

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Análise da ligação ao fibrinogênio através de métodos  
fenotípicos e moleculares em amostras clínicas de  
*Staphylococcus* spp.

Fred Luiz Furriel de Oliveira

2007



Análise da ligação ao fibrinogênio através de métodos  
fenotípicos e moleculares em amostras clínicas de  
*Staphylococcus* spp.

Fred Luiz Furriel de Oliveira

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em Ciências  
(Microbiologia), Instituto de Microbiologia  
Professor Paulo de Góes, da Universidade  
Federal do Rio de Janeiro, como parte dos  
requisitos necessários à obtenção do título  
de Mestre em Ciências (Microbiologia).

Orientadoras: Marinella Silva Laport  
Kátia Regina Netto dos Santos

Rio de Janeiro  
Abril de 2007

Oliveira, Fred Luiz Furriel de Oliveira.

Análise da ligação ao fibrinogênio através de métodos fenotípicos e moleculares em amostras clínicas de *Staphylococcus* spp.

/ Fred Luiz Furriel de Oliveira. Rio de Janeiro: UFRJ, CCS, 2007.

xi, 108f. il.; 31 cm.

Orientadoras: Marinella Silva Laport e Kátia Regina Netto dos Santos.

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ CCS/ Programa de Pós-graduação em Ciências (Microbiologia), 2007.

Referências Bibliográficas: f. 109-128.

1. *Staphylococcus* 2. Proteínas ligadoras de fibrinogênio. I. Laport, Marinella Silva; Santos, Kátia Regina Netto dos. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde.
- III. Análise da ligação ao fibrinogênio através de métodos fenotípicos e moleculares em amostras clínicas de *Staphylococcus* spp.

Análise da ligação ao fibrinogênio através de métodos fenotípicos e moleculares em amostras clínicas de *Staphylococcus* spp.

Fred Luiz Furriel de Oliveira

Orientadoras: Marinella Silva Laport e Kátia Regina Netto dos Santos

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências (Microbiologia).

Aprovada por:

---

Presidente, Profa. Regina Maria Cavalcante Pilotto Domingues

---

Profa. Ana Luiza de Mattos-Guaraldi

---

Profa. Maria Cândida de Souza Ferreira

---

Profa. Márcia Giambiagi- deMarval

Rio de Janeiro  
Abril de 2007

Às pessoas essenciais na minha vida, minha família, meus amigos que contribuíram muito para a realização deste trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Um agradecimento especial para a Dra. Marinella Silva Laport que me ajudou em todos os momentos da realização deste trabalho. Teve paciência para me orientar e sempre me ajudou em todos os momentos que precisei. Além de orientadora, uma grande amiga.

À Dra. Kátia Regina Netto dos Santos, pela orientação, confiança e incentivo.

À toda equipe (ou que fizeram parte dela) do Laboratório de Infecção Hospitalar: Ana Paula Neves, Ana Paula Nunes, Carla, Carolzita, Eliézer (careca), Elizângela, Guga Zoletti, Ivana, Jaqueline, Karoline, Milena, Moema, Naty Iorio, Olinda, Renata, Ricardo, Roberta (Caboclo), e Valéria em especial aos amigos, Carolzita, Ricardo e Caboclo, Naty Iorio e Eliezer pelos momentos de descontração e pela infinita ajuda nos experimentos.

Aos amigos Roberta Caboclo, Naty Iorio, Ricardo e Eliezer. Obrigado por tudo!!!

À todos os amigos do Laboratório de Micobactéria.

Ao Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, nas pessoas da Profa. Agnes Marie de Sá Figueiredo, Diretora e Profa. Thais Souto-Padrón, Coordenadora de Pós-Graduação.

À Cíntia pela paciência e pela ajuda nos experimentos e toda equipe do laboratório de Microbiologia coordenado pela Prof Ana Luiza de Mattos-Guaraldi na UERJ.

À professora Márcia Giambiagi- deMarval e toda equipe do laboratório de Microbiologia Molecular: Nairita, Elaine, Alice, Natalia, Olinda, Ana Paula.

À minha família: minha mãe e irmã pelo incentivo nos momentos de tristeza e desânimo, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida, dos

primeiros passos até a decisão de fazer mestrado. Ao meu “pai”, Marcus, pelo apoio, carinho, incentivo, paciência, conselhos, exemplo.

Ao meu cunhado e “irmão” André, pelo apoio, pelas aulas de surf que digasse de passagem não aprendi até hoje, mas principalmente pela sua amizade.

À minha namorada, Cecília, pelo apoio incondicional e por existir.

À FAPERJ, CAPES, CNPq, PRONEX e FUJB, pelo suporte financeiro.

O tempo muito nos ensinou.  
Ensinou a amar a vida,  
Não desistir da luta,  
Recomeçar na derrota,  
Renunciar as palavras e pensamentos negativos,  
Enfim , acreditar nos valores humanos.  
Ser otimista!

Cora Coralina

## RESUMO

### **Análise da ligação ao fibrinogênio através de métodos fenotípicos e moleculares em amostras clínicas de *Staphylococcus* spp.**

Fred Luiz Furriel de Oliveira

Marinella Silva Laport e Kátia Regina Netto dos Santos

Resumo da dissertação de mestrado submetida ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

A detecção da proteína de superfície celular conhecida como fator “clumping”, através de testes fenotípicos auxilia na diferenciação de *Staphylococcus aureus* em relação aos *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN). Porém, outras espécies de *Staphylococcus* também apresentam proteínas de superfície envolvidas na ligação com o fibrinogênio, como a Fbe em *S. epidermidis* e a Fbl em *S. lugdunensis*. Neste estudo, 77 amostras clínicas de *Staphylococcus* foram analisadas frente a três sistemas fenotípicos de aglutinação normalmente utilizados na identificação presuntiva dos *S. aureus*: aglutinação do plasma de coelho e plasma humano e sistema comercial "Slidex Staph Plus" (bioMerieux). O sistema comercial apresentou maior precisão (100%) na detecção do fator “clumping” e os testes de aglutinação com plasma foram os que apresentaram maior número de amostras de *S. epidermidis* com resultados “falso-positivos” para os dois plasmas utilizados (12/20). Sete destas amostras foram selecionadas para testes de quantificação de aderência ao fibrinogênio em placa de micro titulação. Os testes de aglutinação em lâmina não apresentaram correlação com os testes de aderência. Uma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os resultados obtidos no início (maior aderência) e no final (menor aderência) da fase log de crescimento. Nenhuma das sete amostras de *S. epidermidis* analisadas aglutinou no teste com esferas de látex adsorvidas ao fibrinogênio. Testes de hemaglutinação, aglutinação espontânea e auto-aglutinação realizados com as sete amostras de *S. epidermidis* selecionadas, apresentaram resultados não relacionados com aqueles observados com os testes com plasma. Todas as 24 amostras de *S. epidermidis* apresentaram o gene *fbe*, que codifica a proteína Fbe e o gene *atlE*, que codifica a autolisina AtlE, e todas as 35 amostras de *S. aureus* apresentaram os genes *clfA* e *clfB*, relacionados com o fator “clumping”. As sete amostras de *S. epidermidis* selecionadas expressaram a proteína AtlE. Diante dos resultados observados, podemos sugerir a existência de outros fatores envolvidos na aglutinação de amostras de *S. epidermidis* com plasma que não somente a proteína ligadora de fibrinogênio Fbe.

Palavras-chave: *Staphylococcus*, proteína ligadora de fibrinogênio, fator “clumping”.

Abril de 2007

## ABSTRACT

### **Analysis of the binding to the fibrinogen through phenotypical and molecular methods in clinical strains of *Staphylococcus* spp.**

Fred Luiz Furriel de Oliveira

Marinella Silva Laport e Kátia Regina Netto dos Santos

*Abstract* da dissertação de mestrado submetida ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Clumping factor is a cell surface protein and its detection, through phenotypical tests, is performed to differentiate *S. aureus* of the CNS (coagulase negative *Staphylococcus*). However, other species of *Staphylococcus* have also surface proteins involved in fibrinogen binding, as Fbe of *S. epidermidis* and Fbl of *S. lugdunensis*. In this study, 77 clinical strains of *Staphylococcus* were analyzed using three phenotypical systems of agglutination currently used in the presumptive identification of *S. aureus*: rabbit plasma agglutination, human plasma agglutination and "Slidex Staph Plus" (bioMerieux) commercial system. The commercial system presented high precision (100%) in the detection of the "clumping" factor, while the agglutination tests with plasma presented the highest number of *S. epidermidis* strains with "false-positive" results for both plasmas (12/20). Seven of *S. epidermidis* strains were selected for tests of quantification of adherence to fibrinogen. However, the agglutination tests using plasma did not present relationship with the adherence tests. A statistically significant difference was observed between the results obtained at the beginning and the end of the log phase of bacterial growth. None of the seven selected *S. epidermidis* strains agglutinated in the test with fibrinogen coated to latex spheres. Hemagglutination, spontaneous aggregation and auto-aggregation were tested for the seven selected *S. epidermidis* strains and the results were not related with the results observed with the plasma tests. All the 24 *S. epidermidis* strains presented the fbe, that encodes Fbe protein and *atlE* genes, that encodes AtlE protein and all the 35 *S. aureus* strains presented the *clfA* and *clfB* genes, that represents the "clumping" factor. The seven selected *S. epidermidis* strains expressed the AtlE protein. Basing of the observed results, we can suggest that other factors can be involved in the agglutination of *S. epidermidis* strains with plasma besides the Fbe.

Keywords: *Staphylococcus*, fibrinogen binding protein, "clumping" factor

Abril 2007

## SUMÁRIO

1) INTRODUÇÃO	1
1.1) Considerações gerais sobre a interação bactéria-hospedeiro	1
1.2) O gênero <i>Staphylococcus</i>	4
1.2.1) Espécies coagulase-positivas	6
1.2.2) Espécies coagulase-negativas	8
1.3) Proteínas de superfície de <i>Staphylococcus</i> que se ligam ao fibrinogênio e genes relacionados	11
1.4) Outras estruturas de superfície relacionadas a adesão de <i>Staphylococcus</i>	21
1.5) Testes fenotípicos utilizados na caracterização da ligação de <i>Staphylococcus</i> ao fibrinogênio	22
1.6) Testes moleculares utilizados na detecção de proteínas de superfície de <i>Staphylococcus</i> com afinidade por fibrinogênio	26
2) OBJETIVOS	30
3) MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1) Origem das amostras bacterianas	31
3.2) Identificação das amostras de <i>Staphylococcus</i>	32
3.2.1) Aspecto morfo-tintorial	32
3.2.2) Produção da enzima catalase	32
3.2.3) Teste de coagulase em tubo	33
3.2.4) Produção de hemólise	33

3.2.5) Produção da enzima pirrolidonil arilamidase (PYRase)	34
3.2.6) Produção da enzima urease	34
3.2.7) Produção da enzima fosfatase	35
3.2.8) Fermentação de carboidratos	35
3.2.9) Produção de enzima descarboxilase	36
3.2.10) Produção de acetoína	37
3.2.11) Susceptibilidade aos antimicrobianos: bacitracina, novobiocina e desferrioxamina	37
3.3) Curva de crescimento	38
3.4) Avaliação da precisão de testes de aglutinação em lâmina para verificação da ligação de <i>Staphylococcus</i> ao fibrinogênio.	39
3.5) Quantificação da aderência de <i>S. epidermidis</i> ao fibrinogênio	42
3.6) Avaliação da capacidade hemaglutinante de algumas cepas de <i>S. epidermidis</i>	43
3.7) Teste de Aglutinação espontânea (AE)	45
3.8) Teste de Auto-aglutinação (AA)	45
3.9) Detecção de genes que codificam proteínas ligadoras de fibrinogênio	46
3.9.1) Liberação do DNA bacteriano	46
3.9.2) Amplificação dos genes <i>clfa</i> , <i>clfb</i> , <i>atle</i> , <i>fbe</i> através da reação de PCR	46
3.10) Western Blotting	48
3.10.1) Extração de proteínas totais	48
3.10.2) SDS-PAGE	49
3.10.3) Anticorpos utilizados e suas procedências	50
3.10.4) Técnica de Western Blotting	50
3.11) Comparação das seqüências de aminoácidos das proteínas Fbe e AtlE de <i>S.</i> <i>epidermidis</i> com seqüências homólogas de outros <i>Staphylococcus</i>	52
3.12) Análises Estatísticas	52
4) RESULTADOS	58

4.1) Identificação fenotípica das amostras de <i>Staphylococcus</i>	58
4.2) Avaliação da precisão dos métodos fenotípicos de aglutinação em lâmina, utilizados na caracterização de amostras clínicas de <i>Staphylococcus</i> .	58
4.3) Curva de crescimento	60
4.4) Quantificação da aderência ao fibrinogênio	61
4.5) Ensaio de hemaglutinação	63
4.6) Ensaio de Aglutinação espontânea (AE)	64
4.7) Ensaio de auto-aglutinação (AA)	64
4.8) Detecção dos genes <i>clfa</i> , <i>clfb</i> , <i>fbe</i> , <i>atlE</i> , através da técnica de PCR	65
4.9) Comparação das seqüências de aminoácidos das proteínas Fbe e AtlE de <i>S. epidermidis</i> com seqüências homólogas de outros <i>Staphylococcus</i>	68
4.10) Detecção das proteínas AtlE e Fbe de <i>S. epidermidis</i>	80
5) DISCUSSÃO	87
6) CONCLUSÕES	108
7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109

## **1) INTRODUÇÃO**

### **1.1) Considerações gerais sobre a interação bactéria-hospedeiro**

O estudo dos microrganismos é fundamental para a compreensão das infecções que acometem o homem, podendo contribuir para a utilização de uma terapêutica adequada e restabelecimento satisfatório do paciente. A interação entre um microrganismo e o hospedeiro humano é complexa e o resultado é determinado pelo potencial de agressão do patógeno, local de exposição e capacidade do hospedeiro em responder imunologicamente ao microrganismo (MURRAY *et al.*, 2002).

Os microrganismos pertencentes ao gênero *Staphylococcus* têm larga distribuição na natureza, colonizando a boca, as glândulas mamárias, a superfície cutânea, os tratos geniturinário e intestinal, e o trato respiratório superior de mamíferos e aves. Eles geralmente fazem parte da microbiota anfibiótica do organismo, mantendo uma relação simbiótica com seu hospedeiro. Entretanto, podem se tornar patogênicos se a barreira cutâneo-mucosa for rompida através da inoculação de agulhas, da implantação de dispositivos médicos invasivos, dentre outros, podendo causar bacteriemia e ou sepse, dependendo do sítio ocupado no hospedeiro (BANNERMAN, 2003).

Os *Staphylococcus* são divididos em dois grandes grupos: *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN) e o grupo dos coagulase-positivos. Esta divisão é baseada na presença ou ausência da enzima extracelular denominada coagulase,

que ao converter o fibrinogênio sanguíneo em fibrina, confere a bactéria a capacidade de coagular o plasma (ARCHER, 2000). A coagulase induz a polimerização do fibrinogênio em fibrina se ligando e ativando a protrombina (HENDRIX *et al.*, 1983). Após conversão da protrombina em trombina, o complexo coagulase-trombina causa a liberação dos fibrinopeptídeos do fibrinogênio de maneira similar ao processo fisiológico descrito para trombina na cascata de coagulação sanguínea (JELJASZEWICZ, SWITALSKI & ADLAM, 1983).

A espécie *Staphylococcus aureus*, do grupo dos coagulase-positivos, se destaca por possuir um maior potencial de agressão entre os estafilococos isolados em infecções humanas, tanto de origem comunitária quanto hospitalar. As infecções por essa espécie são, na maioria das vezes, precedidas por colonização, principalmente nasal, que ocorre em mais de 30% dos indivíduos saudáveis ou hospitalizados (VANDENBERGH *et al.*, 1999; SCANVIC *et al.*, 2001).

Até a década de 1970, os SCN eram citados apenas como um grupo de estafilococos, sem distinção em nível de espécie, e a distinção dos *S. aureus* era baseada na incapacidade de coagular o plasma sanguíneo. O reconhecimento dos SCN como patógenos capazes de causar infecções, principalmente hospitalares, começou há duas décadas, o que levou a uma melhor caracterização taxonômica de espécies deste grupo, como por exemplo, das espécies *Staphylococcus lugdunensis* e *Staphylococcus schleiferi* (JARLOV, 1999). Os SCN são considerados menos virulentos do que os *S. aureus*, mas a incidência deste grupo em infecções nos

hospitais vem aumentando, devido ao uso crescente de cateteres e próteses e à utilização constante de terapia imunossupressora (BOYCE, 1996).

Dados do sistema NNIS (National Nosocomial Infections Surveillance), coletados no período de 1990 a 1996, mostraram que as espécies *S. aureus* e *Escherichia coli* eram os agentes etiológicos mais frequentes em infecções hospitalares, seguidos pelos SCN, *Enterococcus* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* (NNISS, 1996). Um estudo realizado por Sader e colaboradores (2004), em hospitais da América Latina, inclusive do Brasil, no período de janeiro de 1997 a dezembro de 2001, mostrou que os *S. aureus* foram responsáveis por cerca de 21% das bacteriemias, sendo os organismos prevalentes neste tipo de infecção. Em terceiro lugar, foram detectados os SCN, responsáveis por cerca de 13% dessas infecções.

O progressivo aumento na ocorrência de infecção por amostras de *Staphylococcus* multirresistentes tem dificultado o tratamento dos pacientes e aumentado a problemática em relação a este grupo de microrganismos. Dados do programa SENTRY mostraram uma taxa de aproximadamente 30% das amostras de *S. aureus* isoladas de bacteriemias apresentaram resistência à oxacilina, em países da América Latina, enquanto mais de 70% das amostras de SCN isoladas em diferentes partes do mundo se mostraram resistentes a este antimicrobiano (DIEKEMA *et al.*, 2001).

*S. aureus* resistentes à oxacilina (ORSA) emergiram na década de 1980 como um grande problema clínico e epidemiológico nos hospitais e se mantém até hoje como um desafio para as Comissões de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH)

(WENZEL & EDMOND, 2001). Amostras ORSA, assim como amostras de SCN multirresistentes, podem ser adquiridas endogenamente ou por transmissão cruzada durante a hospitalização (PHILLIPS, HEGGERS & ROBSON, 1992; PUJOL *et al.*, 1996). A emergência na comunidade de amostras de *S. aureus* resistentes à oxacilina também tem sido motivo de preocupação, já que estas amostras são, normalmente, muito virulentas, e quando associadas à multirresistência têm tornado a infecção mais grave (O`BRIEN *et al.*, 2004).

Em um estudo realizado com 82 pacientes que sofreram queimaduras e fizeram tratamento contra bacteriemia no Departamento de Cirurgia Plástica e Queimados do Hospital Universitário de Kaunas, na Lituânia, entre 1999 e 2003, o principal agente etiológico causador de bacteriemia foi ORSA (“Oxacillin Resistant *S. aureus*”) (70,7%), seguido de *Pseudomonas aeruginosa* (11%) (VOSTRUGINA, GUDAVICIENE & VITKAUSKIENE, 2006).

Em consequência da problemática relacionada a infecções por *Staphylococcus*, torna-se imperiosa a detecção rápida e precisa deste tipo de microrganismo em indivíduos infectados e ou colonizados. Desta forma, a terapêutica pode ser realizada de forma apropriada e medidas de controle e prevenção instituídas no ambiente hospitalar (VANNUFFEL *et al.*, 1998).

## **1.2) O Gênero *Staphylococcus***

Sir Alexander Ogston, em 1883, criou o gênero *Staphylococcus* e no ano seguinte, Rosenbach o dividiu em dois grupos, de acordo com a pigmentação

colonial: *Staphylococcus pyogenes aureus* para colônias amarelas e *Staphylococcus pyogenes albus* para as colônias brancas. De acordo com essa classificação, somente o primeiro grupo era considerado patogênico, ficando o *S. pyogenes albus* como espécie avirulenta, sendo denominado em 1892, como *S. epidermidis albus* (OGSTON *apud* NAFZIGER & WENZEL, 1989). Durante anos, este último foi considerado como contaminante dos espécimes clínicos, apesar de já haver relatos sobre sua associação com endocardites e bacteriemias (BRANDT & SWAHN, 1960; WILSON & STUART, 1965). A partir da década de 1970, esses patógenos começaram a ser reconhecidos como capazes de causar infecções, mas a intensificação dos estudos taxonômicos só foi possível na década de 1980, com o desenvolvimento de novas metodologias de identificação para espécie e subespécie (NAFZIGER & WENZEL, 1989; KLOOS & BANNERMAN, 1994; BANNERMAN, 2003). Bannerman, em 2003, descreveu o gênero *Staphylococcus* como composto por 35 espécies e 17 subespécies. Atualmente, esse gênero é composto por 40 espécies e 24 subespécies (EUZÈBY, 2007)

Os *Staphylococcus* são classificados como cocos Gram-positivos, com baixo conteúdo G+C, reconhecidos como pertencentes à família Staphylococcaceae (EUZÈBY, 2007). Podem ser visualizados em microscopia óptica, em pares, tétrades, como cadeias pequenas (3 a 4 células) ou como “cachos de uva”. Não apresentam motilidade, não são esporulados, são resistentes à bacitracina, podem apresentar cápsula, são em geral, catalase-positivos e anaeróbios facultativos,

exceto a espécie *Staphylococcus saccharolyticus* e a subespécie *S. aureus* subsp. *anaerobius* que são anaeróbias estritas e catalase- negativas (BANNERMAN, 2003).

### **1.2.1) Espécies coagulase-positivas**

*S. aureus*, o patógeno de maior importância entre os coagulase-positivos, têm sido apontado como o principal patógeno nosocomial, sendo responsável por altos níveis de morbidade e mortalidade. Essa espécie pode causar infecções cutâneas e, se não tratadas, pode haver disseminação do microorganismo, via circulação sanguínea, para sítios metastáticos envolvendo outros órgãos (BANNERMAN, 2003). As infecções por *S. aureus* quando na pele, recebem diferentes designações, tais como foliculite, furunculose, impetigo, dentre outras, de acordo com a localização. Em indivíduos debilitados por doenças crônicas, traumas físicos, queimaduras ou imunossupressão, esse microorganismo pode causar infecções de caráter mais grave. Dentre as infecções profundas destacam-se a osteomielite, bacteriemia, endocardite, pneumonia e, ocasionalmente, meningite e artrite bacteriana (SMITH & JARVIS, 1999).

Além de infecções, a espécie *S. aureus* pode causar intoxicações, como a síndrome de Ritter, caracterizada pelo deslocamento de extensas áreas da epiderme devido a ação da toxina estafilocócica esfoliatina ou epidermolisina, intoxicações alimentares causadas pelas enterotoxinas estafilocócicas ou a

síndrome do choque tóxico causada pela toxina TSST-1 (toxina da síndrome do choque tóxico-1) (DINGER, ORWIN & SCHLIEVERT, 2000).

*S. aureus* também produz enzimas que atuam aumentando a sua virulência, como: coagulase, catalase, desoxirribonuclease, hialuronidase, lipase, proteases e estafiloquinase (CROSSLEY & ARCHER, 1997; DINGER, ORWIN & SCHLIEVERT, 2000).

*S. aureus* também expressa o fator “clumping” que está envolvido em sua patogênese e é responsável por sua aderência a células e a componentes da matriz extracelular, assim como, aos componentes do plasma (PATTI *et al.*, 1994). Esse fator pode ser, ao menos parcialmente, responsável por promover a aderência da bactéria a um tecido traumatizado e a dispositivos médicos invasivos, como próteses e cateteres que se tornam cobertos por fibrinogênio e outras proteínas do plasma após o implante (VAUDAUX *et al.*, 1990).

Os *S. aureus* possuem sua parede celular composta de ácido teicóico e peptidoglicana, na qual está inserida a proteína A, específica da espécie. Devido à sua reatividade com a porção Fc das imunoglobulinas, essa proteína impede a interação dos anticorpos com as células fagocitárias (JOHN & BARG, 1996). De acordo com John e Barg (1996) e Lee e Lee (2000) mais de 90% das amostras de *S. aureus* produzem uma cápsula polissacarídica em sua superfície, que atua como fator antifagocitário, sendo os tipos CP5 e CP8, os prevalentes nesse agente etiológico.

Outras espécies coagulase-positivas, como *S. intermedius* e *S. schleiferi* subsp. *coagulans* e, coagulase variável, como *S. hyicus* são importantes em infecções veterinárias. (BANNERMAN, 2003).

### **1.2.2) Espécies coagulase-negativas**

Entre as espécies do grupo dos SCN, as que têm sido mais isoladas de infecções humanas, especialmente de bacteriemias e infecções relacionadas a dispositivos médicos, são *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. hominis* (ING, BADDOUR & BAYER, 1997). *S. epidermidis* é o SCN mais isolado de bacteriemias, endocardites, infecções de sítio cirúrgico, do trato urinário e do sistema nervoso central (SNC), peritonites e infecções relacionadas ao uso de próteses e cateteres (RUPP & ARCHER, 1994). Um fator de virulência associado à patogenicidade dos *S. epidermidis*, e conhecido como PIA (Polysaccharide Intercellular Adhesin), está relacionado com a habilidade desta espécie em colonizar superfícies poliméricas e formar uma densa multicamada de células, constituindo um biofilme (VON EIFF, PETERS & HEIFMANN, 2002). Em infecções hospitalares associadas a biomateriais, aproximadamente 80% dos microrganismos envolvidos são da espécie *S. epidermidis* (GÖTZ, 2002).

Além de biofilme, os *S. epidermidis* produzem bacteriocinas da família dos lantibióticos, peptídeos que tem ação sobre outros microrganismos, e também produzem sideróforos, utilizando o ferro que é retirado das transferrinas do hospedeiro, para o seu próprio metabolismo. Esses fatores de virulência também

auxiliam na colonização e na sobrevivência da bactéria no hospedeiro (HUEBNER & GOLDMANN, 1999; VON EIFF, PETERS & HEIFMANN, 2002).

A segunda espécie de SCN mais encontrada em infecções hospitalares, *S. haemolyticus*, está relacionada com endocardites, septicemias, peritonites, infecções do trato urinário e de sítio cirúrgico (KLOSS & BANNERMAN, 1994; RUPP & ARCHER, 1994). Esta é também a terceira espécie mais comum entre as amostras clínicas de *Staphylococcus* resistentes à meticilina isoladas de infecções (SANTOS SANCHES *et al.*, 2000). Esta espécie é frequentemente resistente a múltiplos antibióticos, sendo uma das poucas espécies dentro do gênero que tem desenvolvido resistência a glicopeptídeos (NUNES *et al.*, 2002; CAMPANILE *et al.*, 2006).

A terceira espécie mais isolada, *S. hominis*, é causa de artrites, endocardites e tem sido associada a casos de sepse (ING, BADDOUR & BAYER, 1997; BANNERMAN, 2003; RUHE *et al.*, 2004).

*S. saprophyticus* é um importante patógeno oportunista em infecções comunitárias do trato urinário, em mulheres jovens sexualmente ativas, e também em homens (VON EIFF, PETERS & HEIFMANN, 2002).

*S. lugdunensis* tem sido relacionado, principalmente, com endocardites (VANDENESCH *et al.*, 1993). A agressividade das infecções causadas por essa espécie revela a necessidade de uma rápida identificação para uma correta terapia antimicrobiana (BANNERMAN, 2003). Por causa da natureza agressiva dessas infecções, demonstrada através de experiências com ratos, *S. lugdunensis* é

considerada mais patogênica do que outras espécies do grupo dos SCN (LAMBE *et al.*, 1990; VANDENESCH *et al.*, 1993; THOMAS, HOY & CAPPER, 2006).

*S. schleiferi* subsp. *schleiferi* tem sido implicado como agente etiológico de muitas infecções nosocomiais, incluindo bacteriemia (JEAN-PIERRE *et al.*, 1989; LATORRE *et al.*, 1993), abscesso cerebral (GRATTARD *et al.*, 1993), infecções do trato urinário (OZTURKERI *et al.*, 1994), infecções relacionadas a implantes ortopédicos (JEAN-PIERRE *et al.*, 1989) e infecções de sítio cirúrgico (GRATTARD *et al.*, 1993; KLUYTMANS *et al.*, 1998).

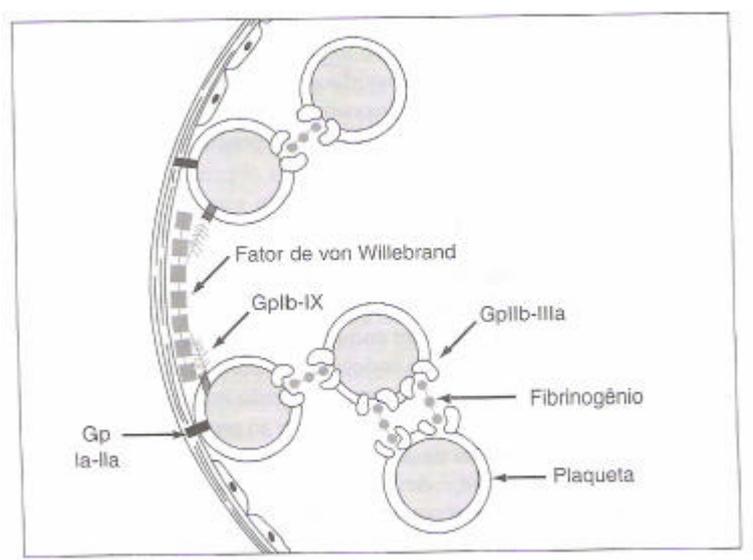
As espécies, *S. lugdunensis* e *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*, compartilham um ou mais fatores de virulência com a espécie *S. aureus*, dentre eles: o fator “clumping” (JONSSON *et al.*, 1991; FOSTER & MCDEVITT, 1994; MCDEVITT *et al.*, 1994; PATTI *et al.*, 1994; PEACOCK *et al.*, 1999) e a enzima Dnase, porém, não têm seus mecanismos de virulência bem descritos (LAMBE *et al.*, 1990; VANDENESCH *et al.*, 1993). Devido a possibilidade de uma identificação errada, visto que a espécie *S. aureus* e *S. lugdunensis* são reconhecidamente fator “clumping” positivo, Schnitzler e colaboradores, em 1998, sugeriram um teste adicional, visto que os *S. lugdunensis* são os únicos microrganismos do grupo dos SCN que apresentam positividade simultânea para os testes bioquímicos de descarboxilação da ornitina e PYR (pyrrolidonyl arylamidase).

Outras espécies de SCN causam uma variedade de infecções como: *S. cohnii* que está associada a endocardites e pneumonia; *S. cohnii*, *S. xylosum*, *S. hominis* e *S. caprae* que têm sido associadas a infecções do trato urinário; *S. caprae* e *S. cohnii*

podem causar artrites, enquanto *S. caprae* têm sido implicado em infecções de feridas e osteomielites; *S. capitis* e *S. warneri* são agentes de infecções relacionadas a cateteres (RUPP & ARCHER, 1994; CALVO *et al.*, 2000), e *S. sciuri* está associado a feridas cutâneas (MARSOU *et al.*, 1999).

### **1.3) Proteínas de superfície dos *Staphylococcus* que se ligam ao fibrinogênio e os respectivos genes relacionados**

A cascata de coagulação sangüínea é um evento fisiológico de extrema importância para evitar a perda sangüínea. Muitos fatores são ativados ao longo desta cascata. Na etapa final do processo ocorre a conversão da protrombina em trombina, na presença do fator V, cálcio e fosfolipídio. A conversão da protrombina ocorre de forma mais rápida quando está presente na superfície de plaquetas ativadas e células endoteliais. A trombina além de converter o fibrinogênio em fibrina, também ativa os fatores V, VIII e XIII e estimula a agregação e a secreção de plaquetas (Figura 1). Após a liberação dos fibrinopeptídeos A e B das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  do fibrinogênio, a molécula modificada, agora denominada de monômero de fibrina, sofre polimerização (HARRISON *et al.*, 2002).



**Figura 1:** Aderência e agregação plaquetárias. A aderência ao subendotélio vascular é facilitada pelo fator de von Willebrand, que forma uma ponte com as fibrilas do colágeno na parede vascular e nos receptores glicoprotéicos GpIb-IX das plaquetas. De modo semelhante, o fibrinogênio liga-se às plaquetas adjacentes através de receptores plaquetários glicoprotéicos GpIIb-IIIa (adaptado de HARRISON *et al.*, 2002).

O fibrinogênio tem como principal função o controle da perda de sangue através da formação de coágulos de fibrina. Além disso, faz parte do sistema de defesa do hospedeiro contra microrganismos, já que sua clivagem em fibrina resulta na liberação de fibrinopeptídeos que são imunoestimulatórios (NILSSON *et al.*, 2004). O fibrinogênio consiste em 6 cadeias polipeptídicas (2 $\alpha$ , 2 $\beta$ , 2 $\gamma$ ), formando uma estrutura simétrica, com a região N-terminal na parte central. O cálcio pode se ligar na região C-terminal da cadeia  $\gamma$  e no nódulo central do fibrinogênio, acelerando a formação de fibrina (YEE *et al.*, 1997).

*S. aureus* pode interagir com o fibrinogênio através de diferentes proteínas ligadoras de fibrinogênio (BODÉN & FLOCK, 1989; BODÉN & FLOCK, 1992; MCDEVITT *et al.*, 1994). Os principais mediadores da aderência dos *S. aureus* ao

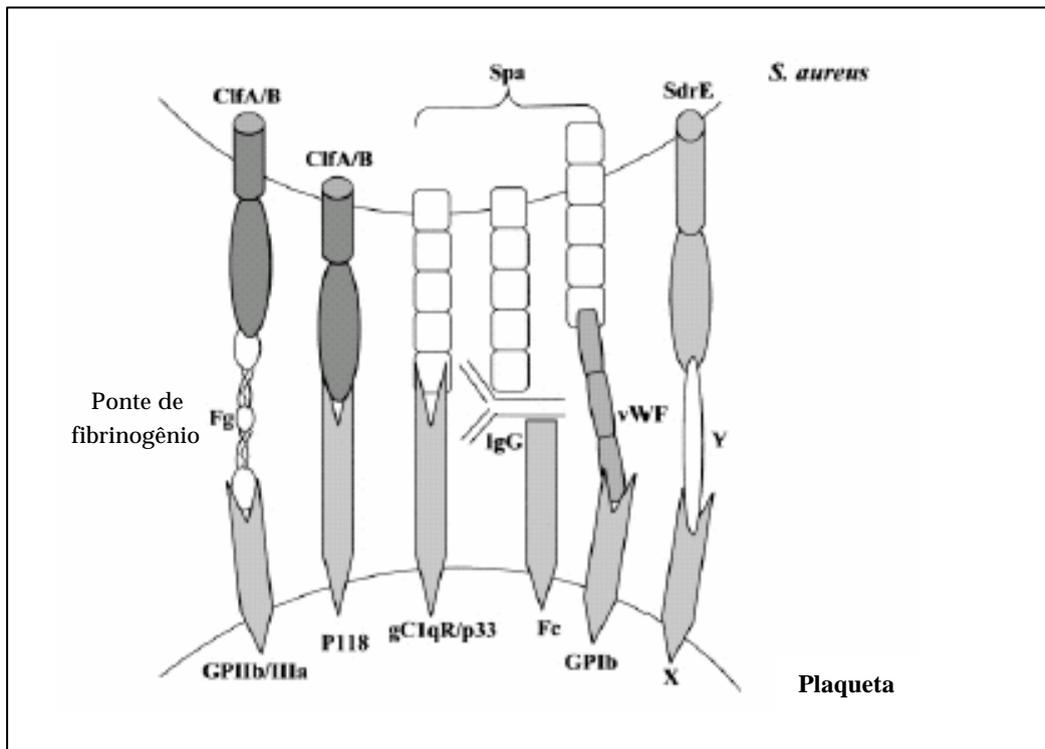
fibrinogênio são as proteínas de superfície celular ClfA e ClfB, conhecidas como fator “clumping” (MCDEVITT *et al.*, 1994). Além desse fator de superfície, o *S. aureus* produz outras proteínas extracelulares que se ligam ao fibrinogênio, como: CoA (proteína coagulase) (MCDEVITT *et al.*, 1994), Efb (proteína ligadora de fibrinogênio extracelular) também conhecida como Fib (PALMA *et al.*, 2001) e Eap (proteína extracelular de adesão) (BODÉN & FLOCK, 1989; BODÉN & FLOCK, 1992; PALMA *et al.*, 2001). FbpA é uma proteína ligadora de fibrinogênio presente em *S. aureus* e descrita por Cheung e colaboradores em 1995. A análise da seqüência de aminoácidos desta proteína mostrou que esta apresentava alta similaridade com a CoA e baixa similaridade com outras proteínas ligadoras de fibrinogênio, como a Fib (CHEUNG *et al.*, 1995).

A ligação de *S. aureus* ao fibrinogênio tem sido demonstrada como importante no desenvolvimento de endocardites (MOREILLON *et al.*, 1995) e na ligação a biomateriais implantados (PALMA, HAGGAR & FLOCK, 1999). Uma das complicações relacionadas à bacteriemia causada por *S. aureus* é o desenvolvimento de endocardite infecciosa (CHANG, 2000). Esse tipo de endocardite é caracterizada pelo crescimento bacteriano na superfície de válvulas cardíacas e está relacionada a ligação com plaquetas nesta superfície. Dados de Wilson e colaboradores (1995), mostraram um índice de óbitos, por endocardite infecciosa, por *S. aureus*, variando de 20 a 40%.

A espécie *S. aureus* é conhecida por aderir a plaquetas via mecanismo dependente de fibrinogênio (HERRMANN *et al.*, 1993). Estudos anteriores já

sugeriam que a proteína A (Spa), presente na superfície de *S. aureus*, seria necessária para o patógeno induzir a agregação de plaquetas (HAWIGER *et al.*, 1979). Contudo, só recentemente foi descoberto que essa proteína estafilocócica era capaz de se ligar ao fator de von Willebrand (HARTLEIB *et al.*, 2000), que é reconhecido pelo receptor glicoprotéico GPIb e de complemento gC1qr/p33 da superfície das plaquetas (Figura 2) (NGUYEN, GHEBREHIWET & PEERSCHKE, 2000). Palma e colaboradores (2001) verificaram através da técnica de western blotting que a proteína extracelular de aderência ao fibrinogênio, Efb, se liga na região A $\alpha$  do fibrinogênio. Essa região está muito próxima da região de ligação do receptor glicoprotéico plaquetário Gpiib/IIIA ao fibrinogênio, possibilitando uma interferência da proteína no processo de agregação plaquetária (PALMA *et al.*, 2001).

Um dos problemas encontrados ao se comparar a habilidade de diferentes amostras de *S. aureus* em interagir com plaquetas ou outros componentes do hospedeiro é o fato desses microrganismos expressarem diferentes proteínas de superfície (PEACOK *et al.*, 2000; RICE *et al.*, 2001), com variados graus de expressão entre as amostras (MCALEESE *et al.*, 2001).



**Figura 2:** Representação esquemática da interação de *S. aureus* com as plaquetas. O modelo de interação bactéria-plaqueta proposto, mostra diversas proteínas de superfície de *S. aureus* (ClfA, ClfB, proteína A, SdrE) interagindo direta ou indiretamente com as plaquetas. As proteínas ClfA e ClfB podem interagir com as plaquetas diretamente através do receptor plaquetário P118, ou via ponte de fibrinogênio. Em relação à proteína SdrE não se sabe ao certo com que tipo de receptor plaquetário ela interage (X), porém, é sabido que ela interage com as plaquetas através de uma ponte plasmática protéica que foi denominada na figura como Y (adaptado de O'Brien *et al.*, 2002).

Outras espécies de *Staphylococcus* spp. têm proteínas específicas envolvidas na ligação com o fibrinogênio, como a proteína de afinidade ao fibrinogênio, Fbe, expressa pela maioria das amostras de *S. epidermidis*. Essa proteína se liga ao sítio de clivagem da trombina no fibrinogênio e pode interferir na formação do coágulo e na liberação dos fibrinopeptídeos (NILSSON *et al.*, 1998).

Após clonagem e seqüenciamento do gene *fbe* de *S. epidermidis* foi verificada identidade entre a seqüência de aminoácidos da proteína Fbe e a da proteína ClfA

de *S. aureus*, variando de 44 a 64%, de acordo com a região, porém, a região SD (região de repetição SD) (Figura 3) mostrou uma identidade de 80% (NILSSON *et al.*, 1998). Na região A (região de ligação ao fibrinogênio) das proteínas ClfA e Fbe, as regiões de maior identidade (45%) foram aquelas localizadas entre os aminoácidos 373-516 e 317-460, respectivamente (NILSSON *et al.*, 1998).

Através da reação de PCR, utilizando oligonucleotídeos para detecção do gene *fbe*, 40 de 43 amostras clínicas de *S. epidermidis*, analisadas por Nilsson e colaboradores (1998), apresentaram o gene. A proteína Fbe foi identificada por Hartford e colaboradores (2001), em amostras de *S. epidermidis*, como sendo membro de uma família de proteínas “Sdr” (serina-aspartato), que se encontram ancoradas à superfície da parede celular. O fator “clumping” A de *S. aureus* (ClfA) foi o primeiro membro dessa família descrito (VON EIFF *et al.*, 2002). Contrariamente ao ClfA, que se liga à cadeia  $\gamma$  do fibrinogênio, e similar à proteína ClfB, a Fbe se liga à cadeia  $\beta$  do fibrinogênio. (NILSSON *et al.*, 1998; HARTFORD *et al.*, 2001).

Existem membros adicionais dessa família Sdr, como: ClfB (segundo fator “clumping” de *S. aureus*), SdrC, SrdD, e SdrE (JOSEFSSON *et al.*, 1998). As proteínas SdrC, SdrD e SdrE possuem de duas a cinco seqüências de 113 resíduos de aminoácidos repetidos “in tandem”. A função das proteínas SdrC, SdrD, SdrE é pouco conhecida. Mas, hipoteticamente, essas proteínas devem interagir com as proteínas do hospedeiro via região A (JOSEFSSON *et al.*, 1998).

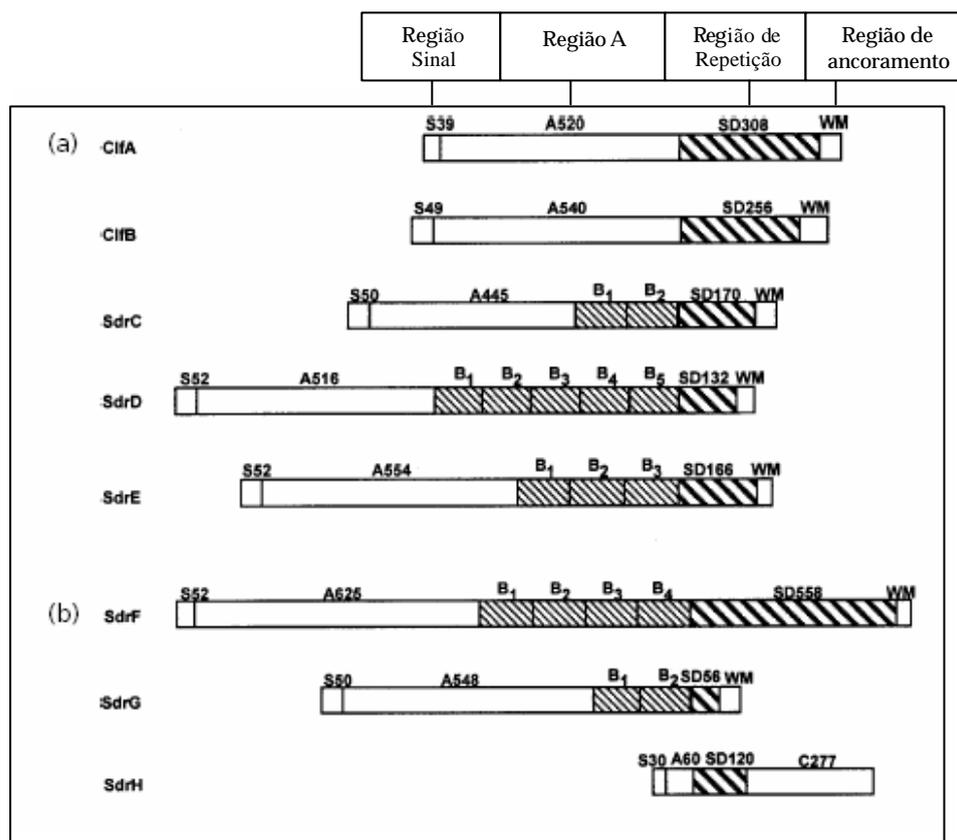


Figura 3: Representação esquemática das proteínas Sdr de *S. aureus* (a) e *S. epidermidis* (b). S - região sinal; A - região A; B<sub>n</sub> - Região de repetições B; SD - região de repetição de dipeptídeos de serina; C - região C (somente na proteína SdrH); WM - região de ancoramento na parede celular (McCrea *et al.*, 2000).

Em um estudo realizado por Foster e colaboradores, em 2002, foi utilizada uma amostra de *S. aureus* defectiva na expressão de ClfB, para demonstrar que esta proteína promovia a aderência da bactéria ao epitélio da mucosa nasal pela interação específica ClfB e citoqueratina K10.

Tung e colaboradores (2000) descreveram um variante alélico da proteína SdrE, que foi definido como Bbp (“bone-sialo binding protein”). Em 2002, Peacock e colaboradores demonstraram uma forte correlação entre a capacidade de invasão dos *S. aureus* e a presença de um dos variantes alélicos do gene *sdrE*. Sabat e

colaboradores (2006) realizaram um estudo entre 1990 e 1995, com 497 amostras, de *S. aureus*, isoladas de doenças invasivas e de portadores nasais. Através da técnica de PCR triplex, eles avaliaram a presença dos genes *sdrC*, *sdrD* e *sdrE*, nestas amostras e tentaram correlacionar, através de análises estatísticas, com a capacidade de invasão da bactéria e com resistência e sensibilidade a antibióticos. O gene *sdrC* esteve presente em todas as amostras estudadas. De acordo com as análises estatísticas, a presença do gene *sdrD* estava fortemente relacionada com amostras de *S. aureus* resistentes à metilina ( $P < 0,0001$ ).

A organização geral da proteína Fbe corresponde a de outras proteínas Sdr. O papel da Fbe foi desvendado quando descobriram que amostras mutantes deficientes de Fbe mostraram reduzida aderência ao fibrinogênio na superfície do poliestireno (PEI & FLOCK, 2001). Além disso, anticorpos anti-Fbe bloquearam a aderência, sugerindo a possibilidade de uma terapia imunoprolática contra esse tipo de infecção (PEI *et al*, 1999; PEI & FLOCK, 2001). Vernachio e colaboradores (2003), em um modelo experimental de endocardite infecciosa em coelhos, verificaram que uma imunoglobulina policlonal específica para o fator “clumping” A de *S. aureus* em combinação com vancomicina apresentou maior potencial de redução da aderência dos MRSA ao fibrinogênio imobilizado do que o antimicrobiano sozinho.

Outras proteínas associadas à superfície celular, da família de proteínas serina-aspartato (Sdr) chamadas SdrG (95% de similaridade a Fbe), SdrF e SdrH foram identificadas em *S. epidermidis* (MCCREA *et al.*, 2000). Os genes *sdrG* e *sdrH*

estavam presentes em todas as 16 amostras de *S. epidermidis* testadas, e o *sdrF* em somente 12 amostras. Anticorpos protéicos anti-SdrG e anti-SdrH foram encontrados no soro de 16 pacientes convalescentes de infecções por *S. epidermidis*, sugerindo que essas proteínas são expressas durante a infecção (MCCREA *et al.*, 2000). A proteína SdrG se liga a cadeia  $\beta$  do fibrinogênio, mais especificamente no segmento N-terminal (peptídeo  $\beta$ 6-20) do polipeptídeo, que se localiza próximo ao sítio de clivagem da trombina. A proteína SdrG pode inibir a formação do coágulo induzido pela trombina, ao se ligar perto da região de clivagem da trombina, interferindo na liberação do fibrinopeptídeo B (DAVIS *et al.*, 2001). Especulou-se que a ligação da SdrG poderia prevenir a liberação de elementos quimiostáticos como o fibrinopeptídeo B, reduzindo o influxo de neutrófilos fagocíticos e deste modo, ajudaria na sobrevivência da bactéria no hospedeiro (DAVIS *et al.*, 2001).

A função dos outros membros da família de proteínas serina-aspartato continua desconhecida. Liu e colaboradores, em 2004, descreveram a primeira proteína ligadora de colágeno da família "Sdr", SdrX, sendo a primeira proteína MSCRAMM (Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules) identificada em *S. capitis* (LIU *et al.*, 2004).

A regulação dessas proteínas ligadoras de fibrinogênio está parcialmente compreendida até os dias de hoje. A expressão de muitos fatores de virulência do *S. aureus* é regulada pelo locus *agr*. O locus *agr* é responsável pela regulação negativa da síntese de proteínas de superfície celular, incluindo proteína A e

coagulase, e pela regulação positiva da expressão de produtos externos como: hemolisinas e TSST-1 (COULTER *et al.*, 1998). Análises feitas com mutantes defectivos no locus de regulação global, como *arg* (KORNBLUM *et al.*, 1990) e *sar* (CHEUNG *et al.*, 1992), indicaram que algumas dessas proteínas são reguladas por um locus ou ambos. O locus *sar* parece estar relacionado a regulação positiva do fator “clumping”, enquanto o locus *agr* parece estar relacionado a uma repressão da expressão da coagulase (KORNBLUM *et al.*, 1990).

Uma metodologia inovadora para detecção de genótipos responsáveis por surtos epidêmicos foi descrita por Koreen e colaboradores, em 2005, consistindo em uma tipagem da região R, de repetição de dipeptídeos de serina, do gene *clfB* dos *S. aureus*, sendo que as variações entre os genótipos ocorria na seqüência de nucleotídeos e no tamanho dessa região. Nesse relato, o resultado da tipagem do gene *clfB* combinado com a do gene que codifica a proteína A mostrou um poder discriminatório de 99,5% entre os grupos clonais, sendo comparável ao da metodologia de tipagem por Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) (KOREEN *et al.*, 2005).

Recentemente, foi caracterizado um gene que codifica uma proteína ligadora de fibrinogênio em *S. lugdunensis*, denominada “Fbl”. Essa proteína apresenta uma região ligadora de fibrinogênio (região A) com 62% de similaridade com “ClfA” de *S. aureus* e 30% com “Fbe” de *S. epidermidis*, sugerindo que existe uma correlação entre as funções das três proteínas, como a ligação ao fibrinogênio (NILSSON *et al.*, 2004).

#### **1.4) Outras estruturas de superfície relacionadas a adesão de *Staphylococcus***

Além das proteínas ligadoras de fibrinogênio descritas anteriormente, estudos mostraram a existência de outras estruturas de superfície relacionadas à adesão bacteriana, como as autolisinas (AtlE), que podem estar relacionadas à aderência inicial de *S. epidermidis* a superfícies poliméricas (HEILMANN *et al.*, 1997). A autolisina AtlE também se liga a vitronectina, revelando que essa autolisina, confere a bactéria a capacidade de colonização de outros sítios, como o tecido do hospedeiro. No entanto, a proteína (AtlE) é multifuncional, com propriedades enzimáticas (amidase com 60 kDa e glicoaminidase com 52 kDa) e adesivas (HEILMANN *et al.* 1997). Estudos recentes mostraram a importância da AtlE na patogenicidade dos *S. epidermidis*: a amostra *S. epidermidis* mutante para AtlE se mostrou menos virulenta que a amostra *S. epidermidis* selvagem (AtlE+), em um modelo de infecção relacionada a cateter em ratos (RUPP *et al.*, 2001).

As autolisinas bacterianas são hidrolases peptidoglicanas que possuem uma importante função no processo de síntese de parede celular, divisão celular e lise da célula bacteriana induzida por antibióticos, podendo ser consideradas como fatores de virulência (HOLTJE, 1996). Em um modelo experimental com cobaias, desenvolvido por Mani e colaboradores (1994), amostras de *S. aureus* defectivas na expressão de autolisinas exibiram uma virulência menor que as amostras de *S. aureus* que expressavam as mesmas. Os cobaias que sofreram inoculação de  $10^3$  UFC de amostras de *S. aureus* mutantes, defectivas na expressão de autolisinas, não desenvolveram endocardite infecciosa, enquanto que os cobaias que foram

inoculados com a amostra de *S. aureus* que expressava autolisinas desenvolveram endocardite infecciosa (MANI *et al.*, 1994).

Outras autolisinas já foram descritas, como a Aas dos *S. saprophyticus* que se liga a eritrócitos de carneiro promovendo hemaglutinação (HELL, MEYER & GATERMANN, 1998), AtlC de *S. caprae* (ALLIGNET *et al.*, 2002), as quais são homólogas as adesinas AtlE de *S. epidermidis* e Atl de *S. aureus* (FOSTER, 1995; OSHIDA *et al.*, 1995) conferindo a bactéria a capacidade de se aderir à fibronectina. Heilmann e colaboradores (2003), relatou a existência da AaE, uma autolisina/adesina que confere a *S. epidermidis* a capacidade de interagir com fibrinogênio, fibronectina e vitronectina.

### **1.5) Testes fenotípicos utilizados na caracterização da ligação de *Staphylococcus* ao fibrinogênio**

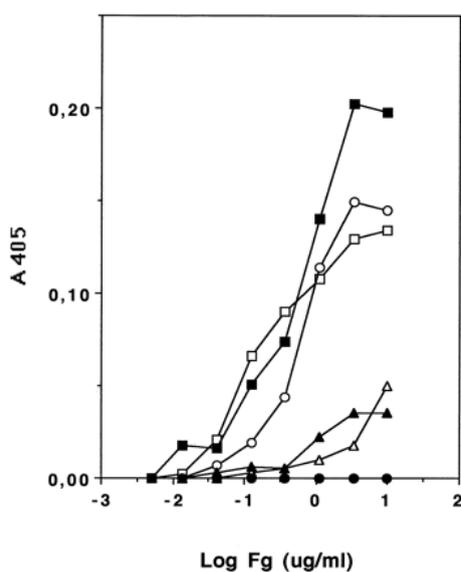
O esquema simplificado para identificação presuntiva de *S. aureus* utilizado na maioria dos laboratórios de rotina é baseado, principalmente, na capacidade desta espécie em coagular plasma (BANNERMAN, 2003). Embora o teste de coagulase em tubo para a detecção da enzima seja, geralmente, considerado o teste padrão para diferenciar *S. aureus* dos SCN, o tempo usado para o teste (4 a 24 h) induz os laboratórios de microbiologia clínica a usarem alternativas mais rápidas. Os testes de aglutinação em lâmina, como por exemplo, os que detectam o fator “clumping”, têm sido utilizados por serem mais simples e rápidos (< 1 minuto) já que detectam proteínas da superfície da célula bacteriana. Porém, 10 a 15% das

estirpes de *S. aureus* não possuem fator “clumping” e podem fornecer resultados falso-negativos (BANNERMAN, 2003). Em adição, existem espécies de SCN que apresentam proteínas de superfície que reagem com fibrinogênio resultando em positividade quando testes comerciais de detecção do fator “clumping” são utilizados, além de aglutinarem o plasma humano ou de coelho, como é o caso das espécies *S. lugdunensis* e *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* (PERSONNE *et al.*, 1997). Amostras de *S. intermedius* também podem, erroneamente, ser identificadas como *S. aureus*, porque são variáveis na expressão do fator “clumping” (BANNERMAN, 2003).

Personne e colaboradores (1997) determinaram a sensibilidade e especificidade de seis sistemas comerciais de aglutinação para identificação presuntiva de *S. aureus*. Foram analisadas 512 estirpes de *Staphylococcus*, comparando-se seis sistemas comerciais e o teste de coagulase em tubo, para identificação de *S. aureus*, sendo o sistema “Slidex Staph Plus” (bioMérieux) o que apresentou maior sensibilidade (100%) e uma especificidade de 81,8%. O sistema comercial “Slidex Staph Plus” (bioMérieux) consiste em partículas de látex cobertas com fibrinogênio, para detecção do fator “clumping”, e de anticorpos monoclonais específicos para detecção da proteína A de *S. aureus*. (PERSONNE *et al.*, 1997). Van Griethuysen e colaboradores (2001) verificaram que o sistema comercial Slidex Staph Plus (bioMérieux) apresentou uma especificidade superior (98,9%) a dos sistemas Staphaurex Plus (Murex, Chantillon, France) (96,2%) e Pastorex Staph Plus (Sanofi Diagnostics Pasteur, France) (95,7%) na identificação de 892 amostras

de *Staphylococcus*. O sistema Slidex Staph Plus foi então considerado um dos melhores métodos para identificação presuntiva de *S. aureus* (PERSONNE *et al.*, 1997).

Nilsson e colaboradores (1998) utilizaram a técnica de quantificação de aderência ao fibrinogênio em cinco cepas de *S. epidermidis* e uma de *S. aureus* (Newman), em placas de microtitulação, utilizando quantidade variável de fibrinogênio. De acordo com os resultados, houve uma grande variação de aderência ao fibrinogênio imobilizado entre as amostras, e as mesmas foram classificadas como não ligantes, parcialmente ligantes e altamente ligantes ao fibrinogênio. Os valores de aderência variaram de 0 a 0,2 em DO<sub>405nm</sub> (Figura 4). Em um teste realizado em separado, as amostras foram tratadas com proteinase K e todas perderam a capacidade de se ligar ao fibrinogênio. Com base nos resultados sugeriu-se que a Fbe estaria relacionada a adesão dos *S. epidermidis* ao fibrinogênio imobilizado (NILSSON *et al.*, 1998).



**Figura 4:** Representação esquemática da aderência bacteriana ao fibrinogênio imobilizado. Os poços da microplaca foram cobertos com diferentes concentrações de fibrinogênio bloqueados com BSA. A aderência foi permitida por 2 horas e, posteriormente, os poços foram lavados e secos, e a aderência relativa foi determinada por espectrofotometria ( $A_{405nm}$ ). ○, *S. aureus* Newman; ◻, *S. epidermidis* 2; ◼, *S. epidermidis* 19; ◻, *S. epidermidis* 269; ◻, *S. epidermidis* 333; ● *S. epidermidis* HB (adaptado de NILSSON *et al.*, 1998).

O'Brien e colaboradores (2002), verificaram a expressão de proteínas de superfície, em *Lactobacillus lactis*, utilizando um vetor plasmidial carreando os genes *clfA* e *clfB*, com o objetivo de verificar se a expressão das proteínas codificadas por estes genes seria similar a de *S. aureus*. Foi utilizada uma placa de microtitulação (96 poços) com concentrações de fibrinogênio, variando de 0,3 a 10 µg/mL. A aderência ao fibrinogênio de ambas as amostras dependeu da concentração do mesmo. Notou-se que as amostras de *L. lactis* expressando fator “clumping” A e B (ClfA e ClfB) tiveram uma afinidade maior ao fibrinogênio que as amostras de *S. aureus* expressando as mesmas proteínas. As proteínas ClfA e

ClfB foram expressas na superfície das amostras de *L. lactis* (pKS80) utilizadas. A expressão dessas proteínas de superfície foi analisada com o objetivo de se verificar a função das mesmas no processo de agregação plaquetária induzida por bactéria (O'BRIEN *et al.*, 2002).

### **1.6) Testes moleculares utilizados na detecção de proteínas de superfície de *Staphylococcus* com afinidade por fibrinogênio**

Wastfelt e Flock (1995), através das técnicas SDS-PAGE e imunoblotting, utilizando anticorpo anti-Fib, conseguiram detectar a proteína de 19kDa (Fib), em todas as 39 amostras de *S. aureus* de origem humana pesquisadas, porém, em amostras de origem bovina o percentual caiu para 52%. Ao utilizarem inibidor de protease, os autores conseguiram detectar a proteína Fib em todas as 27 amostras de *S. aureus* de origem bovina pesquisadas. Os autores concluíram que as amostras animais produziam alguma substância com atividade proteolítica que impedia a detecção da proteína Fib através de métodos moleculares.

Hussain e colaboradores (2001) através da metodologia de SDS-PAGE, analisaram as proteínas de superfície da amostra Newman de *S. aureus*. Duas proteínas (70 e 40 kDa) foram encontradas em maior quantidade, em comparação com outras proteínas. Essas proteínas de superfície foram identificadas como sendo as adesinas Eap (70 kDa) e Emp (40 kDa) através da técnica de western blotting. Em um estudo prévio, realizado por Bodén e Flock (1992), a proteína de 70kDa havia sido caracterizada como proteína extracelular de adesão (Eap). A

proteína de 40 kDa, descrita por Hussain e colaboradores (2001) como proteína de matriz extracelular (Emp), se ligou a um amplo espectro de proteínas do hospedeiro, tais como: fibrinogênio, fibronectina, vitronectina e colágeno.

Após a inserção do vetor plasmidial pK80, em amostras de *L. lactis*, foi verificada a expressão das proteínas SdrG e Fbe através de western blotting, utilizando-se um anticorpo específico para a região A da proteína Fbe (HARTFORD *et al.*, 2001). Liu e colaboradores (2004), descreveram a primeira proteína ligadora de colágenos (SdrX) da família “Sdr”. Através das técnicas SDS-PAGE e western blotting, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-SdrX, os autores conseguiram verificar a expressão desta proteína de superfície em amostras de *S. capitis*.

Em um trabalho realizado por Stephan e colaboradores (2001) foram aliadas testes fenotípicos a moleculares para a identificação de 34 amostras de *S. aureus* provenientes do leite de 34 vacas com mastite em 34 fazendas diferentes no Noroeste da Suíça. Dentre os testes fenotípicos foram realizados: método de aglutinação em látex (detecção do fator “clumping”), verificação de hemólise e teste de resistência a antimicrobianos. A caracterização molecular incluiria: PCR, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores para os genes *clfa* (fator “clumping”), *coa* (coagulase) e *spa* (proteína A) e para a região intergênica do rRNA 16S-23S, além de PFGE para identificação de 34 amostras provenientes de leite de vaca com mastite. A amplificação do gene *clfa* resultou em um amplicon com um tamanho de 980pb para todas as 34 amostras de *S. aureus*, indicando ausência de

polimorfismos no tamanho deste gene. A amplificação do gene *spa* resultou em 4 tamanhos diferentes de amplicon: 300, 280, 200 e 100 pb. Esses tamanhos diferenciados do gene *spa* foram correlacionados a deleções de repetições na região X, podendo estar relacionadas possivelmente a mudanças evolutivas. Foi relatado no trabalho, que as amostras de *S. aureus* podem apresentar os genes *clfa* e *spa* e resultados negativos nos testes de aglutinação. Isso pode ser explicado pela reduzida expressão dessas proteínas de superfície ou pela interferência do material capsular em receptores de superfície (STEPHAN *et al.*, 2001).

Existe uma necessidade, por parte dos laboratórios de microbiologia, em buscar sistemas rápidos de identificação para *Staphylococcus*, que apresentem boa precisão e baixo custo, já que uma identificação errônea acarreta em terapêutica inapropriada que por sua vez pode facilitar a seleção de microrganismos resistentes (VANUFEL *et al.*, 1998). Portanto neste estudo foram realizadas análises fenotípicas e moleculares com intuito de verificar a expressão de proteínas de superfície de *Staphylococcus* relacionadas a ligação ao fibrinogênio, na tentativa de correlacionar esses dados com os resultados dos testes fenotípicos utilizados na detecção do fator “clumping” em amostras clínicas de *Staphylococcus*.

A tabela abaixo mostra diversas proteínas de *Staphylococcus* relacionadas à ligação ao fibrinogênio.

Tabela – Proteínas de *Staphylococcus* que se ligam ao fibrinogênio relacionadas de acordo com a localização, sítio de ligação, gene codificador e microorganismo.

Proteína	Localização no microorganismo	Sítio de ligação	Gene codificador	microorganismo
ClfA	Ancorada a parede celular	Fibrinogênio	<i>clfa</i>	<i>S. aureus</i>
ClfB	Ancorada a parede celular	Fibrinogênio	<i>clfB</i>	<i>S. aureus</i>
Fib	Extracelular	fibrinogênio	<i>fib</i>	<i>S. aureus</i>
Emp	Extracelular	Fibrinogênio, fibronectina, vitronectina e colágenos	<i>emp</i>	<i>S. aureus</i>
Fbe	Ancorada a parede celular	fibrinogênio	<i>fbe</i>	<i>S. epidermidis</i>
SdrG	Ancorada a parede celular	fibrinogênio	<i>sdrG</i>	<i>S. epidermidis</i>
Aae	Ancorada a parede celular	fibrinogênio	<i>aae</i>	<i>S. epidermidis</i>
Fbl	Ancorada a parede celular	fibrinogênio	<i>fbl</i>	<i>S. lugdunensis</i>

## 2) OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi verificar, através de diferentes técnicas, a ligação de amostras clínicas de *Staphylococcus* spp. ao fibrinogênio e detectar a presença de genes e algumas proteínas correspondentes relacionadas a esta ligação.

Objetivos específicos:

- 1) Avaliar a precisão de métodos fenotípicos de caracterização da ligação do *Staphylococcus* ao fibrinogênio como a aglutinação em lâmina, utilizando-se plasma de coelho, plasma humano e o sistema comercial “Slidex Staph Plus” (bioMérieux) na identificação de amostras clínicas de *Staphylococcus* spp.
- 2) Avaliar a ligação ao fibrinogênio em placa de microtitulação e a capacidade hemaglutinante e auto-aglutinante de amostras clínicas de *S. epidermidis*.
- 3) Detectar os genes *fbe* e *atle* de *S. epidermidis*, e *clfA* e *clfB* de *S. aureus*, que codificam proteínas de superfície responsáveis pela ligação ao fibrinogênio, através da técnica de PCR.
- 4) Verificar a expressão dos genes *fbe* e *atle* através da técnica de “Western Blotting” em amostras de *S. epidermidis*.
- 5) Analisar, comparativamente, as seqüências previstas de aminoácidos das proteínas Fbe e AtlE de *S. epidermidis*, com seqüências de outras espécies de *Staphylococcus*, utilizando-se recursos de bioinformática.

### **3) MATERIAIS E MÉTODOS:**

#### **3.1) Origem das amostras bacterianas**

Foram analisadas 88 amostras de *Staphylococcus* spp., obtidas a partir de diferentes sítios de infecção e/ou colonização. Estas amostras pertencem a coleção de cultura do Laboratório de Infecção Hospitalar, do Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ. Amostras de origem veterinária, fornecidas pela Embrapa – Juíz de Fora, MG, também foram avaliadas (Tabela 1). Estas amostras foram identificadas previamente por técnicas de automação, nos hospitais de origem, enquanto as amostras de origem veterinária foram identificadas no laboratório de Bacteriologia na Embrapa.

Como controle dos testes foram utilizadas diferentes cepas padrão oriundas da coleção de culturas do American Type Culture Collection (ATCC), dentre as quais estão relacionadas na Tabela 2.

Todas as amostras utilizadas no trabalho foram estocadas em caldo (“Tryptic Soy Broth”, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) TSB adicionado de 20% de glicerol e mantidas a -20°C.

### **3.2) Identificação das amostras de *Staphylococcus***

As amostras utilizadas neste estudo tiveram sua identificação confirmada, utilizando-se metodologias segundo MacFaddin (1977) e Bannerman (2003), como descrito a seguir:

#### 3.2.1) Aspecto morfo-tintorial

O aspecto morfo-tintorial foi verificado através da coloração pelo método de Gram. A leitura foi realizada observando-se a coloração, a morfologia e o arranjo das células bacterianas. As células coradas em violeta de formato cocóide foram consideradas como cocos Gram-positivos.

#### 3.2.2) Produção da enzima catalase

A produção de catalase foi verificada através da transferência de uma colônia bacteriana, previamente crescida em TSA (Tryptic Soy Agar, Oxoid), para uma gota de peróxido de hidrogênio (Proquimios, Rio de Janeiro, RJ) a 3%(v/v), sobre uma lâmina, com o auxílio de uma agulha bacteriológica. Quando houve formação de bolhas, a amostra foi considerada positiva. Foram utilizadas as cepas *S. epidermidis* ATCC 14990 e *E. faecalis* ATCC 29212 como controles positivo e negativo, respectivamente.

### 3.2.3) Teste de coagulase em tubo

Amostras de *Staphylococcus* coagulase-positivos foram diferenciados daquelas pertencentes ao grupo dos *Staphylococcus* coagulase-negativos através do teste da coagulase livre. Este teste foi realizado a partir de colônias isoladas em ágar (Blood Agar Base”, Oxoid), com 5% de sangue desfibrinado de carneiro, previamente mantidas a uma temperatura de 35°C, entre 24 a 48h, e repicadas para um tubo contendo plasma de coelho (Biocampo, Friburgo, Rio de Janeiro, RJ) diluído em solução salina 1:1(v/v). Após incubação a 37°C, por 4h em banho-maria, a produção de coágulo indicava, reação positiva. Resultados negativos foram confirmados em até 24 h de incubação.

Este teste permitiu separar as espécies *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. schleiferi* subsp. *coagulans* das demais espécies de *Staphylococcus*. As amostras padrão *S. aureus* ATCC 12600 e *S. epidermidis* ATCC 14990 foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

### 3.2.4) Produção de hemólise

A produção de hemólise foi verificada através de uma inspeção visual da amostra em meio de ágar sangue após 24, 48 e 72h de incubação, a 35°C. O aparecimento de zona de hemólise intensa ao redor das colônias, em até 48h de incubação, foi indicativo da presença de hemólise. Enquanto que, o aparecimento

de zona de hemólise menor ou igual a 1mm ou ausente, em até 72h de incubação, foi indicativo de hemólise fraca ou ausente, respectivamente.

As amostras *S. haemolyticus* ATCC 29970 e *S. aureus* ATCC 12600 foram utilizadas como controles de hemólise positiva, enquanto *S. epidermidis* ATCC 14990 foi utilizada como controle negativo deste teste.

### 3.2.5) Produção da enzima pirrolidonil arilamidase (PYRase)

A produção desta enzima foi verificada através de um inóculo de 3 colônias em 0,2mL de caldo TSB (Oxoid) contendo 0,01%(p/v) de L-pirroglutamil- $\beta$ -naftilamina (Sigma Chemical company, St. Louis, MO, EUA).

A leitura do teste foi realizada pela adição de uma gota de solução reveladora contendo dimetilaminocinamaldeído a 1% (p/v) (Sigma Chemical Company), após 4h de incubação a 37°C. O aparecimento de uma coloração rosa ou púrpura em até 10 min, sob agitação leve, foi indicativo de resultado positivo. Como controles positivo e negativo da reação foram usadas as amostras *S. haemolyticus* ATCC 29970 e *S. aureus* ATCC 12600, respectivamente.

Os testes de identificação descritos abaixo, foram inoculados a partir de uma suspensão bacteriana, equivalente a escala 2 de McFarland [ $\sim 6 \times 10^8$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL].

### 3.2.6) Produção da enzima urease

Um inóculo denso (0,25mL - escala McFarland 2) da amostra foi transferido para 3mL de caldo uréia de Rustigian & Stuart, confeccionado segundo MacFaddin (1977). A leitura foi realizada após 48h de incubação, a 35°C. A mudança de coloração do meio, de amarela para vermelha ou rosa, foi considerada como resultado positivo. As amostras tipo *S. epidermidis* ATCC 14990 e *S. haemolyticus* ATCC 29970 foram utilizadas como controles positivo e negativo desta prova, respectivamente.

### 3.2.7) Produção da enzima fosfatase

Para a verificação da produção da enzima fosfatase foram utilizados 3mL de caldo PDP (Phenolphthalein Diphosphate) adicionados de uma gota de solução PDP, ambos confeccionados de acordo com MacFaddin (1977). Foi utilizado um inóculo denso (0,25 mL - escala McFarland 2) da suspensão bacteriana e o tubo foi, então, incubado por 24 h a 35°C. A leitura foi realizada após a adição de uma gota de solução reveladora de NaOH a 40% (p/v), observando-se o aparecimento de coloração rosa para as amostras positivas. As amostras tipo utilizadas foram *S. aureus* ATCC 12600 (controle positivo) e *S. haemolyticus* ATCC 29970 (controle negativo).

### 3.2.8) Fermentação de carboidratos

A fermentação dos carboidratos foi verificada em 3mL de caldo vermelho de fenol, confeccionado de acordo com MacFaddin (1977), contendo 1% (p/v) de cada um dos açúcares: trealose (Sigma Chemical Co, USA) e manose (BDH Laboratory Supplies, England). Os açúcares foram adicionados ao caldo base vermelho de fenol após serem filtrados em membrana de celulose-acetato (0,2µm) (Advantac MFS, Inc., CA, USA). Foi utilizado um inóculo denso (0,25mL - escala McFarland 2) da suspensão bacteriana em cada tubo. A leitura foi realizada em 24, 48 e 72h de incubação, a 35°C. A modificação da coloração do meio, de vermelha para amarela, foi indicativa de resultado positivo.

Foram utilizadas as amostras *S. epidermidis* ATCC 14990 como controle positivo para manose e negativo para trealose e *S. haemolyticus* ATCC 29970 como controle negativo para manose e positivo para trealose.

### 3.2.9) Produção de enzima descarboxilase

A descarboxilação de aminoácidos foi verificada adicionando-se 1 gota da suspensão bacteriana (escala McFarland 2) em 1mL de caldo base Møller (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA) contendo 1% (p/v) L(+)-ornitina (ISO FAR, Rio de Janeiro, Brasil). O aminoácido ornitina foi adicionado à base Møller após ser filtrado em membrana de celulose-acetato (0,2µm) (Advantac). Após a inoculação bacteriana, os meios foram cobertos com óleo mineral. A leitura foi realizada com

24, 48 e 72h de incubação, a 35°C. A não alteração da coloração do meio ou a modificação para amarela foram indicativas de resultados negativos, enquanto a modificação da coloração do meio para roxa foi indicativa de resultado positivo.

Foram utilizadas as amostras *S. lugdunensis* DSM 4804 e *S. haemolyticus* ATCC 29970 como controles positivo e negativo da descarboxilação da ornitina, respectivamente.

#### 3.2.10) Produção de acetoína

A produção de acetoína a partir da glicose foi verificada após inoculação de 0,25mL da suspensão bacteriana (escala McFarland 2) em 3mL de meio Clark e Lubs, confeccionado de acordo com MacFaddin (1977), incubado por 48h a 35°C. Após adição das soluções reveladoras de  $\alpha$ -naftol (Vetec) a 5%(p/v) (0,6mL) e KOH (Vetec) a 40%(p/v) (0,2mL) foi verificado o aparecimento da coloração rosa, em até 15min, para o resultado positivo. Não foi observada alteração na coloração do meio quando o resultado era negativo.

As amostras *S. aureus* ATCC 12600 e *S. intermedius* ATCC 29663 foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

#### 3.2.11) Susceptibilidade aos antimicrobianos: bacitracina, novobiocina e desferrioxamina

Uma suspensão bacteriana, de cada amostra, com uma turbidez equivalente a 0,5 da escala McFarland ( $\sim 10^8$  UFC/mL) foi preparada em salina 0,85% (p/v) e

semeada com auxílio de um “swab” em ágar Muller-Hinton (Difco Laboratories, Maryland, EUA). Posteriormente, foram depositados sobre o meio discos de bacitracina (0,04U) (CECON, São Paulo, Brasil), novobiocina (5µg) (CECON, São Paulo, Brasil) e desferrioxamina (100µg) (Sigma Chemical Co) e a placa foi incubada a 35°C, por 24h.

Um halo menor ou igual a 9mm foi indicativo de resistência à bacitracina (BANNERMAN, 2003). As amostras utilizadas no controle do teste foram *S. aureus* ATCC 12600 (resistente) e *Micrococcus luteus* ATCC 10240 (sensível).

As amostras que apresentaram halos menores ou iguais a 16mm foram consideradas resistentes à novobiocina (BANNERMAN, 2003). As amostras tipo utilizadas como controles foram *S. saprophyticus* ATCC 15305 (resistente) e *S. epidermidis* ATCC 14990 (sensível).

As amostras que apresentaram qualquer halo de inibição foram consideradas susceptíveis à desferrioxamina (MONSEN *et al.*,1998). Foram utilizadas as amostras *S. hominis* ATCC 27844 e *S. warneri* ATCC 10209 como controles de sensibilidade e resistência, respectivamente.

### **3.3) Curva de crescimento**

Como alguns trabalhos mostram que em *Staphylococcus* o ponto ótimo de expressão de algumas proteínas de superfície que se ligam ao fibrinogênio é na fase log de crescimento (NI EIDHIN *et al.*, 1998; RENNERMALM, NILSSON &

FLOCK, 2004), foi realizada uma curva de crescimento, em duplicata, com a amostra controle *S. epidermidis* ATCC 35984, para se conhecer o início e o final da fase log.

A referida amostra foi incubada em caldo TSB por 18h e, posteriormente, foi diluída em 3 mL de caldo TSB, em uma concentração final equivalente a escala 0,5 de MacFarland, aproximadamente  $10^8$  UFC. A leitura foi feita em intervalos de 1h, em um espectrofotômetro B295II (Micronal, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), com um filtro de densidade ótica de 600nm ( $DO_{600nm}$ ), até o momento em que não houvesse aumento da DO (fase estacionária).

#### **3.4) Avaliação da precisão de testes de aglutinação em lâmina para verificação da ligação de *Staphylococcus* ao fibrinogênio.**

Os testes de aglutinação em lâmina, utilizados para detecção da interação bacteriana com o fibrinogênio, foram realizados utilizando-se plasma de coelho (Biocampo), plasma humano (obtido a partir de uma única coleta no laboratório do Hospital Naval Marcílio Dias, Rio de Janeiro), esferas de látex com fibrinogênio (Sigma) e o sistema comercial “Slidex Staph Plus” (bioMérieux S/A, Marcy E`toile, France).

Os testes de aglutinação foram realizados, com plasmas pertencentes ao mesmo lote, a partir de uma amostra cultivada por 48h, em ágar sangue, obtendo-se uma suspensão bacteriana densa preparada a partir de 3 colônias em 40 $\mu$ L de

água destilada sobre uma lâmina de vidro (BANNERMAN, 2003). Foram analisadas 88 amostras de *Staphylococcus*. Em seguida, foi adicionada uma gota de plasma à cada suspensão. O resultado foi considerado positivo quando houve aglutinação em até 10seg. O controle de auto-aglutinação do teste foi realizado observando-se a suspensão, sem adição do plasma, na outra extremidade da lâmina. Para sete amostras de *S. epidermidis* (18hpa, 4s, 20s, 56s, 61s, 72s, 86s), crescidas previamente por 24h em ágar sangue, foi realizado o teste a partir da cultura bacteriana inoculada em caldo TSB (Oxoid) até uma concentração bacteriana referente a escala 0,5 McFarland. Após isso as amostras foram crescidas por 4 e 9h a 35°C. As culturas foram centrifugadas a 3.000xg por 5 min e o sedimento foi suspenso novamente em 500µL de água destilada previamente esterilizada. Para os testes de aglutinação com plasma, foram utilizados 40µL dessa suspensão para a realização de cada ensaio.

Para a realização do teste de detecção da interação bacteriana às esferas de látex com fibrinogênio, as sete amostras de *S. epidermidis* citadas anteriormente, foram preparadas de acordo com Szöke e colaboradores (1996), com algumas modificações. Uma suspensão de esferas de látex (1mL) foi misturada com 3mL de tampão glicina-NaOH (0,17M; pH 8,2), centrifugada (3.000xg, 20min) e lavada (2x) no mesmo tampão. Após suspender novamente o sedimento em 3mL do mesmo tampão, foram adicionados 20µg/mL de fibrinogênio plasmático (Sigma Chemical Co). A suspensão foi agitada (80rpm), a temperatura ambiente, por 18h, centrifugada e lavada (2x) com tampão glicina-NaOH contendo 0,05% de soro

albumina bovina (BSA; Sigma Chemical Co). Para a realização do teste, 20 $\mu$ L da suspensão bacteriana (escala 2 McFarland) foram misturados, em uma lâmina, com 10 $\mu$ L da suspensão de esferas de látex, previamente recobertas com fibrinogênio. Como controle negativo, as suspensões bacterianas foram misturadas, nas mesmas proporções, somente com tampão glicina-NaOH. A leitura foi feita a olho nu, após misturar a suspensão bacteriana com as esferas de látex, por 2min, a temperatura ambiente. O resultado foi considerado positivo quando houve aglutinação neste intervalo de tempo (2min) (NAGY, MANNCKE & WERNER, 1994).

O sistema comercial “Slidex Staph Plus” foi utilizado para detecção de aglutinação conforme instruções do fabricante. O procedimento a seguir foi utilizado para a confecção do teste: Os reagentes (R1, látex anti-PTN-A e fator “clumping” de *S. aureus* e R2, látex controle negativo) foram deixados à temperatura ambiente (18° a 25°C) antes da utilização. Em uma cartela descartável, foram escolhidos dois círculos: em um dos círculos foi colocada uma gota de R1 e no segundo uma gota de R2, segurando-se os frascos conta-gotas, verticalmente, ao distribuir as gotas. As colônias suspeitas provenientes de um ágar sangue foram transferidas com auxílio de bastões de poliestireno para cada um dos dois círculos. Após misturar cuidadosamente durante 10seg com auxílio dos bastões foi aplicado um movimento rotativo sobre a cartela durante 20seg. A leitura da reação foi realizada sob luz normal, sem utilizar lupa. O resultado foi considerado positivo quando houve aglutinação dentro dos 20seg.

Foram utilizados como controles positivo e negativo nos testes de aglutinação as amostras de *S. aureus* ATCC 12600 e *S. epidermidis* ATCC 14990, respectivamente.

### **3.5) Quantificação da aderência de *S. epidermidis* ao fibrinogênio**

A quantificação da aderência bacteriana ao fibrinogênio foi realizada, de acordo com Nilsson e colaboradores (1998), com algumas modificações. A aderência das amostras ao fibrinogênio foi verificada após cultivo das 24 amostras clínicas de *S. epidermidis* em ágar sangue e incubação por 18 - 24h, a 35°C. As colônias bacterianas (3 a 5) foram transferidas para 5mL de tampão PBS. Posteriormente, a concentração bacteriana foi ajustada em tampão PBS para a densidade ótica de 0,5 (DO<sub>600nm</sub>).

Os poços da placa de microtitulação (Nunc, Copenhagen, Denmark) foram cobertos com fibrinogênio (Calbiochem, San Diego, Califórnia) diluído em PBS, em concentrações de 10 µg/mL e 20 µg/mL, e a placa mantida por 24 horas a 4°C. O bloqueio da aderência inespecífica foi feito com 1% (v/v) de BSA (Soro Albumina Bovina) (Roche) em PBS, por 1h a 37°C.

Após lavagem com PBS, 50µL da suspensão bacteriana foram transferidos para placa de microtitulação. Após incubação por 2h, a 35°C, os poços foram lavados com PBS e, a seguir, secos. As células foram fixadas com formaldeído a 10% por 1h a 4°C. Após uma lavagem com PBS, foi inserido 50 µL de cristal violeta 0,1% em cada poço da placa de microtitulação. Após duas lavagens a placa foi seca

por inversão em papel absorvente e foram adicionados 50µL de solução etanol-acetona (80:20) em cada poço da placa e a aderência bacteriana foi determinada por leitura ótica, em DO<sub>570nm</sub>. A aderência bacteriana foi calculada por média aritmética em cada concentração de fibrinogênio. Para cada amostra foram utilizados 6 poços da placa de microtitulação com as concentrações de fibrinogênio (10µg/mL e 20µg/mL). Como controles foram utilizadas as amostras *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228 e *S. epidermidis* ATCC 35984.

Para sete amostras clínicas de *S. epidermidis* que apresentaram alguns resultados discrepantes nos testes fenotípicos de aglutinação em lâmina com plasma, a aderência das amostras ao fibrinogênio foi verificada após cultivo das mesmas em caldo TSB por 4h e 9h (início e fim da fase log de crescimento bacteriano). Após centrifugação (IEC modelo Centra MP4) por 5min a 3.000xg, as amostras provenientes dos dois tempos de crescimento foram suspensas novamente em 5 mL de tampão PBS. Posteriormente, a concentração bacteriana foi ajustada em tampão PBS para densidade ótica de 0,5 (DO<sub>600nm</sub>). Após isso, o procedimento foi realizado da mesma maneira que foi descrito acima.

Todos os testes fenotípicos descritos a seguir, excluindo o item 3.9, foram realizados para sete amostras de *S. epidermidis*, dentre as quais, algumas apresentaram resultados falso-positivos nos testes de aglutinação. Amostras da mesma espécie com resultados negativos e cepas controle também foram utilizadas para os ensaios a seguir. Esses testes foram realizados com a finalidade de confirmar ou não os resultados discrepantes encontrados para esta espécie.

### **3.6) Avaliação da capacidade hemaglutinante de algumas cepas de *S. epidermidis***

A hemaglutinina é um carboidrato de superfície celular, de natureza polissacarídica, e pode ser uma adesina alternativa envolvida na ligação à superfícies de amostras que não possuem adesinas protéicas como Fbe e AtlE, ou polissacarídicas como PS/A, mas que conseguem formar biofilmes em uma segunda etapa (RUPP & HAN, 1995). A reação de hemaglutinação foi realizada por microtécnica, utilizando-se hemácias humanas B, não tripisinizadas, suspensas em solução PBS [137 mM (p/v) de NaCl (Reagen, Quimibras indústrias, Rio de Janeiro, RJ), 2,7 mM (p/v) de KCl (Reagen), 10 mM (p/v) de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Reagen), 1,4 mM (p/v) de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Reagen), pH 7,4] (MATTOS-GUARALDI & FORMIGA, 1986). As amostras de *S. epidermidis*, cultivadas previamente por 48h em ágar sangue, testadas foram lavadas 3 vezes e foram suspensas novamente em PBS, numa turvação de absorbância 0,8 (DO<sub>570nm</sub>) em espectrofotômetro. Foram adicionados 50µL da suspensão de hemácias 0,5% a cada orifício da placa de microtitulação, contendo 50µL das suspensões microbianas previamente diluídas (1:2) em PBS. As placas de microtitulação foram agitadas por 30seg, incubadas a 37°C, por 3 - 4h. A leitura foi confirmada após incubação por uma noite, a 4°C. A aglutinação foi demonstrada pela formação de um tapete de hemácias difuso e frouxo depositado no fundo dos orifícios da placa de microtitulação. As amostras toxinogênicas de *Corynebacterium diphtheriae* subsp. *mitis* CDC E8392 (aderência difusa) e 241 (aderência localizada) foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

Os testes de hidrofobicidade de superfície celular descritos a seguir nos itens 3.7 e 3.8 foram realizados segundo Rosenberg e Doyle (1990) e Krespky e colaboradores (2003).

### **3.7) Teste de Aglutinação espontânea (AE)**

Para observar a hidrofobicidade baseada na capacidade de aglutinação das amostras em caldo de crescimento, as bactérias foram incubadas por 24h em caldo TSB (pH 7,0). Após este período, a cultura foi agitada em “vortex” e observada visualmente para a detecção de grumos formados pelos microrganismos. Os estafilococos que apresentaram aglutinação em caldo de cultura original foram considerados auto-aglutinantes (hidrofobicidade positiva), enquanto os não aglutinantes mantiveram o meio de cultura turvo, mesmo após suspensão da cultura através da agitação do caldo em “vortex”. Como controles positivo e negativo foram utilizadas as amostras *S. epidermidis* ATCC 35984 e *S. epidermidis* HAM 892, respectivamente.

### **3.8) Teste de Auto-aglutinação (AA)**

Para avaliar a hidrofobicidade das amostras, principalmente daquelas que não apresentaram aglutinação quando testadas em meio de cultura, 40µL da suspensão bacteriana em PBS (pH 6,8) foi colocada sobre uma lâmina,

homogeneizada com auxílio de um bastão e observada contra a luz. As suspensões que apresentaram formação de grumos foram consideradas hidrofóbicas (AA+). As bactérias não aglutinantes (AA-) apresentaram-se como uma suspensão leitosa. Como controles positivo e negativo foram utilizadas as amostras *S. epidermidis* ATCC 35984 e *S. epidermidis* HAM 892, respectivamente.

### **3.9) Detecção de genes que codificam proteínas ligadoras de fibrinogênio**

#### 3.9.1) Liberação do DNA bacteriano

A liberação do DNA bacteriano foi realizada através de lise térmica, de acordo com o protocolo de Nunes e colaboradores (1999). As amostras de *Staphylococcus* spp. foram inicialmente cultivadas em 3mL de meio TSB e incubadas a 35°C, durante 18 - 24h. Posteriormente, uma alíquota de 1mL desta cultura foi submetida à centrifugação, por 4min, a 5.000xg. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado três vezes em 1mL de tampão TE [10mM (p/v) de Tris(Sigma) ,1mM (p/v) de EDTA (Sigma), pH 7,8] e dissolvido em 100µL de água livre de nucleases. Esta suspensão foi mantida a temperatura de ebulição (100°C) por 10min e, em seguida, foi centrifugada por 30seg, a 10.000xg, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e utilizado para detecção dos genes *clfa*, *clfb*, *atle*, *fbe* através da reação da polimerase em cadeia (Polymerase Chain Reaction, PCR) descrita a seguir

### 3.9.2) Amplificação dos genes *clfa*, *clfb*, *atle*, *fbe* através da reação de PCR

A técnica de PCR foi realizada para 35 amostras de *S. aureus* (*clfa*, *clfb*) e 24 amostras de *S. epidermidis* (*fbe*, *atle*). Dentro desse grupo de amostras, existem algumas que apresentaram resultados positivos nos testes fenotípicos de aglutinação e algumas amostras negativas que serviram como controles dos testes. A detecção dos genes *fbe* e *atle*, de *S. epidermidis*, foi realizada conforme descrito por Nilsson e colaboradores (1998) e Frebourg e colaboradores (2000), respectivamente, enquanto os genes *clfA*, *clfB* foram detectados segundo Tristan e colaboradores (2003). Os iniciadores e as condições empregadas na reação estão listados na tabela 4.

A amplificação foi realizada em um termociclador (PTC-100; MJ Research, Inc., Watertown, Massachussets, EUA), utilizando-se um volume total de 25µL para cada reação, constituída de 3µL de DNA liberado por lise térmica, 1pmol de cada iniciador (Genemed Synthesis, San Francisco, CA, EUA), 200µM de cada deoxinucleotídio trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) (Life Technologies, São Paulo, Brasil), tampão da enzima [10mM (p/v) de Tris HCl (Sigma), 25mM (p/v) de KCl (Biotools)], 2 mM (p/v) de MgCl<sub>2</sub> (Biotools) e 1,5U de *Taq* DNA polimerase (Biotools, Madrid, Espanha) .

Os fragmentos amplificados foram analisados pela técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em TBE [0,89M (p/v) de Tris(Sigma), 0,89M (v/v) de ácido bórico(Sigma), 2,5mM (p/v) de EDTA (Sigma), pH 8,2] a 80 V por 1:30min. Posteriormente, o gel foi corado com solução de brometo de etídio (0,5µg/mL) e

fotografado sob luz UV. Como padrão de tamanho de DNA, para a corrida eletroforética, foi utilizado o marcador 100 pb DNA ladder (Biotools).

Foram utilizadas as amostras *S. aureus* ATCC 25923 (*clfA*+ *clfb*+ *fbe*- *atlE*- ) e *S. epidermidis* ATCC 35984 (*fbe*+ *atlE*+ *clfa*- *clfb*-) como controles das reações de PCR.

### **3.10) Western Blotting**

#### 3.10.1) Extração de proteínas totais

A extração de proteínas totais foi realizada segundo Laport e colaboradores (2001). Foram selecionadas as amostras clínicas de *S. epidermidis* e as amostras controle *S. epidermidis* ATCC 35984 e *Escherichia coli* ATCC 11229. As amostras bacterianas foram cultivadas em meio TSB sob agitação de 500xg, a 37°C, por uma noite. Após este período, foi realizada uma diluição de 1:10 (1mL do inóculo para 9mL de TSB), e foram novamente colocadas na estufa a 35°C, sob agitação de 500xg, por 4h, para as amostras de *Staphylococcus* e 1h para a amostra controle *E. coli* ATCC 11229. As células em fase exponencial de crescimento foram centrifugadas (centrífuga Sorval, modelo RC2-B) por 18min, a 3.000xg. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado duas vezes em 1mL de tampão TE 1x [10mM (p/v) de Tris(Sigma) ,1mM (p/v) de EDTA (Sigma), pH 7,8], sendo centrifugado (microcentrífuga Fanem, modelo 213) por 10min, a 12.000xg, após cada lavagem. Os sedimentos bacterianos foram, então, ressuspensos em 50µL deste mesmo tampão e incubados por 2h, a 37°C, com lisozima (20mg/mL -

Pharmacia) e lisostafina (0,1mg/mL - Sigma), apenas para as amostras de *Staphylococcus*.

Para análise das proteínas por eletroforese em SDS-PAGE, foram adicionados 50µL de tampão de tratamento [2% azul de coomassie; 0,5M de Tris, pH 6,8; 4% (p/v) de SDS (Pharmacia); 10% (p/v) de beta-mercaptoetanol (Reagen); 20% (p/v) de glicerol]. As amostras foram, então, aquecidas a 100°C por 5min e centrifugadas a 2.500xg por 5min, para a obtenção do sobrenadante, que foi estocado a -20°C.

### 3.10.2) SDS-PAGE

Para a realização da eletroforese unidimensional de proteínas, o gel de poliacrilamida foi preparado como descrito por Laemmli (1970), constando de um sistema vertical e descontínuo. A eletroforese foi feita a partir de um gel de empilhamento [0,25M de Tris-HCl, pH 6,8; 0,1% (p/v) de SDS; 4% (p/v) de acrilamida bis-acrilamida; 2% (p/v) de persulfato de amônia; 0,1% (v/v) de TEMED] e de um gel de separação [0,4% (p/v) de Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% (p/v) de SDS; 0,1% (p/v) de glicerol; 10% (p/v) de acrilamida bis-acrilamida; 2% (p/v) de persulfato de amônia; 0,1% (v/v) de TEMED]. Os extratos protéicos contendo obtidos a partir de suspensões com o mesmo número de células foram separados em gel de poliacrilamida 10% sob uma corrente de 20mA em tampão de corrida [25mM de Tris; 193mM de glicina; 0,1% (p/v) de SDS]. As proteínas separadas por eletroforese foram visualizadas após coloração com uma solução de azul de

coomassie [0,125% de “Coomassie Brilliant Blue” R-250; 50% (v/v) de metanol; 10% (v/v) de ácido acético] por, aproximadamente, 2h. A seguir, realizou-se a descoloração por 2h, com uma solução de 50% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético e com uma solução contendo os mesmos reagentes a 5 e 7% (v/v), respectivamente, até o clareamento do fundo.

### 3.10.3) Anticorpos utilizados e suas procedências:

Anticorpo monoclonal Anti-Fbe de *S. epidermidis* – Cedido pelo Professor Jan-Ingmar Flock – Karolinska Institutet, Microbiology and TumorBiology Center, Stockholm, Sweden.

Anticorpo monoclonal Anti-AtIE de *S. epidermidis* – Cedido pelo Professor Simon Foster - Department of Molecular Biology and Biotechnology - University of Sheffield, United Kingdom.

### 3.10.4) Técnica de “Western Blotting”

As proteínas separadas em SDS-PAGE foram transferidas, eletroforéticamente para uma membrana de nitrocelulose, segundo Towbin, Staehelin e Gordon (1979). A transferência foi feita durante 2h, a 90V, em tampão de transferência [25 mM de Tris; 193mM de glicina; 20% (v/v) de metanol].

Para a identificação das proteínas Fbe e AtIE de *S. epidermidis*, após a transferência, a membrana foi incubada por 18h, em tampão de bloqueio, contendo PBS (137mM de NaCl; 20 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 80mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 2,7mM de KCl)

acrescido de 4% (p/v) de leite desnatado em pó (Molico, Nestlé) para saturar a nitrocelulose. Em seguida, três lavagens de 15min foram feitas em PBS, acrescido de 0,1% (v/v) de Tween 20. A membrana foi, então, incubada por 1h, sob agitação, à temperatura ambiente, com o anticorpo primário GST-Fbe (Glutathione-S-Transferase) ou anti-AtIE de *S. epidermidis*, na diluição recomendada de 1:1.000 em PBS acrescido de 0,5% (p/v) de leite desnatado em pó. Após a incubação, três lavagens de 15min, em PBS, se seguiram e a membrana foi incubada novamente à temperatura ambiente, sob agitação, por 1h, com o anticorpo secundário diluído 1:1000 em PBS-leite 0,5% (p/v), anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (KPL, Gaithersburg MD, USA) para a proteína AtIE ou anti-IgG de carneiro conjugado à peroxidase (KPL, Gaithersburg MD, USA) para a proteína Fbe. Para remover o anticorpo conjugado foram realizadas três lavagens de 15min em PBS. A revelação da reação foi realizada utilizando-se o kit comercial por quimiluminescência (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce Biotechnology, Inc, Rockford, IL – USA). A membrana foi incubada, por 5 min, na presença da solução reveladora. Após o tempo de revelação, desprezou-se o revelador e a membrana foi exposta a um filme de raio-X (X-OMAT, Kodak) em um cassete. A membrana ficou exposta por, aproximadamente, 1min, após o qual o filme foi revelado com MC-110 (Kodak) e fixado (fixador para raio X Dental, Kodak).

Alternativamente, a revelação foi realizada com DAB (3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride Dihydrate, 97%) (Sigma Chemical Co),

segundo a técnica de Jaffe e colaboradores (1984), que consiste em uma revelação colorimétrica. A membrana foi revelada com uma solução de 50mg/mL de DAB, 0,01% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 volumes em tampão PBS, por no máximo 15min, na ausência de luz. Passado o tempo de revelação, desprezou-se o revelador e, para parar a reação, acrescentou-se água destilada.

Foram utilizadas as amostras controle *S. epidermidis* ATCC 35984 como controle positivo e *E. coli* ATCC 11229 como controle negativo para a expressão das proteínas Fbe e AtlE.

### **3.11) Comparação das seqüências de aminoácidos das proteínas Fbe e AtlE de *S. epidermidis* com seqüências homólogas de outros *Staphylococcus***

As seqüências de aminoácidos da proteína ligadora de fibrinogênio, Fbe, e da autolisina, AtlE, de *S. epidermidis* foram obtidas através das ferramentas de procura do “National Center for Biotechnology Information - NCBI” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A seguir, as seqüências foram comparadas com seqüências homólogas presentes em espécies de *Staphylococcus*, através das ferramentas de procura (“BLAST search”) disponíveis no endereço eletrônico [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) do NCBI. As seqüências que apresentaram maior percentual de identidade ou que já foram descritas na literatura como relacionadas com as proteínas Fbe e AtlE foram alinhadas através da ferramenta ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

### 3.12) Análises Estatísticas

Foi realizado o Teste *t* de Student para as amostras de *S. epidermidis*, que apresentaram resultados iguais entre os testes com plasma de coelho e humano, na comparação dos resultados, entre os seguintes grupos: valor da  $DO_{570nm}$  em amostras incubadas com 10 ou 20 $\mu$ g/mL de fibrinogênio versus amostras positivas ou negativas nos testes de aglutinação em plasma de coelho e humano. Para a avaliação da influência do tempo de incubação (4 e 9h) das amostras de *S. epidermidis* e a concentração de fibrinogênio (10 e 20 $\mu$ g/mL) foi feita uma análise pelo teste “ANOVA one way” comparando-se os resultados obtidos. O nível de significância utilizado em todas as análises foi de  $p = 0,05$ . O software utilizado foi o SPSS 10.0.

Tabela 1 –Caracterização das 88 amostras de *Staphylococcus* analisadas no presente estudo, de acordo com o local, identificação por automação e a fonte de isolamento.

Local de isolamento (nº de amostras)	Espécie (nº de amostras)	Fonte de isolamento (nº de amostras)
HNMD (54)	<i>S. aureus</i> (21)	Sangue (44)
	<i>S. epidermidis</i> (15)	Urina (3)
	<i>S. haemolyticus</i> (14)	Sítio cirúrgico (2)
	<i>S. lugdunensis</i> (2)	Líquido peritonial (1)
	<i>S. saprophyticus</i> (2)	Tumor peri-umbilical (1) Secreção de quadril (1) Ponta de cateter (1) Líquor (1)
Copa D`or (3)	<i>S. aureus</i> (3)	Lavado bronquio alveolar (2) Secreção traqueal (1)
HUCFF (11)	<i>S. aureus</i> (8)	Sangue (3)
	<i>S. lugdunensis</i> (2)	Sítio cirúrgico (2)
	<i>S. epidermidis</i> (1)	Secreção traqueal (2) Narina anterior (3) Lesão cutânea (1)
Embrapa, MG (2)	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i> (2)	Fonte canina (2)
HCUFU (5)	<i>S. aureus</i> (3)	Sítio de inserção de cateter (1)
	<i>S. saprophyticus</i> (1)	Ponta de cateter (1)
	<i>S. epidermidis</i> (1)	Fístula A/V(1) Narina anterior (1) Fezes (1)
HBP (1)	<i>S. epidermidis</i> (1)	Sangue (1)
HCR (1)	<i>S. epidermidis</i> (1)	Narina anterior (1)
CB (4)	<i>S. epidermidis</i> (4)	Narina anterior (4)
LB (2)	<i>S. saprophyticus</i> (2)	Urina (2)
HB (1)	<i>S. lugdunensis</i> (1)	Sangue (1)
HUAP (2)	<i>S. lugdunensis</i> (1)	Ponta de cateter (1)
	<i>S. epidermidis</i> (1)	Secreção ocular (1)
LL (1)	<i>S. saprophyticus</i> (1)	Urina (1)
LSF (1)	<i>S. lugdunensis</i> (1)	Punção cutânea (1)

HNMD: Hospital Naval Marçilio Dias; HUCFF: Hospital Universitário Clementino Fraga Filho; Embrapa: Empresa Brasileira de Agropecuária; HCUFU: Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia; HBP – Hospital Beneficência Portuguesa; HCR: Hospital Cardoso Rodrigues; CB: Clínica Bambina; LB: Laboratório Bronstein; HB: Hospital de Bonsucesso; HUAP: Hospital Universitário Antônio Pedro; LL: Laboratório Lâmina; LSF: Laboratório Sergio Franco, Fístula A/V – átrio-ventricular

Tabela 2 – Relação das cepas padrão das diferentes espécies de *Staphylococcus* pertencentes a coleções de culturas internacionais.

Espécie	Característica	Referência	Número
<i>S. aureus</i>	Amostra padrão para antibiograma (CLSI)	ATCC	25923
	Amostra tipo	ATCC	12600
<i>S. epidermidis</i>	Amostra tipo	ATCC	14990
	Produtora de slime ( <i>ica+</i> )	ATCC	35984
	Cepa FDA	ATCC	12228
	Amostra padrão	HAM	892
<i>S. haemolyticus</i>	Amostra tipo	ATCC	29970
<i>S. intermedius</i>	Amostra tipo	ATCC	29663
<i>S. saprophyticus</i>	Amostra tipo	ATCC	15305
<i>S. hominis subsp. hominis</i>	Amostra tipo	ATCC	27844
<i>S. warneri</i>	Amostra tipo	ATCC	10209
<i>S. lugdunensis</i>	Amostra tipo	DSM	4804
<i>E. faecalis</i>	Amostra padrão	ATCC	29212
<i>Micrococcus luteus</i>	Amostra tipo	ATCC	10240
<i>C. diphtheriae subsp. mitis</i>	Amostra padrão	CDC	E8392
	Amostra padrão	Brasileira	241
<i>Escherichia coli</i>	Amostra padrão	ATCC	11229

ATCC – “American Type Culture Collection”; DSM – “Deutsche Sammlung von Mikroorganismen”; CCM – Czechoslovak Collection of Microorganisms; CDC – Center for Disease and Control; CLSI – Clinical and Laboratory Standard Institute; FDA – Food and Drug Administration; HAM: Institut für Allgemeine Mikrobiologie

Tabela 3 – Relação das 24 amostras clínicas de *S. epidermidis* avaliadas através dos testes de ligação ao fibrinogênio em relação a fonte, ao local e a data de isolamento e susceptibilidade à oxacilina.

Amostra de <i>S. epidermidis</i>	Fonte de isolamento	Local	Data de isolamento (mês/ano)	Susceptibilidade à oxacilina
18hp	sangue	HNMD	10/01	resistente
27hp	sangue	HNMD	11/01	resistente
32hp	sangue	HNMD	11/01	resistente
33hp	sangue	HNMD	11/01	resistente
40hp	sangue	HNMD	11/01	resistente
4s	narina anterior	HUCFF	12/94	resistente
12s	fezes	HU-UFU	05/96	resistente
20s	secreção ocular	HUAP	04/97	NR
56s	sangue	HBP	11/98	resistente
61s	narina anterior	HCR	07/98	sensível
68s	sangue	HNMD	06/98	resistente
70s	sangue	HNMD	07/98	resistente
72s	sangue	HNMD	07/98	resistente
73s	sangue	HNMD	08/98	sensível
78s	sangue	HNMD	09/98	resistente
86s	sangue	HNMD	12/98	resistente
90s	sangue	HNMD	02/99	sensível
140s	líquido peritoneal	HNMD	06/99	resistente
142s	tumor peri-umbilical	HNMD	07/99	resistente
144s	sítio cirúrgico	HNMD	07/99	sensível
203s	narina anterior	CB	09/99	NR
205s	narina anterior	CB	10/99	NR
206s	narina anterior	CB	09/99	NR
207s	narina anterior	CB	09/99	NR

Nesta tabela estão incluídas as duas amostras de *S. epidermidis* que foram auto-aglutinantes nos testes com plasma. NR: teste não realizado; HNMD: Hospital Naval Marcílio Dias; HC-UFU: Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia; CB: Clínica Bambina; HUCFF: Hospital Universitário Clementino Fraga Filho; HUAP: Hospital Universitário Antônio Pedro; HCR: Hospital Cardoso Rodrigues; HBP: Hospital Beneficência Portuguesa. Todos os dados das amostras desta tabela foram retirados das fichas dos pacientes dos respectivos hospitais citados anteriormente.

Tabela 4. Seqüências de oligonucleotídeos utilizadas como iniciadores e condições das reações de PCR.

gene	oligonucleotídeos (concentração)	Tm	ciclo	Tamanho do amplicon (pb)	referência
<i>atlE</i>	atlE-F CAA CTG CTC AAC CGA GAA CA (50pmoles/reação) atlE-R TTT GTA GAT GTT GTG CCC CA (50pmoles/reação)	58°C 56°C	94°C - 2min 94°C - 1min 55°C - 1min 72°C - 2min } 30x 72°C - 5min	682	Frebourg <i>et al.</i> , 2000
<i>clfA</i>	CLFA-1 ATTGGCGTGGCTTCAGTGCT (50pmoles/reação) CLFA-2 CGTTTCTTCCGTAGTTGCATTTG (50pmoles/reação)	57°C 56°C	94°C - 3min	292	Tristan <i>et al.</i> , 2003 (com modificações)
<i>clfB</i>	CLFB-1 CATCAGTAATAGTAGGGGGCAAC (50pmoles/reação) CLFB-2 TTCGCACTGTTTGTGTTGCAC (50 pmoles/reação)	58°C 56°C	94°C - 1min 55°C - 1min 72°C - 2min } 30x 72°C - 5min	205	
<i>fbe</i>	FBE-F 5'- TAAACACCGACGATAATAACCAAA -3' (50pmoles/reação) FBE-R5'-GTCTAGCCTTATTTTCATATTCA-3' (50 pmoles/reação)	53°C 53°C	94°C - 3min 94°C - 1min 62°C - 1min 72°C - 1min } 30x 72°C - 5min	495	Nilsson <i>et al.</i> , 1998 (com modificações)

pb - pares de bases de nucleotídeos, Tm - Temperatura média de anelamento.

## **4) RESULTADOS:**

### **4.1) Identificação fenotípica das amostras de *Staphylococcus*.**

As 88 amostras de *Staphylococcus* analisadas neste estudo, incluindo as sete amostras que foram auto-aglutinantes nos testes com plasma e as 4 amostras que apresentaram resultados diferentes entre os plasmas utilizados, foram identificadas, pelo esquema convencional de testes bioquímicos, como sendo: *S. aureus* (35), *S. epidermidis* (24), *S. haemolyticus* (14), *S. lugdunensis* (7) e *S. saprophyticus* (6). Duas amostras identificadas como *S. intermedius* no laboratório da Embrapa foram caracterizadas como *S. schleiferi* subsp. *coagulans* no presente estudo, uma vez que o teste de produção de acetoina foi positivo para estas duas amostras, enquanto que o fator “clumping” foi negativo, entre outros testes realizados. A espécie *S. intermedius* é negativa para o primeiro teste e variável para o segundo.

### **4.2) Avaliação da precisão dos métodos fenotípicos de aglutinação em lâmina, utilizados na caracterização de amostras clínicas de *Staphylococcus*.**

A utilização dos métodos de aglutinação em lâmina mostrou sete amostras auto-aglutinantes nos testes com plasma, das 88 amostras das diferentes espécies avaliadas. O sistema comercial Slidex Staph Plus não apresentou resultados de auto-aglutinação. Assim, as amostras auto-aglutinantes não foram consideradas

para análise da precisão dos testes de aglutinação na identificação presuntiva dos *Staphylococcus* (Tabela 5). As amostras de *S. epidermidis* (33Hp, 203s), de *S. saprophyticus* (139s), de MRSA (667a) que apresentaram resultados diferentes (aglutinação positiva e negativa) entre os plasmas de coelho e humano utilizados, também foram excluídas da análise (tabela 5).

Comparando-se a precisão dos três métodos de aglutinação utilizados na caracterização de amostras clínicas de *Staphylococcus*, foi verificado, para as amostras analisadas, que o sistema comercial Slidex Staph Plus apresentou uma precisão (100%) superior quando comparado aos testes de aglutinação em plasma de coelho e em plasma humano para as diferentes espécies de *Staphylococcus*.

As amostras de *S. aureus* foram agrupadas na tabela 5 de acordo com o perfil de susceptibilidade ao antibiótico oxacilina. Assim foi observado que todas as amostras de *S. aureus* sensíveis à oxacilina (OSSA) aglutinaram nos três métodos fenotípicos. Enquanto que as amostras de *S. aureus* resistentes à oxacilina (ORSA) apresentaram valores menores de aglutinação, como 90% (9/10) em plasma humano e 90% (9/10) em plasma de coelho (Tabela 5).

Todas as amostras de *S. lugdunensis* aglutinaram no sistema comercial Slidex Staph Plus (100%) e nenhuma aglutinou nos plasmas de coelho ou humano. Duas amostras foram excluídas da análise por serem auto-aglutinantes nos testes de aglutinação utilizando plasma (Tabela 5).

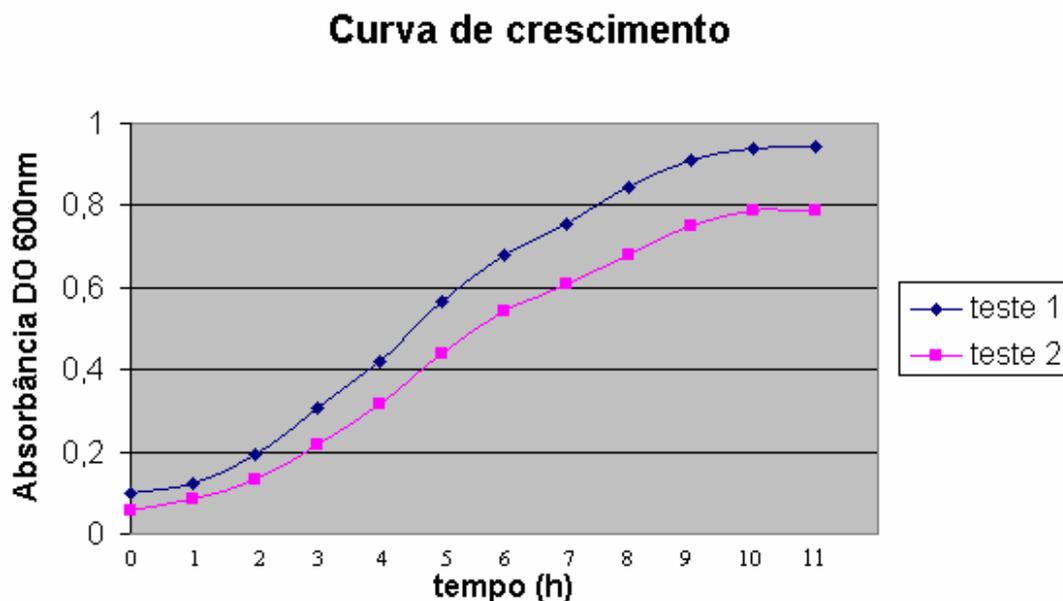
Nenhuma amostra de *S. saprophyticus* apresentou aglutinação nos testes realizados com plasma humano (100%) e plasma de coelho (100%) (Tabela 5).

Apesar de *S. epidermidis* ser considerado fator “clumping” negativo pelo Manual de Microbiologia Clínica (BANNERMAN, 2003), 40% (8/20) das amostras aglutinaram nos plasmas de coelho e humano, resultado que não se repetiu no sistema comercial Slidex Staph Plus, onde nenhuma amostra apresentou aglutinação (Tabela 5). Duas amostras foram excluídas da análise por serem auto-aglutinantes e outras duas amostras que apresentaram resultados diferentes entre os plasmas utilizados (33hp, 203s).

Diante dos resultados falso-positivos observados nos testes de aglutinação com plasma, em maior frequência para as amostras clínicas de *S. epidermidis*, estas foram melhor avaliadas através da utilização de testes relacionados com a ligação ao fibrinogênio. A tabela 7 mostra as amostras de *S. epidermidis* selecionadas para os testes.

#### **4.3) Curva de crescimento**

A partir desta análise, conforme descrito no item 3.3 do capítulo Material e Métodos, com a amostra controle *S. epidermidis* ATCC 35984 (Figura 5), foram selecionados os períodos de incubação de 4h (início da fase log de crescimento bacteriano) e 9h (final da fase log de crescimento bacteriano) para a realização dos testes de aglutinação com plasma, testes de esferas de látex adsorvidas ao fibrinogênio e de quantificação de aderência ao fibrinogênio para amostras clínicas de *S. epidermidis* e amostras controles (Figura5).



**Figura 5:** Curva de crescimento da amostra controle *S. epidermidis* ATCC 35984, realizada em duplicata.

#### 4.4) Quantificação da aderência ao fibrinogênio

Este teste foi realizado com as 24 amostras clínicas de *S. epidermidis* avaliadas nos testes de aglutinação e três amostras controles (*S. epidermidis* ATCC35984, *S. epidermidis* ATCC12228, *S. aureus* ATCC25923), com o objetivo de verificar se a aglutinação positiva nos testes realizados em lâmina, eram em parte devido a ligação da bactéria ao fibrinogênio. O teste foi realizado em placa de microtitulação e os resultados de DO<sub>570nm</sub> apresentados na tabela 6 são a média de seis ensaios do mesmo experimento de aderência obtidos para cada concentração de fibrinogênio (10µg/mL e 20µg/mL) em cada ensaio realizado.

A análise dos resultados da tabela 6 mostrou que não houve correlação entre os resultados dos testes realizados. Este dado foi confirmado após a aplicação do teste *t* de Student que mostrou que não houve diferença quanto aos valores de  $DO_{570\text{ nm}}$  obtidos para amostras clínicas positivas ( $n=12$ ) em relação às negativas ( $n=10$ ), quando comparados com os resultados dos testes de aglutinação em plasma de coelho e humano. Um valor de  $p = 0,642$  foi encontrado para as amostras incubadas na presença de  $20\mu\text{g/mL}$  e um  $p = 0,93$  para as amostras incubadas na presença de  $10\mu\text{g/mL}$  de fibrinogênio. Assim, pode-se concluir que, para as amostras analisadas, os valores positivos observados nos testes de aglutinação em plasma foram independentes da ligação ao fibrinogênio.

Os testes a seguir foram realizados com sete amostras clínicas de *S. epidermidis* (quatro positivas e três negativas nos testes de aglutinação com plasma) e três amostras controle selecionadas para melhor caracterização dos resultados falso-positivos encontrados. As amostras foram incubadas por 4h (início da fase log de crescimento) e 9h (final da fase log de crescimento), em caldo TSB e, em seguida, realizados os testes na presença de 10 e  $20\mu\text{g/mL}$  de fibrinogênio e os testes com plasma em lâmina. Estes últimos também foram realizados a partir do caldo em duas fases de crescimento bacteriano, de modo similar ao teste de aderência ao fibrinogênio. Não houve correlação entre os resultados dos diferentes grupos (4h e  $10\mu\text{g/mL}$ ); (4h e  $20\mu\text{g/mL}$ ); (9h e  $10\mu\text{g/mL}$ ); (9h e  $20\mu\text{g/mL}$ ) e os resultados dos testes de aglutinação (Tabela 7). Para tanto, foi aplicado o teste estatístico

“ANOVA one way”, onde os valores de  $p$  encontrados foram sempre maiores do que 0,05. Contudo, quando comparados os resultados obtidos em 4h e 9h, para todas as amostras houve diferença estatística significativa. Na concentração de 20 $\mu$ g/mL de fibrinogênio, as amostras de *S. epidermidis* aderiram melhor em 4h do que em 9h ( $p=0,000019$ ), enquanto na concentração de 10 $\mu$ g/mL o valor de  $p$  foi igual a 0,000008. Assim, foi observada diferença significativa entre os dois períodos de crescimento bacteriano, para todas as amostras avaliadas, incluindo a espécie *S. aureus*. Estes dados sugerem que no início da fase log de crescimento as amostras analisadas se aderiram mais ao fibrinogênio do que no final desta fase. Os testes com fibrinogênio adsorvido às esferas de látex não mostraram resultados positivos para as amostras de *S. epidermidis*, sugerindo que a ligação ao fibrinogênio seria independente da ligação ao plasma nos testes de aglutinação. O grande número de amostras auto-aglutinantes (4 de 7 amostras de *S. epidermidis*) foi um fator limitante deste teste.

#### **4.5) Ensaio de hemaglutinação**

Visando-se observar a capacidade de *S. epidermidis* em aglutinar hemácias, todas as sete amostras clínicas de *S. epidermidis* listadas na tabela 7 (amostras positivas e negativas nos testes com plasma) foram submetidas ao ensaio de hemaglutinação. Este teste foi realizado para nos esclarecer se a hemaglutinação poderia influenciar nos resultados falso-positivos para algumas amostras de *S.*

*epidermidis* nos testes com plasma em lâmina. Foi observado que as amostras não foram capazes de aglutinar as hemácias (Tabela 8).

#### **4.6) Ensaio de aglutinação espontânea (AE)**

Este ensaio foi realizado, visando-se observar a capacidade das amostras de *S. epidermidis* de se auto-aglutinarem no meio de cultura TSB. Foi observado que duas amostras, *S. epidermidis* 4s (aglutinação positiva no teste de aglutinação em plasma) e 61s (aglutinação negativa no mesmo teste), apresentaram a capacidade de auto-aglutinação no meio de cultura. No entanto, as outras 5 amostras, 2 negativas e 3 positivas nos testes de aglutinação em plasma, não apresentaram esta capacidade (Tabela 8).

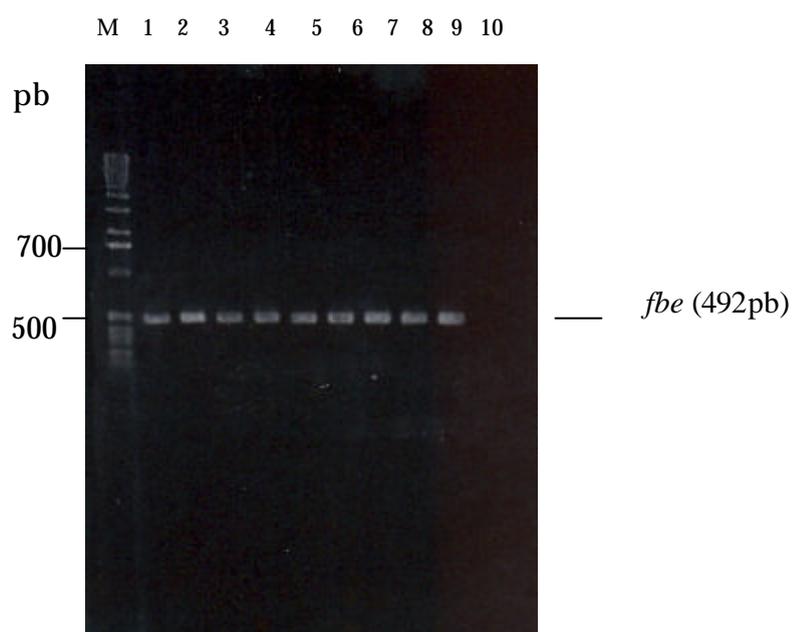
#### **4.7) Ensaio de auto-aglutinação (AA)**

Este ensaio foi realizado, visando-se observar a capacidade das amostras de *S. epidermidis* de se auto-aglutinarem na solução PBS. Foi observado que as mesmas duas amostras, *S. epidermidis* 4s e 61s, apresentaram a capacidade de auto-aglutinação na solução PBS. No entanto, as outras 5 amostras, 2 negativas e 3 positivas nos testes de aglutinação em plasma, foram negativas no teste (Tabela 8).

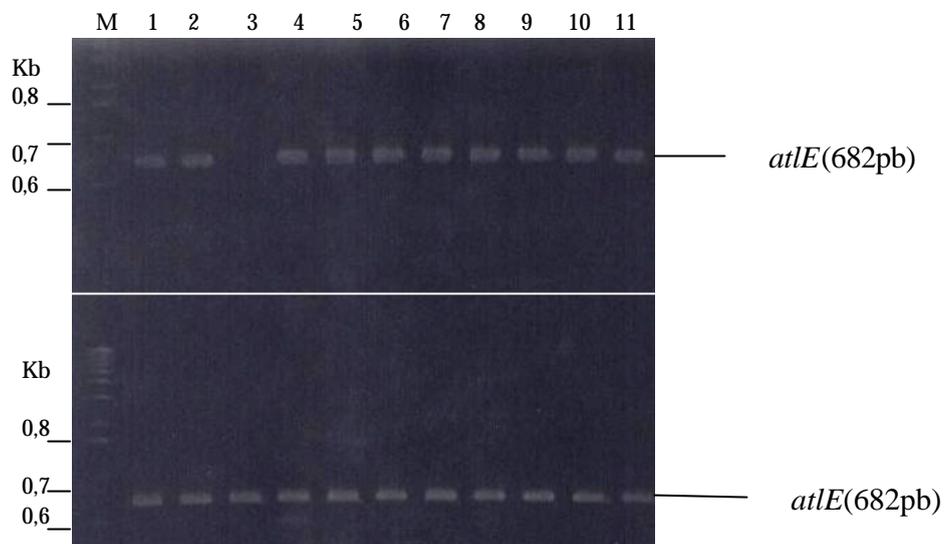
#### 4.8) Detecção dos genes *clfa*, *clfb*, *fbe*, *atle*, através da técnica de PCR

A reação de polimerase em cadeia foi realizada com o objetivo de se detectar a presença de genes (*clfa*, *clfb*, *fbe*, *atle*) codificadores de proteínas ligadoras de fibrinogênio e de proteínas de superfície relacionadas à adesão em amostras clínicas de *S. aureus* e *S. epidermidis*.

Em todas as 24 amostras clínicas de *S. epidermidis* foi detectado o gene *fbe* (fragmento de 492pb) codificador da proteína ligadora de fibrinogênio Fbe (Figura 6) e o gene *atle* (fragmento de 682pb) codificador da autolisina AtlE, relacionada à aderência (Figura 7).

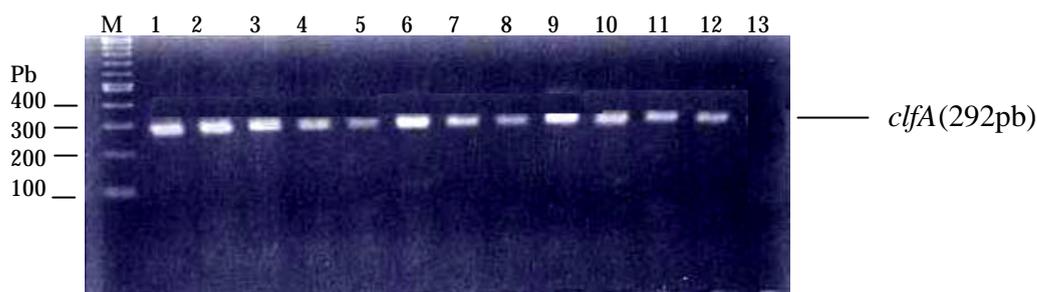


**Figura 6:** Foto representativa do PCR realizado para 24 amostras clínicas de *S. epidermidis*, com oligonucleotídeo específico para o gene *fbe*. O fragmento de 492 pb foi detectado após eletroforese em gel de agarose 1,5%. M: padrão de tamanho molecular de DNA (100 pb-DNA Ladder, Biotools), coluna 1: *S. epidermidis* ATCC35984 (controle positivo), coluna 2: amostra 32hp, coluna 3: 33hp, coluna 4: 12s, coluna 5: 20s, coluna 6: 61s, coluna 7: 4s, coluna 8: 56s, coluna 9: 207s, coluna 10: *S. aureus* ATCC 25923 (controle negativo).

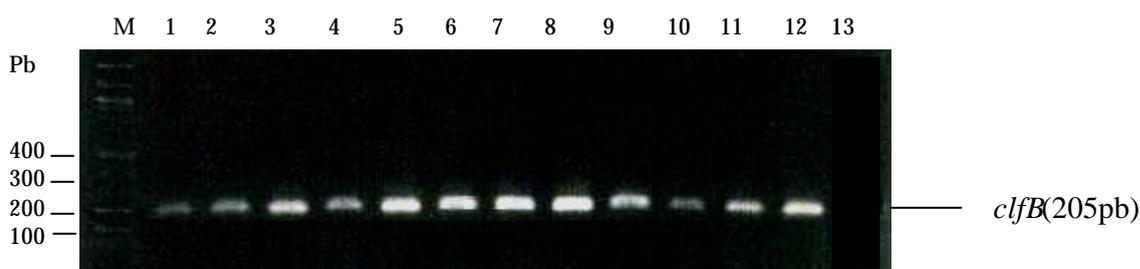


**Figura 7:** Foto representativa para o PCR realizado para as 24 amostras clínicas de *S. epidermidis* com oligonucleotídeo específico para o gene *atIE*. O fragmento de 682 pb foi detectado após eletroforese em gel de agarose 1,5%. M: padrão de tamanho molecular de DNA (1Kb-DNA Ladder, Biotools). Gel superior - coluna 1: controle positivo *S. epidermidis* ATCC 35984, coluna 2: *S. epidermidis* ATCC 12228, coluna 3: controle negativo *S. aureus* ATCC 25923; amostras clínicas de *S. epidermidis* - coluna 4: 18hp, coluna 5: 33hp, coluna 6: 40hp, coluna 7: 32hp, coluna 8: 27hp, coluna 9: 61s, coluna 10: 68s, coluna 11: 72s. Gel inferior, amostras clínicas de *S. epidermidis* - coluna 1: 12s, coluna 2: 20s, coluna 3: 26s, coluna 4: 70s, coluna 5: 56s, coluna 6: 90s, coluna 7: 140s, coluna 8: 142s, coluna 9: 144s, coluna 10: 205s, coluna 11: 206s.

Foram detectados, em todas as 35 amostras de *S. aureus* analisadas, os genes *clfA* (fragmento de 295pb) (Figura 8) e *clfB* (fragmento de 292pb) (Figura 9), codificadores das proteínas ligadoras de fibrinogênio ClfA e ClfB, respectivamente.



**Figura 8:** Foto representativa para o PCR realizado para 35 amostras clínicas de *S. aureus* com oligonucleotídeo específico para o gene *clfA*. O fragmento de 292 pb foi detectado após eletroforese em gel de agarose 1,5%. M: padrão de tamanho molecular de DNA (100pb-DNA Ladder, Biotools). coluna 1: controle positivo *S. aureus* ATCC 25923; amostras clínicas de *S. aureus* coluna 2: 21a, coluna 3: 442a, coluna 4: 1hp, coluna 5: 22a, coluna 6: 76hp, coluna 7: 4hp, coluna 8: 58hp, coluna 9: 55hp, coluna 10: 71hp, coluna 11: 441a, coluna 12: 6a; coluna 13: controle negativo *S. epidermidis* ATCC 35984.



**Figura 9:** Foto representativa para o PCR realizado para 35 amostras clínicas de *S. aureus* com oligonucleotídeo específico para o gene *clfB*. O fragmento de 205 pb foi detectado após eletroforese em gel de agarose 1,5%. M: padrão de tamanho molecular de DNA (100pb-DNA Ladder, Biotools). coluna 1: controle positivo *S. aureus* ATCC 25923; amostras clínicas de *S. aureus* coluna 2: 78hp, coluna 3: 23hp, coluna 4: 80hp, coluna 5: 60hp, coluna 6: 91hp, coluna 7: 47hp, coluna 8: 8hp, coluna 9: 14hp, coluna 10: 3a, coluna 11: 2a, coluna 12: 1a; coluna 13: controle negativo *S. epidermidis* ATCC 35984.

#### **4.9) Comparação das seqüências de aminoácidos das proteínas Fbe e AtlE de *S. epidermidis* com seqüências homólogas de outros *Staphylococcus***

Após serem obtidas as seqüências de aminoácidos das proteínas Fbe e AtlE, através da ferramenta de procura do NCBI, observou-se que estas apresentaram identidade com outras seqüências de aminoácidos de outras espécies de *Staphylococcus*.

A seqüência de aminoácidos da proteína ligadora de fibrinogênio de *S. epidermidis*, chamada Fbe, de 119 kDa, apresentou elevado grau de identidade com algumas seqüências de aminoácidos de proteínas de outras espécies do gênero. Em relação ao *S. aureus*, observou-se uma identidade e similaridade de cerca de 44% e 62% com a proteína da família das Serinas (“Ser-Asp rich fibrinogen-binding/bone sialoprotein-binding protein”) ([gi|82750268|ref|YP\\_416009.1|](#)), 24% e 42% com o fator “clumping” A ([gi|76364117|sp|Q932C5|CLFA\\_STAAM](#)) e 25% e 41% com o fator “clumping” B ([gi|88196585|ref|YP\\_501414.1|](#)). A proteína Fbe apresentou 55% de identidade e 70% de similaridade com a seqüência da proteína SdrG ([gi|70727428|ref|YP\\_254344.1](#)) de *S. haemolyticus*; 39% de identidade e 55% de similaridade com a seqüência da proteína SdrI ([gi|22086547|gb|AAM90673.1|AF402316\\_1](#)) e 20% e 55% com a autolisina Aas ([gi|3184134|emb|CAA03852.1|](#)), ambas de *S. saprophyticus*; 26% de identidade e 44% de similaridade com a seqüência da proteína Fbl ([gi|15341503|gb|AAK95649.1|AF404823\\_1](#)) de *S. lugdunensis*, 26% ([gi|15212037|emb|CAC51118.1|](#)) de identidade e 40% de similaridade com uma

autolisina bifuncional putativa de *S. xylosus* e 20% de identidade e 50% de similaridade ([gi|19913101|emb|CAC83649.1|](#)) com uma autolisina putativa de *S. cohnii*. No entanto, a proteína Fbe apresentou elevados graus de identidade e similaridade com outras proteínas da própria espécie, como: 68% e 81% com SdrF ([gi|8101005|gb|AAF72509.1|AF245041\\_1](#)) e 88% e 90% com SdrG ([gi|8101007|gb|AAF72510.1|AF245042\\_1](#)) de *S. epidermidis*. Entretanto a proteína Fbe, apresentou um baixo grau de identidade (6%) e similaridade (6%) em relação a proteína AtlE.

A seqüência de aminoácidos da autolisina AtlE, proteína que se apresenta com duas isoformas de massas moleculares de 60kDa e 52kDa, mostrou elevado grau de identidade com algumas seqüências de proteínas de outras espécies do gênero. Após o BLAST, observou-se que a seqüência de aminoácidos desta autolisina apresentou 75% de identidade e 84% de similaridade com a autolisina ligadora de fibronectina, AtlC, de *S. caprae* ([gi|13272276|gb|AAK17065.1|](#)); 66% de identidade e 77% de similaridade com uma autolisina de *S. warneri* ([gi|56805553|dbj|BAD83399.1|](#)); 56% de identidade e 70% de similaridade com uma autolisina precursora bifuncional codificada pelo gene *atl* de *S. aureus* ([gi|31088272|gb|AAP44166.1|](#)); 52% de identidade e 67% de similaridade com uma autolisina de *S. haemolyticus* codificada pelo gene *atl* ([gi|68447636|dbj|BAE05220.1|](#)); 39% de identidade e 55% de similaridade com uma proteína de superfície da classe das adesinas/autolisinas, AAS, dos *S. saprophyticus* ([gi|3184134|emb|CAA03852.1|](#)); 34% de identidade e 50% de

similaridade com uma autolisina putativa de *S. cohnii* ([gi|19913101|emb|CAC83649.1|](#)); 38% de identidade e 51% de similaridade com uma autolisina bifuncional putativa de *S. xylosus* ([gi|15212037|emb|CAC51118.1|](#)).

Após as análises pela ferramenta BLAST, algumas seqüências foram selecionadas, principalmente aquelas que apresentaram mais do que 50% de identidade ou que são descritas na literatura como relacionadas, para terem as suas seqüências alinhadas pelo programa clustalW (Figuras 10, 11, 12 e 13) e tabelas 9 e 10.

```

_Fbe      MINKKNNLLTKKKPIANKSNKYAIRKFTVGTASIVIGATLLFGLGHNEAKAEENSVQDVK
_AtLE     --TTSTKPSQPSKPSGGTNNKLTVSANRG-----VAQIKPTNNGLYTT
          ....:      .** .....** : :                               *.  ..

_Fbe      DSNTDDELSDSNDQSSDEEKNDVINNNQSINTDDNNQIIKKEETNNYDGEIKRSEDRTES
_AtLE     VYDSKSGHKTDVQKTLSTVTKTATLGNNKFYLVEDYNSGKKYGWVKQGDVVYNTAKAPVKV
          :... :*. ::: . * . :.***:  .:* * . * . : : * : : : : : . :

_Fbe      TTNVDENEATFLQKTPQDNTHLTHEEEVKESSSVESNSSIDTAQQPSHTTINREESVQTS
_AtLE     NQTYNVKAGSTLYTVPWG-----TPKQVASKVSGTGNQTFKATKLQQIDKATYLYGT
          . . : : . : * ..* . . . . : : : * . : . : * : . . * : : : :

_Fbe      DNVEDSHVSDFANSKIKESNTESGKEENTIEQPNKVKEDSTTSQPSGYTNIDEKISNQDE
_AtLE     VNGKSGWISKYYLTSASKPSNPTKP-----STNNQLTVTNNNGVAQINAK
          * :.. :*. : : . . : . . : : : : : : : : : : : : : : : : :

_Fbe      LLNLPINEYENKARPLSTTSAQPSIKRVTVNQLAAEQGSNVNHLIKVTDQSITEGYDDSE
_AtLE     NSGLYTTVYDTKG--KTDDQIQRTLSVTKAATLGDKKFYLVGDYNTGTNYGWVKQDEVIY
          . * . * : . * . : * . * : : . . . . * . : : * . . * : . . : :

_Fbe      GVIKAHDAENLIYDVTFEVDDKVKSGDTMTVDIDKNTVPSDLTDSFTIPKIKDNSGEIIA
_AtLE     NTAKSPVKINQTYNVKPGVKFHTVVPWGTYNQVAGTVSGKGDQTFKATKQQQIDK-----A
          . . * : * * : * . * . : . . . * . . . : . * * . * : * : *

_Fbe      TGTYDNKNKQITYTFTDYVDKYENIKAHLKLTSYIDKSKVPNNNTKLDVEYKTALSSVNK
_AtLE     TYLYGTVNGKSGWISKYYLTTPSKVQTLSTQSTPAPKQVQSSTQTVNHIAQVKANNSGIR
          * * . * : : . * : . : : : . : : * . . . : * . : . * . * :

_Fbe      TITVEYQRPNENRTANLQSMFTNIDTKNHTVEQTIYINPLRYSAKETNVNISGNGDEGST
_AtLE     ASVYDKTAKSGTKYANRTFLIN-----KQRTEGNNTYVLLQDGTSENTPLGWVNIND
          : . . : . . : ** : : . : : * * : : . * . . : .

_Fbe      IIDSTIIKVKYVGDQNQLPDSNRIYDYSEYEDVTNDDYAQLGNNDVNVNINFGNIDSPYI
_AtLE     VTTQNIGKQTSIGKYSVKPTNNGLYSIAWGTKNQ----QLLAPNTLANQAFNASKAVYV

```



```

_Fbe      -MINKNNLLTKKKPIANKSNKYAIRKFTVGTASIVIGATLLFGLGHNEAKAEENS--VQ
_SdrG    --MIKNNLLTKKKPIANKSNKYAIRKFTVGTASIVIGAALLFGLGHNEAKAEENT--VQ
_SdrF    MKKRRQGPINKRVDFLSNKNVYKYSIRKFTVGTASILVGATLMFGAADNEAKAEDNQLES
          :. : . : : ** ** : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
_Fbe      DVKDSNTDDELSDSNDQSSDEEKNDVINNNQSINTDDNNQIIKKEETNNYDGIKRS---
_SdrG    DVKDSNMDELSDSNDQSSNEEKNDVINNSQSINTDDNQIKK-EETNSNDAIENRS---
_SdrF    ASKEEQKGRDNENSKLNQVDLNGSHSSEKTTNVNATEVKKVEAPTTSDVSKPKANEA
          * : : . . . . . : : . * . . . . : : * : : : : * * . . . * : : :
_Fbe      ----EDRTESTTNVDENEATFLQKTPQDNTHLTEEEVKESSVVESSNSSIDTAQQPSHTT
_SdrG    ----KDITQSTTNVDENEATFLQKTPQDNQLKKEEVVKEPSSVVESSNSSMDTAQQPSHTT
_SdrF    VVTNESTKPKTTEAPTVEESIAETPKTSTTQQDSTEKNNPSLKDNLNSSSTTSKESKTD
          : . . . * : . : : : : * : . : * : . * : : . . * * : : : * : *
_Fbe      INREESVQTSNVEDSHVSDFANSKIKESNTESGKEENTIEQPNKVKEDSTTSQ-----
_SdrG    INSEASIQTSDNEENSRVSDFANSKIEESNTESNKEENTIEQPNKVRREDSTTSQ-----
_SdrF    EHSKQAQMSTNKSNLDTNDSPTQSEKTSQANNDSTDNQSAPSKQLDQSKPSEQKVYKTK
          : . * * * . : . * . . . . * . . . . : . . * * : . . : *
_Fbe      -----PSGYTNID
_SdrG    -----PSSYKNID
_SdrF    FNDEPTQDVEHTTTLKTPSVSTDSVNDKQDYTRSAVASLGVDSNETEAITNAVRDNL
          : * : *
_Fbe      EKISNQDELLNLPINEYENKAR-----PLSTTSAQP-----SIKRVTVNQLAAE
_SdrG    EKISNQDELLNLPINEYENKVR-----PLSTTSAQP-----SSKRVTVNQLAAE
_SdrF    LKAASREQINEAIIAEALKKDFSNPDYGVDTPLALNRSQSKNSPHKSASPRMNLMSLAAE
          * : : : : : : * * : * ** : . : * . : * : : . * : : : * : *
_Fbe      --QGSNVNHLIKVTDQSITEG--YDDSEGVKAHDAENLIYDVTFEVDDKVKSGDTMTVD
_SdrG    --QGSNVNHLIKVTDQSITEG--YDDSDGIKAHDAENLIYDVTFEVDDKVKSGDTMTVD
_SdrF    PNSGKNVNDKVKITNPTLSLNKSNNHANNVIWPTSNEQFNLKANYELDDSIKEGDTFTIK
          . * . * . * : : : : : . : : : : * . . * : : . . : : * : * : : * :
_Fbe      IDKNTVPSDLTDSFTIPKIKDNSGEIIATGTYDNKNKQITYTFTDYVDKYENIKAHLKLT
_SdrG    IDKNTVPSDLTDSFAIPKIKDNSGEIIATGTYDNTNKQITYTFTDYVDKYENIKAHLKLT
_SdrF    YGQYIRPGGLELPAIKTQLRSKDGSI VANGVYDKTNTTTTYTFTNYVDQYQNI TGSFDLI
          . : * . * . . : : : : : * * : * : * : : : : * : * : * : * : *
_Fbe      SYIDKSKVPNNNTKLDVEYKTALSSVNKTITVEYQRPENERTANLQSMFTNIDTKNHTVE
_SdrG    SYIDKSKVPNNNTKLDVEYKTALSSVNKTITVEYQKPNENRTANLQSMFTNIDTKNHTVE
_SdrF    ATPKRETAIKDNQNYPMEVTIANEVVKKDFIVDYGNNKDNNTTAAVANVDNVNKNHNEVV
          : . : . . : * : * . * . * : : * : * . : : * : * : : * : * : *
_Fbe      QTIYINPLRYSAKETNVNISGNGDEGSTIIDSTIIKVYKVDNQNLPDSNRIYDYSEYE
_SdrG    QTIYINPLRYSAKETNVNISGNGDEGSTIIDSTIIKVYKVDNQNLPDSNRIYDYSEYE
_SdrF    YLNQNNQNPKYAKYFSTVKNGEFIPGEVKVYEVTDTNAMVDSFNPDLNSSNVKDVTSQFA
          * * * . . * : * . . : : * : . . * : * * * * * : :
_Fbe      DVTNDDYAQLGNNNDVNIN-----FGNIDSPYIIKVISKYDPNKDDYTTI
_SdrG    DVTNDDYAQLGNNNDVNIN-----FGNIDSPYIIKVISKYDPNKDDYTTI
_SdrF    PKVSADGTRVDINFARSMANGKKYIVTQAVRPTGTGNVYTEYWLTRDGTNTNDFYRGTK
          . . * : : . * . : : ** : : * : . . : : * . *
_Fbe      QQTVMQTTINEYTGFEFRTASYDNITIAFSTSSGQGQDLPP-----
_SdrG    QQTVMQTTINEYTGFEFRTASYDNITIAFSTSSGQGQDLPP-----
_SdrF    STTVTYLNGSSTAQGDNPITYSLGDYVWLKKNKNGVQDDDEKGLAGVYVTLKDSNNRELQR
          . * * * . . * : * * . : : : . . . . * . *
_Fbe      -----
_SdrG    -----
_SdrF    VTTDQSGHYQFDNLQNGTYTVEFAIPDNYTPSPANNSTNDAIDSGERDGRKVVVAKGT

```

\_Fbe -----EKTYKIGDYVWEDVDKDGIQNTNDNEKPLSNVLVTLTYPDG-TSK  
 \_SdrG -----EKTYKIGDYVWEDVDKDGIQNTNDNEKPLSNVLVTLTYPDG-TSK  
 \_SdrF INNADNMTVDTGfYLTPKYNVGDYVWEDTNKdGIQ--DDNEKGISGvkVTLkNkNGDTIG  
                   .\*:\*\*\*\*\*.:\*\*\*\*\* :\*\*\*\* :\*. \* \*\* . : \* \*

\_Fbe SVRTDEDGKYQFDGLKNG-----  
 \_SdrG SVRTDEEGKYQFDGLKNG-----  
 \_SdrF TTTTDSNGKYEFtGLENGDYtIEfETPEGYtPTkQNSGSDegKDSNGTKTtTVTKDADNK  
                   :. \*\*.:\*\*\*:\* \*\*:\*\*

\_Fbe -----  
 \_SdrG -----  
 \_SdrF TIDSGFYKPTYNLGDYVWEDTNKdGIQDDSEKGISGvkVTLkDkNGNAIGtTTTtDASGHY

\_Fbe -----LTYKITfETPEGYtPTLKHSGtNPALDSEGNSVWVTINGQDDMTIDSGfYQTP  
 \_SdrG -----LTYKITfETPEGYtPTLKHSGtNPALDSEGNSVWVTINGQDDMTIDSGfYQTP  
 \_SdrF QfKGLENGsYtVEfETPSGYtPTkANSgQDITVDSNGITtTGIINGADNLTIDSGfYKTP  
                   :\*.: \*\*\*\*.\*\*\*\*\* :\*\* : :\*\*\*:\* :. \*\*\* \*.:\*\*\*\*\*:\*\*\*

\_Fbe KYSLGNyVWYDTNKdGIQGDDEKGISGvkVTLkDENGNIISTTTtDENGKYQFDNLNSGN  
 \_SdrG KYSLGNyVWYDTNKdGIQGDDEKGISGvkVTLkDENGNIISTTTtDENGKYQFDNLNSGN  
 \_SdrF KYsvGDYVWEDTNKdGIQDDNEKGISGvkVTLkDEKGNiISTTTtDENGKYQFDNLDSGN  
                   \*\*\*:\*.\*\*\* \*\*\*\*\* .\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*

\_Fbe YIVHfDKPSGMTQTTTtDSGDDDEQDADGEEVHVtITDHDDfSIdNGYDDESDSDSDSDS  
 \_SdrG YIVHfDKPSGMTQTTTtDSGDDDEQDADGEEVHVtITDHDDfSIdNGYDDESDSDSDSDS  
 \_SdrF YIiHFekPEGMTQTTANSgNDDEKdADGEDVRVTITDHDDfSIdNGYfDSDSDSDSDSDS  
                   \*\*:\*.\*.\*.\*\*\*\*\*:.\*:\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*

\_Fbe DSDSDSDS-----  
 \_SdrG DSD-----  
 \_SdrF DSDSDSDSDADSDSDADSDSDADSDSDSDSDSDADSDSDSDSDSDSDADSDSDSDS  
                   \*\*\*

\_Fbe -----  
 \_SdrG -----  
 \_SdrF DSDADSDADSDADSDSDS

\_Fbe -----  
 \_SdrG -----  
 \_SdrF DSDSDADSDSDSDSDSDADSDSDSDSDSDSDSDADSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDS

\_Fbe -----  
 \_SdrG -----  
 \_SdrF DSDSDADSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDADSDADSDADSDADSDADSDSDS

\_Fbe -----  
 \_SdrG -----  
 \_SdrF DSDADSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDADSDSDSDSDSDSDSDSDSDADSD

\_Fbe -----DSDSDSDSDSDSDSDS  
 \_SdrG -----  
 \_SdrF DSDSDSDSDADSDSDSDSDADSDSDSDSDADSDSDSDSDSDSDSDADSDSDSDS

\_Fbe DS











```

_AtI_aureus      QYKP-QVQRVPGKWT DANFN DVKHAMDTKR LAQDPALKYQFLRLDQPQNI SIDKINQFLK
_AtI_haemolyticus YGAPPQVQRNGYGWSNATYSEIKNAMNTEKLA KDDTLKYQFLCLDRPQNL SVASLNQLLK
_AtIE           -----

_AtIC           GQGVLEGGQAAFS EAAK KYGINEIYLVAHALVETGNGTSQLAKGGDIVNGKFS DKTKTKY
_AtI_warneri    GKGVLENQGAAFSQA AKQYGLNEIYLI SHALLETGNGQSQLAKGANITNGVVNTRSTTKY
_AtI_aureus     GKGVLENQGAAFNKAAQMYGINEVYLI SHALLETGNGTSQLAKGADVNNKVVVNSNTKY
_AtI_haemolyticus GKGVLENQGQAFSQA AATSGINEIYLI AHALIE TGNGQSQLAKGANIVNNYVTTKSATKY
_AtIE           -----

_AtIC           HNVFGIGAYDSSPLIEGIKYAKNAGWDSVSKA IGGAKFIGQSYIKAGQNTLYKMRWNPS
_AtI_warneri    HNVFGIAAFDYNALGEGVKFAKASGWSVSKA IGGAKFIGNSYVKAGQNTLYKMRWNPE
_AtI_aureus     HNVFGIAAYDNDPLREGIKYAKQAGWDTVSKA I VGGAKFIGNSYVKAGQNTLYKMRWNPA
_AtI_haemolyticus HNVFGIAAFDANPLYNGIN YAKQAGWNSVSKA IGGAKFIGKDYIKAGQNTLYKMRWNPD
_AtIE           -----

_AtIC           NPGTHQYATDIHWATVNAQTIKGFYDKIGEVGKY YEIPKYK-
_AtI_warneri    NPGTHQYATDINWAESNAQVLKGLYDQIGEVGKFFDIPKFKA
_AtI_aureus     HPGTHQYATDVDWANINAKI IKGYYDKIGEVGKYFDIPQYK-
_AtI_haemolyticus HPATHQYATDINWANANAQYLKQLYNEIKAVGKYFDISSYSK
_AtIE           -----

```

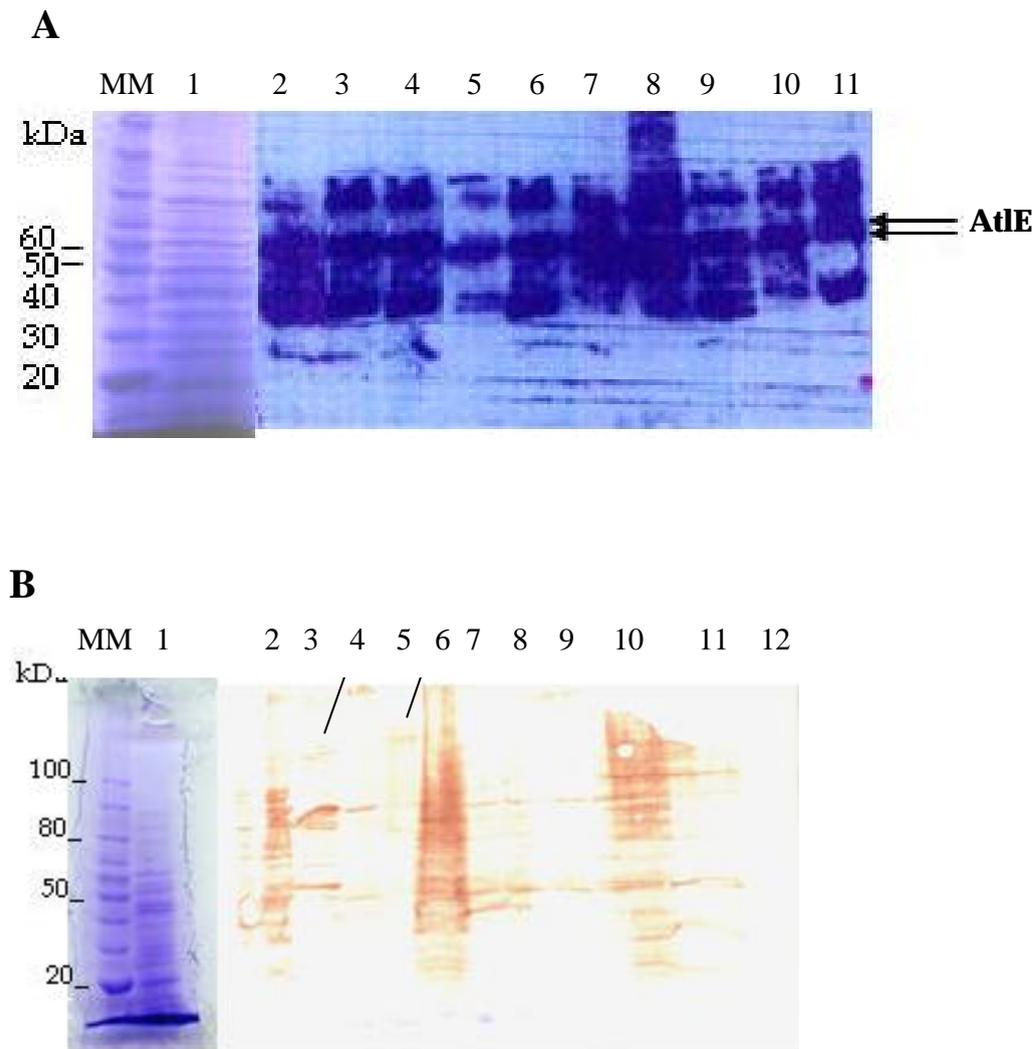
**Figura 13:** Alinhamento das seqüências de aminoácidos previstos para as proteínas AtIE de *S. epidermidis*; AtIC de *S. caprae*; autolisina de *S. haemolyticus*; autolisina de *S. aureus* e autolisina de *S. warneri*. (\*) aminoácidos idênticos; (:) substituição conservativa; (.) substituição semi-conservativa.

#### **4.10) Detecção das proteínas AtlE e Fbe de *S. epidermidis*.**

Com o objetivo de se detectar a expressão das proteínas AtlE e Fbe em *S. epidermidis*, sete amostras clínicas que apresentaram resultados discrepantes nos testes fenotípicos de aglutinação com plasma e listadas na tabela 7, foram analisadas por western blotting, utilizando-se anticorpos Anti-AtlE e Anti-Fbe, respectivamente.

Duas proteínas com massas moleculares em torno de 52 e 60 kDa foram detectadas pelo anticorpo anti-AtlE em todas as amostras de *S. epidermidis* analisadas (Figura 14A).

Não foi possível fazer qualquer afirmação, neste resultado preliminar, sobre a expressão da proteína Fbe, de 119kDa, entre as sete amostras clínicas de *S. epidermidis* estudadas. Como mostrado na figura 14B, algumas proteínas reagiram cruzadamente com o anticorpo anti-Fbe utilizado. No entanto, em duas amostras, 61s e 20s (indicadas por setas), o anti-Fbe se ligou a proteínas com massas moleculares maiores do que 100 kDa. Análises futuras deverão ser realizadas a fim de se confirmar esta detecção.



**Figura 14:** Análise por western blotting das proteínas AtIE (A) e Fbe (B) de *S. epidermidis*. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE e analisadas por western blot com anticorpos anti-AtIE (A) e anti-Fbe (B), respectivamente. (A): MM: padrão de massa molecular Invitrogen (100kDa) e amostras de *S. epidermidis* 1: ATCC 35984; 2: ATCC 35984; 3: ATCC 12228; 4: 56s; 5: *S. aureus* ATCC 25923; 6: 4s; 7: 86s; 8: 72s; 9: 18hp; 10: 20s; 11: 61s; As setas indicam a proteína AtIE e suas massas moleculares (60kDa e 52kDa). (B) As setas indicam proteínas de peso molecular maior que 100 kDa. Amostras de *S. epidermidis* 1: ATCC 35984 2: ATCC 12228; 3: 61s; 4: 56s; 5: 20s; 6: 86s; 7: 72s; 8: 4s; 9: 18hp; 10: ATCC 35984; 11: *S. aureus* ATCC 25923; 12: *E coli* ATCC 11229.

Tabela 5 – Avaliação da precisão dos métodos fenotípicos de aglutinação em lâmina, utilizados na caracterização de 77 amostras clínicas de *Staphylococcus*.

Espécie (total de amostras)	Resultado esperado do Fator “clumping”, segundo Bannerman, 2003	% de precisão dos métodos de aglutinação em lâmina		
		Plasma Humano (nº de amostras)	Plasma de Coelho (nº de amostras)	Slidex Staph Plus (nº de amostras)
<i>S. aureus</i> (OSSA) (24)	+	100% (24)	100% (24)	100% (24)
<i>S. aureus</i> (ORSA) (10)	+	90% (9)	90% (9)	100% (10)
<i>S. epidermidis</i> (20)	-	40% (8)	40% (8)	100% (20)
<i>S. haemolyticus</i> (12)	-	100% (12)	100% (12)	100% (12)
<i>S. saprophyticus</i> (4)	-	100% (4)	100% (4)	100% (4)
<i>S. lugdunensis</i> (5)	+	0% (0)	0% (0)	100% (5)
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i> (2)	-	100% (2)	100% (2)	100% (2)

Caracterização de 88 amostras clínicas de *Staphylococcus* através de métodos fenotípicos de aglutinação em lâmina excluindo da análise as 7 amostras autoaglutinantes. (OSSA) *S. aureus* sensíveis à oxacilina, (ORSA) *S. aureus* resistentes à oxacilina, (+) Fator “Clumping” positivo, (-) Fator “Clumping” negativo. As amostras auto-aglutinantes [*S. epidermidis* (2), *S. saprophyticus* (1), *S. lugdunensis* (2), *S. haemolyticus* (2)] foram excluídas da análise por se tratar de uma limitação dos testes. As 4 amostras [*S. aureus* (1), *S. epidermidis* (2), *S. saprophyticus* (1)] que apresentaram resultados diferentes entre os plasmas utilizados também foram excluídas da análise. Não foi feita a análise de precisão para as amostras de *S. intermedius* por se tratarem de amostras com fator “clumping” variável, de acordo com o Manual de Microbiologia Clínica (Bannerman, 2003).

Tabela 6 – Quantificação da aderência ao fibrinogênio em placa de microtitulação e comparação com testes de aglutinação em lâmina em 24 amostras clínicas de *S. epidermidis* e três amostras controles avaliadas.

Amostras Analisadas	Concentrações de fibrinogênio		Testes de aglutinação em lâmina	
	20µg/mL	10µg/mL	Plasma humano	Plasma de coelho
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,335	0,311	+	+
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	0,040	0,040	-	-
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	0,033	0,033	-	-
<i>S. epidermidis</i> 18hp	0,009	0,011	+	+
<i>S. epidermidis</i> 40hp	0,026	0,024	+	+
<i>S. epidermidis</i> 4s	0,012	0,008	+	+
<i>S. epidermidis</i> 12s	0,115	0,099	+	+
<i>S. epidermidis</i> 70s	0,023	0,027	+	+
<i>S. epidermidis</i> 72s	0,005	0,009	+	+
<i>S. epidermidis</i> 86s	0,022	0,004	+	+
<i>S. epidermidis</i> 140s	0,022	0,028	+	+
<i>S. epidermidis</i> 142s	0,015	0,015	+	+
<i>S. epidermidis</i> 144s	0,043	0,058	+	+
<i>S. epidermidis</i> 207s	0,026	0,023	+	+
<i>S. epidermidis</i> 205s	0,018	0,010	+	+
<i>S. epidermidis</i> 203s	0,016	0,010	+	-
<i>S. epidermidis</i> 33hp	0,005	0,021	-	+
<i>S. epidermidis</i> 27hp	0,015	0,032	-	-
<i>S. epidermidis</i> 32hp	0,002	0,006	-	-
<i>S. epidermidis</i> 20s	0,024	0,025	-	-
<i>S. epidermidis</i> 56s	0,012	0,010	-	-
<i>S. epidermidis</i> 61s	0,012	0,013	-	-
<i>S. epidermidis</i> 68s	0,055	0,049	-	-
<i>S. epidermidis</i> 73s	0,014	0,018	-	-
<i>S. epidermidis</i> 78s	0,025	0,020	AG	AG
<i>S. epidermidis</i> 90s	0,046	0,050	-	-
<i>S. epidermidis</i> 206s	0,038	0,041	AG	AG

As amostras *S. epidermidis* ATCC 35984, *S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 12228 foram utilizadas como controles; Resultado positivo (+) ou negativo (-) ou amostras auto-aglutinantes (AG) nos testes de aglutinação em lâmina. As amostras clínicas de *S. epidermidis* foram crescidas por 24h em ágar-sangue, para a realização do teste de aglutinação em lâmina e do teste de quantificação de aderência ao fibrinogênio e a seguir, foram incubadas na placa de microtitulação na presença de fibrinogênio por 2h a 35°C. A quantificação de aderência ao fibrinogênio das amostras foi medida em uma DO<sub>570nm</sub> e os valores apresentados a média de seis ensaios de aderência para cada concentração de fibrinogênio (10µg/mL e 20µg/mL).

Tabela 7 – Testes de aderência ao fibrinogênio e de aglutinação em lâmina, no início e no final da fase log de crescimento bacteriano, em sete amostras clínicas de *S. epidermidis* e três amostras controle.

Amostras Analisadas	Concentrações de fibrinogênio				Testes de aglutinação em lâmina								
	20µg/mL		10µg/mL		Plasma de coelho			Plasma humano			Esferas de látex		
	4h	9h	4h	9h	4h	9h	24h	4h	9h	24h	4h	9h	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,411	0,374	0,336	0,297	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	0,090	0,055	0,089	0,060	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	0,085	0,029	0,073	0,029	-	-	-	-	-	-	AG	AG	AG
<i>S. epidermidis</i> 18hpa	0,036	0,016	0,056	0,020	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> 4s	0,061	0,029	0,051	0,033	+	+	+	+	+	+	AG	AG	AG
<i>S. epidermidis</i> 20s	0,109	0,059	0,086	0,063	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> 56s	0,064	0,024	0,062	0,024	-	-	-	+	-	-	AG	AG	AG
<i>S. epidermidis</i> 61s	0,049	0,018	0,055	0,024	-	-	-	-	-	-	AG	AG	AG
<i>S. epidermidis</i> 72s	0,067	0,012	0,063	0,021	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> 86s	0,041	0,014	0,037	0,016	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Resultado positivo (+) ou negativo (-) ou amostras auto-aglutinantes (AG) nos testes de aglutinação. As amostras clínicas de *S. epidermidis* foram crescidas por 4 e 9h em TSB e a seguir, foram incubadas na placa de microtitulação na presença do fibrinogênio por 2h a 37°C. A quantificação de aderência ao fibrinogênio das amostras foi medida em uma DO<sub>570nm</sub> e os valores são a média de 6 ensaios. As amostras *S. epidermidis* ATCC 35984 (*fbe* +), *S. aureus* ATCC 25923 (*ica* +) e *S. epidermidis* ATCC 12228 foram utilizadas como controles

Tabela 8 - Resultados dos testes de hemaglutinação, aglutinação espontânea e auto-aglutinação em relação aos testes de aglutinação em lâmina, em sete amostras clínicas de *S. epidermidis* e três amostras controle avaliadas.

Amostras Analisadas	HEM	AA	AE	Testes de aglutinação em lâmina					
				Plasma de coelho			Plasma Humano		
				4h	9h	24h	4h	9h	24h
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. diphtheriae</i> CDC E8392	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
<i>C. diphtheriae</i> 241	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
<i>S. epidermidis</i> 18hpa	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>S. epidermidis</i> 4s	-	++	++	+	+	+	+	+	+
<i>S. epidermidis</i> 20s	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> 56s	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. epidermidis</i> 61s	-	++	++	-	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> 72s	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>S. epidermidis</i> 86s	-	-	-	+	+	+	+	+	+

HEM: teste de hemaglutinação; AA: teste de auto-aglutinação; AE: teste de aglutinação espontânea. NR - Teste não realizado; ++: positivo forte; +: positivo; -: negativo; A amostra padrão *C. diphtheriae subsp. mitis* CDC E8392 e 241 foram utilizadas como controle positivo e negativo respectivamente apenas no teste de hemaglutinação. A amostra *S. epidermidis* ATCC 35984, *S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 12228 foram utilizadas como controles para os testes de aglutinação.

Tabela 9 - Comparação da seqüência de aminoácidos da proteína Fbe de *S. epidermidis* com outras seqüências.

Proteína (espécie)	Identidade com a Fbe	Similaridade com a Fbe
AtIE ( <i>S. epidermidis</i> )	6%	6%
ClfA ( <i>S. aureus</i> )	24%	42%
ClfB ( <i>S. aureus</i> )	25%	41%
Fbl ( <i>S. lugdunensis</i> )	26%	44%
SdrF ( <i>S. epidermidis</i> )	68%	81%
SdrG ( <i>S. epidermidis</i> )	88%	90%

Análise da identidade e similaridade de diferentes proteínas de *Staphylococcus* com a proteína ligadora de fibrinogênio Fbe de *S. epidermidis* através da ferramenta BLAST.

Tabela 10 - Comparação da seqüência de aminoácidos da proteína AtIE de *S. epidermidis* com seqüências homólogas de outros *Staphylococcus*

Proteína (espécie)	Identidade com a AtIE	Similaridade com a AtIE
AtIC ( <i>S. caprae</i> )	75%	84%
AtIW ( <i>S. warneri</i> )	66%	77%
Atl ( <i>S. aureus</i> )	56%	70%
AtIH ( <i>S. haemolyticus</i> )	52%	67%
Aas ( <i>S. saprophyticus</i> )	39%	55%

Análise da identidade e similaridade de diferentes autolisinas de *Staphylococcus* com a autolisina AtIE de *S. epidermidis* através da ferramenta BLAST.

## 5) DISCUSSÃO

*Staphylococcus* é um dos patógenos mais freqüentes em infecções hospitalares e a multirresistência antimicrobiana apresentada por ele é considerada um grande problema clínico e epidemiológico nos hospitais. Esta problemática vem se mantendo até hoje como um desafio para as Comissões de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) (WENZEL & EDMOND, 2001). Assim, a identificação de *Staphylococcus* em espécies e subespécies tem sido considerada de relevância, não somente por contribuir para estudos epidemiológicos de infecções causadas pelo microrganismo, mas também, por permitir o monitoramento destes microrganismos como reservatório de genes de resistência (HUEBNER & GOLDMANN, 1999).

O teste preconizado nos laboratórios de microbiologia para diferenciar *S. aureus* dos demais *Staphylococcus* é o de coagulase em tubo. Contudo, esse teste apresenta um período de leitura que pode variar de 4h a 24h, induzindo a utilização, por laboratórios clínicos, de testes mais rápidos, como aqueles em lâmina que detectam aglutinação diretamente da colônia bacteriana (BANNERMAN, 2003). Outro fato relacionado ao teste de coagulase que, eventualmente pode ocorrer, é a dificuldade em diferenciar entre si, amostras das espécies *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, devido ao fato de todas produzirem a enzima coagulase. Mas, em se tratando das três espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivo citadas, mesmo a utilização do teste em lâmina, não forneceria resultado conclusivo já que estas espécies são positivas e/ou

variáveis para o mesmo. Portanto, o preconizado nestes casos é a utilização dos testes em conjunto a provas bioquímicas adicionais (BANNERMAN, 2003). No presente estudo, duas amostras de *S. schleiferi* subsp. *coagulans* que foram identificadas, erroneamente, como *S. intermedius* pelo laboratório de origem (Embrapa), através do teste da coagulase, somente após a utilização do teste de produção de acetoina, puderam ser corretamente identificadas.

Testes de aglutinação em lâmina têm sido utilizados para identificação de *S. aureus*. No entanto, 10 a 15% destas amostras não produzem este fator e podem fornecer resultados falso-negativos. Por outro lado, amostras de *S. lugdunensis* e *S. schleiferi* e, eventualmente, *S. intermedius* (variável para o teste) seriam identificadas erroneamente como *S. aureus* por se tratarem também de amostras fator “clumping” positivo (BANNERMAN, 2003). Assim, o teste de produção do fator “clumping” utilizado isoladamente para identificação de *Staphylococcus* também pode levar a resultados errôneos.

Portanto, este trabalho foi realizado visando avaliar a confiabilidade do teste em lâmina, utilizando plasmas (humano ou coelho) em comparação ao sistema comercial “Slidex Staph Plus” (bioMerieux), métodos estes, normalmente aplicados na rotina laboratorial para identificação presuntiva de espécies de *Staphylococcus*.

Nos últimos anos, começaram a ser desenvolvidos sistemas comerciais de identificação rápida de *S. aureus* e a acurácia desses sistemas passou a ser avaliada

comparativamente (FOURNIER, BOUTONNIER & BOUVET, 1989; PERSONNE *et al.*, 1997; VAN GRIETHUYSEN *et al.*, 2001).

Personne e colaboradores, em 1997, compararam diferentes sistemas comerciais e verificaram que o sistema “Slidex Staph Plus” apresentou uma sensibilidade de 100% e especificidade de 81,8% na identificação de amostras ORSA, sendo considerado um dos melhores sistemas para identificação de *S. aureus*. No estudo, amostras de SCN também foram avaliadas e as espécies que apresentaram resultados de aglutinação positiva no sistema Slidex Staph Plus (bioMerieux) foram: *S. schleiferi* (58,6% das amostras); *S. lugdunensis* (23,3%) e *S. intermedius* (50%). De acordo com o Manual de Microbiologia Clínica, as duas primeiras espécies são consideradas fator “clumping positivo” e a última é variável para este fator (BANNERMAN, 2003). Como o sistema comercial se propõe a identificar amostras da espécie *S. aureus* esses resultados comprometem sua especificidade, segundo os autores. O seu alto custo, em torno de US\$185,00, com capacidade de realizar 50 testes, também é um fator limitante para a utilização nos laboratórios de microbiologia do Brasil, que ainda utilizam os testes de aglutinação em lâmina com plasmas para detecção do fator “clumping” em amostras de *Staphylococcus* spp.

Em um estudo posterior, realizado por Van Griethuysen e colaboradores (2001), com 892 amostras de *Staphylococcus*, comparando diferentes sistemas comerciais, o Slidex Staph Plus (bioMerieux) apresentou uma especificidade de

98,9% e uma sensibilidade de 98,2%, sendo um dos mais indicados para identificação presuntiva de *S. aureus*, segundo os pesquisadores.

Recentemente, Weist e colaboradores (2006), avaliaram seis sistemas comerciais para identificação de *S. aureus*. Um total de 295 amostras de *Staphylococcus* foi analisado e o sistema comercial Slidex Staph Plus apresentou uma sensibilidade de 97,6% para amostras OSSA e 92,3% para ORSA, valores inferiores aos encontrados quando a avaliação foi realizada pelo sistema Slidex Staph Kit (98,9 e 97,9%, respectivamente) que, curiosamente, foi desenvolvido antes do sistema Slidex Staph Plus.

Baixos valores de sensibilidade na identificação de amostras ORSA já havia sido mencionado por Van Griethuysen e colaboradores (2001), que verificaram diferenças na sensibilidade do sistema comercial Slidex Staph Plus (bioMerieux) quando analisaram amostras ORSA da Suíça, França e Bélgica, com valores relacionados de: 95,9%, 97,3% e 98%, respectivamente. Segundo Fournier, Burtonnier e Bouvet (1989), resultados falso-negativos podem ser observados para amostras ORSA quando utilizados os sistemas comerciais de aglutinação. Estes autores verificaram a presença do polissacarídeo capsular sorotipo 5, predominante em amostras ORSA que apresentaram resultados falso-negativos nos sistemas comerciais de aglutinação. Os polissacarídeos capsulares podem mascarar estruturas de superfície bacterianas, como o fator “clumping” e/ou proteína A (FOURNIER, BOUTONNIER & BOUVET, 1989).

No presente estudo, resultados falso-negativos não foram observados quando o sistema comercial “Slidex Staph Plus” foi utilizado na identificação de amostras ORSA, mostrando 100% de precisão na identificação destas amostras.

Foi observado também que através do sistema comercial “Slidex Staph Plus” a reação de aglutinação ocorreu mais lenta e fracamente com amostras de *S. lugdunensis* do que com amostras de *S. aureus*, apesar de todas as amostras de *S. lugdunensis* terem aglutinado neste teste. É provável que, no caso do sistema comercial, a especificidade para amostras de *S. aureus* seja devido a constituição do sistema por partículas de látex adsorvidas com fibrinogênio e anticorpo anti-proteína A. Contudo, ambos os fatos podem estar relacionados a menor expressão de proteínas de superfície (“fator clumping”) relacionadas à ligação ao fibrinogênio, ou mesmo a quantidade de fibrinogênio presente em cada um dos métodos.

Mateo e colaboradores (2005), em um estudo realizado com 17 amostras clínicas de *S. lugdunensis*, verificaram que algumas amostras apresentaram resultado negativo para o fator “clumping”, quando utilizaram o sistema comercial Pastorex Staph-Plus (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Mitchell, Tristan e Foster (2004) verificaram a capacidade de amostras de *S. lugdunensis* de se aderirem ao fibrinogênio imobilizado. As oito amostras de *S. lugdunensis* testadas apresentaram variações nos níveis de aderência, porém, após a adição de anticorpo anti-Fbl a aderência ao fibrinogênio foi completamente inibida. Isso reforça a hipótese de que a proteína Fbl está relacionada com a aderência ao fibrinogênio, e

provavelmente, também associada com a aglutinação de amostras de *S. lugdunensis* em testes de detecção do fator “clumping”.

Em nosso estudo, o sistema comercial “Slidex Staph Plus” foi aquele que apresentou maior precisão na detecção do fator “clumping” de *S. aureus*. Também pode-se destacar o fato de não terem sido observados resultados falso-positivos para as espécies *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, espécies frequentemente isoladas de espécimes clínicos.

Atualmente, em laboratórios de microbiologia, há uma tendência pela utilização de sistemas rápidos de identificação que sejam capazes de diferenciar amostras de *S. aureus* dos demais SCN com uma boa precisão (PERSONNE *et al.*, 1997; VAN GRIETHUYSEN *et al.*, 2001; BANNERMAN, 2003).

Testes de aglutinação em lâmina, utilizando plasma de coelho ou humano, para detecção do fator “clumping”, são uma alternativa rápida e de baixo custo para a identificação de espécies de *Staphylococcus* (BANNERMAN, 2003). Entretanto no presente estudo, 35 amostras de *S. aureus* foram analisadas pelos testes de aglutinação com plasma, sendo que uma amostra ORSA não aglutinou no teste com plasma humano e no teste com plasma de coelho. Como já mencionado anteriormente, a presença de polissacarídeos capsulares específicos podem ter influenciado nos resultados falso-negativos observados nos testes com plasma para amostras ORSA no presente trabalho (FOURNIER, BOUTONNIER & BOUVET, 1989). Essa limitação dos testes em lâmina na identificação de amostras ORSA é de

grande relevância e pode comprometer o diagnóstico de infecções graves por *S. aureus*.

No presente estudo, sete amostras de *Staphylococcus*, de um total de 88 analisadas, auto-aglutinaram na água destilada nos testes em lâmina com plasmas, correspondendo a cerca de 7,9 % das amostras. Reação de auto-aglutinação foi observada com amostras das espécies *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. lugdunensis* e *S. epidermidis*. A auto-aglutinação é um fator limitante dos testes em lâmina e pode contribuir para a imprecisão do método. Por outro lado, os testes em lâmina realizados a partir do sistema comercial mostraram grande aplicação, com ausência de auto-aglutinação para todas as amostras avaliadas. Portanto, podemos especular que existam “elementos adicionais” no plasma que favorecem a auto-aglutinação das amostras, ao contrário dos sistemas comerciais, que possuem na sua composição partículas de látex adsorvidas com fibrinogênio e anticorpos anti-proteína A específicos para identificação presuntiva de *S. aureus*.

Nenhuma amostra de *S. saprophyticus* aglutinou nos testes para detecção do fator “clumping”. Cabe ressaltar que esta espécie apresenta características coloniais semelhantes às de *S. aureus*, exceto pela falta de hemólise, que também pode ser observada, eventualmente, em algumas cepas de *S. aureus*. Recentemente, Sakinc, Kleine e Gatermann (2006), identificaram a proteína SdrI, em uma amostra de *S. saprophyticus* 7108, relacionando-a com a capacidade da bactéria de se ligar a colágenos. Gatermann e colaboradores (1994), verificaram que amostras de *S. saprophyticus* que eram capazes de aglutinar eritrócitos de carneiro, possuíam a

capacidade de se ligar à fibronectina, diferentemente das amostras que não aglutinavam. Eles verificaram que a hemaglutinina estava relacionada com a adesão dos *S. saprophyticus* à fibronectina imobilizada. Apesar do relato da presença da proteína SdrI, da família de proteínas serina-aspartato, não se tem relato de proteínas ligadoras de fibrinogênio em *S. saprophyticus* (Sakinc, Kleine & Gatermann, 2006).

Apesar de, segundo Bannerman (2003), a espécie *S. lugdunensis* ser classificada como positiva para o fator “clumping”, neste trabalho resultados falso-negativos foram observados para cinco amostras testadas pelo método de aglutinação em lâmina utilizando plasmas.

No presente estudo, foi observada uma baixa precisão (40%) dos testes de aglutinação com plasma de coelho ou humano, principalmente, na identificação de amostras de *S. epidermidis*. Por se tratar de uma espécie prevalente em infecções hospitalares, principalmente relacionadas a bacteriemias e a utilização de biomateriais, é de extrema importância a correta identificação de membros desta espécie (GÖTZ, 2002; VON EIFF, PETERS & HEIFMANN, 2002).

Neste estudo, resultados de falsa aglutinação foram observados com 13 amostras de *S. epidermidis* no teste com plasma humano e com 13 amostras no teste com plasma de coelho, sendo 12 amostras positivas em ambos os plasmas. Alguns trabalhos têm relatado, em algumas estirpes desta espécie, a existência de proteínas com afinidade ao fibrinogênio, chamadas de Fbe, que pertencem à família das proteínas Sdr (serina-aspartato) que englobam também as proteínas

relacionadas com o fator “clumping” de *S. aureus* (NILSSON *et al.*, 1998; VON EIFF, PETERS & HEIFMANN, 2002). Assim, a possibilidade de aglutinação do plasma por amostras produtoras destas proteínas não poderia ser descartada.

Em um trabalho realizado por Blake e Metcalfe (2001), foram analisadas amostras de ORSA e de *S. epidermidis* que apresentavam resultados falso-negativos e falso-positivos, respectivamente, para sistemas comerciais compostos de partículas de látex cobertas com fibrinogênio e anticorpos anti-polissacarídeo capsular. Através da técnica de imunodifusão em gel de agarose, verificou-se que as amostras ORSA e *S. epidermidis* compartilhavam antígenos, pois o soro preparado especificamente para uma amostra de *S. epidermidis* 2213 mostrava reação cruzada com amostras ORSA e com amostras de *S. epidermidis* que apresentavam resultados falso-positivos. Entretanto, esses autores verificaram que nos testes em lâmina realizados com plasma de coelho, nenhuma das amostras de *S. epidermidis* apresentou positividade para o fator “clumping”. Neste estudo não houve a presença de resultados falso-positivos para amostras de *S. epidermidis*, quando utilizado o sistema comercial, entretanto todos os resultados falso-positivos observados foram visualizados quando utilizados os plasmas de coelho e humano para identificação presuntiva de *Staphylococcus*.

Para se ter informações adicionais sobre os resultados falso-positivos observados nos testes de aglutinação em lâmina, utilizando plasmas, para a espécie *S. epidermidis* foi realizado um teste de quantificação de aderência ao fibrinogênio em placas de microtitulação. De acordo com a análise estatística dos dados obtidos,

não houve correlação entre os resultados de aglutinação falso-positiva, quando utilizados os testes de aglutinação em plasmas, com aqueles encontrados nos de quantificação de aderência ao fibrinogênio ( $p>0,05$ ). Esta análise nos levou a sugerir que provavelmente, os resultados positivos nos testes de aglutinação com plasma não foram devido a ligação da bactéria ao fibrinogênio. Porém, para investigarmos mais sobre esta hipótese, outras análises foram realizadas, conforme discutidas a seguir. Algumas amostras de *S. epidermidis* foram, então, selecionadas para testes adicionais para analisarmos os possíveis motivos da falsa positividade nos testes em lâmina. Estas sete amostras clínicas foram analisadas pelo teste de quantificação de aderência, pela aglutinação em plasma de coelho e humano e pelo teste de esferas de látex cobertas com fibrinogênio no início e no final da fase log de crescimento bacteriano. As amostras foram crescidas em TSB por 4h e 9h para a realização dos testes. Estes períodos de crescimento foram utilizados após ter sido realizada uma curva de crescimento com uma amostra tipo, *S. epidermidis* ATCC 35984, para verificar o momento em que a bactéria entrava em fase log de crescimento e quando chegava na fase estacionária.

Rennermalm, Nilsson e Flock (2004), descreveram que o melhor momento da expressão de proteínas ligadoras de fibrinogênio era na fase log de crescimento. Ni Eidhin e colaboradores (1998), mostraram que a proteína ClfB, relacionada a ligação dos *S. aureus* ao fibrinogênio imobilizado era expressa somente na fase log de crescimento bacteriano, diferentemente da proteína ClfA, também relacionada a

adesão dos *S. aureus* ao fibrinogênio, que era expressa em todas as fases de crescimento.

Apesar de não ter havido correlação entre a falsa-positividade nos testes de lâmina e os valores da quantificação de aderência ao fibrinogênio nos dois momentos de crescimento (início e fim da fase log) na presença de 10 e 20 $\mu$ g/mL de fibrinogênio, as sete amostras de *S. epidermidis* analisadas apresentaram maior aderência ao fibrinogênio, através da técnica de quantificação de aderência, após 4h de incubação quando comparado com 9h. Assim, podemos concluir que no início da fase log de crescimento, as amostras de *S. epidermidis*, apresentaram maior capacidade de se aderir ao fibrinogênio imobilizado do que no final desta fase. Contrastando com os resultados obtidos no presente estudo, Nilsson e colaboradores (1998), através da técnica de quantificação de aderência ao fibrinogênio imobilizado, verificaram uma grande variação de aderência ao fibrinogênio imobilizado entre cinco amostras de *S. epidermidis* avaliadas, crescidas previamente em ágar sangue, por 24h a 37° C.

Em relação aos testes fenotípicos de aglutinação com plasma realizados nos dois períodos de crescimento (4 e 9h) para as sete amostras de *S. epidermidis* selecionadas, somente a amostra 56s mostrou resultado diferente nas duas fases de crescimento, aglutinação positiva em 4h e negativa em 9h. Contudo, nos testes iniciais realizados a partir da colônia bacteriana, esta amostra se apresentou negativa nos testes com plasmas. As outras amostras de *S. epidermidis* apresentaram os mesmos resultados nos testes fenotípicos de aglutinação com

plasma, nos dois momentos de crescimento (4h e 9h), sugerindo que não existe diferença significativa na expressão de proteínas capazes de aglutinar o plasma, nos dois momentos analisados. O teste realizado com esferas de látex cobertas com fibrinogênio foi realizado com o mesmo objetivo. Porém, a única amostra que apresentou capacidade de aglutinar no teste foi o controle positivo *S. aureus* ATCC 25923. Estes resultados sugerem, mais uma vez que, que os resultados falso-positivos encontrados para algumas amostras de *S. epidermidis* nos testes de aglutinação em lâmina utilizando plasmas de coelho ou humano, não estão relacionados, pelo menos em parte, com a expressão de proteínas ligadoras de fibrinogênio.

Podemos especular que em *S. epidermidis* podem existir outros fatores envolvidos na aglutinação com plasma e não somente a proteína ligadora de fibrinogênio Fbe. Sabemos que os *Staphylococcus* possuem uma série de proteínas de superfície da família serina-aspartato, como: SdrG, SdrF e SdrH (MCCREA *et al.*, 2000, HARTFORD *et al.*, 2001) que provavelmente podem estar relacionadas com os resultados falso-positivos observados com plasma, no presente estudo.

Pei e colaboradores (1999), verificaram a aderência à placa de microtitulação com fibrinogênio imobilizado de uma amostra de *S. epidermidis* marcada radiotivamente. Foram adicionadas proteínas à placa [Fbe, GST (Glutathione-S-Transferase), GST-Fbe e ClfA] para verificar a capacidade das mesmas de inibirem a aderência da bactéria ao fibrinogênio. A aderência bacteriana à placa foi completamente inibida pela adição de Fbe e GST-Fbe, porém,

não houve variação na aderência quando somente a proteína GST foi adicionada. A adição da proteína ClfA resultou em uma ligeira inibição da aderência da amostra de *S. epidermidis*, porém, para a amostra de *S. aureus* o bloqueio da aderência foi de aproximadamente 50%. Neste mesmo estudo, em outro experimento, foi adicionado fibrinogênio imobilizado à placa de microtitulação e a proteína GST-Fbe, e em outra placa foi adicionada GST-Fbe imobilizado e fibrinogênio solúvel. Os resultados mostraram que GST-Fbe foi capaz de se ligar tanto a forma solúvel quanto a imobilizada de fibrinogênio. Os autores concluíram que a proteína Fbe era a responsável pela adesão dos *S. epidermidis* ao fibrinogênio.

A hemaglutinina é um carboidrato de superfície celular, podendo se comportar como uma adesina responsável pela adesão inicial de amostras à superfícies e/ou biomateriais (RUPP & HAN, 1995). O ensaio de hemaglutinação para amostras de *S. epidermidis* que apresentaram resultados discrepantes nos testes fenotípicos de aglutinação com plasma foi realizado com o objetivo de avaliar se a capacidade hemaglutinante teria correlação com os resultados falso-positivos encontrados com os testes com plasma. Em um trabalho realizado por Gatermann e Meyer (1994), foi verificado que a hemaglutinina estava relacionada com a adesão dos *S. saprophyticus* à fibronectina imobilizada. Neste estudo, nenhuma amostra de *S. epidermidis* testada apresentou capacidade de aglutinar hemácias, não havendo qualquer tipo de correlação entre a capacidade hemaglutinante e os resultados falso-positivos observados com os testes com plasma.

Para avaliarmos se a hidrofobicidade de superfície celular estava relacionada com a capacidade das amostras de *S. epidermidis* aglutinarem nos testes com plasma, foram realizados os testes de auto-aglutinação e aglutinação espontânea nas sete amostras de *S. epidermidis* selecionadas. Somente duas amostras de *S. epidermidis* (4s e 61s) apresentaram capacidade auto-aglutinante em PBS e de aglutinação espontânea em caldo TSB. Estes dados demonstram que não houve qualquer correlação entre os resultados falso-positivos observados nos testes com plasma e a hidrofobicidade da superfície celular.

Krespky e colaboradores (2003), ao analisarem 60 amostras clínicas de *S. epidermidis*, verificaram correlação entre os resultados dos testes de aglutinação espontânea e os resultados de auto-aglutinação em tampão PBS (98%), em um estudo onde foi feita a correlação entre os testes de hidrofobicidade de superfície celular.

Apesar dos testes em lâmina não apresentarem correlação com a ligação ao fibrinogênio nos testes fenotípicos, todas as 35 amostras de *S. aureus* e as 24 de *S. epidermidis* analisadas através da técnica de PCR, apresentaram seus respectivos genes relacionados com a expressão das proteínas ligadoras de fibrinogênio. Foi possível observar que todas as amostras de *S. epidermidis* apresentavam o gene *fbe* responsável pela codificação da proteína ligadora de fibrinogênio Fbe. No estudo realizado por Nilsson e colaboradores, em 1998, das 43 amostras de *S. epidermidis* analisadas por PCR com iniciadores para o gene *fbe*, 40 amostras apresentavam este gene. Porém, neste estudo, não houve sequer especulação sobre este resultado

encontrado. Em relação à espécie *S. aureus*, todas as amostras analisadas por PCR apresentaram o gene *clfa* (292pb) e *clfb* (205pb), que codificam as proteínas ligadoras de fibrinogênio, ClfA e ClfB. Essas proteínas são responsáveis pela adesão inicial da bactéria ao fibrinogênio imobilizado e pela adesão à plaquetas (O'BRIEN *et al.*, 2002). Também são importantes fatores de virulência relacionados à colonização inicial da bactéria ao tecido do hospedeiro. Portanto, era esperado que todas as amostras de *S. aureus* analisadas apresentassem seus respectivos genes codificadores de proteínas ligadoras de fibrinogênio. Em um estudo realizado por Tristan e colaboradores, 157 amostras de *S. aureus* foram analisadas através da técnica de PCR multiplex com nove genes que codificam adesinas de superfície, 99% das amostras apresentaram o gene *clfA* e todas as amostras apresentaram o gene *clfB*.

Como todas as amostras clínicas de *S. epidermidis* apresentaram o gene *fbe*, resolvemos analisar a seqüência de aminoácidos da proteína Fbe, disponível nos bancos de dados do NCBI e compará-la com proteínas de outras espécies. A seqüência de aminoácidos da proteína ligadora de fibrinogênio de *S. epidermidis*, chamada Fbe, de 119 kDa, apresentou elevado grau de identidade com algumas seqüências de aminoácidos de proteínas de *S. epidermidis* e de outras espécies do gênero. Neste trabalho, observamos para *S. epidermidis*, um alto grau de identidade e similaridade da proteína Fbe, em relação às proteínas SdrG (88%, 90%) e SdrF (68%, 81%). Esses dados eram esperados por se tratarem de proteínas pertencentes a família serina-aspartato, possuidoras de uma seqüência de repetição de

dipeptídeos serina (SD) em sua estrutura. Em relação a proteína SdrG, esta apresenta função semelhante a da proteína Fbe (HARTFORD *et al.*, 2001).

Com *S. aureus*, observou-se uma identidade e similaridade de cerca de 44% e 62% com uma proteína da família das serinas (“Ser-Asp rich fibrinogen-binding/bone sialoprotein-binding protein”); 24% e 42% com o fator “clumping” A (CflA) e 25% e 41% com o fator “clumping” B (CflB); 26% e 44% com a seqüência da proteína Fbl de *S. lugdunensis* e 20% e 55% com a autolisina Aas de *S. saprophyticus*.

Nilsson e colaboradores (1998), verificaram identidade entre as seqüências de aminoácidos da proteína Fbe com a da proteína ClfA de *S. aureus*. A identidade das seqüências variava de 44 a 64%, de acordo com a região, porém, a região SD (região de repetição SD) apresentou uma identidade de 80%. Posteriormente, o mesmo grupo, comparou as seqüências das proteínas que estavam relacionadas com a ligação ao fibrinogênio e observaram que a proteína Fbl de *S. lugdunensis* apresentava 62% de identidade em relação a ClfA de *S. aureus* e apenas 30% em relação a Fbe de *S. epidermidis* (NILSSON *et al.*, 2004). Os percentuais de identidade, relacionados a comparação de proteínas, obtidos neste estudo foram diferentes dos obtidos por Nilsson e colaboradores (1998, 2004). Neste estudo, as seqüências inteiras dos aminoácidos correspondentes a cada proteína foram analisadas, enquanto que no estudo anterior foram feitas análises de identidade de cada região das proteínas separadamente. As proteínas ClfA, ClfB e SdrE de *S. aureus*, Fbl de *S. lugdunensis* e Fbe de *S. epidermidis* pertencem a

mesma família de proteínas serina-aspartato, portanto, alguma homologia entre essas proteínas era esperada.

Frebourg e colaboradores (2000) desenvolveram um PCR multiplex baseado em genes de virulência de *S. epidermidis* e observaram que tanto em amostras consideradas infectantes quanto em contaminantes, o gene *atlE* era detectado, mostrando que este gene expressava uma proteína essencial para o *S. epidermidis*, diferentemente de outros genes analisados como: *ica* (relacionado a formação de biofilme) e *mecA* (relacionado a resistência à oxacilina) que foram detectados em amostras consideradas infectantes, provavelmente relacionadas com a virulência da espécie.

Outra proteína analisada de *S. epidermidis* analisada neste estudo foi a AtlE. Heilmann e colaboradores (1997), mostraram que a autolisina (AtlE) estava associada com a adesão inicial de *S. epidermidis* ao plástico.

Neste estudo foi realizada uma análise de identidade da proteína AtlE com outras proteínas relacionadas através da ferramenta BLAST e ClustalW. A seqüência de aminoácidos da autolisina AtlE mostrou elevado grau de identidade e similaridade com algumas seqüências de proteínas autolisinas de outras espécies do gênero como: 75% de identidade e 84% de similaridade com a autolisina ligadora de fibronectina, AtlC, de *S. caprae*; 66% de identidade e 77% de similaridade com uma autolisina de *S. warneri*; 56% e 70% com uma autolisina precursora bifuncional codificada pelo gene *atl* de *S. aureus* e 52% de identidade e 67% de similaridade com uma autolisina de *S. haemolyticus*. Porém, houve uma

baixa identidade e similaridade, de aproximadamente 6%, quando comparada com a seqüência da proteína Fbe de *S. epidermidis*. Provavelmente, por se tratar de proteínas diferentes estruturalmente e pertencentes a diferentes classes de proteínas: a proteína Fbe pertence à classe de proteínas serina-aspartato e a proteína AtlE pertence a classe das autolisinas com propriedades adesivas (HELL, MEYER & GATERMANN, 1998; NILSSON *et al.*, 1998).

Neste trabalho, as sete amostras clínicas de *S. epidermidis* selecionadas (quatro positivas e três negativas para os testes com plasma), foram utilizadas para análise da expressão das proteínas AtlE e Fbe. Através da técnica de western blotting, utilizado-se anticorpo anti-AtlE, foi possível detectar em todas as sete amostras, pelo menos duas proteínas de massas moleculares em torno de 52 e 60 kDa. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Heilmann e colaboradores (1997). A proteína AtlE é uma autolisina bifuncional com um domínio N-terminal alanina amidase, um domínio ancorado à parede celular (CWA) que consiste em três repetições (R1 a R3), cada uma com 165 aminoácidos, e um domínio C-terminal glicosaminidase. O mesmo é clivado entre R2 e R3 na superfície da bactéria, gerando duas enzimas separadas: a de 60-kDa alaninamidase e a de 52-kDa glicosaminidase. Os produtos do processamento da AtlE têm mostrado capacidades adesivas (HEILMANN *et al.*, 1997), provavelmente envolvendo os domínios R1, R2 e R3 (HELL, MEYER & GATERMANN, 1998).

Hartford e colaboradores (2001), através da técnica de western blotting com anticorpo anti-Fbe (SdrG) específico para a região A, verificaram a expressão

de uma proteína de 190kDa pela amostra de *S. epidermidis* HB, enquanto a mesma amostra com uma mutação específica para o gene *fbe*, não expressava esta proteína. O gene *fbe* das amostras de *S. epidermidis* HB e K28 foram clonados em uma amostra de *Lactococcus lactis* através do vetor pKS80 e transformados em uma amostra de *L. lactis* MG1363. Estudos preliminares do grupo indicaram que a incubação da amostra com mutanolisina e lisozima por 15min foi possível observar a expressão da proteína de 190kDa. A aparente massa molecular da proteína Fbe de *S. epidermidis* HB, de 190 kDa, é maior do que a da proteína SdrG, 170kDa, expressa pela amostra *S. epidermidis* K28 (MCCREA *et al.*, 2000) e maior que a da proteína Fbe, de 119kDa, descrita por Nilsson e colaboradores (1998).

No presente trabalho, foram realizados experimentos de western blotting, utilizando-se anticorpo anti-Fbe, para se verificar a expressão da proteína Fbe nas sete amostras de *S. epidermidis* selecionadas. Foi observado que o anticorpo apresentou reação cruzada com várias proteínas de diferentes massas moleculares, sendo que em duas amostras foram detectadas proteínas com massas moleculares maiores que 100kDa. Pode se considerar o fato da seqüência da proteína Fbe, de 119 kDa, apresentar elevada homologia com outras proteínas, principalmente com as proteínas da família das serinas dos *S. epidermidis*, podendo, assim, o anticorpo anti-Fbe reagir de forma cruzada com outras proteínas de *S. epidermidis*.

Fbe é uma proteína de aproximadamente 119kDa localizada na superfície de amostras de *S. epidermidis* e está diretamente relacionada a adesão da bactéria ao fibrinogênio (NILSSON *et al.*, 1998; RENNERMALM, NILSSON & FLOCK, 2004).

A proteína Fbe é expressa na superfície de *S. epidermidis* durante a infecção. O momento da expressão desta proteína pode ser verificado pelo aumento do título de anticorpos anti-Fbe no soro de pacientes infectados com *S. epidermidis* (MCCREA *et al.*, 2000). Sellman e colaboradores (2005) não conseguiram verificar a expressão da proteína Fbe em um estudo de detecção de antígenos de superfície em *S. epidermidis*. Este grupo sugeriu alguns fatores que poderiam estar relacionados com a não detecção da proteína em questão, como: baixo nível de expressão da proteína, perda do sítio de ligação no momento da transferência para a membrana de nitrocelulose, perda da proteína durante o processo de lavagem, e a condição “in vitro” do experimento, que difere da encontrada no processo infeccioso. Este último sugere que a proteína seria expressa ou teria a sua expressão aumentada apenas “in vivo”.

Assim, como perspectivas futuras, temos como objetivo realizar uma melhor análise de expressão da proteína Fbe em amostras de *S. epidermidis*. Inicialmente, será realizada uma análise por Northern blotting, a fim de se confirmar se o gene *fbe* seria expresso “in vitro”. Confirmando-se a capacidade de expressão “in vitro” deste gene, a seguir, as proteínas totais de *S. epidermidis* serão submetidas a uma marcação por pulso com <sup>35</sup>S-metionina. Nesta análise também será observada se há diferenças na síntese das proteínas Fbe e AtIE, nas diferentes fases de crescimento da bactéria, principalmente no início (4h) e no final (9h) da fase log de crescimento bacteriano.

Este estudo será continuado pelo nosso grupo para melhor analisarmos os possíveis fatores que poderiam estar interferindo no elevado número de resultados falso-positivos, como observado nos testes de aglutinação com plasma para a espécie *S. epidermidis*.

## 6) CONCLUSÕES

O Sistema comercial “Slidex Staph Plus” apresentou maior acurácia do que os testes de aglutinação com os plasmas, sendo assim, o mais indicado para a detecção do fator “clumping” em amostras de *Staphylococcus*.

A aglutinação nos testes em lâmina, utilizando plasma de coelho ou humano, apresentada por algumas amostras de *S. epidermidis*, não mostrou correlação com os testes de aderência ao fibrinogênio, indicando que outros componentes do plasma e/ou da superfície celular, além da proteína Fbe, contribuam para este evento.

Através da técnica de quantificação de aderência ao fibrinogênio foi verificada maior aderência ao fibrinogênio de amostras de *S. epidermidis* no início da fase log de crescimento bacteriano (4h), do que no período de 9h de incubação.

Todas as amostras de *S. epidermidis* analisadas apresentaram os genes *atlE* e *fbe* através da técnica de PCR. Através de western blotting, a proteína AtlE, foi detectada em sete amostras de *S. epidermidis* selecionadas, apresentando as duas isoformas de 60kDa e 52kDa.



BOYCE.; 1996. Coagulase-negative staphylococci. In: *Hospital Epidemiology and Infection Control*. C. Glen Mayhall, M. D., Ed. Williams & Wilkins Company, Baltimore, USA. p. 306-334.

BRANDT, L.; SWAHN, B. 1960. Subacute bacterial endocardites due to coagulase-negative *Staphylococcus albus*. *Acta Med. Scand.* **166**:125-132.

CALVO, J.; HERNANDEZ J. L.; FARINAS, M. C.; GARCIA-PALOMO,; D. AGUERO, J. 2000. Osteomyelitis caused by *Staphylococcus schleiferi* and evidence of misidentification of this *Staphylococcus* species by an automated bacterial identification system. *J. Clin. Microbiol.* **38**:3887-3889.

CAMPANILE, F.; VENDITTI, M.; BORBONE, S.; BUONGIORNO, D.; PENNI, A.; STEFANI, S. 2006. Daptomycin activity against multi-resistant *Staphylococcus haemolyticus* bloodstream isolates from severe infections. Poster n. 1585, *16th ECCMID-Nice*, Springer, Berlin/Heidelberg. p.131.

CHANG, F. 2000. *Staphylococcus aureus* bacteremia and endocarditis. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **33**:63-68.

CHEUNG, A. L.; KOOMEY, J. M.; BUTLER, C. A.; PROJAN, S. J.; FISCHETTI, V. A. 1992. Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (sar) distinct from agr. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**:6462-6466.

CHEUNG, A. I.; PROJAN, S. J.; EDELSTEIN, R. E., FISCHETTI, V. A. 1995. Cloning, expression, and nucleotide sequence of a *Staphylococcus aureus* gene (fbpA) encoding a fibrinogen-binding protein. *Infect. Immun.* **63**:1914-1920.

CLUSTALW. Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> Acesso em: 19 janeiro de 2007.

COULTER, S. N.; SCHWAN, W. R.; NG, E. Y.; LANGHORNE, M. H.; RITCHIE, H. D.; WESTBROCK-WADMAN, S.; HUFNAGLE, W. O.; FOLGER, K. R.; BAYER, A. S.; STOVER, C. K. 1998. *Staphylococcus aureus* genetic loci impacting growth and survival in multiple infection environments. *Mol. Microbiol.* **30**:393-404.

CROSSLEY, K. B.; G. L. ARCHER (eds.). 1997. *Staphylococci in Human Disease*. Churchill Livingstone Inc., New York, N.Y.

DAVIS S. L.; GURUSIDDAPPA S.; MCCREA K. W.; PERKINS S.; HOOK M. 2001. SdrG, a fibrinogen-binding bacterial adhesin of the microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules subfamily from *Staphylococcus epidermidis*, targets the thrombin cleavage site in the Bbeta chain. *J. Biol. Chem.* **276**:27799-27805.

DIEKEMA, D. J.; PFALLER, M. A.; SCMITZ, F. J.; SMAYEVSKY, J.; BELL, J.; JONES, R. N.; BEACH, M. & SENTRY GROUP. 2001. 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.* **32**:114-132.

DINGER, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol. Rev.* **1**:16-34.

EUZÈBY, J. P. 2007. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature – Genus *Staphylococcus*. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/cv.html> Acesso em: 19 janeiro de 2007.

FEY, P. D.; ULPHANI, J. S.; GÖTZ, F.; HEILMANN, C.; MACK, D.; RUPP, M. E. 1999. Characterization of the relationship between polysaccharide intercellular adhesin and hemagglutination in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Infect. Dis.* **179**:1561–1564.

FOSTER, T. J.; MCDEVITT, D. 1994. Surface-associated proteins of *Staphylococcus aureus*: their possible roles in virulence. *FEMS Microbiol. Lett.* **118**:199–206.

FOSTER, S. J. 1995. Molecular characterization and functional analysis of the major autolysin of *Staphylococcus aureus* 8325/4. *J. Bacteriol.* **177**: 5723–5725.

FOSTER, T. J.; PEACOCK, S. J.; MASSEY, R. C.; WALSH, E. I.; O'BRIEN, L. M. 2002. *Staphylococcus aureus* clumping factor B (ClfB) promotes adherence to human type I cytokeratin 10: implications for nasal colonization. *Cell Microbiol.* **11**:759–770.

FOURNIER, J. M.; BOUTONNIER, A.; BOUVET, A. 1989. *Staphylococcus aureus* strains which are not identified by rapid agglutination methods are of capsular serotype 5. *J. Clin. Microbiol.* **27**:1372–1374.

FREBOURG, N. B.; LEFEBVRE, S.; BAERT, S.; LEMELAND, J. F. 2000. PCR-Based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. *J. Clin. Microbiol.* **38**:877–880.

GATERMANN, S. G.; MEYER, H. G. 1994. *Staphylococcus saprophyticus* hemagglutinin binds fibronectin. *Infect. Immun.* **62**:4556–4563.

GÖTZ, F. 2002. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol.* **43**:1367–1378.

GRATTARD, F.; ETIENNE, J.; POZZETTO, B.; TARDY, F.; GAUDIN, O.G.; FLEURETTE, J. 1993. Characterization of unrelated strains of *Staphylococcus schleiferi* by using ribosomal DNA fingerprinting, DNA restriction patterns and plasmid profiles. *J. Clin. Microbiol.* **31**:812–818.

HARRISON; BRAUNWALD; FAUCI; KASPER; HAUSER; LONGO; JAMESON. (eds.). 2002. Sangramento e trombose *In: Medicina Interna*. 15th. Brasil. Ed. Mc Graw Hill Interamericana do Brasil. p. 375-381

HARTFORD, O.; O'BRIEN, L.; SCHOFIELD, K.; WELLS, J.; FOSTER, T.J. 2001. The Fbe (SdrG) protein of *Staphylococcus epidermidis* HB promotes bacterial adherence to fibrinogen. *Microbiology*. **147**:2545-2552.

HARTLEIB, J.; KÖHLER, N.; DICKINSON, R.; CHHATWAL, G.; SIXMA, J.; HARTFORD, O. 2000. Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood*. **96**:2149–2156.

HAWIGER, J.; STECKLEY, S.; HAMMOND, D.; CHENG, C.; TIMMONS, S.; GLICK, A.; DES PREZ, R. 1979. Staphylococci- induced human platelet injury mediated by protein A and immunoglobulin G Fc fragment receptor. *J. Clin. Invest.* **64**:931–937.

HELL, W., MEYER, H. G.; GATERMANN, S. G. 1998. Cloning of *aas*, a gene encoding a *Staphylococcus saprophyticus* surface protein with adhesive and autolytic properties. *Mol. Microbiol.* **29**:871–881.

HEILMANN, C.; HUSSAIN, M.; PETERS, G.; GOTZ, F. 1997. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol. Microbiol.* **24**:1013–1024.

HEILMANN, C.; THUMM, G.; CHHATWAL, G S.; HARTLEIB, J.; UEKOTTER, A.; PETERS, G. 2003. Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology*. **10**:2769-2778.

HENDRIX, H. T.; LINDHOUT K.; MERTENS, W.; ENGELS; HEMKER, H. C. 1983. Activation of human prothrombin by stoichiometric levels of staphylocoagulase. *J. Biol. Chem.* **258**:3637–3644.

HERRMANN, M.; LAI, Q; ALBRECHT, R.; MOSHER, D.; PROCTOR, R 1993. Adhesion of *Staphylococcus aureus* to surface bound platelets: role of fibrinogen/fibrin and platelet integrins. *J. Infect. Dis.* **167**:312–322.

HOLTJE, J. V. 1996. A hypothetical holoenzyme involved in the replication of the murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiology* **142**: 1911–1918.

HUEBNER, J.; GOLDMANN, D. A. 1999. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annu. Rev. Med.* **50**:223-236.

HUSSAIN, M.; BECKER, K.; VON EIFF, C.; SCHRENZEL, J.; PETERS, G.; HERRMANN, M. 2001. Identification and characterization of a novel 38,5-kilodalton cell surface protein of *Staphylococcus aureus* with extended- spectrum binding activity for extracellular matrix and plasma proteins. *J. Bacteriol.* **183**:6778-6786.

ING, H. B.; BADDOUR, L. M.; BAYER, A. S. 1997. Bacteremia and infective endocarditis: pathogenesis, diagnosis, and complications. In: *The Staphylococci in*

*Human Disease*, Crossley, K. B. & Archer, G. L. (eds.). Churchill Livingstone. New York. USA. p.331-355.

JAFFE, C. L.; BENNETT, E.; GRIMALDI, JR. G.; MCMAHON-PRATT, D. 1984. Production and characterization of species-specific monoclonal antibodies against *Leishmania donovani* for immunodiagnosics. *J. Immunol.* **133**:440-447.

JARLOV, J. O. 1999. Phenotypic characteristics of coagulase-negative staphylococci: typing and antibiotic susceptibility. *APMIS Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* **107**:1-42.

JEAN-PIERRE, H.; DARBAS, H.; JEAN-ROUSSENQ, A.; BOYER, G. 1989. Pathogenicity in two cases of *Staphylococcus schleiferi*, a recently described species. *J. Clin. Microbiol.* **27**:2110-2111.

JELJASZEWICZ, J., L. M. SWITALSKI, AND C. ADLAM. 1983. Staphylocoagulase and clumping factor. In: *Staphylococci and staphylococcal infections* vol.2 Easmon, C. S. F. & Adlam, C. (eds.), Academic Press, Inc. (London), Ltd., London. p.525-557

JOHN, J. F. ; BARG N. L. 1996. *Staphylococcus aureus*. In: Mayhall, C G (ed.). *Hospital Epidemiology and Infection Control*. Williams & Wilkins Company, Baltimore, USA p. 271-289.

JONSSON, K.; SIGNAS, C.; MULLER, H. P.; LINDBERG, M. 1991. Two different genes encode fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus*. The complete nucleotide sequence and characterization of the second gene. *Eur. J. Biochem.* **202**:1041-1048.

JOSEFSSON, E.; MCCREA, K. W.; NI EIDHIN, D.; O'CONNELL, D.; COX, J.; HOOK, M.; FOSTER, T. J. 1998. Three new members of the serine-aspartate repeat protein multigene family of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*. **144**:3387-3395.

KLOOS, W. E.; BANNERMAN, T. L.; 1994. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol. Rev.* **7**:117-140

KLUYTMANS, J.; BERG, H.; STEEGH, P.; VANDENESCH, F.; ETIENNE, J.; VAN BELKUM, A. 1998. Outbreak of *Staphylococcus schleiferi* wound infections: strain characterization by randomly amplified polymorphic DNA analysis, PCR ribotyping, conventional ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **36**:2214-2219.

KORNBLUM, J. B.; KREISWIRTH, S. J.; PROJAN, H.; ROSS, & NOVICK.; R. P. 1990. *agr*: a polycistronic locus regulating exoprotein synthesis in *Staphylococcus aureus*, In Molecular biology of the staphylococci. R. P. Novick (ed.), VCH Publishers, New York. p.373-402.

KOREEN, L.; RAMASWA, M. Y. S. V.; NAIDICH, S.; KOREEN, I. V.; GRAFF, G. R.; GRAVISS, E. A.; KREISWIRTH, B. N. 2005. Comparative sequencing of the serine-aspartate repeat-encoding region of the clumping factor B gene (*clfB*) for resolution within clonal groups of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **8**:3985-3994.

KREPSKY, N.; FERREIRA, R. B. R; NUNES, A. P. F.; LINS, U. G. C.; FILHO, F. C. S.; MATTOS-GUARALDI, A. L.; SANTOS, K. R. N. 2003. Cell surface hydrophobicity and slime production of *Staphylococcus epidermidis* Brazilian isolates. *Curr. Microbiol.* **46**(4):280-286.

LAEMMLI, V. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*. **227**:680-685.

LAMBE, D. W. Jr.; FERGUSSON, K. P.; KEPLINGER, J. L.; GEMMELL, C. G.; KALBFLEISCH, J. H. 1990. Pathogenicity of *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus schleiferi*, and three other coagulase-negative staphylococci in a mouse model and possible virulence factors. *Can J. Microbiol.* **36**:455-463.

LAPORT, M.S., CASTRO, A.C.D., VILLARDO, A.F., LEMOS, J.A.C., BASTOS, M.C.F. AND GIAMBIAGI-DEMARVAL, M. 2001. Heat-shock response in *Streptococcus pyogenes*. A comparison to *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. *Current Microbiology* **4**:264-268.

LATORRE, M.; ROJO, P. M.; UNZAGA, M. J.; CISTERNA, R. 1993. *Staphylococcus schleiferi*: a new opportunistic pathogen. *Clin. Infect. Dis.* **16**:589-590.

LEE, C.Y.; LEE, J.C. 2000. Staphylococcal capsule. In: *Gram-Positive Pathogens*. Fischetti, V.A.; Novick, R.P.; Ferretti, J.J.; Portnoy, D.A. & Rood, J.I. (eds), 1st edition. ASM Press, Washington, D.C., USA. p.361-366.

LIU, Y.; AMES, B.; GOROVITS, E.; PRATER, B. D.; SYRIBEYS, P.; VERNACHIO, J. H.; PATTI, J. M. 2004. SdrX, a serine-aspartate repeat protein expressed by *Staphylococcus capitis* with collagen VI binding activity. *Infect. Immun.* **11**:6237-6244.

MAC FADDIN, J. F. 1977. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Williams & Wilkins Company, Baltimore, USA. 312p.

MANI, N.; BADDOUR, L. M.; OFFUTT, D. Q.; VIJARANAKUL, U.; NADAKAVUKAREN, M. J.; JAYASWAL, R. K. 1994. Autolysis-defective mutant

of *Staphylococcus aureus*: pathological considerations, genetic mapping, and electron microscopic studies. *Infect. Immun.* **62**:1406–1409.

MARSOU, R.; BES, M.; BOUDOUMA, M.; BRUN, Y.; MEUGNIER, H.; FRENEY, J.; VANDENESCH, F.; ETIENNE J. 1999. Distribution of *Staphylococcus sciuri* subspecies among human clinical specimens, and profile of antibiotic resistance. *Res. Microbiol.* **150**:531-541.

MATEO, M.; MAESTRE, J. R.; AGUILAR, L.; CAFINI, F., PUENTE, P.; SANCHEZ, P.; ALOU, L.; GIMENEZ, M. J.; PRIETO, J. 2005. Genotypic versus phenotypic characterization, with respect to susceptibility and identification, of 17 clinical isolates of *Staphylococcus lugdunensis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2**:287-291.

MATTOS-GUARALDI, A. L.; FORMIGA, L. C. 1986. Agglutination of sheep erythrocytes by *Corynebacterium diphtheriae*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1**:75-77.

MCALEESE, F. M.; WALSH, E. J.; SIEPRAWKA, M.; POTEMPA, J.; FOSTER, T. J. 2001. Loss of clumping factor B binding activity by *Staphylococcus aureus* involves cessation of transcription, shedding and cleavage by metalloprotease. *J. Biol. Chem.* **276**:29969–29978.

MCCREA, K. W.; HARTFORD, O.; DAVIS, S.; EIDHIN, D. N.; LINA, G.; SPEZIALE, P.; FOSTER, T. J.; HOOK, M. 2000. The serine-aspartate repeat (Sdr) protein family in *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology.* **7**:1535-1546.

MCDEVITT, D.; FRANCOIS, P.; VAUDAUX, P.; FOSTER, T. J. 1994. Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **11**:237–248.

MITCHELL, J.; TRISTAN, A.; FOSTER, T. J. 2004. Characterization of the fibrinogen-binding surface protein Fbl of *Staphylococcus lugdunensis*. *Microbiology*. **150**:3831-3841.

MONSEN, T.; RÖNNMARK, M.; OLOFSSON, C.; WISTRÖM, J. 1998. An inexpensive and reliable method for routine identification of staphylococcal species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **17**:327-335.

MOREILLON, P.; ENTENZA, J. M.; FRANCIOLI, P.; MCDEVITT, D.; FOSTER, T. J.; FRANCOIS, P.; VAUDAUX, P. 1995. Role of *Staphylococcus aureus* coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis. *Infect. Immun.* **63**: 4738-4743.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER M. A. (eds). 2002. Medical Microbiology Introduction. *In: Medical Microbiology* 4<sup>th</sup> edition. ed. Koogan. p.1-3.

NAGY, E.; MANNCKE, B.; WERNER, H. 1994. Fibronectin and vitronectin binding of *Bacteroides fragilis* and eight other species of the genus. *Zentralbl Bakteriol.* **281**:235-239.

NAFZIGER, D. A.; WENZEL, R. P. 1989. Coagulase-negative staphylococci: epidemiology, evaluation, and therapy. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **3**:915-929.

NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE (NNIS) SYSTEM REPORT. 1996. Data summary from October 1986-April 1996, issued May 1996. *Am. J. Infect. Control.* **24**:380-388.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI).  
Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Acesso em 22 de janeiro de 2007.

NGUYEN, T.; GHEBREHIWET, B.; PEERSCHKE, E. 2000. *Staphylococcus aureus* protein A recognizes platelet gC1qR/p33: a novel mechanism for staphylococcal interactions with platelets. *Infect. Immun.* **68**:2061-2068.

NILSSON, M.; FRYKBERG, L.; FLOCK, J. I.; PEI, L.; LINDBERG, M.; GUSS, B. 1998. A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* **66**:2666-2673.

NILSSON, M.; BJERKETORP, J.; GUSS, B.; FRYKBERG L. 2004. A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS. Microbiol. Lett.* **241**:87-93.

NI EIDHIN, D.; PERKINS, S.; FRANCOIS, P.; VAUDAUX, P.; HOOK, M.; FOSTER, T. J. 1998. Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **30**:245-257.

NUNES, A. P. F.; TEIXEIRA, L. M.; BASTOS, C. C. R.; FONSECA, L. S.; SANTOS, K. R. N. 2002. Susceptibility of Brazilian staphylococcal strains to glycopeptides evaluated by different testing methods. *Curr Microbiol.* **46**:280-286.

NUNES, E. L. C.; SANTOS, K. R. N.; MONDINO, P. J. J.; BASTOS, M. C. F.; GIAMBIAGI-DE-MARVAL, M. 1999. Detection of *ileS-2* gene encoding mupirocin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by multiplex PCR. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **34**:77-81.

O'BRIEN, L.; KERRIGAN, S. W.; KAW, G.; HOGAN, M.; PENADES, J.; LITT, D.; FITZGERALD, D. J.; FOSTER, T. J.; COX D. 2002. Multiple mechanisms for the

activation of human platelet aggregation by *Staphylococcus aureus*: roles for the clumping factors ClfA and ClfB, the serine-aspartate repeat protein SdrE and protein A. *Mol. Microbiol.* **44**:1033-1044.

O'BRIEN, F. G.; LIM, T. T.; CHONG, F. N.; COMBS, G. W.; ENRIGHT, M. C.; ROBINSON, D. A.; MONK, A.; SALIM, B. S.; KREISWIRTH, B. N.; GRUBB, W. B. 2004. Diversity among Community Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Australia. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 3185-3190.

OSHIDA, T.; SUGAI, M.; KOMATSUZAWA, H.; HONG, Y. M.; SUGINAKA, H.; TOMASZ, A. 1995. A *Staphylococcus aureus* autolysin that has an N-Acetylmuramoyl-L-alanine amidase domain and an endo-b-N-acetylglucosaminidase domain: cloning, sequence analysis and characterization. *Proc Natl Acad Sci* **92**: 285-289.

OZTURKERI, H.; KOCABEYOGLU, O.; YERGOK, Y. Z.; KOSAN, E.; YENEN, O. S.; KESKIN, K. 1994. Distribution of coagulase-negative staphylococci, including the newly described species *Staphylococcus schleiferi*, in nosocomial and community acquired urinary tract infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**:1076-1079

PALMA, M.; HAGGAR, A.; FLOCK, J. I. 1999. Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. *J. Bacteriol.* **181**:2840-2845.

PALMA, M.; SHANNON, O.; QUEZADA, H. C.; BERG, A.; FLOCK, J. I. 2001. Extracellular fibrinogen-binding protein, Efb, from *Staphylococcus aureus* blocks

platelet aggregation due to its binding to the alpha-chain. *J. Biol. Chem.* **276**:31691-31697.

PATTI, J. M.; ALLEN, B. L.; MCGAVIN, M. J.; HOOK, M. 1994. MSCRAMM mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**:585-617.

PEACOCK, S. J.; LINA, G.; ETIENNE, J.; FOSTER, T. J. 1999. *Staphylococcus schleiferi* subsp. *schleiferi* expresses a Fibronectin-Binding Protein. *Infect. Immun.* **67**:4272-4275.

PEACOCK, S.; DAY, N.; THOMAS, M.; BERENDT, A.; FOSTER, T. 2000. Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibit diversity in *fnb* genes and adhesion to human fibronectin. *J. Infect.* **41**:23-31.

PEI, L.; FLOCK, J. I. 2001. Functional study of antibodies against a fibrinogen-binding protein in *Staphylococcus epidermidis* adherence to polyethylene catheters. *J. Infect. Dis.* **184**:52-55.

PEI, L.; PALMA, M.; NILSSON, M.; GUSS, B.; FLOCK, J. I. 1999. Functional studies of a fibrinogen binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* **67**:4525-4530.

PERSONNE, P.; BES, M.; LINA, G.; VANDENESCH, F.; BRUN, Y.; ETIENNE, J. 1997. Comparative performances of six agglutination kits assessed by using typical and atypical strains of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **35**:1138-1140.

PHILLIPS, L. G.; HEGGERS, J. P.; ROBSON, M. C. 1992. Burn and trauma units as source of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Burn Care Rehabil.* **13**:293-297.

PUJOL, M.; PENA, C.; PALLARES, R.; ARIZA, J.; AYATS, J.; DOMINGUEZ, M. A.; GUDIOL, F. 1996. Nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteremia among nasal carriers of methicillin-resistant and methicillin-susceptible strains. *Am. J. Med.* **100**:509–516.

RENNERMALM A, NILSSON M, FLOCK JI. 2004. The fibrinogen binding protein of *Staphylococcus epidermidis* is a target for opsonic antibodies. *Infect. Immun.* **72**:3081-3083.

RICE, K.; HUESCA, M.; VAZ, D.; MCGAVIN, M. 2001. Variance in fibronectin binding and *fnb* locus polymorphisms in *Staphylococcus aureus*: identification of antigenic variation in a fibronectin binding protein adhesin of the epidemic CMRSA-1 strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **69**: 3791–3799.

ROSENBERG, M.; DOYLE, R.J. 1990. Microbial cell surface hydrophobicity: history, measurement and significance. *In: Microbial Cell Surface Hydrophobicity*, Doyle & Rosenberg (eds), American Society for Microbiology Press, Washington DC, USA. P. 1-30.

RUPP, M. E.; ARCHER, G. L. 1994. Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin. Infect. Dis.* **19**:231-245.

RUPP, M. E.; FEY, P. D.; HEILMANN, C.; GOTZ, F. 2001. Characterization of the importance of *Staphylococcus epidermidis* autolysin and polysaccharide intercellular adhesin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *J. Infect. Dis.* **183**:1038–1042.

RUPP, M. E.; HAN, J. 1995. Phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* hemagglutinin expression in-vitro, In: *Annual Meeting of Infectious Diseases Society of America*, San Francisco, CA. *Clin. Infect. Dis.* **21**:724

RUHE, J.; MENON, D.; MUSHATT, D.; DEJACE, P.; HASBUN, R. 2004. Non-*epidermidis* coagulase-negative staphylococcal bacteremia: clinical predictors of true bacteremia. *Eur. J. Clin. Microbiol Infect. Dis.* **26**:495-498.

SABAT, A.; MELLES, D. C.; MARTIROSIAN, G.; GRUNDMANN, H.; VAN BELKUM, A.; HRYNIEWICZ, W. 2006. Distribution of the serine-aspartate repeat protein-encoding *sdr* genes among nasal-carriage and invasive *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 1135-1138.

SADER, H. S.; JONES, R. N.; GALES, A. C.; SILVA, J. B.; PIGNATARI, A. C.; SENTRY Participants Group (Latin America). 2004. SENTRY antimicrobial surveillance program report: 2004. Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. *Braz. J. Infect. Dis.* **8**:25-79.

SAKINC, T.; KLEINE, B.; GATERMANN, S. G. 2006. SdrI, a serine-aspartate repeat protein identified in *Staphylococcus saprophyticus* strain 7108, is a collagen-binding protein. *Infect Immun.* **74**:4615-4623.

SANTOS SANCHES; MATO, R.; DE LANCASTRE, H.; TOMASZ, A.; CEM/NET. 2000. Collaborators and the International Collaborators, Patterns of multidrug resistance among methicillin-resistant hospital isolates of coagulase-positive and coagulase-negative staphylococci collected in the international multicenter study RESIST in 1997 and 1998. *Microb. Drug Resist.* **6**:199-211.

SCANVIC, A; DENIC, F; GAILLON, S; GIRY, P; ANDREMONT, A & LUCET, J 2001. Duration of colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after hospital discharge and risk factors for prolonged carriage. *Clin Infect Dis.* **32**: 1393-1398.

SCHNITZLER, N.; MEILICKE, R.; CONRADS, G.; FRANK, D.; HAASE, G. 1998. *Staphylococcus lugdunensis*: report of a case of peritonitis and an easy-to-perform screening strategy. *J. Clin. Microbiol.* **36**:812–813.

SELLMAN, B. R.; HOWELL, A. P.; KELLY-BOYD, C.; BAKER, S. M. 2005. Identification of immunogenic and serum binding proteins of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* **73**:6591-6600.

SMITH, T. ; JARVIS, W. 1999. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. *Microb. Infect.* **1**:795-805.

STEPHAN, R.; ANNEMULLER, C.; HASSAN, A. A.; LAMMLER, C. 2001. Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. *Vet. Microbiol.* **78**:373-382.

SZÖKE, I.; PASCU, C.; NAGY, E.; LJUNG, A.; WADSTRÖM, T. 1996. Binding of extracellular matrix proteins to the surface of anaerobic bacteria. *J. Med. Microbiol.* **45**:338-343.

THOMAS S, HOY C, CAPPER R. 2006. Osteomyelitis of the ear canal caused by *Staphylococcus lugdunensis*. *J. Infect.* **53**:227-229.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**:4350-4354.

TRISTAN, A.; YING, L.; BES, M.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; LINA, G. 2003. Use of multiplex PCR to identify *Staphylococcus aureus* adhesins involved in human hematogenous infections. *J. Clin. Microbiol.* **9**:4465-4467.

TUNG, H.; GUSS, B.; HELLMAN, U.; PERSSON, L.; RUBIN, K.; RYDEN, C. 2000. A bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*: a member of the staphylococcal Sdr family. *Biochem. J.* **345**:611-619.

VAN GRIETHUYSEN, A.; BES, M.; ETIENNE, J.; ZBINDEN, R.; KLUYTMANS J. 2001. International multicenter evaluation of latex agglutination tests for identification of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **39**:86-89.

VANDENESCH, F.; ETIENNE, J.; REVERDY, M. E.; EYKYN, S. J. 1993. Endocarditis due to *Staphylococcus lugdunensis*: report of 11 cases and review. *Clin. Infect. Dis.* **17**:871-876.

VANDENBERGH, M. F. Q.; YZERMAN, E. P. F.; BELKUM, A.; BOELEN, H. A. M.; SIJMONS, M.; VERBRUGH, H. A. 1999. Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years: redefining the persistent carrier state. *J. Clin. Microbiol.* **37**:3133-3140.

VANNUFFEL, P.; LATERRE, P. F.; BOUYER, M.; GIGI, J.; VANDERCAM, B.; REYNAERT, M.; GALA, J. L., 1998. Rapid and specific molecular identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in endotracheal aspirates from mechanically ventilated patients. *J. Clin. Microbiol.* **36**:2366-2368.

VAUDAUX, P. H.; YASUDA, M. I.; VELAZCO, E.; HUGGLER, I.; RATTI, F. A.; WALDVOGEL, D. P.; LEW,.; PROCTOR, R. A. 1990. Role of host and bacterial factors in modulating staphylococcal adhesion to implanted polymer surfaces. *J. Biomater. Appl.* **5**:134- 153.

VERNACHIO, J.; BAYER, A. S.; LE, T.; CHAI, Y. L.; PRATER, B.; SCHNEIDER, A.; AMES, B.; SYRIBEYS, P.; ROBBINS, J.; PATTI, J. M. 2003. Anti-clumping factor A immunoglobulin reduces the duration of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia in an experimental model of infective endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **11**:3400-3406.

VON EIFF, C. V.; PETERS, G.; HEIFMANN, C. 2002. Pathogenesis of infections due to coagulase negative staphylococci. *Lancet Infect. Dis.* **2**:677-685.

VOSTRUGINA, K.; GUDAVICIENE, D. & VITKAUSKIENE, A. 2006. Bacteremias in patients with severe burn trauma. *Medicina (Kaunas).* **7**:576-579.

WASTFELT, M. K. B.; FLOCK, J. I. 1995. Incidence of highly conserved *fib* gene and expression of the fibriogen-binding (Fib) protein among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J.Clin.Microbiol.* **33**:2347-2352.

WEIST, K.; CIMBAL, A. K.; LECKE, C.; KAMPF, G.; RUDEN, H.; VONBERG, R. P. 2006. Evaluation of six agglutination tests for *Staphylococcus aureus* identification depending upon local prevalence of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). *J. Med. Microbiol.* **55**:283-290.

WENZEL, R. P.; EDMOND, M. B. 2001. The impact of hospital-acquired bloodstream infections. *Emerg. Infect. Dis.* **7**:174-177. Review.

WILSON, T. S.; STUART, R. D. 1965. *Staphylococcus albus* in wound infection and in septicemia. *Can. Med. Assoc. J.* **93**:8-16

WILSON, W.; KARCHMER, A.; DAJANI, A., TAUBERT, K., BAYER, A., KAYE, D. 1995. Antibiotic treatment of adults with infective endocarditis due to streptococci, enterococci, staphylococci and HACEK microorganisms. *J. Am. Med. Assoc.* **274**:1706–1713.

YEE, V. C.; PRATT, K. P.; COTE, H. C. F.; TRONG, I. L.; CHUNG, D. W.; DAVIE, E. W.; STENKAMP, R. E.; TELLER, D. C. 1997. Crystal structure of a 30 kDa C-terminal fragment from the gamma chain of human fibrinogen. *Structure.* **5**:125–138.