderente (D.O. ≤0,120nm), fracamente aderente (D.O. 0,120 a 0,240nm) e fortemente aderente (D.O. ≥0,240nm) (Christensen et al., 1985).

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A produção *in vitro* de *slime* foi verificada utilizando-se segmentos de cateter esterilizados representando uma superfície abiótica, como descrito por Pizzolitto (1997). Os estafilococos foram inoculados isoladamente em tubos cônicos (Falcon-CORNING) contendo caldo Mueller Hinton e um segmento de 0,5cm de cateter venoso central de Vialon (Código 384917, 14GX30cm, i-Cath B-D®). Esses tubos foram incubados em agitação constante a 100 rpm/37°C por 72 horas. Após esse período os segmentos de cateter foram retirados e imersos em solução de glutaraldeído 2,5%; fixados em uma série de álcoois (15, 30, 50, 70, 90 e 100%) por 15 minutos cada um respectivamente; secos em centrifuga a vácuo (DNA mini WIKA HETO LAB Equipment) por cinco minutos; metalizados com ouro e montados em suportes metálicos e observados em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-T330A), para evidenciação da formação do biofilme.

Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Para o teste de sensibilidade aos antimicrobianos os estafilococos foram suspensos em caldo triptonsoja e a suspensão foi ajustada para uma turbidez equivalente a 0,5 da escala de MacFarland. O teste de sensibilidade foi realizado usando a técnica do disco difusão (Bauer et al., 1966). Os estafilococos foram categorizados como sensíveis, moderadamente sensíveis e resistentes, baseados no critério de interpretação desenvolvido pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (2000). Foram usados os seguintes antimicrobianos: Eritromicina (ERI/15mcg), Clindamicina (CLI/2mcg), Cloranfenicol (CLO/30mcg), Ciprofloxacina (CIP/5mcg), Gentamicina (GEN/10mcg), Levofloxacina (LVX/5mcg), Oxacilina (OXA/1mcg), Penicilina G (PEN/10unid), Rifampicina (RIF/30mcg), Sulfazotrim (SUT/25mcg), Teicoplanina (TEC/30mcg), Tetraciclina (TET/30mcg), Vancomicina (VAN/30mcg)

RESULTADOS

Identificação de estafilococos coagulase-negativa

A Tabela 1 mostra a identificação por espécie dos 27 estafilococos coagulase-negativa isolados de ponta de cateter venoso central.

Produção de slime

Os resultados dos testes estão mostrados na Tabela 2. A porcentagem de produção de *slime* por estafilococos coagulase-negativa, caracterizada como positiva usando os métodos de ágar vermelho Congo, espectrofotométrico e microscopia eletrônica de varredura foi respectivamente: 77,7%; 81,4% e 88,9%.

A Figura 1 mostra em ilustração o resultado da produção de *slime* por espécies de estafilococos coagulase-negativa usando o método espectrofotométrico.

Tabela 1 - Identificação das 27 cepas de estafilococos coagulase-negativa.

Espécies de estafilococos coagulase-negativa	Total isolados	Porcentagem
<i>S. epidermidis</i>	10	37,1
<i>S. haemolyticus</i>	4	14,8
<i>S. warneri</i>	4	14,8
<i>S. xylosum</i>	2	7,4
<i>S. lugdunensis</i>	2	7,4
<i>S. hominis</i>	2	7,4
<i>S. saprophyticus</i>	1	3,7
<i>S. schleiferi</i>	1	3,7
<i>S. chromogenes</i>	1	3,7
TOTAL	27	100

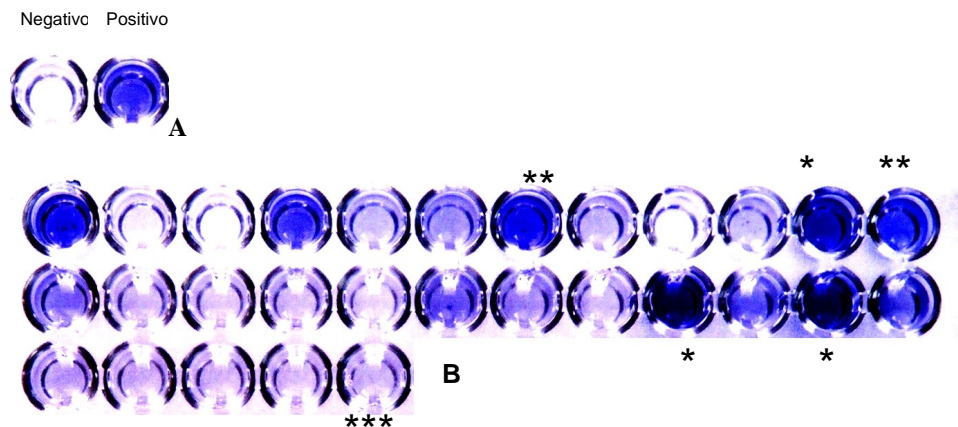


Figura 1. A: controle negativo à esquerda (*S. epidermidis*-ATCC12228) e controle positivo à direita (*S. epidermidis*-ATCC35984). B: na placa de poliestireno, a variação da intensidade da cor indica: cor azul escuro*=forte produção de *slime* ou bactéria fortemente aderente; azul mais claro**=fraca produção de *slime* ou bactéria fracamente aderente e, azul transparente***=não produtor de *slime* ou bactéria não aderente.

Produção de slime por estafilococos isolados de cateter

Tabela 2 - Distribuição por métodos ágar vermelho Congo-AVC, espectrofotométrico-ESP e microscopia eletrônica de varredura-MEV na produção de *slime* por estafilococos coagulase-negativa.

Espécie	Nº de isolados	Identificação laboratorial	AVC ¹	ESP ²	MEV ³
<i>S. chromogenes</i>	01	C ₁	Negra	Forte	Negativa
<i>S. epidermidis</i>	10	E ₁	Negra	Forte	Positiva
		E ₂	Negra	Forte	Positiva
		E ₃	Negra	Forte	Positiva
		E ₄	Negra	Forte	Positiva
		E ₅	Negra	Forte	Positiva
		E ₆	Negra	Forte	Positiva
		E ₇	Negra	Forte	Positiva
		E ₈	Negra	Forte	Positiva
		E ₉	Negra	Forte	Positiva
		E ₁₀	Negra	Forte	Positiva
<i>S. haemolyticus</i>	04	Ha ₁	Negra	Fraca	Positiva
		Ha ₂	Negra	Forte	Positiva
		Ha ₃	Negra	Forte	Negativa
		Ha ₄	Negra	Forte	Positiva
<i>S. hominis</i>	02	Ho ₁	Vermelha	Fraca	Positiva
		Ho ₂	Vermelha	Fraca	Positiva
<i>S. lugdunensis</i>	02	L ₁	Vermelha	Forte	Positiva
		L ₂	Vermelha	Forte	Positiva
<i>S. saprophyticus</i>	01	Sa ₁	Vermelha	Forte	Positiva
<i>S. schleiferi</i>	01	Sc ₁	Vermelha	Fraca	Positiva
<i>S. xylosus</i>	02	X ₁	Negra	Forte	Positiva
		X ₂	Negra	Forte	Positiva
<i>S. warneri</i>	04	W ₁	Negra	Fraca	Negativa
		W ₂	Negra	Forte	Positiva
		W ₃	Negra	Forte	Positiva
		W ₄	Negra	Forte	Positiva

Legenda: AVC¹=ágar vermelho Congo; ESP²=espectrofotômetro; MEV³=microscopia eletrônica de varredura.

O *slime* foi detectado em todos os isolados clínicos de *S. epidermidis* nas provas do AVC, ESP e MEV.

A Figura 2 (A-C) mostra em micrografia eletrônica de varredura o slime caracterizado por uma massa amorfa que envolve as células bacterianas aderidas entre si formando um agrupamento, como indicado pela flecha. O biofilme apresenta o aspecto da matriz de polissacarídeo extracelular em pseudo tridimensional.

A Tabela 3 mostra a distribuição da produção de *slime* e resistência aos agentes antimicrobianos entre as 27 cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativa. Entre as 10 cepas *S. epidermidis*, 90,0% foram resistentes a eritromicina, oxacilina, penicilina G e 80,0% a gentamicina. Entre as quatro cepas *S. haemolyticus*, 100,0% foram resistentes a eritromicina, gentamicina, penicilina G e 75,0% a oxacilina. Entre as quatro

cepas *S. warneri*, 75,0% foram resistentes a eritromicina, 50,0% a gentamicina, 75,0% a oxacilina e 100,0% a penicilina G.

Os resultados do teste de sensibilidade aos antimicrobianos estão mostrados na Tabela 4. A porcentagem de resistência dos estafilococos coagulase-negativa contra os agentes antimicrobianos eritromicina, gentamicina, oxacilina e penicilina G foi respectivamente 81,5%; 59,3%; 70,4% e 88,9%.

DISCUSSÃO

A espécie de estafilococos coagulase-negativa mais isolada de microbiota normal, bem como de amostras clínicas é o *S. epidermidis* (Heilmann & Peters, 2000; De Paulis et al., 2003).

Produção de slime por estafilococos isolados de cateter

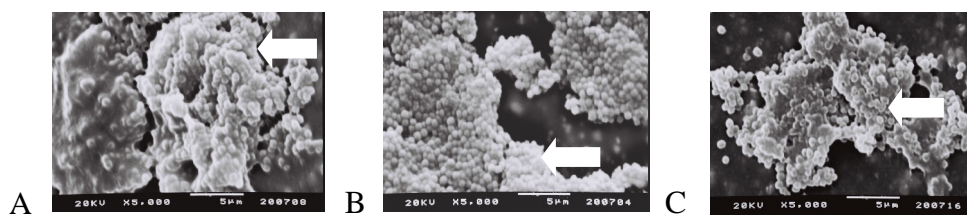


Figura 2. Micrografia eletrônica de varredura (5000X) mostra a formação de biofilme e produção de *slime* observada como massa amorfa sobre superfície abiótica em: (A) *S. epidermidis*; (B) *S. xylosus*; (C) *S. hominis*.

Tabela 3 - Distribuição da produção de *slime* e resistência aos agentes antimicrobianos entre as 27 cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativa.

Microrganismos	Produção de <i>slime</i>			Resistência aos antimicrobianos	
	AVC ¹	ESP ²	MEV ³		
<i>S. chromogenes</i>	C ₁	+	+	-	CIP, CLI, ERI, LVX, OXA, PEN, SUT, TEC
<i>S. epidermidis</i>	E ₁	+	+	+	CIP, CLI, CLO, ERI, GEN, LVX, OXA, PEN, TET
	E ₂	+	+	+	Não houve
	E ₃	+	+	+	CLI, ERI, GEN, OXA, PEN, RIF, TET
	E ₄	+	+	+	CIP, CLI, CLO, ERI, GEN, LVX, OXA, PEN, RIF, SUT
	E ₅	+	+	+	CLI, CLO, ERI, GEN, LVX, OXA, PEN, RIF, SUT
	E ₆	+	+	+	CIP, CLI, CLO, ERI, GEN, LVX, OXA, PEN, RIF, SUT
	E ₇	+	+	+	CIP, CLI, ERI, GEN, LVX, OXA, PEN, RIF, SUT
	E ₈	+	+	+	CIP, ERI, LVX, OXA, PEN, SUT
	E ₉	+	+	+	CIP, CLI, CLO, ERI, GEN, OXA, PEN, RIF, SUT, TET
	E ₁₀	+	+	+	CIP, CLI, CLO, ERI, GEN, OXA, PEN, RIF, SUT
<i>S. haemolyticus</i>	H _{a1}	+	+	+	CIP, CLI, ERI, GEN, LVX, PEN, SUT, TET
	H _{a2}	+	+	+	CIP, ERI, GEN, LVX, OXA, PEN, SUT, TEC, TET
	H _{a3}	+	+	-	CIP, CLI, CLO, ERI, GEN, LVX, OXA, PEN, RIF, SUT, TET
	H _{a4}	+	+	+	CIP, CLI, ERI, GEN, LVX, OXA, PEN, SUT,
<i>S. hominis</i>	H _{o1}	-	+	+	PEN
	H _{o2}	-	+	+	PEN, SUT, TET
<i>S. lugdunensis</i>	L ₁	-	+	+	Não houve
	L ₂	-	+	+	CIP, CLI, CLO, ERI, GEN, LVX, OXA, PEN,
<i>S. saprophyticus</i>	S _{a1}	-	+	+	CIP, CLI, CLO, ERI, LVX, OXA, PEN, SUT, TET
<i>S. schleiferi</i>	S _{c1}	-	+	+	CLI, ERI
<i>S. xylosus</i>	X ₁	+	+	+	CIP, CLI, CLO, ERI, LVX, OXA, PEN, SUT
	X ₂	+	+	+	ERI, PEN,
<i>S. warneri</i>	W ₁	+	+	-	CLI, ERI, GEN, OXA, PEN, SUT, TET
	W ₂	+	+	+	ERI, PEN
	W ₃	+	+	+	CLI, ERI, GEN, OXA, PEN, TEC
	W ₄	+	+	+	CIP, CLO, LVX, OXA, PEN

Legenda: +=positivo (produziu *slime*); -=negativo (não produziu *slime*); CIP = Ciprofloxacina, CLI = Clindamicina, CLO = Cloranfenicol, ERI = Eritromicina, GEN = Gentamicina, LVX = Levofloxacina, OXA = Oxacilina, PEN = Penicilina G, RIF = Rifampicina, SUT = Sulfazotrim, TEC = Teicoplanina, TET = Tetraciclina, VAN = Vancomicina.

Tabela 4 - Perfil de sensibilidade e resistência aos antimicrobianos das 27 cepas de *Staphylococcus coagulase-negativa*.

Microrganismos	ANTIMICROBIANOS												
	CIP	CLI	CLO	ERI	GEN	LVX	OXA	PEN	RIF	SUT	TEC	TET	VAN
C ₁	R	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	S
E ₁	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S
E ₂	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E ₃	S	R	S	R	R	S	R	R	R	S	S	R	S
E ₄	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
E ₅	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
E ₆	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
E ₇	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
E ₈	R	S	S	R	S	R	R	R	S	R	S	S	S
E ₉	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S
E ₁₀	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S
Ha ₁	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S	R	S
Ha ₂	R	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S
Ha ₃	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
Ha ₄	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S
Ho ₁	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
Ho ₂	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	S
L ₁	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
L ₂	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
Sc ₁	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Sa ₁	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S
X ₁	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S
X ₂	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S
W ₁	S	R	S	R	R	S	R	R	S	R	S	R	S
W ₂	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S
W ₃	S	R	S	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S
W ₄	R	S	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S

Legenda: C₁ = *Staphylococcus chromogenes*, E₁-E₁₀ *Staphylococcus epidermidis*, Ha₁-Ha₄ *Staphylococcus haemolyticus*, Ho₁-Ho₂ *Staphylococcus hominis*, L₁-L₂ *Staphylococcus lugdunensis*, Sc₁ = *Staphylococcus schleiferi*, Sa₁ = *Staphylococcus saprophyticus*, X₁-X₂ = *Staphylococcus xylosus*, W₁-W₂ = *Staphylococcus warneri*; CIP = Ciprofloxacina, CLI = Clindamicina, CLO = Cloranfenicol, ERI = Eritromicina, GEN = Gentamicina, LVX = Levofloxacina, OXA = Oxacilina, PEN = Penicilina G, RIF = Rifampicina, SUT = Sulfazotrim, TEC = Teicoplanina, TET = Tetraciclina, VAN = Vancomicina.

No presente estudo, os resultados de identificação das bactérias isoladas de cateter venoso central mostraram que 37,0% eram *S. epidermidis*, seguido de outras espécies como *S. haemolyticus* (14,8%), *S. warneri* (14,8%), *S. lugdunensis* (7,4%), *S. hominis* (7,4%), *S. xylosus* (7,4%), *S. chromogenes* (3,7%), *S. saprophyticus* (3,7%) e *S. schleiferi* (3,7%), como mostrado na Tabela 1. A distribuição das espécies para *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* foi consistente com Hussain et al. (2000), Petinaki et al. (2001) e Alcaráz et al. (2003).

Dentre a maioria das infecções atribuídas a estas bactérias estão, as hospitalares que tem como fonte de contaminação a pele e as mucosas e, como porta de entrada o cateter intravascular. Ainda, segundo De Paulis et al. (2003) a identificação de estafilococos coagulase-negativa é muito

importante para o conhecimento das características fisiopatológicas, clínicas e em estudos epidemiológicos. Algumas cepas, deste microrganismo, produzem uma substância extracelular, como se fosse um muco, chamada de *slime* (Turkyilmaz & Esklizmirliler 2006).

A produção de *slime* é encontrada em cepas de estafilococos associados com a infecção, envolvendo cateteres intravasculares ou biomateriais (Christensen et al., 1985; Kloos & Bannerman, 1994; O'Gara & Humphreys, 2001) e vários métodos para detectar os microrganismos aderidos a superfícies têm sido usados (Christensen et al., 1985; Ludwicka et al., 1985; Zufferey et al., 1988; Freeman et al., 1989; Donlan et al., 2001; Johannes et al., 2002).

Neste estudo (Tabela 2), 27 cepas de estafilococos coagulase-negativa, isoladas de cateter venoso central, foram

examinadas por três diferentes métodos, ágar vermelho Congo; espectrofotométrico e microscopia eletrônica de varredura, para detectar, nas bactérias estudadas, a produção de *slime* e formação de biofilme. As porcentagens de positividade em cada um dos testes, respectivamente, foi de 77,7%, 81,4% e 88,9%. A habilidade de produzir slime e formar biofilme entre as diversas espécies de estafilococos coagulase-negativa foi demonstrada por microscopia eletrônica de varredura (Figura 2). Os dados obtidos, no presente estudo, foram consistentes com Peters et al. (1982), Christensen et al. (1993), Kockro et al. (2000), Arciola et al. (2002), Bonaventura et al. (2004) que mostraram a produção de *slime* usando o mesmo método da microscopia eletrônica de varredura. As micrografias obtidas, no presente estudo, mostram que os estafilococos coagulase-negativa estão aderidos entre si e sobre a superfície do cateter formando agrupamentos celulares e envoltos em uma massa amorfa (*slime*).

Turkyilmaz & Esklímirliler (2006) estudaram a produção de *slime* em 180 cepas de *Staphylococcus* spp., isoladas de vários materiais clínicos, usando o método do ágar vermelho Congo (61,1%) e o teste da microplaca (55,5%), com resultados para este último, inferiores ao do presente estudo, em que todas as 10 cepas de *S. epidermidis* examinadas mostraram a produção de *slime*, por meio da intensidade da cor azul e registrada como aderente à placa de poliestireno (Figura 1). No entanto, algumas cepas coagulase-negativa não *S. epidermidis* não produziram *slime*, ou seja, não aderiram à placa de poliestireno, enquanto outras eram fortemente aderentes (Tabela 2), indicando que produção de *slime* varia com a espécie do *Staphylococcus*.

Em relação ao uso do método do ágar vermelho Congo, no presente estudo, 77,7% das cepas produziram *slime* (Tabela 2), dados consistentes com outros estudos (Christensen et al., 1982; Christensen et al., 1985; Peters et al., 1987).

Vários outros pesquisadores mostraram a relevância do teste do *slime* como marcador de infecções com estafilococos coagulase-negativa; assim, Christensen et al. (1982) relataram uma associação significativa entre a produção de *slime* e a infecção relacionada ao cateter. Também, concordantes com Christensen et al. (1985), Davenport et al. (1986), Dunne et al. (1987) e Younger et al. (1987) sustentaram a hipótese de que a produção de *slime* extracelular é um importante indicador de infecções associadas a implantes.

As bactérias associadas ao biofilme são a principal preocupação no tratamento das infecções relacionadas aos biomateriais devido a sua resistência a vários agentes antimicrobianos (Needham & Stempsey, 1984; Nickel et al., 1985; Davenport et al., 1986; Younger et al., 1987; Gottenbos et al., 2002).

Quanto ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos (Tabela 3) os resultados deste trabalho mostraram que as cepas *S. chromogenes*, *S. epidermidis* (E_1 , E_3 - E_{10}), *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis* (L_2), *S. saprophyticus*, *S. xylosus* (X_1), *S. warneri* (W_1 , W_3 , W_4) eram

multi-droga resistentes, de acordo com Davenport et al. (1986) que relataram a ligação entre a produção de *slime* e a resistência da infecção. Diaz-Mitoma et al. (1987) também encontraram uma relação entre a resistência aos antibióticos e a produção de *slime*. Arciola et al. (2002) relataram que a produção de *slime* está associada com a reduzida sensibilidade aos agentes antimicrobianos. No presente estudo, observou-se que cepas produtoras de *slime* (Tabela 3) apresentaram resistência a mais de cinco agentes antimicrobianos e foram consideradas cepas multirresistentes, isto pode estar relacionado à possível proteção dada aos microrganismos pela formação do biofilme. Mohan et al. (2002) observaram multi-droga resistência com mais de 90% de resistência para penicilina G, mais de 50% para cefalexina e ciprofloxacina e mais de 20% para oxacilina. A variabilidade nos padrões de sensibilidade e resistência, neste estudo, foram mais altos do que aqueles relatados por Goel et al. (1991), Pathak et al. (1994), Mohan et al. (2002) e Turkyilmaz & Esklímirliler (2006). A resistência máxima foi observada contra penicilina G (88,9%), seguida de eritromicina (81,5%), oxacilina (70,4%) e gentamicina (59,2%). Todos os estafilococos foram sensíveis a vancomicina. De acordo com Jaffe et al. (2000) nos últimos anos houve um aumento e emergência de cepas *Staphylococcus* coagulase-negativa resistentes ao antibiótico oxacilina, principalmente em hospitais. No presente estudo, as cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativa resistentes a oxacilina (70,4%) eram também produtoras de *slime* e foram isoladas de cateteres removidos de pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva, resultados concordantes com Louie et al. (2001) e Dickema et al. (2001) que relataram que mais 70% destes microrganismos em todo o planeta são resistentes a oxacilina. Estudos realizados no Brasil por Ferreira et al. (2003) mostraram freqüência de resistência a oxacilina de 64% entre os *Staphylococcus* coagulase-negativa isolados de diferentes amostras clínicas. Sader et al. (2001) relataram uma freqüência de 80% de resistência entre os *Staphylococcus* coagulase-negativa envolvidos nas infecções de corrente sanguínea. Dickinson & Archer (2000) relataram que a resistência a oxacilina envolve resistência cruzada com todos os antibióticos beta-lactâmicos.

Observou-se também, na presente pesquisa, que 81,5% das cepas *Staphylococcus* coagulase-negativa foram resistentes a eritromicina e 66,7% a clindamicina (Tabela 4), dados concordantes com Barberis et al. (2001) e comparável a Del'Alamo et al. (1999). Jorgensen et al. (2004) relataram que a resistência aos macrolídeos em estafilococos pode ser devido modificação do alvo ribossomal e está associada com o fenótipo de resistência macrolídeo-lincosamida-estreptogramina B e a resistência pode ser constitutiva ou induzida após a exposição ao macrolídeo.

Como conclusão, a maioria das espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa mostraram associação entre a produção de *slime*, origem das cepas e reduzida sensibilidade aos antimicrobianos, sugerindo potencial patogênico destes organismos no ambiente hospitalar.

ABSTRACT

Detection of slime production by coagulase-negative staphylococci isolated from central venous catheter

Slime production is an important virulence factor of coagulase-negative *Staphylococcus* spp., allowing them to attach to smooth surfaces of biomaterials, and it has been associated with infections of implanted medical devices. In the present study the production of slime capsules in 27 strains of coagulase-negative *Staphylococcus* was investigated by culture in Congo Red agar (77.7% positivity), spectrophotometric or microplate method (81.4% positivity) and scanning electron microscopy (88.9% positivity). The resistance of coagulase-negative strains of *Staphylococcus* to various antimicrobial agents was also determined by agar disk diffusion. The proportion of strains resistant to penicillin G, oxacillin, erythromycin, clindamycin and gentamicin among the slime-producing staphylococci was 88.9%, 70.4%, 81.5%, 66.7% and 59.2%, respectively; all of the coagulase-negative staphylococci were susceptible to vancomycin. The strains isolated from central venous catheters were identified by a conventional method and the API Staph system. The 27 coagulase-negative *Staphylococcus* strains were identified as: *S. saprophyticus* (3.7%), *S. xylosum* (7.4%), *S. haemolyticus* (14.8%), *S. epidermidis* (37.0%), *S. warneri* (14.8%), *S. lugdunensis* (7.4%), *S. hominis* (7.4%), *S. schleiferi* (3.7%) and *S. chromogenes* (3.7%). It can be concluded that in the most of the coagulase-negative *Staphylococcus* species there was an association between slime production, the nosocomial origin of the strains and reduced sensitivity to the antibiotics, suggesting a pathogenic potential in the hospital environment.

Keywords: coagulase-negative staphylococci; slime; virulence factors; extracellular polysaccharide; biofilm.

REFERÊNCIAS

Alcaráz LE, Satorres SE, Lucero RM, Centorbi ONP. Species identification, slime production and oxacillin susceptibility in coagulase-negative staphylococci isolated from nosocomial specimens. *Braz J Microbiol* 2003; 34:45-51.

Arciola CR, Campoccia D, Montanaro L. Detection of biofilm forming strains of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *Expert Rev Mol Diagn* 2002; 2:478-84.

Barberis IL, Pájaro MC, Godino SD, Pascual L, Daniele MD. Antimicrobial sensitivity and adherence study in strains of coagulase-negative *Staphylococcus* spp. *Rev Latinoam Microbiol* 2001; 43:109-13.

Baselga R, Albizu I, De La Cruz M, Del Cacho E, Barberan M, Amorena B. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implications in colonization and virulence. *Infect Immun* 1993; 61:4857-62.

Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966; 45:493-6.

Bernardi ACA, Pizzolitto EL, Pizzolitto AC. Identificação de cocos aeróbios Gram-positivos, catalase positiva com implicação em processos infecciosos. *Rev Ciênc Farm* 2001; 22:223-38.

Bonaventura GD, Spedicato I, Domenico DA, Robuffo I, Piccolomini R. Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia*: modulation by quinolones, trimethoprim-sulfamethoxazole and ceftazidime. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:151-60.

Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun* 1982; 37:318-26.

Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. Experimental foreign body infections in mice challenged with slime producing *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 1993; 38:407-19.

Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH. Adherence of coagulase-negative *Staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *Staphylococcus* to medical devices. *J Clin Microbiol* 1985; 22:996-1006.

Costerton JW, Montanaro L, Arciola CR. Biofilm in implant infections: its production and regulation. *Int J Artif Organs* 2005; 28:1062-8.

Costerton JW, Stewart P, Greenberg P. Bacterial Biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284:1318-22

Davenport DS, Massanari RM, Pfaller MA, Bale MJ, Streed SA, Hierholzer WJ. Usefulness of a test for slime production as a marker for clinically significant infections with coagulase negative staphylococci. *J Infect Dis* 1986; 153:332-9.

De Paulis AN, Predari S, Chazarreta CD, Santoianni JE. Five-test simple scheme for species-level identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 2003; 41:1219-24.

Del' Alamo L, Cereda RF, Tosin I, Miranda EA, Sader HS. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci and characterization of isolates with reduced susceptibility to glycopeptides. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 34:185-91.

Diaz-Mitoma FG, Harding GKM, Hoban DJ, Roberts RS, Low DE. Clinical significance of a test for slime production in ventriculoperitoneal shunts infections with coagulase negative staphylococci. *J Infect Dis* 1987; 156:555-60.

Dickema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, Beach M. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United

- States, Canada, Latin America, Europe and the Western Pacific region for the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997-1999. *Clin Infect Dis* 2001; 32:114-32.
- Dickinson TM, Archer GL. Phenotypic expression of oxacillin resistance in *Staphylococcus epidermidis*: Roles of *mecA* Transcriptional Regulation and resistant-subpopulation selection. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:1616-23.
- Donlan RM, Murga R, Bell M, Toscano CM, Carr JH, Novicki TJ, Zuckerman C, Corey LC, Miller JM. Protocol for detection of biofilm on needleless connectors attached to central venous catheters. *J Clin Microbiol* 2001; 39:750-3.
- Dunne WM, Nelson DB, Chusid MJ. Epidemiologic markers of pediatric infections caused by coagulase-negative staphylococci. *Pediatr Infect Dis* 1987; 6:1031-5.
- Ferreira RBR, Iorio NLP, Malvar KL, Nunes APF, Fonseca LS, Bastos CCR, Santos KRN. Coagulase-negative staphylococci: comparison of phenotypic and genotypic oxacillin susceptibility tests and evaluation of the agar screening test by using different concentrations of oxacillin. *J Clin Microbiol* 2003; 41:3609-14.
- Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol* 1989; 42:872-4.
- Goel MM, Singh AV, Mathur SK, Singhal S, Chaturvedi UC. Resistant coagulase negative staphylococci from clinical samples. *Indian J Med Res* 1991; 93:350-2.
- Gottenbos B, Busscher HJ, Van Der Mei HC. Pathogenesis and prevention of biomaterial centered infections. *J Mater Sc: Mater Med* 2002; 13:717-22.
- Heilmann C, Peters G. Biology and pathogenicity of *S. epidermidis*. In: Fischetti VA; Novick RP; Ferreti JJ; Portnoy DA; Rood JI *Gram-positive pathogens*. Washington, D.C.: ASM Press, 2000. p.442-9.
- Hussain Z, Stoakes L, Massey V, Diagre D, Fitzgerald V, El Sayed S, Lannigan R. Correlation of oxacillin MIC with *mecA* gene carriage in coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 2000; 38:752-4.
- Jaffe R, Lane JD, Albury SV, Niemeyer DM. Rapid extraction from and direct identification in clinical samples of methicillin-resistant staphylococci using the PCR. *J Clin Microbiol* 2000; 38:3407-12.
- Johannes KM, Knoblock M, Mathias A, Rohde H, Mack D. Evaluation of different methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol* 2002; 191:101-6.
- Jorgensen JH, Crawford SA, McElmeel ML, Fiebelkorn KR. Detection of inducible clindamycin resistance on staphylococci in conjunction with performance of automated broth susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 2004; 42:1800-2.
- Kloos WE, Bannerman TL. *Staphylococcus* and *Micrococcus* In: Murray P R; Baron EJ; Pfaller MA; Tenover FC; Tenover RH *Manual of clinical microbiology*. 7th.ed. Washington, D.C.: ASM Press, 1999. p.264.
- Kloos WE, Bannerman TL. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7:117-40.
- Kockro RA, Hamol JA, Jansen B, Peters G, Scheihing M, Giacomelli R, Kunze S, Aschoff A. Use of scanning electron microscopy to investigate the prophylactic efficacy of rifampin-impregnated CSF shunt catheters. *J Med Microbiol* 2000; 49:441-50.
- Louie L, Majury A, Goodfellow J, Louie M, Simor AE. Evaluation of a latex agglutination test (MRSA-Screen) for detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 2001; 39:4149-51.
- Ludwicka A, Switalski LM, Lundin A, Pulverer G, Wadstrom T. Bioluminescent assays for measurement of bacterial attachment to polyethylene. *J Microbiol Methods* 1985; 4:169-77.
- MacFaddin JF. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 3rd.ed. Philadelphia: Lawrence McGraw, Lippincott Williams & Wilkins, USA, 2000. 901p
- Menichetti F. Current and emerging serious Gram-positive infections. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 22-8.
- Mohan U, Jindal N, Aggarwal P. Species distribution and antibiotic sensitivity pattern of coagulase negative staphylococci isolate from various clinical specimens. *Indian J Med Microbiol* 2002; 20:45-6.
- Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. *Manual of clinical microbiology*. 8th.ed. Washington D.C.:ASM Press. 2003. v.1.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; 7th.ed. NCCLS document M2-A7. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- Needham CA, Stempsey W. Incidence, adherence, and antibiotic resistance of coagulase-negative *Staphylococcus* species causing human disease. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1984; 2:293-9.
- Nickel JC, Gristina AC, Costerton JW. Electron microscopy study of an infected Foley catheter. *Can J Surg* 1985; 28:50-4.
- O'Gara J, Humphreys H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *J Med Microbiol* 2001; 50:582-7.
- Pathak J, Udgaonkar U, Kulkarni RD, Pawan SW. Study of coagulase negative staphylococci and their incidence in human infections. *Indian J Med Microbiol* 1994; 12:90-5.
- Peters G, Locci R, Pulverer G. Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci and surfaces of intravenous catheters. *J Infect Dis* 1982; 146:479-82.

- Peters G, Schumacher-Perdreau F, Jansen B, Bey M, Pulverer G. Biology of *S. epidermidis* extracellular slime. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg 1 Abt* 1987; 16(Suppl):15-32.
- Petinaki E, Kontos F, Miriagou V, Maniati M, Hatzi F, Maniatis AN. Survey of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the hospitals of central Greece. *Int J Antimicrob Agents* 2001; 18:61-5.
- Pfaller MA, Davenport D, Bale M, Barret M, Koontz F, Massanari R. Development of the quantitative micro-test for slime production by coagulase negative staphylococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988; 7:30-3.
- Pizzolitto EL. *Contribuição ao estudo in vitro da corrosão induzida por microrganismos sobre liga metálica a base de cobre, de uso na Odontologia: modelo experimental com as cepas cariogênicas Streptococcus mutans e Streptococcus sobrinus*. [Tese] Araraquara: Instituto de Química, UNESP; 1997.
- Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, Mendes RE, Zocolli C, Barth A, Jones RN. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Braz J Infect Dis* 2001; 5:200-14.
- Tenover FC, Lancaster MV, Hill BC. Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. *J Clin Microbiol* 1988; 36:1020-7.
- Turkyilmaz S, Eklizmitliler S. Detection of slime factor production and antibiotic resistance in *Staphylococcus* strains isolated from various animal clinical samples. *Turk J Vet Anim Sci* 2006; 30:201-6.
- Vandenesch F, Eykyn S, Bes M, Meugnier H, Fleurette J, Ettiène J. Identification and ribotypes of *Staphylococcus caprae* isolated as human pathogens and from goat milk. *J Clin Microbiol* 1995; 33:888-92.
- Veenstra G, Cremers F, van Dijk H, Fleer A. Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesion of *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol* 1996; 178:537-41.
- von Eiff C, Peters G, Heilmann C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect Dis* 2002; 2:677-85.
- Vuong C, Otto M. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microb Infect* 2002; 4:481-9.
- Younger JJ, Christensen GD, Bartley DL, Simmons JCH, Barret FF. Coagulase-negative staphylococci isolated from cerebrospinal fluid shunts: importance of slime production, species identification and shunt removal to clinical outcome. *J Infect Dis* 1987; 156:548-54.
- Zufferey J, Rime B, Francioli P, Bille J. Simple method for rapid diagnosis of catheter-associated infections by direct Acridine orange staining of catheter tips. *J Clin Microbiol* 1988; 26:175-7.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.