

O valor da análise bioquímica de *Staphylococcus aureus* na determinação da sensibilidade à eritromicina

The value of biochemical analysis of Staphylococcus aureus determining erythromycin sensitivity

Alexandre S. Marcon ⁽¹⁾
Giovanni M. Travi ⁽¹⁾
Italo M. Marcon ⁽²⁾
Zélia M. Corrêa ⁽³⁾

RESUMO

Objetivo: O objetivo deste estudo foi calcular o valor da biotipagem na determinação da sensibilidade à eritromicina de múltiplos isolados de *Staphylococcus aureus* de conjuntiva e borda palpebral de olhos normais.

Métodos: Foram analisadas 42 amostras dessa bactéria, isoladas de 100 voluntários, através dos painéis *MicroScan® Pos-Combo type 6* (Dade International, West Sacramento, CA). As reações bioquímicas foram organizadas em tabela. O número do biotipo foi determinado através da adição de valores para cada reação, de acordo com as instruções do fabricante.

Resultados: O biotipo 317147 foi o mais prevalente (n = 19), com 11 isolados sensíveis à eritromicina e oito resistentes. Outros biotipos foram analisados: 317163 (n = 8), 317167 (n = 6), 317347 (n = 2), etc.

Conclusão: Concluiu-se que a biotipagem de maneira isolada não pode prever a sensibilidade à eritromicina para o biotipo 317147 de *S. aureus* (IC 95% de 0,29-0,087 para os sensíveis e de 0,08-0,76 para os resistentes).

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*; Eritromicina; MicroScan; Biotipagem.

INTRODUÇÃO

O *Staphylococcus aureus* é um dos principais isolados de conjuntiva normal do olho humano ^{1, 2} e importante agente etiológico de infecções oculares ³.

A eritromicina é um antimicrobiano do grupo dos macrolídeos cujo mecanismo de ação é uma inibição da síntese protéica bacteriana ⁴. Não há estudos quanto a sensibilidade à eritromicina do *Staphylococcus aureus* isolado de olhos normais.

A análise de múltiplos isolados de bactérias de uma mesma espécie pode determinar se os mesmos representam uma única ou múltiplas cepas. Tal fato reveste-se de importância tanto para o clínico quanto para o pesquisador. O primeiro pode desejar saber se diversos isolados de um mesmo paciente representa uma única cepa infecciosa ou múltiplos contaminantes. Já o pesquisador pode, a partir destas informações analisar os novos conhecimentos quanto à patogênese e à epidemiologia da infecção.

De maneira geral, o termo **isolado** refere-se a uma única colônia que presumidamente representa um único organismo e o termo cepa representa um conjunto de isolados que quando analisados por métodos de tipagem são indistinguíveis uns dos outros e podem ser diferenciados de outros isolados ⁵.

Esse trabalho foi realizado no Serviço de Oftalmologia da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre - Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre. Porto Alegre, RS, Brasil. Apresentado como Tema Livre no XIII Congresso Brasileiro de Prevenção da Cegueira e Reabilitação Visual (Setembro de 1998, Rio de Janeiro).

- ⁽¹⁾ Médicos residentes do segundo ano do Curso de Especialização em Oftalmologia da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA) - Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA). Porto Alegre, RS, Brasil.
- ⁽²⁾ Médico chefe do serviço e coordenador do Curso de Especialização em Oftalmologia da ISCMPA - FFFCMPA. Porto Alegre, RS, Brasil. Professor regente de oftalmologia da FFFCMPA, Porto Alegre, Brasil.
- ⁽³⁾ Médica chefe do departamento de retina e oncologia ocular do serviço de oftalmologia da ISCMPA - FFFCMPA. Porto Alegre, RS, Brasil.

Os autores declaram que não possuem interesse financeiro no desenvolvimento ou marketing dos instrumentos ou medicação referidos nesse estudo.

Endereço para correspondência: Alexandre S. Marcon. Av. Nilo Peçanha, 2421. Porto Alegre (RS) Brasil CEP 91330-001. E-mail: marcon@zaz.com.br

Uma maneira conveniente de classificar sistemas de tipagem é dividi-los em técnicas fenotípicas, como a biotipagem e a suscetibilidade antimicrobiana, que detectam características expressas pelo microrganismo, e técnicas genotípicas, que envolvem uma análise direta do DNA⁵. A biotipagem é o método mais rápido, direto e amplamente difundido⁵. Este método utiliza-se de um padrão de atividades metabólicas, classicamente utilizadas para taxonomia, expressas por um isolado e pode incluir reações bioquímicas específicas, morfologia colonial, e tolerância a fatores ambientais⁵.

Na maioria dos laboratórios clínicos de microbiologia, a biotipagem tem sido rotineira e fidedigna, utilizada através de métodos automatizados designados para a identificação de espécies^{5,6}.

O objetivo deste estudo foi calcular o valor de diversas análises bioquímicas (biotipagem) na determinação da sensibilidade à eritromicina de 42 amostras de *S. aureus* isoladas de conjuntiva e borda palpebral de olhos normais.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 42 amostras de *S. aureus*, isoladas da conjuntiva e borda palpebral de 100 voluntários hígidos, submetidas ao sistema automatizado MicroScan® (Dade International, West Sacramento, CA) de diagnóstico microbiológico através dos painéis *Pos-combo type 6* para a obtenção dos biotipos e do padrão de sensibilidade à eritromicina dessas bactérias.

O número do biotipo para os estafilococos, pelo método MicroScan®, é gerado pela designação de um valor numérico para todas as reações bioquímicas positivas dos painéis do sistema.

As reações são organizadas em forma de tabelas. Cada teste positivo da primeira linha recebe um valor de 4, os da linha abaixo um valor de 2 e cada um dos testes positivos da última linha recebe um valor de 1. O número do biotipo é determinado pela adição dos valores de cada reação de uma mesma coluna. Todas as reações negativas recebem o escore zero. Esse procedimento deverá ser repetido para todas as seis colunas para que o número do biotipo se complete. O biotipo será finalmente conhecido pela utilização dos números encontrados após a adição dos valores das colunas dispostos na ordem e que se encontraram após esse procedimento.

Os números dos biotipos são listados em ordem numérica. Cada biotipo é seguido por uma porcentagem estatística de certeza para a identificação do organismo encontrado. Todas as possíveis espécies para cada biotipo até uma probabilidade de 99.9% a 100% são listadas.

Os testes utilizados para a identificação dos microrganismos são, em ordem de cima para baixo em cada coluna, os seguintes: cristal violeta (CV), micrococus screen (MS) e nitrato (NIT) na primeira coluna; Novobiocina (NOV), PNP-β-D-glicuronida (PGR) e indoxil fosfatase (IDX) na segunda coluna; Voges-Proskauer (VP), optoquina (OPT) e fosfatase

(PHO) na terceira coluna; Bile esculina a 40% (BE), L-pirolidonil-β-naftilamida (PYR) e arginina (ARG) na quarta coluna; PNP-β-D-galactopiranosida (PGT), uréia (URE) e rafinose (RAF) na quinta coluna; Lactose (LAC), trealose (TRE) e manose (MNS) na sexta coluna.

Os valores de frequência derivam de uma lista de organismos baseada a partir da porcentagem de reações bioquímicas positivas. Cinco ou menos microrganismos com o maior valor de frequência com um ponto de corte pré-determinado são avaliados quanto à porcentagem de probabilidade. A determinação é baseada a partir da soma das frequências e após, dividindo a frequência de cada organismo pelo valor total⁷.

Para análise estatística utilizou-se o cálculo do intervalo de confiança.

RESULTADOS

Foram isoladas, biotipadas e testadas quanto a sensibilidade à eritromicina 42 amostras de *S. aureus* isoladas de conjuntiva e borda palpebral (Tabela 1).

Dezenove amostras eram do biotipo 317147; logo, foram positivas para as reações de MS, NIT, IDX, VP, OPT, PHO, ARG, PGT, LAC, TRE e MNS. Onze amostras sensíveis à eritromicina e oito amostras resistentes.

Oito amostras eram do biotipo 317163, positivas para as reações de MS, NIT, IDX, VP, OPT, PHO, ARG, PGT, URE, TRE e MNS. Sete amostras sensíveis à eritromicina e uma amostra com sensibilidade intermediária.

Seis amostras eram do biotipo 317167, positivas para MS, NIT, IDX, VP, OPT, PHO, ARG, PGT, URE, RAF, LAC, TRE e MNS. Quatro amostras sensíveis à eritromicina, uma amostra resistente e uma amostra com sensibilidade intermediária.

Dois amostras do biotipo 317347, positivas para MS, NIT, IDX, VP, OPT, PHO, PYR, ARG, PGT, LAC, TRE e MNS. Ambas resistentes à eritromicina.

Dois amostras eram do biotipo 317143, positivas para MS, NIT, IDX, VP, OPT, PHO, ARG, PGT, TRE e MNS. Ambas as amostras sensíveis à eritromicina.

Uma amostra era do biotipo 317367, positiva para MS, NIT, IDX, VP, OPT, PHO, PYR, ARG, PGT, URE, LAC, TRE e MNS. Esta amostra era sensível à eritromicina.

Uma amostra era do biotipo 327143, positiva para MS, NIT, PGR, VP, OPT, PHO, ARG, PGT, TRE e MNS. Apresentava-se sensível à eritromicina.

Uma amostra do biotipo 357163 era positiva para MS, NIT, PGR, VP, OPT, PHO, ARG, PGT, URE, TRE e MNS. Esta amostra apresentava resistência à eritromicina.

Uma amostra do biotipo 377147 era positiva para MS, NIT, NOV, PGR, IDX, VP, OPT, PHO, ARG, PGT, LAC, TRE e MNS. Amostra resistente à eritromicina.

Uma amostra do biotipo 317563 era positiva para MS, NIT, IDX, VP, OPT, PHO, BE, ARG, PGT, URE, TRE e MNS. Esta amostra apresentou-se sensível à eritromicina.

O biotipo mais prevalente foi o 317147. Das 42 amostras,

Tabela 1. Apresentação de resultados das reações bioquímicas relacionado ao biotipo, e resultados da resistência à eritromicina de amostras de *Staphylococcus aureus* isolados de conjuntiva e borda palpebral

Reações Bioquímicas																	E	Biotipo	N	
CV	MS	NIT	NOV	PGR	IDX	VP	OPT	PHO	BE	PYR	ARG	PGT	URE	RAF	LAC	TRE				MNS
-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	S	317147	11
-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	R	317147	8
-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	S	317163	7
-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	I	317163	1
-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	S	317167	4
-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	I	317167	1
-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	R	317167	1
-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	R	317347	2
-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	S	317143	2
-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	S	317367	1
-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	S	327143	1
-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	R	357163	1
-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	R	377147	1
-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	S	317563	1
Total																			42	

27 foram sensíveis à eritromicina, 13 resistentes e duas apresentaram sensibilidade intermediária. Não foi possível prever, com a biotipagem de maneira isolada, a sensibilidade à eritromicina para o biotipo 317147 de *S. aureus* (IC 95% de 0,29-0,087 para os sensíveis e de 0,08-0,76 para os resistentes).

DISCUSSÃO

A hipótese central motivadora dos estudos de tipagem é a de que isolados obtidos de uma cepa epidemiológica ou durante uma infecção em um único paciente são relacionados clonalmente, isto é, descendem diretamente de um precursor comum. Os sistemas de tipagem são baseados na premissa de que isolados clonalmente relacionados têm características em comum que podem diferenciá-los de espécies não relacionadas ⁵.

Não existe nenhum método considerado *gold standard* para julgar os métodos de tipagem ou para definir de maneira consistente os testes verdadeiro-positivos ou negativos ⁵.

Um estudo de cepas de *S. aureus* de animais comprovou uma próxima correlação entre a bioquímica, a sorologia e a fagotipagem o que, segundo os autores, substancia a utilidade prática da subdivisão dessas bactérias em biotipos ⁸.

Outro estudo com cepas de *S. aureus*, isoladas de diversas espécies de animais e de seres humanos refere, entre outras, que todas as cepas obtidas a partir de frangos, cães e pombos, e a maioria das cepas de bovinos, porcos e seres humanos eram classificáveis como pertencentes a diferentes biotipos. Os autores concluem que esses resultados dão suporte ao conceito da subdivisão das espécies de *S. aureus* em biotipos e ecotipos ⁹.

Em ambiente hospitalar foi realizado um estudo epidemiológico de *S. aureus*, combinando biotipagem e sensibilidade bacteriana a antibióticos. Os autores concluem que a análise da propagação de *S. aureus* multiresistentes, utilizando esses dois

métodos é efetiva na avaliação das medidas mais apropriadas para a contenção de uma endemia dessa bactéria ¹⁰.

Em uma análise com 5511 isolados de estafilococos de olhos, foi demonstrado que 93% dos *S. aureus* foram sensíveis a eritromicina ¹¹.

Em outro estudo foi realizada uma tipagem epidemiológica de estafilococos coagulase-negativo provenientes de infecções nosocomiais que incluía a biotipagem e antibiogramas. A biotipagem não foi considerada um bom marcador para cepas. Além disso, observaram algumas alterações nos padrões de sensibilidade de isolados de um mesmo paciente. Concluem que nenhum método de forma isolada comprovou ser inteiramente satisfatório e que a combinação de métodos de tipagem foi suficiente para evidenciar a correlação entre isolados de *S. epidermidis* de um mesmo paciente ¹².

Concluiu-se que a biotipagem de maneira isolada não pode prever a sensibilidade à eritromicina para o biotipo 317147 de *S. aureus* (IC 95% de 0,29-0,087 para os sensíveis e de 0,08-0,76 para os resistentes).

SUMMARY

Purpose: To assess the reliability of biochemical pattern (biotype) to determine erythromycin sensitivity of multiple *Staphylococcus aureus* isolates from the conjunctiva and lid margin of healthy eyes.

Methods: The authors analyzed 42 samples of *S. aureus*, isolated from 100 volunteers, through MicroScan® (Dade International, West Sacramento, CA) Pos-Combo type 6 panels. Biochemical reactions were organized in a table. The biotype number was determined by adding values of each reaction according to the manufacturer's instructions.

Results: Biotype 317147 was more prevalent (n = 19), 11 being sensitive to erythromycin and 8 resistant. Other

biotypes were analyzed: 317163 (n = 8), 317167 (n = 6), 317347 (n = 2), etc.

Conclusion: It was concluded that biotyping alone can not predict erythromycin sensitivity erythromycin sensibility for *S. aureus* biotype 317147 (CI 95%, 0.29-0.087 for sensible isolates and 0.08-0.76 for resistant isolates).

Keywords: *Staphylococcus aureus*; *MicroScan*; *Erythromycin*; *Biotyping*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cason MA, Winkler CH. Bacteriology of the eye: normal flora. Arch Ophthalmol 1954;51:196-9.
2. Marcon AS, Barbosa MP, Vasques CL, Marcon IM, Dorneles JC, Kader ITA, Cauduro PF. Microbiota aeróbica e anaeróbica normal da conjuntiva e borda palpebral de indivíduos hígidos. Arq Bras Oftalmol 1996;59:289-94.
3. Perkins RE, Kundsinn RB, Pratt MV, Abrahansen I, Leibowitz HM. Bacteriology of Normal and Infected Conjunctiva. J of Clin Microbiol 1975;1:147-9.
4. Glasser DB, Baun J. Antibacterial Agents. In: Tabbara KF & Hyndiuk RA (eds) - Infections of the Eye 2 ed. Boston, Little Brown 1996;207-31.
5. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. Manual of Clinical Microbiology, 6 ed. ASM Press, Washington 1995;190-2.
6. Aldrige KE, Janney A, Sanders CV, Marier RL. Interlaboratory variation of antibiograms of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains with conventional and commercial test systems. J Clin Microbiol 1983;18:1226-36.
7. MicroScan - Biotype Codebook for aerobic Gram-positive organisms. Dade International 1991.
8. Oeding P, Hajek V, Marsalek E. A comparison of antigenic structure and phage pattern with biochemical properties of *Staphylococcus aureus* strains isolated from sheep. Acta Pathol Microbiol Scand 1976;84:61-5.
9. Devriese LA, Oeding P. Characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species. Res Vet Sci 1976;21:284-91.
10. Yoshida J, Nagata T. Nosocomial propagation of multiresistant *Staphylococcus aureus*: an analysis using biotyping and drug sensitivity. Surg Today 1995;25:483-9.
11. Brinser JH, Burd EM. Ocular bacteriology. In: Tabbara KF, Hyndiuk RA (eds) - Infections of the eye 2 ed. Boston, Little Brown 1996;125-6.
12. Geary C, Jordens JZ, Richardson JF, Hawcroft DM, Mitchell CJ. Epidemiological typing of coagulase-negative staphylococci from nosocomial infections. J Med Microbiol 1997; Mar 46; 3:195-203.



T & M Equipamentos Médicos Ltda.

Av. Prestes Maia, 241 - 8º andar - salas 815/ 817
CEP 01031 - 001 - São Paulo - SP

Responsáveis: Miguel Toro Aguilar e Antônio Paulo Moreira

REPRESENTANTES EXCLUSIVOS PARA O BRASIL DAS EMPRESAS:

- MARCO OPHTHALMIC INC. - USA
Lâmpadas de fenda - Refractor - Ceratômetro -
Lensômetro - Microscópios cirúrgicos - Perímetros
Yag Laser e Auto perímetro
- KONAN CAMERA RESEARCH - JAPAN
Microscópios cirúrgicos - Microscópio Specular
e Cell Analysis System
- EAGLE - Lentes intraoculares

DISTRIBUIDORES PARA O BRASIL:

- HGM - MEDICAL LASER SYSTEMS
Completa linha de Argon Laser e Yag Laser
- NIKON OPHTHALMIC INSTRUMENTS
Auto-refrator - Camera retinal - Tonômetro de
aplanação e demais equipamentos oftalmológicos
- WELCH ALLYN
Retinoscópios - Oftalmoscópios - etc.

NACIONAIS:

- XENÔNIO
- SIOM

Assistência Técnica: completa para os equipamentos das empresas representadas.

Solicite atendimento ou informações:

São Paulo: T & M - tel.: (011) 229-0304 - Fax: (011) 229-6437

Disk Lentes - tels.: (011) 228-5122 / 228-5448

Ribeirão Preto: Disk Lentes - tel.: (016) 635-2943 - Fax: (016) 636-4282

NOVOS
TELEFONES