

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**IDENTIFICAÇÃO DE BACILOS GRAM POSITIVOS
AERÓBICOS ISOLADOS DE ESPÉCIMES CLÍNICOS
EM UM HOSPITAL ESCOLA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Mariane de Mello Maraschin

**Santa Maria, RS, Brasil
2007**

**IDENTIFICAÇÃO DE BACILOS GRAM POSITIVOS
AERÓBICOS ISOLADOS DE ESPÉCIMES CLÍNICOS EM UM
HOSPITAL ESCOLA**

por

Mariane de Mello Maraschin

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em
Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria
(UFSM/RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof^a Adj. Dra Rosmari Hörner
Co-orientadora: Thereza Cristina Ferreira Camello

Santa Maria, RS, Brasil
2007

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciência Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**IDENTIFICAÇÃO DE BACILOS GRAM POSITIVOS
AERÓBICOS ISOLADOS DE ESPÉCIMES CLÍNICOS EM UM
HOSPITAL ESCOLA**

Elaborada por
Mariane de Mello Maraschin

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Análises Clínicas e Toxicológicas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Rosmari Hörner, Dra.
(Presidente/Orientadora)

Berta Maria Heinzmann, Dra. (UFSM)

Sydney Hartz Alves, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 09 de março de 2007.

AGRADECIMENTOS

A minha família por todo amor, força e confiança que sempre me dedicaram, e também por todo o apoio nos momentos difíceis desta jornada.

Aos meus pais, Marlei e Pedro, por todos os princípios e valores passados a mim.

Aos meus irmãos de sangue, Márcia e Marcelo, e aos emprestados, Diogo e Carolina, por todo carinho, atenção e pela simples existência.

A professora Rosmari Hörner, pela amizade, estímulo e principalmente pela confiança. E também por todos os ensinamentos a mim passados para que eu me tornasse uma pessoa melhor e consciente do meu dever como profissional.

Ao Paulo pelo afeto, apoio e toda a paciência durante a etapa final desta jornada.

A Thereza Camello por sua co-orientação e auxílio durante a pesquisa.

Ao chefe do LAC/HUSM, Eleú, que permitiu que eu pudesse utilizar as amostras do hospital para realizar minha pesquisa, e também as bioquímicas do setor de microbiologia por guardarem as cepas durante a correria da rotina do laboratório.

Ao médico infectologista Reinaldo Ritzel por toda a colaboração na análise das pastas dos pacientes.

As técnicas do LAC Loeci e Carmem pelos materiais e informações essenciais no preparo dos meios de cultura.

A minha querida colega de bancada a Claudinha pela amizade e companheirismo nas nossas infinitas horas dentro do laboratório.

A Vanessa, pelo incansável auxílio durante o desenvolvimento da pesquisa.

A minha amiga Edileusa pelos momentos de descontração durante os almoços e cafezinhos.

A minha amiga Valéria por todas as dicas durante o mestrado.

A secretária do DACT, Rozane por todo o auxílio e “empréstimos”, principalmente do seu computador.

Aos demais colegas do laboratório Fabiane, Fernanda, Thiago, Luiz e Gustavo, pela colaboração.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

IDENTIFICAÇÃO DE BACIOS GRAM POSITIVOS AERÓBICOS ISOLADOS DE ESPÉCIMES CLÍNICOS EM UM HOSPITAL ESCOLA

Autora: Mariane de Mello Maraschin
Orientadora: Prof^a Adj. Dra Rosmari Hörner
Santa Maria, 09 de março de 2007.

Os bacilos Gram positivos, nos últimos anos, têm sido relatados com crescente frequência como patógenos nosocomiais. O seu reconhecimento como agentes etiológicos de infecções sérias, tais como, sepsis bacteriana, endocardite e infecções em cateteres têm aumentado principalmente em pacientes imunocomprometidos. O tratamento destas infecções tornou-se problemático devido à elevação de sua resistência frente aos antibióticos comercialmente disponíveis. Graves e às vezes fatais consequências ocorrem devido à combinação de dificuldades clínicas e microbiológicas, incluindo falha na identificação, reconhecimento de sua importância e terapia inapropriada. A identificação dos bacilos Gram positivos frequentemente causa problemas. No período de janeiro a dezembro de 2005 foram isoladas 50 cepas de bacilos Gram positivos de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria. Estes microrganismos foram identificados através de uma bateria proposta de provas bioquímicas convencionais em comparação com o sistema comercial API Coryne. Para a determinação da sensibilidade a antimicrobianos foi utilizada a metodologia de disco-difusão. O maior número de isolamentos foi proveniente de hemoculturas 72% (n=36). Destacaram-se os corineformes 48% (n=24), entre eles o gênero *Corynebacterium*, e as espécies de *Bacillus* 44% (n=22). As bactérias pertencentes a este estudo demonstraram boa sensibilidade frente à vancomicina, linezolida, ciprofloxacina, imipenem e meropenem. Entretanto 6% (n=3) destas cepas apresentaram multirresistência aos antimicrobianos testados, inclusive à vancomicina, confirmada pelo E-test. A bateria de provas bioquímicas sugerida para a identificação dos BGPs isolados de espécimes clínicos mostrou-se eficiente, com desempenho similar ao comercial disponível, porém mais barata.

ABSTRACT

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

IDENTIFICATION OF AEROBIC GRAM POSITIVE RODS ISOLATED FROM CLINICAL SOURCES IN A TEACHING HOSPITAL

Autora: Mariane de Mello Maraschin
Orientadora: Prof^a Adj. Dra Rosmari Hörner
Santa Maria, 09 de março de 2007.

In recent years, the gram positive rods have been reported with an increasing frequency as nosocomial pathogens. The recognition those microorganisms as etiological agents of serious infections, such as bacterial sepsis, endocarditis, and catheter infections, have increased, especially in immunocompromised patients. Treatment of these infections has been problematic because the increase in resistance to antibiotics. Graves and sometimes fatal clinical outcomes due to combination of clinical and microbiologic difficulties, including an inappropriate therapy, the difficulty in identifying these organism and failure to recognize their significance, have been reported. Identification of gram positive rods often causes problems. The aim of this study was to propose the serial biochemical probes to identify in comparison with the trade system API Coryne and determine the antimicrobial susceptibility of Gram positive rods isolated from different clinical specimens of patients from the University of Santa Maria Hospital. Between January and December 2005, 50 Gram positive rods strains were isolated. The organisms were identified by conventional biochemical tests and the antimicrobial susceptibility testing was performed by disk-diffusion. Blood-culture 72% (n=36) was the most frequent source. The more prevalent microorganisms were coryneforms 48% (n=24) and *Bacillus* species, 44% (n=22). Antibiotic susceptibility tests showed good sensibility to vancomycin, linezolid, ciprofloxacin, imipenem and meropenem. However, 6% (n=3) of microorganisms isolated were multi-drug-resistant, included vancomycin, confirmed by the E-test. In our study we demonstrated the efficiency of the suggest battery, with similar efficacy as trade system, as a tool to identification of aerobic gram positive rod isolated from clinical sources.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Identificação bioquímica convencional proposta.....	38
Figura 2: Tiras de identificação do sistema API Coryne.....	43
Figura 3: <i>Corynebacterium</i> sp. morfologia das colônias (A) Coloração de Gram (100x) (B).....	55
Figura 4: <i>Microbacterium</i> sp. morfologia das colônias (A). Coloração de Gram (100x) (B).....	55
Figura 5: <i>Brevibacterium</i> sp. morfologia das colônias em 24h de incubação (A). Coloração de Gram (100x) de colônias com menos de 24h de incubação (B). Morfologia celular após 48h de incubação (C). <i>Cellulomonas</i> sp morfologia(D).....	57
Figura 6: <i>C. amycolatum</i> morfologia das colônias (A). Coloração de Gram (100x) de <i>C. amycolatum</i> , (B).....	59
Figura 7: <i>C. minutissimum</i> morfologia das colônias após 24h de incubação (A). Morfologia das colônias largas após 72h de incubação (B).....	59
Figura 8: <i>Listeria</i> sp colônias de coloração levemente branca e bordas transparentes e ausência de β -hemólise em AS (A). Coloração de Gram (100x) a partir das colônias, demonstrando cocobacilos Gram positivos (B).....	60
Figura 9: <i>L. monocytogenes</i> morfologia das colônias pequenas (A) e coloração de Gram (100x) (B). Prova da motilidade (C). Prova de CAMP positiva (D).....	61
Figura 10 <i>B. cereus</i> morfologia das colônias grandes e irregulares com grande halo de β -hemólise em AS (A) e coloração de Gram (100x) (B).....	62
Figura 11: <i>B. mycoides</i> morfologia das colônias (A) e Coloração de Gram (100x) (B). <i>Bacillus</i> sp. morfologia das colônias (C). Coloração de Gram (100x) (D).....	64
Figura 12: <i>A. Rhodococcus</i> sp. colônias de coloração salmão em AS após 24h de incubação. Coloração de Gram (100x) de colônias jovens de <i>Rhodococcus</i> sp. demonstrando formas cocobacilares. (B).....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Procedência dos Bacilos Gram Positivos isolados no HUSM no período de um ano.....	48
Tabela 2 - Distribuição topográfica dos pacientes nas unidades do HUSM relacionado ao estado de internação	49
Tabela 3 - Características clínicas dos pacientes dos quais foram isolados BGP's.....	50
Tabela 4 - Gêneros de BGP's identificados pelos testes bioquímicos convencionais propostos e suas características morfológicas.....	52
Tabela 5 - Nível de identificação e percentual encontrado para os gêneros e espécies de BGP's irregulares, regulares e ramificados identificados através da metodologia convencional proposta.....	53
Tabela 6 - Gêneros de BGP's corineformes identificados e os respectivos espécimes clínicos.....	54
Tabela 7 - Espécies de <i>Corynebacterium</i> isoladas e respectivas amostras biológicas.....	58
Tabela 8 - Espécies de BGP's esporulados identificados através da metodologia convencional	63
Tabela 9 - Microrganismos identificados pelo sistema API Coryne DATABASE 2.0 distribuídos em grupos.....	66
Tabela 10 - Comparação entre os resultados das identificações obtidos pelo sistema API Coryne e pelos testes bioquímicos convencionais.....	69
Tabela 11 - Suscetibilidade aos antimicrobianos dos grupos de BGP's isolados expressa em porcentagem de cepas sensíveis.....	71

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 Bacilos Gram positivos irregulares ou Corineformes.....	15
2.2 Bacilos Gram positivos regulares não esporulados.....	21
2.3 Bacilos Gram positivos esporulados.....	24
2.4 Bacilos Gram positivos ramificados, Actinomicetos aeróbios ou nocardioformes	28
2.5 Identificação bioquímica convencional e comercial dos bacilos Gram positivos.....	31
2.6 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos.....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1 Isolamento dos microrganismos.....	36
3.1.1 Composição dos meios de cultura para o isolamento.....	37
3.2 Identificação convencional proposta para os BGPs	37
3.2.1 Composição dos meios de cultura para a identificação.....	38
3.3 Identificação dos BGPs pelo sistema API Coryne.....	43
3.4 Testes de sensibilidade aos antimicrobianos	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.1 Isolamento dos microrganismos.....	46
4.2 Identificação convencional dos BGPs	50
4.3 Identificação dos BGPs pelo sistema API Coryne.....	64
4.4 Teste de sensibilidades aos antimicrobianos.....	69
5. CONCLUSÕES.....	74
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

1. INTRODUÇÃO

Os bacilos Gram positivos aeróbios são comumente isolados no laboratório de bacteriologia clínica. A maioria destes microrganismos é ubíqua na natureza, e habitam os solos, as águas, as plantas e diversos tipos de matéria orgânica. Algumas espécies são reconhecidamente comensais da pele e das mucosas dos seres humanos.

Atualmente a identificação dos bacilos Gram positivos, não diftéricos, como patógenos nosocomiais tornou-se um assunto de interesse clínico devido ao aumento no número de isolamentos destes microrganismos como agentes etiológicos de infecções e, à existência de cepas intrinsecamente resistentes aos antimicrobianos. Todavia, aspectos sobre a infecção e disseminação destes microrganismos no ambiente hospitalar, requerem aprofundamento.

Este grupo de bacilos, abrangendo um grande número de gêneros e espécies, possui características morfológicas e fenotípicas bastante heterogêneas. Da mesma forma, a virulência destes bacilos varia desde microrganismos reconhecidos como patogênicos para a espécie humana, como o *Bacillus anthracis* e a *Listeria monocytogenes*, até contaminantes comuns de laboratório, como algumas espécies do gênero *Bacillus* e algumas do gênero *Corynebacterium*.

A diferenciação entre um quadro infeccioso causado por microrganismo de baixa patogenicidade, ou uma possível contaminação ou colonização, é difícil, uma vez que estes bacilos são constantemente veiculados pelo ar e estão presentes na pele e mucosas dos seres humanos, podendo facilmente ser agentes de infecções, se introduzidos por catéteres ou sondas em pacientes imunocomprometidos.

Os pacientes dos centros de tratamento intensivo (CTI), pacientes oncológicos e pacientes de hemodiálise, na sua maioria fazem uso de cateteres ou sondas por períodos prolongados. Neste contexto, onde a população apresenta uma condição desfavorável de imunodepressão, estes microrganismos oportunistas tornam-se patógenos potenciais, quando obtém acesso facilitado à corrente sangüínea.

A identificação dos BGPs ao nível de gênero ou espécie é difícil, uma vez que muitas cepas não se encontram bem definidas taxonomicamente.

As baterias de testes bioquímicos que compõem os “kits comerciais” disponíveis para a identificação destas espécies, além de serem importadas e dispendiosas, possuem prazo de validade curto, basicamente 6 meses. Além disso, podem não ser eficientes para a identificação de todos os gêneros de BGPs aeróbios clinicamente significativos.

O Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) é considerado um centro de referência da região central do estado, onde aportam pessoas de diversas localidades em busca de atendimento e tratamento especializado. O isolamento destas espécies de microrganismos tem ocorrido com certa frequência a partir de materiais biológicos como hemoculturas, cateteres e sondas. Entretanto, a identificação destes BGPs isolados dos espécimes clínicos dos pacientes internados neste hospital atualmente necessita de uma revisão na metodologia envolvida, para que pelo menos aquelas cepas multirresistentes aos antimicrobianos sejam reconhecidas.

A escolha do HUSM para a realização deste trabalho se deve ao contingente de pacientes oncológicos, transplantados, hemodialisados e soropositivos (com a síndrome da imunodeficiência adquirida ou não) atendidos neste nosocômio e, por este não possuir um procedimento padronizado para a identificação destes microrganismos na rotina laboratorial.

O presente tem como objetivos principais:

- Propor uma bateria composta por provas bioquímicas convencionais para identificar os bacilos Gram positivos aeróbios isolados de amostras biológicas através de uma metodologia convencional,
- Comparar os resultados obtidos “*in house*” com os resultantes da utilização de um sistema comercial de identificação.
- Fornecer subsídios para a implantação de uma rotina de testes fenotípicos de baixo custo, que possam ser facilmente absorvidos na rotina laboratorial, sem que haja desperdício de tempo e racionalizando os custos.
- Determinar a sensibilidade aos antimicrobianos utilizando a metodologia da disco-difusão.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os bacilos Gram positivos (BGPs) aeróbios de importância clínica representam um grupo heterogêneo de bactérias que não estão taxonomicamente relacionados (SILVA & NEUFELD, 2006). A virulência destes bacilos é muito variável, abrangendo desde microrganismos altamente patogênicos como o *Bacillus anthracis* a outras espécies dos gêneros *Bacillus*, *Corynebacterium* e *Lactobacillus*, habitualmente considerados contaminantes comuns do laboratório (KONEMAN et al., 2001).

As infecções humanas causadas por eles são em geral pouco vistas (com exceção aos casos de *Listeria*) (SILVA & NEUFELD, 2006), porém muitos deles podem ser patógenos oportunistas, produzindo doenças em indivíduos com a resistência comprometida, relacionada à enfermidade de base, uso de quimioterápicos ou corticóides (FUNKE & BERNARD, 2003).

Os BGPs de acordo com as características morfológicas evidenciadas na coloração de Gram, podem ser agrupados em 4 grupos distintos: bacilos Gram positivos irregulares ou Corineformes (ex: *Corynebacterium diphtheriae*), bacilos Gram positivos regulares não esporulados (ex: *Listeria monocytogenes*), bacilos Gram positivos esporulados (ex: *Bacillus cereus*) e bacilos Gram positivos ramificados ou Actinomicetos (ex: *Rhodococcus*) (ANVISA, 2004). Neste contexto, as características evidenciadas acima, auxiliam na identificação fenotípica ao nível de gênero, uma vez que este grupo de microrganismos é bastante heterogêneo.

Os BGPs têm sido reportados com uma frequência aumentada como patógenos oportunistas no ambiente hospitalar. O aumento do número de infecções nosocomiais causadas por estes organismos nos últimos anos cresceu concomitantemente com a população de imunocomprometidos. Aliado a isto, à resistência bacteriana (adquirida ou intrínseca) detectada em várias cepas vem exigindo a acurada identificação das BGPs ao nível de gênero e espécie bem como a contínua vigilância dos seus padrões de resistência (HUDSPETH et al., 1998; CAMELLO et al., 2003).

Desta maneira torna-se importante o conhecimento taxonômico destas espécies, e o desenvolvimento de esquemas de identificação eficazes, uma vez que estes microrganismos com frequência são considerados contaminantes de amostras clínicas

por serem na maioria dos casos, microrganismos de patogenia discutível (CAMELLO et al., 2003).

Em pacientes imunocomprometidos, estes microrganismos são capazes de desenvolver doenças graves e de avanço rápido. Além disso, o ambiente hospitalar favorece a aquisição de resistência antimicrobiana pelos patógenos, uma vez que se sabe que há a utilização de antimicrobianos de largo espectro como uma medida profilática, complicando o tratamento das infecções causadas por organismos resistentes (EMORY & GAYNES, 1993).

O aumento do número de infecções em pacientes imunodeprimidos tem sido tópico de interesse clínico, pesquisa e discussão nas últimas décadas. O diagnóstico e a intervenção terapêutica através de procedimentos invasivos (que quebram as barreiras orgânicas naturais de proteção) têm sido aprimorados nos últimos anos, porém o aumento do número de pacientes neutropênicos altera a etiologia dos agentes envolvidos nas infecções e favorece o aparecimento de resistência bacteriana. O estado de imunossupressão debilita as defesas do paciente e, pode ser causado por doenças oncológicas em geral, síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), tratamento com quimioterápicos ou corticosteróides, etc. Neste contexto, os indivíduos imunocomprometidos tornam-se uma população heterogênea com padrões variados de infecções (DONOWITZ et al., 2001). Além do quadro de imunossupressão causado pelas doenças de base, estes pacientes são submetidos a tratamentos modernos, que facilitam o desenvolvimento de infecções pela flora comensal, uma vez que alteram as funções orgânicas e quebram as barreiras mecânicas de proteção do hospedeiro (VISCOLI et. al., 2005).

As infecções sangüíneas causadas por cateteres intravasculares, em especial o cateter venoso central (RAAD et al., 2004), são uma importante causa de infecção nosocomial, sendo responsáveis por 20 a 40% dos casos de bacteremias hospitalares (DOOLEY et al., 1996). A negligência à lavagem das mãos durante a rotina hospitalar, permite que os microrganismos sejam veiculados de um paciente para outro. Neste contexto, a desinfecção insuficiente da pele no momento da inserção de um cateter, ou anterior a uma punção venosa, permite que microrganismos colonizantes tenham acesso as superfícies extra e intraluminais dos cateteres, onde se aderem através de

filamentos protéicos (TON-THAT & SCHNEEWIND, 2004), formando um biofilme que permite a sustentação da infecção e a sua disseminação pela via hematogênica (CARRATALÀ et al., 1999; DONOWITZ et al., 2001).

Os laboratórios de microbiologia direcionam seus isolamentos e a sua capacidade de identificação para o reconhecimento de patógenos estabelecidos como, *Listeria*, *Actinomyces*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium jeikeium* entre outras espécies (CAMELLO, et al., 2003).

Desde a introdução e conseqüente aumento de utilização de terapêutica de dispositivos intravenosos, os laboratórios têm se deparado com crescente número de isolamentos de BGPs a partir de hemoculturas e ponta de cateteres (CAMELLO, et al., 2003).

A identificação dos BGPs aeróbios na rotina laboratorial apresenta muitas deficiências devido a enorme diversidade de gêneros microbianos e, ao reduzido número de testes convencionais de fácil utilização para diferenciá-los, tornando-se neste contexto, uma tarefa bastante difícil e laboriosa para os microbiologistas clínicos (FUNKE et al., 1997b; TANG et al., 2000).

Alguns laboratórios ainda consideram estes microrganismos como simples contaminantes, outros apenas relatam a sua presença pela morfologia encontrada na coloração de Gram e, alguns utilizam sistemas comerciais de identificação miniaturizados que na maioria das vezes possuem baixo limite de detecção (CAMELLO et al., 2003).

Microrganismos comumente residentes da epiderme humana, como os *Staphylococcus* coagulase negativos, espécies de *Micrococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, e *Propionibacterium* entre outros, devem ser considerados significantes quando isolados a partir de uma ou mais hemoculturas de pacientes com cateter intravascular ou de múltiplas hemoculturas de pacientes sem cateter (GROSS et al., 1994).

A avaliação clínica de cada hemocultura pode ser difícil, devendo estar associada ao histórico do paciente, e aos possíveis sinais de sepse ou bacteremia que ele venha a apresentar (RICHTER et al., 2002). Isolamentos repetitivos destas cepas em amostras oriundas de sítios normalmente estéreis sugerem um potencial clínico

relevante. Neste contexto, leucometria, porcentagem de neutrófilos imaturos, temperatura corporal, número de hemoculturas positivas e os sítios anatômicos dos quais foram coletadas (se diretamente do cateter ou outro sítio periférico), devem ser analisados em conjunto, para que o quadro de infecção ou contaminação seja reconhecido, e a terapia antimicrobiana seja ou não implantada (GROSS et al., 1994; RICHTER et al., 2002;).

A neutropenia permanece como principal fator de relevância nos casos de confirmação de infecções oportunistas por BGPs relacionadas a cateteres, sugerindo a remoção deste dispositivo em pacientes imunossuprimidos (DONOWITZ et al., 2001).

2.1 Bacilos Gram positivos irregulares ou Corineformes

Durante os últimos anos espécies emergentes de corineformes têm sido descritas (SJÖDEN et al., 1998) e, aquelas espécies pertencentes aos grupos sem nomenclatura definida pelo Central for Disease Control (CDC) têm sido examinados, reclassificados e renomeados, o que explica as diversas mudanças na taxonomia, e o reconhecimento da relevância clínica de alguns microrganismos (FUNKE et al., 1997a; JANDA, 1998a; JANDA, 1998b).

As infecções por estes microrganismos têm crescido, devido ao aumento no número de pacientes imunocomprometidos (HUDSPETH et al., 1998), nos quais o tratamento e o diagnóstico das enfermidades têm se tornado cada vez mais intensivos e invasivos, propiciando condições de desenvolvimento de infecções de caráter oportunista por estes agentes (FUNKE et al., 1997a).

O grupo corineforme engloba o gênero *Corynebacterium* e outros gêneros relacionados como: *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Dermabacter*, *Microbacterium* entre outros (MURRAY et al., 2004; BERNARD, 2005). As bactérias corineformes compreendem os microrganismos de crescimento aeróbio ou anaeróbio facultativo, não formadores de esporos e não álcool-ácido resistentes (FUNKE et al., 1997a; MURRAY et al., 2004).

O gênero *Corynebacterium* (do grego *koryne*, “clava”; *bacterium* “pequeno bastonete”), se deve ao fato de o microrganismo apresentar-se como um pequeno bastão em forma de clava, catalase positiva e imóveis, esculina e gelatina negativas (FUNKE et al., 1997a; JANDA 1998a; FUNKE & BERNARD, 2003). A coloração dessas bactérias pelo método de Gram revela cadeias curtas (configurações em V ou Y) ou agrupamentos que se assemelham as “letras” chinesas sendo por isso considerados bacilos Gram positivos pleomórficos (MURRAY et al., 2004).

A espécie mais conhecida é o *Corynebacterium diphtheriae*, agente etiológico da difteria (MURRAY et al., 2004). A introdução de um programa de vacinação efetivo em diversos países diminuiu a transmissão da difteria, fazendo com que as espécies de corinebactérias não diftéricas assumissem um papel significativo na medicina clínica. (MARTÍNEZ-MARTINÉZ et al., 1995; GRANOK et al., 2002).

Embora por muitos anos estas espécies tenham sido consideradas contaminantes de amostras clínicas, por serem comensais da pele, mucosas, vias aéreas superiores, do trato gastrintestinal e do trato genital feminino (MURRAY et al., 2004; LAGROU et al., 1998), atualmente têm sido reconhecidos como agentes oportunistas causadores de infecções nosocomiais (LAGROU et al., 1998), especialmente nos casos de bacteremias e infecções relacionadas a cateteres intravasculares e sondas (WEISS et al., 1996; HUDSPETH et al., 1998). O aumento da população de imunocomprometidos e o uso de dispositivos intravenosos têm contribuído para este fenômeno (GRANOK et al., 2002), juntamente com as técnicas diagnósticas e terapêuticas de cateter invasivo, que facilitam a colonização-infecção por estes microrganismos (WEISS et al., 1996; JANDA 1998b).

Atualmente existem relatos de espécies de *Corynebacterium* ocasionando bacteremias significativas e infecções urinárias oportunistas em mulheres grávidas. Os patógenos foram isolados de amostras clínicas durante o mesmo período em que as gestantes tiveram complicações, como aborto espontâneo, diminuição do líquido amniótico e parto prematuro (SHUKLA et al., 2003).

Algumas espécies de *Corynebacterium* como *C. jeikeium* e *C. urealyticum* têm sido claramente reconhecidas como patógenos humanos (CARTWRIGHT et al., 1993; OTEO et al., 2001), exibindo resistência a diversos antibióticos (LAGROU et al., 1998).

Enquanto que outras espécies como *C. xerosis*, *C. striatum*, *C. minutissimum*, e outros têm repercussão clínicas controversa e, ocasionalmente envolvidas em infecções humanas (LAGROU et al., 1998; OTEO et al., 2001). Outras espécies, como *C. amycolatum*, *C. afermentans*, *C. glucuronolyticum*, têm sido isoladas de amostras humanas em processos infecciosos diversos (LAGROU et al., 1998).

C. urealyticum é uma das espécies de corinebactérias mais isolada em amostras clínicas urinárias (NIETO et al., 2000; FUNKE & BERNARD, 2003). É encontrado na pele de pacientes hospitalizados, podendo também ser isolado a partir do ambiente hospitalar, o que sugere a sua transmissão nosocomial (NIETO et al., 2000). É um corineforme lipofílico¹ de crescimento lento nos meios de cultura tradicionais, produz colônias pequenas (< 1 mm de diâmetro) e não hemolíticas, é assacarolítico e degrada rapidamente a uréia (JANDA, 1998a). Apresentam múltipla resistência aos antibióticos β -lactâmicos, aminoglicosídeos e macrolídeos. As quinolonas possuem atividade irregular e, os isolados resistentes a estes antibióticos são selecionados durante a terapia ineficaz com estes antimicrobianos (GARCIA-BRAVO et al., 1996; FUNKE et al., 1997a; JANDA 1998a). Raras cepas são sensíveis às penicilinas (FUNKE et al., 1997a). Tem sido associado às infecções do trato urinário (ITU), como a cistite de incrustação alcalina e outras ITUs de difícil tratamento (KONEMAN et al., 2001; BERNARD, 2005). A bacteriúria ocorre predominantemente em pacientes hospitalizados por um longo período, que estão severamente comprometidos e urologicamente manipulados e sondados (FUNKE et al., 1997a). Outras condições clínicas incluem: bacteremia, endocardite, pneumonia, peritonite e osteomielite em pacientes com câncer, HIV positivo e outros tipos de imunossupressão (JANDA 1998a; KONEMAN et al., 2001; BERNARD, 2005).

Outra espécie de importância em infecções hospitalares e, freqüentemente isolada em amostras clínicas é *C. jeikeium* (MURRAY et al., 2004). Também é uma espécie lipofílica associada com a colonização da pele e infecção em pacientes imunodeprimidos, principalmente associado a distúrbios hematológicos, doenças

¹ Lipofílico: termo utilizado para designar espécies de *Corynebacterium* que tem crescimento aumentado em meio de cultura suplementado com o substrato lipídico Tween 80, soro de coelho, cavalo ou fetal bovino.

malignas, neutropenia e uso de cateteres intravasculares para a administração de medicamentos (JANDA, 1998a). As infecções mais citadas são: endocardites, septicemias, meningites, pneumonia, peritonite, infecções de pele e tecido subcutâneo (JANDA, 1998a; MOOKADAM et al., 2006). O estado portador deste microrganismo é raro em pessoas saudáveis; todavia até 40% dos pacientes hospitalizados podem ter a pele colonizada, independentemente de seu estado imunológico (MURRAY et al., 2004). Fatores como a hospitalização prolongada, granulocitopenia, terapia antimicrobiana de amplo espectro anterior ou atual e quimioterapia favorecem esta colonização e predisõem à infecção (MURRAY et al., 2004). Este microrganismo apresenta múltipla resistência aos antibióticos, como às penicilinas, aminoglicosídeos e cefalosporinas, com sensibilidade variável à eritromicina, tetraciclina, rifampicina, e quinolonas, porém são sensíveis à vancomicina (FUNKE et al., 1997a; MOOKADAM et al., 2006).

O *Corynebacterium amycolatum* é outra espécie reportada pela literatura como agente de infecções oportunistas em pacientes com neoplasias hematológicas e/ou submetidos à diálise peritoneal. É constituinte normal da flora da pele e, também o corineforme não lipofílico mais frequentemente encontrado em espécimes clínicos (FUNKE et al., 1997a). Caracteriza-se por apresentar colônias secas, pálidas com bordas irregulares (1 a 2 mm de diâmetro após 24h de incubação) e capacidade de fermentar a glicose. Com frequência são erroneamente identificados como *C. xerosis*, *C. minutissimum* ou ainda *C. striatum*, devido às características fenotípicas destas espécies serem muito semelhantes e a sua diferenciação em laboratório complexa (FUNKE et al., 1997a; OTEO et al., 2001; FUNKE & BERNARD, 2003). Em geral estas cepas são resistentes aos β -lactâmicos, macrolídeos, clindamicina, aminoglicosídeos, quinolonas e rifampicina; possuindo sensibilidade frente à tetraciclinas e glicopeptídeos (FUNKE et al., 1997a). As infecções descritas citam quadros de bacteremia, sepse, infecção em cateteres, feridas cirúrgicas e sepse fatal em crianças prematuras (FUNKE et al., 1997a; JANDA, 1998a; BERNARD 2005).

C. minutissimum é uma espécie não lipofílica, que coloniza a pele de pessoas saudáveis, e é o agente etiológico do eritrasma, infecção superficial da pele (JANDA 1998a; MURRAY et al., 2004). Raramente está associado à doença extracutânea.

(MURRAY et al., 2004, GRANOK et al., 2002). Alguns autores reportam casos de formação de abscessos, infecções relacionadas a cateteres, oftalmite e bacteremias em pacientes com doença hematológica maligna, como leucemia e mieloma múltiplo (GRANOK et al., 2002). As cepas em geral são suscetíveis a um amplo número de antibióticos (JANDA, 1998a).

O gênero *Brevibacterium* assim como o gênero *Arthrobacter*, anteriormente denominados como Grupos CDC B-1 e B-3 (JANDA, 1998b), há pouco tiveram relevância clínica reconhecida (FUNKE & CARLOTTI, 1994; GRUNER et al., 1994). O habitat primário destes microrganismos são primariamente os produtos derivados do leite (FUNKE & BERNARD, 2003), onde contribuem para o aroma e odor destes derivados principalmente dos queijos. Também são encontrados colonizando a pele humana, podendo contribuir para o odor do corpo em superfícies úmidas (JANDA, 1998b).

Estas espécies têm sido isoladas de amostras clínicas, particularmente da pele e estruturas adjacentes (FUNKE et al., 1997a; WAUTERS et al., 2004). Apresentam-se de forma cíclica, onde colônias novas produzem bacilos corineformes com arranjos em forma de V, enquanto que nas colônias velhas as formas cocóides descoradas são predominantes (FUNKE et al., 1997a; JANDA 1998b). São obrigatoriamente aeróbios de metabolismo oxidativo, não fermentam os açúcares, não possuem urease e são halotolerantes ($\geq 6,5\%$ de NaCl) (JANDA 1998b). Produzem colônias opacas e convexas, amareladas ou cinzentas, não hemolíticas e com odor de queijo característico (FUNKE et al., 1997a; JANDA 1998b).

O *B. casei* é reportado como o mais freqüente isolado humano, mas outras espécies como *B. epidermidis*, entre outras também são encontradas (WAUTERS et al., 2004). Estas espécies têm sido isoladas a partir de amostras normalmente estéreis como sangue e líquido em pacientes com SIDA ou outras doenças de base (GRUNER et al., 1994). As infecções atribuídas a este gênero são as septicemias, osteomielite, endocardites, peritonites, infecções de feridas operatórias e bacteremias associadas a cateteres (FUNKE et al., 1997a; MURRAY et al., 2004; BERNARD, 2005). O tratamento destas infecções é complicado, principalmente nos casos de bacteremias persistentes, uma vez que estas cepas apresentam resistência aos β -lactâmicos, eritromicina,

clindamicina e quinolonas. A utilização de vancomicina, tetraciclina e gentamicina têm se mostrado eficaz contra os isolados (GRUNER et al., 1994; MURRAY et al., 2004;).

O gênero *Cellulomonas* possui nove espécies descritas, na qual o *C. hominis* (anteriormente Grupo A-3 do CDC) (BERNARD, 2005) tem sido reportada como a principal isolada em material humano, principalmente líquido e sangue. As demais espécies (antigamente pertencentes aos Grupos A-4 e A-5 do CDC) provêm de amostras de sangue (JANDA, 1998b). O habitat natural destas cepas é o solo (FUNKE et al., 1997a) e a sua significância clínica ainda é desconhecida (JANDA, 1998b). Na coloração de Gram apresentam-se como pequenos e finos bacilos que, na maioria são catalase positiva com motilidade variável e metabolismo fermentador e oxidativo (FUNKE et al., 1995b; JANDA, 1998b; MURRAY et al., 2003). As colônias geralmente são opacas, convexas e com pigmento amarelo (JANDA, 1998b). Todas as cepas testadas foram sensíveis à rifampicina, tetraciclina e vancomicina (FUNKE et al., 1997a).

As espécies de *Microbacterium* apresentam-se como finos ou curtos bacilos de forma irregular, catalase e motilidade variáveis, podendo ser tanto fermentador quanto oxidativo (JANDA, 1998b; FUNKE & BERNARD, 2003). A maioria das colônias é pigmentada de amarelo ou laranja (FUNKE et al., 1997a). Mais de 40 espécies já foram descritas, mas apenas uma minoria tem importância clínica (FUNKE & BERNARD, 2003). Assim como as espécies de *Cellulomonas*, o gênero *Microbacterium* é freqüentemente encontrado no meio ambiente e algumas cepas são pertencentes aos grupos CDC A-4 e A-5 (JANDA, 1998b). Estes agentes têm sido isolados de pacientes hospitalizados, pacientes imunodeprimidos com algum tipo de doença oncológica, principalmente hematológica (LAU et al., 2002). Os isolados têm sido obtidos partir de hemoculturas, culturas de cateter venoso central, secreções oculares em endoftalmites, líquido, líquido peritoneal, entre outros (FUNKE et al., 1995a; LAU et al., 2002). As infecções por *Microbacterium* estão associadas com uma taxa significativa de mortalidade e morbidade (LAU et al., 2002). Têm demonstrado susceptibilidade *in vitro* à maioria dos agentes antimicrobianos, exceto à penicilina G. Resistência *in vitro* foi demonstrada para os aminoglicosídeos (FUNKE et al., 1995a). Em um caso de bacteremia relacionada a cateter, em paciente infantil com leucemia mielomonocítica,

encontrou-se uma cepa pertencente ao grupo A-5 do CDC que demonstrou resistência *in vitro* à vancomicina (CAMPBELL et al., 1994; JANDA 1998b; LAU et al., 2002).

Cepas resistentes intrinsecamente à vancomicina foram encontradas para a espécie de *Microbacterium resistans* (FUNKE et al., 1998a; JORGENSEN, 2004).

2.2 Bacilos Gram positivos regulares não esporulados

O grupo dos bacilos Gram positivos regulares não formadores de esporos se refere aos gêneros *Listeria*, *Erysipelothrix*, *Lactobacillus* e *Kurthia*, que se caracterizam por apresentar uma morfologia uniforme na coloração de Gram (MURRAY et al., 2004).

O gênero *Listeria* é formado por seis espécies, das quais apenas *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* (anteriormente como *L. monocytogenes* sorotipo 5) são consideradas patogênicas (VÁSQUEZ-BOLAND et al., 2001).

L. monocytogenes é um patógeno humano que reconhecidamente constitui um problema de saúde pública por causar infecção a partir de alimentos e também por oferecer riscos aos profissionais de laboratório que manipulam este microrganismo, enquanto que a *L. ivanovii* é primariamente um patógeno de animais, (BILLE et al., 2003) e os casos de infecções em humanos são raros. (CUMMINS et al., 1994; VÁSQUEZ-BOLAND et al., 2001).

As espécies de *Listeria* são isoladas de diversas amostras do ambiente: solo, água, esgoto, pó ambiental, e uma grande variedade de alimentos crus de origem animal, aves frescas e congeladas, carne vermelha e derivados, pescados, produtos lácteos crus e, também das fezes de pessoas saudáveis e sintomáticas, como nas de animais (KONEMAN et al., 2001; VÁSQUEZ-BOLAND et al., 2001). Esta bactéria possui mecanismos de sobrevivência aos processos industriais, sendo tolerante a altas concentrações de sal e pHs relativamente baixos, e o principal, é capaz de se multiplicar em alimentos refrigerados (VÁSQUEZ-BOLAND et al., 2001; SILVA & NEUFELD, 2006).

Apesar da sua ampla distribuição no meio ambiente, o risco dos seres humanos de desenvolver infecções por *L. monocytogenes* é pequeno. Entretanto, as infecções

decorrentes podem ser graves (KONEMAN et al., 2001; VÁSQUEZ-BOLAND et al., 2001), limitando-se às populações definidas: pacientes com idade avançada (55 a 60 anos), mulheres grávidas, recém-nascidos, indivíduos transplantados, HIV positivos (BILLE et al., 2003) pacientes com doenças malignas sólidas e hematológicas, e também aqueles com distúrbios cardíacos, diabéticos e doenças hepáticas (DREVETS et al., 2004), onde é capaz de causar meningite, encefalite ou septicemia (BILLE et al., 2003).

A *L. monocytogenes* é um bacilo Gram positivo, não formador de esporos, anaeróbio facultativo, catalase positivo, que produz fraca β -hemólise em ágar sangue de carneiro (DREVETS et al., 2004). Produz ácido de glicose e prova de esculina ligeiramente positiva, não hidrolisa a uréia nem a gelatina, e não possui cápsula. Estes organismos são móveis de 10° a 25°C exibindo motilidade característica (em forma de guarda-chuva), as colônias são pequenas e translúcidas, variando de 1 a 2 mm quando incubadas a 37°C (VÁSQUEZ-BOLAND et al., 2001; BILLE et al., 2003), sendo também capazes de crescer a 4°C.

O tropismo de *L. monocytogenes* pelo SNC causa doença severa, como a meningite, principalmente em adultos (BILLE et al., 2003; DREVETS et al., 2004), com alto grau de mortalidade (20 a 50%) e, seqüelas neurológicas entre os sobreviventes (BILLE et al., 2003, GASANOV et al., 2005). A bacteremia e a septicemia (15 a 50% dos casos) também apresentam alta taxa de mortalidade (acima de 70%), e estão associadas a doenças de base severamente debilitantes. As outras formas atípicas de infecção (5 a 10%) incluem: endocardites, miocardite, pneumonia, hepatite, peritonite e abscessos localizados (VÁSQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Em mulheres grávidas, com freqüência causa bacteremia com sintomas de uma gripe leve, que se não tratada, pode causar infecção fetal, devido à sua capacidade de atravessar a barreira placentária, resultando em aborto ou parto prematuro (KONEMAN et al., 2001; BILLE et al., 2003).

A patogênese da infecção humana não está bem esclarecida (BILLE et al., 2003), Como a comida contaminada é a maior causa de infecção tanto nos casos epidêmicos quanto esporádicos (FARBER & PETERKIN 1991; VÁSQUEZ-BOLAND et al., 2001; FARBER & DREVETS et al., 2004), acredita-se que o trato gastrointestinal seja

o primeiro sítio de entrada do organismo patogênico no hospedeiro (VÁSQUEZ-BOLAND et al., 2001). Entretanto, depois da ingestão do alimento contaminado, o desenvolvimento da infecção invasiva depende de alguns fatores como: suscetibilidade do hospedeiro, acidez gástrica, tamanho do inóculo ingerido e fatores de virulência do microrganismo (BILLE et al., 2003). Depois de penetrar no epitélio do trato gastrointestinal, *L. monocytogenes*, por ser um patógeno intracelular facultativo (MURRAY et al., 2004), pode se desenvolver dentro dos macrófagos hepáticos ou esplênicos devido aos fatores de virulência, e se disseminar no sistema nervoso central ou no útero de gestantes (BILLE et al., 2003).

O gênero é naturalmente resistente às cefalosporinas. A penicilina ou ampicilina isoladas ou em associação com um aminoglicosídeo (gentamicina) constitui o tratamento de escolha para as infecções causadas por *L. monocytogenes* (MURRAY et al., 2004, KONEMAN et al., 2001). A vancomicina é uma alternativa para o tratamento de pacientes com septicemia ou endocardite em alérgicos à penicilina. Para os casos de pacientes com meningite, não é eficaz, pois a vancomicina não atravessa a barreira hematoencefálica, quando administrada por via endovenosa. O imipenem tem sido outra alternativa possível para estes casos (KONEMAN et al., 2001).

2.3 Bacilos Gram positivos esporulados

O grupo dos bacilos Gram positivos esporulados compreende o gênero *Bacillus* (LOGAN & TURNBULL, 2003). Estas espécies são ubíquas na natureza, habitando principalmente todos os tipos de solos, águas, pó ambiental, matéria orgânica vegetal e animal (LOGAN & TURNBULL, 2003; ANVISA, 2004). Embora de ampla distribuição no meio ambiente, algumas espécies são patógenos de diversos animais mamíferos, incluindo humanos, e também insetos (LOGAN & TURNBULL, 2003). Estas espécies têm a capacidade de formar esporos, que sobrevivem nos solos por um longo período. Os esporos são resistentes ao calor, radiações, desinfetantes, e aos processos de dessecação, o que permite a sua ampla distribuição e sobrevivência no meio ambiente, inclusive no ambiente hospitalar (LOGAN & TURNBULL, 2003).

Diversas espécies são usadas em processos farmacêuticos, agrícolas e industriais, inclusive nos processos de fabricação de antibióticos e inseticidas (DIB et al., 2003).

As espécies de *Bacillus* com frequência são isoladas de hemoculturas e usualmente consideradas como contaminantes ou integrantes naturais da microbiota da pele (BEBEE & KONEMAN, 1995; KONEMAN 2001; DIB et al., 2003).

Em pacientes imunocomprometidos, uma hemocultura positiva com o desenvolvimento de *Bacillus* spp. deve ser cuidadosamente avaliada (DIB et al., 2003). Embora possuam baixa virulência, estas espécies são patógenos oportunistas (MURRAY et al., 2004), podendo causar uma variedade de doenças invasivas de avanço rápido (KONEMAN et al., 2001) como bacteremia, meningite, pneumonia, oftalmite, endocardite, infecções em tecidos moles e sepse relacionada ao uso cateteres intravasculares (DIB et al., 2003). Infecções disseminadas causadas por espécies de *Bacillus* apresentam alto índice de mortalidade (BEBEE & KONEMAN, 1995).

Estes microrganismos são aeróbios ou anaeróbios facultativos, formadores de endosporos e, em sua maioria catalase e motilidade positivas. Os isolados de espécimes clínicos são Gram positivos em culturas novas, mas algumas vezes poder apresentar-se como Gram variáveis ou ainda Gram negativos o que dificulta a sua caracterização (LOGAN & TURNBULL, 2003; MURRAY et al., 2004).

O gênero *Bacillus* é composto por mais de 50 espécies (MURRAY et al., 2004), e estão distribuídas em três grandes grupos, dependendo da morfologia do esporo e do esporângio (KONEMAN et al., 2001). O grupo de maior interesse clínico é grupo do *Bacillus cereus*, que abrange espécies que exibem propriedades patogênicas bastante divergentes (PRIEST et al., 2004), como o *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. cereus* var. *mycoides*, *B. megaterium*, entre outras (JENSEN 2003; KONEMAN et al., 2001). O *B. anthracis* e o *B. cereus* são os principais representantes e devem ser reconhecidos e identificados pelo laboratório clínico (ANVISA, 2004).

O *B. anthracis* é o mais importante deste grupo, sendo o causador do antrax cutâneo, pulmonar e intestinal (DIB et al., 2003). O anthrax é uma zoonose (HAN et al., 2006), basicamente de herbívoros (MURRAY et al., 2004), que pode ser letal para os

humanos (HAN et al., 2006). É considerado um dos agentes mais temidos da guerra biológica, pois a inalação dos seus esporos geralmente é fatal, devido à produção da toxina de edema e da toxina letal (MURRAY et al., 2004).

O *Bacillus cereus* (do grego *cereus*: “cor de cera”) um organismo ubíquo no solo (HAN et al., 2006), é o patógeno mais importante após o *B. anthracis* (LOGAN & TURNBULL, 2003).

As colônias do *B. cereus* são largas (2 a 7 mm de diâmetro), podendo ter contorno circular ou irregular, com aparência granulosa e coloração esverdeada clara. Crescem a 37°C, mas também em temperaturas mínimas de 15 a 20°C e 40 a 45°C. São hemolíticas em ágar sangue e móveis, as cepas de *B. cereus* var. *mycoides* são imóveis (DROBNIIEWSKI, 1993; KONEMAN et al., 2001; LOGAN & TURNBULL, 2003; ANVISA, 2004;).

O *B. cereus* ocasionalmente causa intoxicações alimentares a partir de alimentos contaminados e infecções oportunistas (LOGAN & TURNBULL, 2003; PRIEST et al., 2004; HAN et al., 2006). É o microrganismo mais isolado, após o *Staphylococcus epidermidis*, nos casos de endoftalmite pós traumáticas (LOGAN & TURNBULL, 2003). As doenças comumente observadas são: gastroenterites, infecções em tecidos moles, principalmente as oculares (PRIEST et al., 2004), endocardite, peritonite, pneumonia e sepse relacionadas ao uso de cateteres endovenosos. Meningite é observada em pacientes intensamente imunossuprimidos (MURRAY et al., 2004) e também em crianças e neonatos (DROBNIIEWSKI, 1993). Embora existam poucos relatos de endocardite causada por *B. cereus*, esta infecção possui um potencial clínico relevante, por estar particularmente associada com a administração de intravenosa de medicamentos e distúrbios cardíacos valvulares (DROBNIIEWSKI, 1993).

Em 2004 foi relatado o primeiro caso de endocardite causada por *B. cereus* no HUSM, em uma paciente de 25 anos do sexo feminino, a identificação foi confirmada pelo Laboratório de referência da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ) (HÖRNER et al., 2004).

A gastroenterite causada por *Bacillus cereus* é mediada por uma de duas enterotoxinas. A enterotoxina termoestável provoca a forma emética da doença, enquanto a enterotoxina termolábil causa a forma diarréica (KONEMAN et al., 2001).

A forma diarréica da intoxicação alimentar mediada por toxinas (DROBNIIEWSKI, 1993) do *B. cereus* resulta do consumo de carne, arroz, legumes, verduras, molhos e sobremesas contaminados com a bactéria (MURRAY et al., 2004).

As duas síndromes se devem ao fato dos esporos do *B. cereus* resistirem ao processo normal de cozimento dos alimentos, e, sob condições não refrigeradas de armazenamento, os esporos germinam e as células vegetativas se multiplicam, produzindo toxinas (KONEMAN et al., 2001; LOGAN & TURNBULL, 2003).

As outras infecções ocorrem, em pessoas com doenças neoplásicas, imunossupressão, alcoólatras, usuários de drogas injetáveis, pacientes submetidos à hemodiálise ou infusão endovenosa contínua (KONEMAN et al., 2001; LOGAN & TURNBULL, 2003). Em recém-nascidos, o isolamento de *B. cereus*, pode ocorrer principalmente a partir de cordão umbilical e trato respiratório, neste caso, associadas com a contaminação dos sistemas de ventilação (LOGAN & TURNBULL, 2003).

O *Bacillus thuringiensis* é patógeno primário de insetos. Esta bactéria produz uma toxina que é utilizada em biopesticidas (PRIEST et al., 2004; HAN et al., 2006). Ocasionalmente, o *B. thuringiensis* pode causar infecção em humanos, semelhantes às aquelas causadas pelo *B. cereus* (PRIEST et al., 2004), como os casos de gastroenterites e infecções oftálmicas (LOGAN & TURNBULL, 2003). Existem relatos também, de infecções em feridas e queimaduras (DROBNIIEWSKI, 1993; DAMGAARD et al., 1997).

As outras espécies não pertencentes ao grupo do *B. cereus*, aparecem como agentes de infecções diversas, principalmente em pseudoepidemias relacionadas à contaminação de sistemas de hemoculturas (LOGAN & TURNBULL, 2003).

B. licheniformis está associado a casos de ventriculites em humanos (LOGAN & TURNBULL, 2003), sendo relatados também, abscesso cerebral, bacteremia e septicemia, pelo uso de catéter venoso central e em gestantes com eclâmpsia, peritonites em pacientes de diálise ambulatorial e ulceração córnea após trauma perfurante. (LOGAN & TURNBULL, 2003; ANVISA, 2004). Pode causar também doença diarréica a partir de alimentos crus estando associada à mortalidade infantil (LOGAN & TURNBULL, 2003).

O *B. subtilis* é citado como agente etiológico de pneumonia fatal, bacteremia e septicemia em pacientes com doenças neoplásicas, doenças renais e hepáticas (LOGAN & TURNBULL, 2003). Casos de endocardites e intoxicações alimentares também foram relatados (DROBNIEWSKI, 1993). As proteases, enzimas produzidas pela *B. subtilis* têm sido utilizadas na indústria para a produção de novos detergentes biodegradáveis, destinados aos programas de reuso de materiais hospitalares, promovendo a higienização e remoção de resíduos orgânicos coagulados em instrumentos cirúrgicos e sondas (ERENO, 2005).

B. licheniformis e *B. subtilis* apresentam colônias semelhantes, em geral de forma irregular e tamanho médio (2 a 4 mm de diâmetro), variando de colônias úmidas e brilhosas ou mucosas, com margens de aspecto ondulado a fimbriados. As colônias do *B. licheniformis* são semelhantes aos líquens e tendem a serem aderentes ao meio (LOGAN & TURNBULL, 2003).

B. stearothermophilus é uma espécie termófila. Seus esporos são altamente resistentes ao calor, o que neste contexto os torna bons indicadores biológicos nos processos de esterilização por calor úmido, em particular à temperatura de referência de 121°C das autoclaves (PENNA & MACHOSHVILI, 1997).

De modo geral as espécies de *Bacillus* são resistentes às penicilinas, inclusive as cefalosporinas de terceira geração (MURRAY et al., 2004). A produção de uma potente β -lactamase foi detectada em algumas espécies, em particular no *B. cereus* e *B. thuringiensis*. As β -lactamases são enzimas que hidrolisam o anel β -lactâmico das penicilinas e cefalosporinas, tornando-as inativas. Estas enzimas produzidas pelo gênero *Bacillus* não são inibidas pelos tradicionais inibidores de β -lactamases (ANDREWS & WISE, 2002; JORGENSEN, 2004). *B. cereus* também apresenta resistência ao trimetoprima, sensibilidade aos aminoglicosídeos, clindamicina, cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina e vancomicina, sendo esta última a droga de escolha para as infecções graves (KONEMAN et al., 2001; TURNBULL et al., 2004). A quinolona ciprofloxacina tem sido utilizada para o tratamento de *B. cereus* em feridas operatórias e infecções oftálmicas (TURNBULL et al., 2004; JORGENSEN 2004).

2.4 Bacilos Gram positivos ramificados, actinomicetos aeróbios ou nocardioformes

Grupo de bactérias Gram positivas aeróbias, que usualmente produzem filamentos ou hifas aéreas semelhantes as dos fungos, que sofrem fragmentação, originando formas bacilares e cadeias cocóides curtas (KONEMAN et al., 2001; ANVISA). Ao contrário dos fungos verdadeiros que possuem células eucarióticas, os procariontes nocardioformes e actinomicetos aeróbios não apresentam membrana nuclear na estrutura celular (KONEMAN et al. 2001).

Os actinomicetos aeróbios são normalmente denominados de nocardioformes por simples conveniência, gerando uma nomenclatura tão imprecisa e confusa quanto o uso dos termos corineforme ou diferóide (KONEMAN et al. 2001). As espécies de *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Oerskovia* e *Streptomyces* são os principais representantes (ANVISA, 2004).

As espécies de *Nocardia* encontram-se distribuídas nos solos e vegetais. São reconhecidas 10 espécies, onde a *N. asteroides* e *N. brasiliensis* são as mais importantes clinicamente (ANVISA, 2004). São bacilos Gram positivos ramificados e filamentosos, embora muitos se corem fracamente e pareçam ser Gram negativos (MURRAY et al., 2000). São aeróbios estritos, catalase positiva, e à medida que a cultura envelhece se fragmentam em bacilos e cocos irregulares (ANVISA, 2004). Os microrganismos deste gênero utilizam carboidratos de maneira oxidativa, e possuem uma estrutura da parede celular semelhante às micobactérias, com a presença de ácidos micólicos, o que lhes proporciona a álcool-ácido resistência parcial frente às colorações de Ziehl Neelsen ou Kinyoun (KONEMAN et al., 2001). As doenças associadas a estes microrganismos incluem doença pulmonar, infecções sistêmicas, micetoma e outras infecções cutâneas de caráter oportunista (MURRAY et al., 2004). Em geral as infecções ocorrem por inalação de partículas de pó infectadas, transportadas pelo ar ou pela introdução traumática da bactéria no tecido subcutâneo (micetoma actinomicótico) (KONEMAN et al., 2001), tendo como principal grupo de risco aqueles pacientes imunocompetentes com doença pulmonar crônica, pessoas

com lesões cutâneas e imunocomprometidos com deficiências das células T (MURRAY et al., 2004).

O gênero *Rhodococcus* (“coco pigmentado de vermelho”), é formado por 12 espécies de bacilos Gram positivos aeróbios obrigatórios (BROWN & McNEIL, 2003). A parede celular desses cocobacilos catalase positivos assemelha-se a das espécies de *Nocardia* e *Mycobacterium*: tem ácido micólico e ácido tuberculoesteárico, tornando os microrganismos parcialmente ácido-resistentes frente aos métodos de coloração de Ziehl-Neelsen ou Kinyoun modificado (McNEIL & BROWN, 1994; MURRAY et al., 2004).

Os membros deste gênero encontram-se amplamente distribuídos no ambiente, principalmente no solo. Variam quanto à morfologia, características bioquímicas, padrões de crescimento, e capacidade de causar doenças. As infecções por *Rhodococcus* sp. são raras, sendo o *Rhodococcus equi* a espécie clínica mais importante deste gênero (PRESCOTT, 1991; McNEIL & BROWN, 1994; BROWN & McNEIL, 2003).

R. equi (anteriormente *Corynebacterium equi*) é um patógeno veterinário bem conhecido, particularmente de herbívoros, que raramente está associado à doença humana (BROWN & McNEIL, 2003).

As infecções por *R. equi* possuem caráter oportunista, e cresceram notavelmente com a era da infecção por HIV, do tratamento para o câncer e com o transplante de órgãos (WEINSTOCK & BROWN, 2002). A aquisição do microrganismo se deve pela inalação a partir do solo, inoculação ou passagem através do trato alimentar. A exposição a animais como cavalos e porcos, tem papel importante na aquisição de algumas das infecções (PRESCOTT, 1991). Outras rotas de aquisição incluem a colonização humana e a transmissão de pessoa para pessoa (WEINSTOCK & BROWN, 2002).

A morfologia microscópica do *R. equi* é cíclica, e varia de formas bacilares a cocóides, dependendo do tempo de incubação e das condições de crescimento (McNEIL & BROWN, 1994). Filamentos Gram positivos rudimentares têm sido observados a partir de culturas novas em meios líquidos (McNEIL & BROWN, 1994). As colônias clássicas do *R. equi* são de aspecto rosa claro e translúcida em 2 a 4 dias de

incubação, podendo também apresentar pigmento coral opaco ou ainda amarelo pálido (McNEIL & BROWN, 1994; BROWN & McNEIL, 2003).

Amostras de *Rhodococcus* com propriedades bioquímicas idênticas às do *R. equi* podem ser encontrados entre as espécies que compõem a microbiota nasal normal de adultos sadios (RASMUSSEN et al., 2000).

As manifestações da infecção por *R. equi* são multiformes e variam desde infecções pulmonares, bacteremias, infecções de pele, endoftalmites, peritonites, sepsse associada a cateter, osteomielite, abscessos cerebrais e prostáticos, entre outras (WEINSTOCK & BROWN, 2002; SILVA & NEUFELD 2006). Porém a infecção pulmonar está presente em aproximadamente 80% dos casos. Bacteremia ocorre em um percentual superior a 80% nos pacientes imunocomprometidos e em 30% dos imunocompetentes (WEINSTOCK & BROWN, 2002). As infecções pulmonares assemelham-se a tuberculose, com progresso lento, produção de lesões cavitárias (KONEMAN et al., 2001) e de infiltrado nodular (WEINSTOCK & BROWN, 2002). Infecções por *R. equi* devem ser consideradas juntamente com as infecções por *Mycobacterium tuberculosis* e *Nocardia* sp. no diagnóstico diferencial das lesões cavitárias e na pneumonia nodular (WEINSTOCK & BROWN, 2002).

O tratamento das infecções pulmonares, ósseas, articulares ou no SNC em pacientes imunodeprimidos requer no mínimo 6 meses de terapia antimicrobiana. Em casos de lesões cavitárias extensas ou abscessos, a intervenção cirúrgica também é utilizada concomitantemente com o tratamento antibiótico (WEINSTOCK & BROWN, 2002).

Outras espécies de *Rhodococcus* também podem ser agentes etiológicos de infecções oportunistas em humanos, principalmente nos pacientes HIV positivos (KONEMAN et al., 2001). O *R. aurantiacus* foi isolado de escarro de pacientes com doença pulmonar crônica e do líquido de um paciente com leucemia, enquanto que o *R. sputi*, um patógeno de suínos, também foi isolado de escarro de pacientes humanos, entretanto não foi associado à doença infecciosa (KONEMAN et al., 2001).

As outras espécies de *Rhodococcus* também apresentam morfologia microscópica cíclica variando de coco a bacilos, podendo ainda apresentar estruturas mais complexas de hifa-bacilo-coco (BROWN & McNEIL, 2003). Todas as espécies são

parcialmente álcool-ácido resistentes e produzem colônias de morfologia variável, que podem ser irregulares, lisas ou mucosas, pigmentadas de amarelo, coral, laranja ou rosada após alguns dias de incubação (BROWN & McNEIL, 2003).

R. equi geralmente *in vitro* é suscetível a eritromicina, rifampicina, fluorquinolonas, aminoglicosídeos, glicopeptídeos e carbapenêmicos. A sensibilidade é variável frente ao sulfametoxazol/trimetropim, tetraciclina, cloranfenicol, clindamicina e cefalosporinas. A maioria dos isolados é resistente às penicilinas, e o seu uso não é recomendado para as cepas sensíveis, devido à rápida aquisição de resistência (VERVILLE et al., 1994; RASMUSSEN et al., 2000; WEINSTOCK & BROWN, 2002). Um estudo sobre emergência de resistência aos antibióticos, relata a possibilidade de cepas de *R. equi* resistentes à vancomicina (HSUEH et al., 1998).

2.5 Identificação bioquímica convencional e comercial dos bacilos Gram positivos

A identificação convencional dos BGPs utiliza diversos testes disponíveis no laboratório de microbiologia. A morfologia das células na coloração de Gram pode indicar ou excluir um determinado gênero. Também devem ser observadas características como morfologia, tamanho, pigmento, odor e hemólise das colônias (FUNKE & BERNARD, 2003).

Um dos esquemas de identificação para microrganismos corineformes que utiliza o perfil bioquímico, foi criado e publicado em uma edição especial do CDC (FUNKE & BERNARD, 2003). O sistema inclui reações como prova da catalase, teste de fermentação/oxidação, motilidade, redução do nitrato, hidrólise da uréia e da esculina, produção de ácido a partir de glicose, maltose, manitol, sacarose e xilose, reação de Christie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP), tolerância ao sal (BERNARD et al., 2002) e um teste para a lipofilia, que deve ser realizado para aquelas cepas catalase positivas com diâmetro inferior a 5 mm (FUNKE & BERNARD, 2003).

Atualmente existem disponíveis no mercado “kits” de identificação comercial para corineformes que incluem: o API Coryne system (bioMeriëux, Marcy l’Etoile, France), o RapID CB Plus system (Remel, Lenexa, Kans.) o Microscan panel (Dade Behring,

Sacramento, Calif.), o BBL Crystal GP system (BD, Sparks, Md.) entre outros sistemas (FUNKE & BERNARD, 2003).

Além das técnicas descritas acima para a caracterização dos corineformes, existem ainda os métodos quimiotaxonômicos, que analisam os constituintes da parede celular dos microrganismos (FRENEY et al., 1991) através de análises cromatográficas ou espectrométricas e, são utilizadas pelos laboratórios de referência. A presença de ácidos micólicos na parede celular e o tamanho destas cadeias pode ser detectada por cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa e espectrometria de massas, ou ainda cromatografia líquida de alta eficiência (DE BRIEL et al., 1992). Estes métodos são utilizados para a diferenciação das espécies de *Corynebacterium* (ácidos micólicos de 22 a 36 átomos de carbono) daquelas bactérias parcialmente ácido resistente (com ácidos micólicos de 30 a 78 átomos de carbono) (FUNKE & BERNARD, 2003). A análise dos ácidos graxos celulares através do uso da cromatografia (gasosa-líquido) é um método extremamente útil para a identificação de corineformes a nível de gênero. (FUNKE & BERNARD, 2003). Entretanto estes métodos convencionalmente utilizados por laboratórios de referência são de alto custo, requerem equipamentos e estruturas diversificadas além de períodos prolongados de incubação (7 a 10 dias) (HUDSPETH et al., 1998).

O API ZYM system (bioMérieux Vitek, Inc., Marcy L'Etoile, France), outro "kit" de identificação comercial, detecta enzimas constitutivas através de substratos cromogênicos, sendo desta maneira utilizado para a identificação rápida dos membros da família *Actinomycetaceae* e bactérias relacionadas (BROWN & McNEIL, 2003).

A identificação das bactérias corineformes a nível de gênero e de espécie na maioria dos casos tem sido reportada com pouco êxito, devido a maioria dos corineformes isolados pertencerem a outros gêneros que não ao gênero *Corynebacterium* (DE BRIEL et al., 1992).

Embora estes testes rápidos e miniaturizados possam ser úteis para a identificação de espécies de actinomicetos aeróbicos, muitos destes organismos não estão ajustados, taxonomicamente, a um gênero definido, o que neste contexto torna mais adequado o uso destes sistemas para um laboratório de pesquisa ou de referência (McNEIL & BROWN, 1994).

Para a identificação dos BGPs esporulados o sistema mais amplamente utilizado para o diagnóstico envolve testes fenotípicos básicos ou testes miniaturizados como a galeria API 20E e 50CHB (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Estes “kits” podem ser utilizados para a diferenciação do *Bacillus anthracis* de outros membros do Grupo do *B. cereus* em 48h. A bioMérieux também oferece um painel para o sistema automatizado Vitek. Entretanto a efetividade da identificação através destes kits pode variar devido ao número de espécies aeróbicas formadoras de esporos que não constam na base de dados destes sistemas, neste contexto há um contínuo estudo para o desenvolvimento de dados mais extensivos para uma identificação fidedigna destas espécies (LOGAN &TURNBULL, 2003).

Outra alternativa de identificação dos BGPs esporulados inclui a identificação quimiotaxonômica através da análise dos ácidos graxos celulares por análise eletroforética em gel de poliacrilamida, espectroscopia de massas ou espectroscopia no infravermelho (LOGAN &TURNBULL, 2003).

As espécies do gênero *Listeria* podem ser identificadas através do sistema API-*Listeria* (bioMérieux Vitek, Inc., Hazel-wood, Mo.) que foi especificamente desenvolvido para este fim e contém 10 testes bioquímicos em micro tubos. O sistema Micro-ID *Listeria* (Organon-Teknica), possui 15 testes bioquímicos e apresenta performance semelhante ao API-*Listeria*, entretanto ambos necessitam de testes que verifiquem a atividade hemolítica das espécies (BILLE et al., 2003). O sistema API Coryne também identifica corretamente o gênero *Listeria*, entretanto, da mesma forma que o kit anterior, testes adicionais como análise da hemólise e a reação de CAMP devem ser realizadas para a completa caracterização das espécies (KERR et al., 1993; BILLE et al., 2003).

2.6 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

O CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) determina procedimentos padrões para o teste de suscetibilidade de agentes antimicrobianos (TSA). Os documentos M2 (*Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*) e M7 (*Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow*

Aerobically) descrevem métodos de referências e padrões de interpretação para os TSA para aqueles microrganismos comumente isolados no laboratório clínico, como os estafilococos, enterococos, enterobactérias, e alguns agentes não fermentadores. (JORGENSEN, 2004; CLSI, 2005).

Apesar da existência destes documentos, um método padrão para a realização dos TSA os bacilos Gram positivos e outros microrganismos fastidiosos, ainda não está descrito explicitamente nestes documentos oficiais (JORGENSEN, 2004; BERNARD, 2005), e os estudos experimentais reportados até o momento, não possuem uma uniformidade na metodologia (MARTÍNEZ et al., 1995).

Dentre os muitos gêneros de bactérias isolados a partir de amostras clínicas, que não possuem padronização nos documentos em vigor, estão às bactérias corineformes, os membros do gênero *Bacillus* spp. (outros que não o *B. anthracis*), e uma série de outros microrganismos fastidiosos. Para a *Listeria* spp. e o *B. anthracis* existem informações limitadas para a realização e interpretação dos testes (JORGENSEN, 2004). A falta de critérios pré-estabelecidos para a realização e interpretação do antibiograma, cria dificuldades para a detecção de possíveis mecanismos de resistência intrinsecamente existentes bem como aqueles possivelmente adquiridos em um ambiente hospitalar (JORGENSEN, 2004).

Tradicionalmente, a disco-difusão e a microdiluição têm sido usadas para testar a suscetibilidade destas cepas. Até o momento dados sobre métodos automatizados para testes de suscetibilidade aos antimicrobianos para os bacilos Gram positivos são desconhecidos (MARTÍNEZ et al., 1995).

Foi proposta a realização destes testes através de disco-difusão em ágar Mueller Hinton suplementado com 5% de sangue de carneiro e incubação a 35°C, por período de 24h, para a maioria das espécies e de 48h para as amostras lipofílicas (FUNKE & BERNARD, 2003; BERNARD, 2005). O critério recomendado para a interpretação dos halos é aquele utilizado para os estreptococos (FUNKE & BERNARD, 2003; JORGENSEN, 2004), embora alguns autores utilizem os “break points” para outras espécies de microrganismos que não *Haemophilus influenzae* e nem *Neisseria gonorrhoeae* (MARTÍNEZ et al., 1995; CAMELLO et al., 2003). O laboratório deve informar o critério de interpretação utilizado para a leitura do antibiograma uma vez que

os “break points” para estes microrganismos ainda não estão estabelecidos (FUNKE & BERNARD, 2003).

Alternativamente, a microdiluição ou diluição em ágar são métodos também citados para a avaliação da sensibilidade destas cepas, e determinam a concentração inibitória mínima (CIM) de um determinado agente antimicrobiano, frente aos isolados clínicos (JORGENSEN, 2004).

Uma boa correlação entre as suscetibilidades para a vancomicina e eritromicina foi observada entre os testes de disco-difusão e microdiluição (WEISS et al., 1996).

A CIM também pode ser determinada através da utilização das fitas E-test (Ab Biodisk, Solna, Suécia) (FUNKE & BERNARD, 2003). As CIMs devem ser reportados sem critério de interpretação específica, mas se for requerido pelo clínico, o critério aplicado deve ser mencionado e deve-se também reportar que até o presente momento padrões de interpretação para corineformes não estão estabelecidos (FUNKE & BERNARD, 2003; JORGENSEN, 2004).

Os valores obtidos com o E-test têm demonstrado boa correlação com os valores encontrados para os métodos de disco-difusão e microdiluição para as espécies de *Corynebacterium* (MARTÍNEZ et al., 1995; FUNKE & BERNARD, 2003).

O E-test fornece um método simples, rápido e confiável para a determinação quantitativa da atividade do agente antimicrobiano contra microrganismos como bacilos Gram negativos, cocos Gram positivos, e bactérias fastidiosas como *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* (MARTÍNEZ et al., 1995). Além da facilidade e versatilidade na execução do procedimento do E-test, este não necessita de nenhum equipamento em especial, e permite escolher determinados agentes antimicrobianos a serem testados, podendo facilmente ser introduzido na rotina laboratorial como uma alternativa à microdiluição (MARTÍNEZ et al., 1995).

O E-test pode ser um método útil para os testes de sensibilidade das corinebactérias, e outros microrganismos Gram positivos fastidiosos (MARTÍNEZ et al., 1995).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram isoladas 50 cepas de BGPs provenientes de amostras clínicas de pacientes hospitalizados em diferentes unidades do Hospital Universitário de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, durante o período de janeiro a dezembro de 2005. As cepas de BGPs aeróbios foram isoladas em culturas realizadas no Laboratório de Bacteriologia Clínica do referido hospital, e posteriormente encaminhadas ao Laboratório de Bacteriologia do DACT – CCS, prédio 26, sala 1201, onde testes fenotípicos necessários à identificação bacteriana dos microrganismos foram efetuados.

3.1 Isolamento dos microrganismos

A partir da coloração de Gram direta da amostra clínica, as cepas foram primeiramente analisadas quanto à morfologia: se BGP regular, irregular, esporulado ou ramificado.

Todas as espécies foram cultivadas em ágar suplementado com 5% de sangue de humano e incubado a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ com atmosfera de 3-5% de CO_2 e atmosfera ambiente, por um período de 24 à 72h, dependendo do desenvolvimento por cada espécie. Também foram cultivadas em ágar sangue azida a 5% de sangue humano. O repique em ágar sangue (AS) humano a 5%, permitiu a visualização do tipo de hemólise, tamanho e coloração da colônia, enquanto que o ágar sangue azida confirmou o crescimento de microrganismos Gram positivos.

Após a análise destas características básicas de cada microrganismo, as cepas foram estocadas em Brain Heart Infusion (caldo BHI, infuso de cérebro e coração) acrescido de 15% de glicerol, e estocadas à -20°C . Posteriormente as cepas foram ativadas a partir deste estoque e então realizadas as baterias de testes bioquímicos “*in house*”.

3.1.1 Composição dos meios de cultura para o isolamento dos micorganismos

A composição dos meios de cultura utilizados para o isolamento refere-se à 100g de meio.

A preparação dos meios de cultura seguiu os procedimentos citados por Zoccoli et al (2004).

3.1.1.1 Base para Agar-sangue (AS)

Peptona de caseína	15,0g
Peptona de farinha de soja	5,0g
NaCl	5,0g
Agar	15,0g

3.1.1.2 Base ágar azida-sangue

Peptona de caseína	5,0g
Peptona de carne	5,0g
Extrato de carne	3,0g
NaCl	5,0g
Azida sódica	0,2g
Ágar	15,0g

Após solubilizar a quantidade do meio em água destilada indicada pelo fabricante para o preparo de 100mL, o mesmo foi autoclavado a 121°C por 15 minutos. Após o resfriamento até 50°C, adicionou-se 5mL de sangue humano para cada 100mL de meio base. O meio então foi homogeneizado e distribuído cuidadosamente em placas de Petri.

3.2 Identificação convencional proposta para os BGPs

O esquema de identificação bioquímica convencional proposto e empregado para a identificação dos BGPs baseou-se em testes bioquímicos sugeridos por diferentes autores (FUNKE et al., 1997a, BERNARD et al., 2002), e constantes nos esquemas de identificação comerciais. Pigmentação, hemólise, morfologia no ágar sangue e na coloração de Gram, juntamente com a prova da catalase, foram observadas durante o período compreendido entre 24 e 72h, dependendo das necessidades de desenvolvimento de cada microrganismo. Após estas análises preliminares, outras provas foram efetuadas (figura 1): verificação da motilidade, utilização do citrato, prova da urease, capacidade de crescimento em NaCl 6,5% e a 42°C, hidrólise de esculina e da gelatina, reação de CAMP, verificação da rota metabólica de utilização dos açúcares, se por fermentação ou oxidação, produção de ácido a partir da glicose, maltose, sacarose, xilose e manitol. Todas as 50 cepas constantes deste estudo foram submetidas a esta identificação, com os testes efetuados em triplicata.

Duas cepas geneticamente puras constantes do American Type Culture Collection (ATCC) foram utilizadas para o controle e validação dos testes bioquímicos utilizados: *Bacillus cereus* ATCC 14579 e *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. Tubos controle negativo também foram utilizados.



Figura 1: Identificação bioquímica convencional proposta.

3.2.1 Composição dos meios de cultura para a identificação dos microrganismos

A composição dos meios de cultura utilizados para a identificação refere-se à 100g de meio.

Os meios contendo bile-esculina, citrato, TSI e uréia, foram distribuídos em tubos estéreis (2mL) e inclinados para a solidificação em ângulo de 45° para obter superfície inclinada, formando duas câmaras de reações com o mesmo comprimento: a porção superior aeróbia (inclinada ou pico) e a porção inferior relativamente anaeróbia (denominada profunda ou fundo) (KONEMAN et al., 2001).

3.2.1.1 Bile esculina agar

Peptona de carne	5,0g
Extrato de carne	3,0g
Bile	40,0g
Esculina	1,0g
Citrato férrico	0,5g
Ágar	15,0g

Após pesar e hidratar o meio com água destilada. O mesmo foi autoclavado a 121°C por 15 minutos e distribuído assepticamente 2mL em tubos estéreis. A seguir os tubos foram inclinados em ângulo de 45° para obter superfície inclinada.

3.2.1.2 Uréia ágar base (Christensen)

Peptona	1,0g
Glicose	1,0g
NaCl	5,0g
Fosfato dissódico	1,2g

Fosfato potássico	0,8g
Vermelho de fenol	0,012g
Agar	15,0g

Após pesar e hidratar o meio com 95mL de água destilada, o mesmo foi autoclavado a 121°C por 15 minutos. Após resfriar até 50°C adicionou-se assepticamente 5mL de uréia a 20% em 95mL do meio base. O meio foi então homogeneizado e distribuído assepticamente 2mL em tubos estéreis, inclinando os tubos em ângulo de 45° para obter superfície inclinada.

Preparação da solução de uréia a 40%:

Pesou-se 40g uréia e dissolveu-se em 100mL água destilada. A solução foi homogeneizada e esterilizada por filtração (Millipore 0,22 μ).

3.2.1.3 Citrato de Simmons

Sulfato de magnésio	0,2g
Fosfato de amônio sódico	0,8g
Fosfato de amônio dihidrogenado	0,2g
Citrato sódico, tri básico	2,0g
NaCl	5,0g
Azul de bromotimol	0,08g
Ágar	15g

Após pesar e hidratar o meio com água destilada. O mesmo foi autoclavado a 121°C por 15 minutos e distribuído assepticamente 2mL em tubos estéreis. A seguir os tubos foram inclinados em ângulo de 45° para obter superfície inclinada.

3.2.1.4 Ágar tríptico de açúcar e ferro (TSI)

Peptona de caseína	15,0g
--------------------	-------

Peptona de carne	5,0g
Extrato de carne	3,0g
Extrato de levedura	3,0g
NaCl	5,0g
Lactose	10,0g
Sacarose	10,0g
D(+) - glicose	1,0g
Citrato de amônio e ferro III	0,5g
Vermelho de fenol	0,024g
Ágar	12,0g

Após pesar e hidratar o meio com água destilada. O mesmo foi autoclavado a 121°C por 15 minutos e distribuído assepticamente 2mL em tubos estéreis. A seguir os tubos foram inclinados em ângulo de 45° para obter superfície inclinada.

3.2.1.5 CTA (Ágar Trípico de Cistina)

Tryptose	20,0g
L-cystina	0,5g
NaCl	5,0g
Sulfito de Na	0,5g
Ágar	15g
Vermelho de fenol	0,01g

Após pesar a quantidade do meio indicada pelo fabricante e solubilizá-lo em água destilada, o mesmo foi aquecido até dissolução completa. A seguir foi autoclavado 121°C por 15 minutos e distribuído 2mL nos tubos de ensaio juntamente com 0,2 mL da solução do açúcar desejado (1%).

Preparação das soluções dos açúcares:

Pesou-se 0,5g dos açúcares: glicose, maltose, manitol, sacarose e xilose. A seguir os açúcares foram solubilizados em 50mL de água destilada estéril, e a solução final foi esterilizada por filtração (Millipore 0,22 μ).

3.2.1.6 Meio Sim

Peptona de caseína	20,0g
Peptona de carne	6,1g
Sulfato de ferro e amônio	0,2g
Tiosulfato de sódio	0,2g
Ágar	3,5g

Após pesar e hidratar o meio com água destilada. O mesmo foi autoclavado a 121°C por 15 minutos e distribuído assepticamente 2mL em tubos estéreis. Os tubos foram colocados em posição vertical a fim de obter-se uma superfície plana. Este meio foi utilizado para a verificação da motilidade.

3.2.1.7 Infuso de cérebro e coração

Cloreto de sódio	5,0g
Dextrose	2,0g
Fosfato dibásico de sódio	2,5g
Infuso de cérebro e coração	17,5g
Peptona de caseína	20,0g
Peptona de carne	6,1g

Após pesar e hidratar o meio com água destilada. O mesmo foi autoclavado a 121°C por 15 minutos e distribuído assepticamente 2mL em tubos estéreis. Para a prova de crescimento a 42°C foram distribuídos assepticamente 2mL do meio em tubos

estéreis. Para a prova de tolerância ao sal, acrescentou-se 6,5g de NaCl a 100 mL do meio líquido.

3.2.1.7 Gelatina

Filme de raios X exposto não revelado.

Solução salina.

O filme de raios X foi cortado em tiras de 5 mm x 1 cm (ANVISA) e esterilizado em cabine de segurança com lâmpada UV por 20 minutos. Após Colocou-se 1 mL de solução salina nos tubos de ensaio e acrescentou-se assepticamente as tiras de raio X.

3.3 Identificação BGP's pelo sistema API Coryne

As tiras do sistema API Coryne (figura 2) permitem a realização de 21 testes bioquímicos com leitura em 24 a 48 horas. Consiste de 20 microtubos contendo substratos desidratados para 11 enzimas (redução do nitrato, pirazinamidase, pirrolidoniil arilamidase, β -galactosidase, fosfatase alcalina, β -glicuronidase, α -glicosidase, N-acetil- β -glicosaminidase hidrólise da esculina, uréia e gelatina,) e 8 testes de fermentação dos açúcares (glicose, ribose, xilose, manitol, maltose, lactose, sacarose e glicogênio, e um microtubo teste controle negativo). A prova da catalase foi efetuada pela adição de uma gota de peróxido de hidrogênio em um dos tubos correspondentes aos testes de esculina ou gelatina.



Figura 2: Tira de identificação do sistema API Coryne 2.0.

A concentração do inóculo utilizada no sistema API Coryne e recomendada pelo fabricante, foi superior ao tubo 6 da escala de McFarland. Após a homogeneização, foi distribuído nos microtubos. Os microtubos foram posteriormente recobertos com parafina para criar uma atmosfera de anaerobiose nas reações dos açúcares, no controle negativo e na hidrólise da uréia.

As tiras foram incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 à 48h. Após este período de incubação, os resultados das provas bioquímicas foram digitados “on line”, no sistema APIWEB, que utiliza dados da versão 2.0 do API Coryne, o qual permite a identificação de 49 gêneros (FRENEY et al., 1991; FUNKE et al., 1997b).

Os microrganismos identificados pelo sistema API Coryne foram aqueles pertencentes ao grupo dos BGPs irregulares, regulares e ramificados.

A comparação entre os resultados do sistema comercial API Coryne com os da identificação convencional, teve o objetivo de avaliar e validar as identificações resultantes da bateria de testes bioquímicos proposta.

A cepa utilizada para o controle de qualidade do sistema comercial foi a *Listeria monocytogenes* ATCC 15313.

3.4 Testes de sensibilidade aos antimicrobianos (MARTÍNEZ et al., 1995; CAMELLO et al., 2003)

A sensibilidade frente aos antimicrobianos foi efetuada utilizando o ágar Mueller-Hinton (MH), suplementado ou não com 5% de sangue humano, dependendo das exigências nutricionais de cada espécie. Um inóculo de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL foi obtido utilizando a metodologia da turvação direta. Para a obtenção de um tamanho de inóculo igual ao tubo 0,5 da escala de McFarland, foram suspensas algumas colônias em meio líquido (salina ou caldo Mueller Hinton), até a obtenção de uma absorbância de 0,8 a 1,0 em espectrofotômetro com filtro de 625 nm. Após a semeadura do inóculo no meio, os discos impregnados com antibacteriano foram então distribuídos e o conjunto incubado em estufa bacteriológica a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24h. Posteriormente ao período de incubação efetuou-se a leitura dos halos de inibição.

O procedimento para o teste de susceptibilidade dos BGPs e a escala para a interpretação dos halos dos agentes antimicrobianos frente a estes microrganismos não possuem um padrão determinado pelo CLSI, antigo NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Neste contexto, foram utilizados os pontos de corte (“breakpoints”) ou pontos de referência dos halos, sugeridos pelo CLSI para o *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 da mesma forma utilizada por Martinez et al. (1995) e Camello et al. (2003).

Os antimicrobianos testados pelo método de disco-difusão de Kirby-Bauer incluíram: amicacina (AMI 30 µg), amoxicilina/ácido clavulânico (AMC 30 µg), ampicilina (AMP 10 µg), azitromicina (AZI 15 µg), ceftazidima (CAZ 30 µg), cefotaxima (CTX 30 µg), cefoxitina (CFO 30 µg), ceftriaxona (CRO 30 µg) ciprofloxacina (CIP 0,5µg), clindamicina (CLI 0,2 µg), gentamicina (GEN 10 µg), imipenem (IMI 10 µg), linezolida (LDZ 30 µg), meropenem (MER 10 µg), oxacilina (OXA 0,1 µg), penicilina (PEN 10 µg), sulfametoxazol/trimetoprima (SFT 25 µg), tetraciclina (TET 30 µg) e vancomicina (VAN 30 µg). Todos os discos eram da marca SENSIDISC, exceto os discos de linezolida, que pertenciam ao fabricante OXOID.

O controle de qualidade dos antimicrobianos utilizou as cepas de *Echerichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 juntamente com as normas técnicas e critérios de interpretação recomendados pelo documento M2 do CLSI.

A metodologia quantitativa do E-test (Ab Biodisk) foi utilizada para a confirmação da resistência a vancomicina, em cepas que apresentaram resistência a este antimicrobiano nos teste qualitativo da disco-difusão. A turvação de inóculo utilizado foi o correspondente ao tubo 0,5 escala de Mc Farland, obtido da mesma forma citada anteriormente e o ágar Mueller-Hinton suplementado com 5% de sangue humano foi o meio utilizado. Após semeadura do inóculo, distribuição das fitas nas placas e período de incubação, as leituras das elipses foram efetuadas (HORN et al., 1996). As CIM de interpretação utilizadas neste estudo são as mesmas sugeridas pelo CLSI (2005) para a verificação da resistência em cepas de *Staphylococcus aureus*.

3.4.1. Agar Mueller-Hinton

NaCl	5,0g
Dextrose	2,0g
Fosfato dibásico de sódio	2,5g

Pesar e dissolver o meio em água destilada, aquecer até a dissolução. Autoclavar a 121°C por 15 minutos. Retirar da autoclave e distribuir 50 a 60 mL em placa Petri, para a obtenção de espessura de 3 a 4 mm. Para o Mueller-Hinton sangue, após o resfriamento até 50°C do meio, adicionou-se 5mL de sangue humano para cada 100mL de meio base. O meio foi então homogeneizado e distribuído lentamente em placas de Petri.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento dos microrganismos

Foram estudadas 50 cepas de BGPs isoladas durante o período de janeiro a dezembro de 2005, provenientes de hemoculturas, de secreções de ferida operatória (SFO), de pontas de cateteres, de secreções traqueais, líquidos de diálise peritoneal e secreções de origem desconhecida (SOD).

De acordo com a Tabela 1, as culturas de sangue foram as amostras predominantes, e os microrganismos mais freqüentemente isolados a partir deste sítio foram as espécies de *Bacillus* (BGPs esporulados), que segundo os autores estão entre os mais comuns contaminantes de hemoculturas (BEBEE & KONEMAN, 1995), seguidos dos corineformes (BGPs irregulares) que foram as espécies predominantes nas culturas das demais amostras clínicas analisadas.

As espécies de *Staphylococcus* e *Streptococcus* β -hemolíticos são reconhecidamente componentes da microbiota da pele que podem causar infecções sistêmicas, enquanto que espécies dos gêneros *Corynebacterium* e *Bacillus*, raramente produzem estas infecções (MOOKADAM et al., 2006). Entretanto, o isolamento repetido destas espécies em culturas puras a partir de amostras biológicas nobres (RICHTER et al., 2002; CAMELLO et al., 2003) requer cuidadosa análise. É pertinente relacionar sinais e sintomas de bacteremia destacando outros agentes.

Os BGPs regulares constaram apenas do gênero *Listeria*, e foram isoladas basicamente de hemoculturas (Tabela 1) de pacientes do centro obstétrico (neonatos e gestantes), não diferindo das populações suscetíveis citadas por outros autores (VASQUÉZ-BOLAND et al., 2001; DREVETS et al., 2004; GASANOV et al., 2005).

As secreções traqueais (Tabela 1) foram obtidas de pacientes imunocompetentes, onde culturas puras de *Rhodococcus* sp (BGPs ramificados) foram identificadas. De acordo com Kedlaya et al. (2001) de 10 a 15% das infecções causadas por *R. equi* ocorrem em pacientes imunocompetentes, e em mais de 40%

destes casos a infecção pulmonar está presente e infecções disseminadas podem ocorrer.

TABELA 1 - Procedência dos Bacilos Gram Positivos isolados no HUSM no período de um ano

Materiais biológicos	N	(%)	Morfologia dos BGPs isolados
Hemoculturas	36	72%	BGP irregular (14) BGP regular (2) BGP esporulados (20)
SOD	5	10%	BGP irregular (5)
SFO	3	6%	BGP esporulados (2) BGP irregular (1)
Líquido de diálise	2	4%	BGP irregular (2)
ST	2	4%	BGP ramificado (2)
Ponta de cateter venoso central	1	2%	BGP irregular (1)
Ponta de cateter de diálise	1	2%	BGP irregular (1)

Legenda:

SOD: secreção de origem desconhecida

SFO: secreção de ferida operatória

ST: secreção traqueal

BGPs irregulares: corineformes

BGPs esporulados: gênero *Bacillus*

BGPs regulares: gênero *Listeria*

BGPs ramificados: gênero *Rhodococcus*

Número de amostras: 50(100%).

Dentre os achados clínicos dos pacientes, as espécies isoladas das SFO e SOD foram consideradas como contaminantes, uma vez que a maioria destas culturas foram polimicrobianas, com o isolamento conjunto de outros organismos como *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Os microrganismos isolados dos líquidos de diálise peritoneal (monomicrobianas) foram considerados como infecciosos e o tratamento antimicrobiano foi instituído. Para as hemoculturas, os achados clínicos constantes nos prontuários dos pacientes foram

incompletos, entretanto, para alguns pacientes o tratamento com antimicrobianos de largo espectro como medida profilática foi utilizado, e para os casos em que os pacientes faziam uso de cateteres e apresentavam sinais de bacteremia, estes dispositivos foram removidos. Para as secreções traqueais as considerações sobre o tratamento não foram encontrados. Durante o período foram isolados 36 BGPs de hemoculturas e somente 2 de ponta de cateter (1 central e 1 de diálise). Pelos dados clínicos constantes nos prontuários dos pacientes, a maioria dos isolamentos de BGPs não foi investigada se a bacteremia detectada possuía como “porta de entrada” o cateter.

TABELA 2 - Distribuição topográfica dos pacientes nas unidades do HUSM relacionado ao estado de internação

Situação do paciente	%	Unidade	N
Pacientes Internados	38% (n=19)	CTI	5
		Clínica médica	4
		Pós-operatório	3
		Centro obstétrico	3
		UPED	2
		URN	1
		Bloco cirúrgico	1
Pacientes externos	34% (n=17)	Pronto atendimento	8
		Nefrologia	5
		Oncologia	3
		Ambulatório	1
Pacientes sem dados	28% (n=14)	Sem dados	14

Legenda:

CTI - centro de tratamento intensivo adulto

UPED - unidade de tratamento intensivo pediátrica

URN - unidade de tratamento intensivo de recém-nascidos

Número total de pacientes: 50(100%).

Como mostra a Tabela 2, as amostras de BGPs isoladas foram provenientes de diversas unidades do HUSM. Entretanto em 28% (n=14) dos pacientes os dados clínicos eram insuficientes ou inexistiam no registro do hospital, o que levou à conclusão que se tratavam de pacientes externos, 38% (n=19) eram pacientes internados que na sua maioria faziam uso de cateteres e sondas, e conseqüentemente recebiam terapia antimicrobiana. Da mesma forma, alguns pacientes externos também faziam uso de cateteres, pois se tratavam de pacientes oncológicos que recebiam quimioterapia ou ainda aqueles pacientes da nefrologia, que faziam hemodiálise.

Podem ser citados como fatores predisponentes e enfermidades de base para o isolamento dos BGPs as seguintes condições relacionadas na Tabela 3.

TABELA 3 - Características clínicas dos pacientes dos quais foram isolados BGPs

Enfermidades de base	Fatores pré disponentes encontrados
Diabetes	Antibioticoterapia
Doenças oncológicas*	Cateter venoso central
Endocardite	Drogas imunossupressoras
Mieloma múltiplo	Gestantes*
Linfoma	Idosos
Peritonite	Neutropenia severa
Pneumonia	Nutrição parenteral
Trombose	Prematuros
	Prótese valvular cardíaca
	Sonda vesical
	Hemodiálise

*Durante o período do estudo 4 pacientes (3 oncológicos e 1 gestante) foram a óbito devido à septicemia por BGPs.

As condições clínicas dos pacientes dos quais foram isolados os BGPs (Tabela 3) são as mesmas relatadas por diversos autores, onde alterações orgânicas causadas por doenças de base ou drogas supressoras (WEINSTOCK & BROWN, 2002), implante de cateteres bem como internação e terapia antimicrobiana prolongadas, permitem que microrganismos normalmente saprófitas ou não patogênicos causem infecções oportunistas em imunodeprimidos (BEBEE & KONEMAN, 1995; RICHTER et al., 2002;

VISCOLI et al., 2005). Entretanto, diferentemente do que os autores relatam pacientes soro positivos ou com SIDA não foram encontrados neste estudo.

Viscoli et al. (2005) cita ainda como principal fator para o desenvolvimento destas infecções, a neutropenia, que afeta a atividade dos macrófagos circulantes permitindo a proliferação de microrganismos na circulação.

4.2 Identificação convencional proposta para os BGPs

O interesse nos BGPs tem crescido nos últimos anos, especialmente após o reconhecimento da importância clínica de algumas espécies como *Corynebacterium jeikeim*, *C. urealyticum*, *C. minutissimum*, *C. amycolatum* e *Bacillus* spp. (MARTÍNEZ et al., 2001; CAMELLO et al., 2003). Os relatos de infecções por estes microrganismos tiveram aumento subsequente ao aparecimento da SIDA, avanços nos transplantes de órgãos, desenvolvimento do tratamento quimioterápico e da terapia intravenosa através do uso de cateteres. Sendo este último, um fator bastante importante nos casos de colonização, pois algumas bactérias Gram positivas ao colonizar um dispositivo intravascular, formam um biofilme, que intensifica o processo infeccioso e favorece a resistência aos antibióticos (RAAD et al., 1995).

O reconhecimento de infecções causadas por BGPs é altamente dependente da habilidade dos laboratórios em identificar estas espécies. Na literatura ainda existem poucas publicações referentes ao reconhecimento destes microrganismos como agentes patogênicos.

Na Tabela 4 estão dispostos os gêneros de BGPs identificados e suas características morfológicas, identificados pela bateria proposta. Houve predomínio no isolamento dos BGPs irregulares com 48% (n=24), seguidos dos BGPs esporulados com 44% (n=22), e finalmente os BGPs regulares e ramificados com 4% (n=2) cada. Foram identificados 5 gêneros distintos do grupo dos corineformes, nos demais grupos apenas um gênero foi isolado.

TABELA 4-Gêneros de BGPs identificados pelos testes bioquímicos convencionais propostos e suas características morfológicas

Morfologia na coloração de Gram	N	%	Gêneros isolados
Gram positivos irregulares ou corineformes	24	48%	<i>Arthrobacter</i> (2%)
			<i>Brevibacterium</i> (6%)
			<i>Cellulomonas</i> (4%)
			<i>Corynebacterium</i> (22%)
			<i>Microbacterium</i> (8%)
			Não identificados (6%)
Gram positivos regulares	2	4%	<i>Listeria</i>
Gram positivos esporulados	22	44%	<i>Bacillus</i>
Gram positivos ramificados	2	4%	<i>Rhododococcus</i>

Número total de microrganismos: 50 (100%).

A Tabela 5 ilustra a porcentagem de gêneros e de espécies de BGPs irregulares, regulares e ramificados identificados pela bateria de testes convencionais propostas pelo estudo, onde 71,2% dos microrganismos foram identificados ao nível de gênero, 18% ao nível de espécie e 10,8% dos isolados não foram identificados.

Com a metodologia convencional proposta, pode-se identificar 89,2% (n=25) dos BGPs deste estudo, excetuando-se os BGPs esporulados. O percentual de 10,8 das 28 cepas (n=3) não foi identificado nem ao nível de gênero, embora, a morfologia corineforme de bactéria que inclui bacilo Gram positivo pleomórfico agrupado em letras chinesas e em forma de V como afirma Janda (JANDA, 1998b) encontrada na coloração de Gram permitiu a inclusão dos microrganismos neste grupo (BGPs irregulares).

Esta dificuldade de identificação se deve ao fato de que mais de 40% das bactérias corineformes e microrganismos correlacionados, pertencerem a outros gêneros que não o *Corynebacterium* (COYLE & LIPSKY, 1990; CAMELLO et al., 2003).

Neste contexto, apenas 60% dos BGPs rotineiramente isolados no laboratório clínico podem ser identificados através dos métodos fenotípicos (FRENEY et al., 1991).

Da mesma forma, para alguns gêneros e espécies a identificação não é possível de ser realizada sem as análises quimiotaxonômicas (que estudam os constituintes da parede celular: ácidos micólicos, ácidos graxos, menaquinonas e aminoácidos) ou os métodos de caracterização do genoma (caracterização e hibridização de ácidos nucléicos) (COYLE & LIPSKY, 1990; FRENEY et al., 1991; CAMELLO et al., 2003; BERNARD, 2005).

TABELA 5 - Nível de identificação e percentual encontrado para os gêneros e espécies de BGPs irregulares, regulares e ramificados identificados através da metodologia convencional proposta

Nível de identificação	N	Microrganismo
Gênero (71,2%)	7	<i>Corynebacterium</i> sp.
	3	<i>Brevibacterium</i> sp.
	4	<i>Microbacterium</i> sp.
	2	<i>Cellulomonas</i> sp.
	1	<i>Arthrobacter</i> sp.
	1	<i>Listeria</i> sp.
	2	<i>Rhodococcus</i> sp.
Espécie (18%)	3	<i>Corynebacterium amycolatum</i>
	1	<i>Corynebacterium minutissimum</i>
	1	<i>Listeria monocytogenes</i>
Não identificado (10,8%)	3	BGP irregular ou corineforme

Legenda:

sp.: refere-se a determinada espécie que não foi identificada.

Número total de microrganismos: 28 (100%).

A seguir a Tabela 6 indica os 5 gêneros de bactérias corineformes isolados correlacionados com o espécime clínico. O gênero *Corynebacterium* foi encontrado em diversas amostras.

TABELA 6 - Gêneros de BGPs corineformes e os respectivos espécimes clínicos

Gênero	N	%	Amostras	Quantidade
<i>Corynebacterium</i>	11	48%	Hemocultura	4
			SFO	1
			SOD	4
			Ponta de catéter venoso central	1
			Ponta de catéter de diálise	1
<i>Microbacterium</i>	4	16%	Hemocultura	2
			Líquido de diálise	2
<i>Brevibacterium</i>	3	12%	Hemocultura	3
<i>Cellulomonas</i>	2	8%	Hemocultura	2
<i>Arthrobacter</i>	1	4%	Hemocultura	1
Não identificada	3	12%	Hemocultura	2
			SOD	1

SFO: secreção de ferida operatória

SOD: secreção de origem desconhecida

Número total de microrganismos: 24 (100%).

As espécies do gênero *Corynebacterium* (Figura 3) apresentaram morfologia diversificada das colônias, com pigmentação variando de amarelada, branca acinzentada e branca amarelada, com aspecto seco e também mucoso. Entretanto todos isolados foram catalase positiva, imóveis, com hidrólise da gelatina e esculina negativas, características estas indispensáveis para a diferenciação deste gênero dos demais corineformes, que também produzem catalase, e na maioria são móveis e hidrolisam a esculina, concordando com os achados de Bernard (2005).

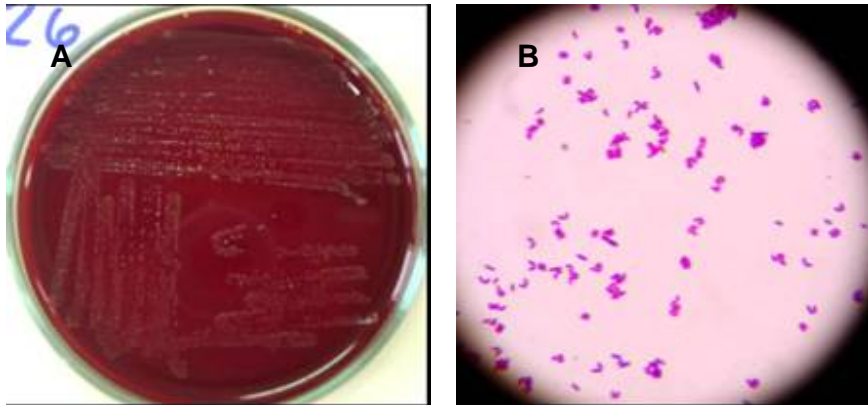


Figura 3: **A. *Corynebacterium sp.*** Colônias não hemolíticas de em AS após incubação overnight a 35°C. **B. Coloração de Gram**, mostrando pequenos bacilos Gram positivos descorados, em paliçadas, em forma de v, semelhantes às letras chinesas (100x).

As espécies de *Microbacterium* (Figura 4) foram isoladas de amostras de sangue e líquido de diálise peritoneal (Tabela 6) fermentavam os carboidratos, com produção de ácido a partir da maltose positiva enquanto que a partir da xilose negativa, uma característica importante para a diferenciação deste gênero do *Cellulomonas*. As cepas hidrolisavam a esculina, gelatina, com motilidade e urease negativas.

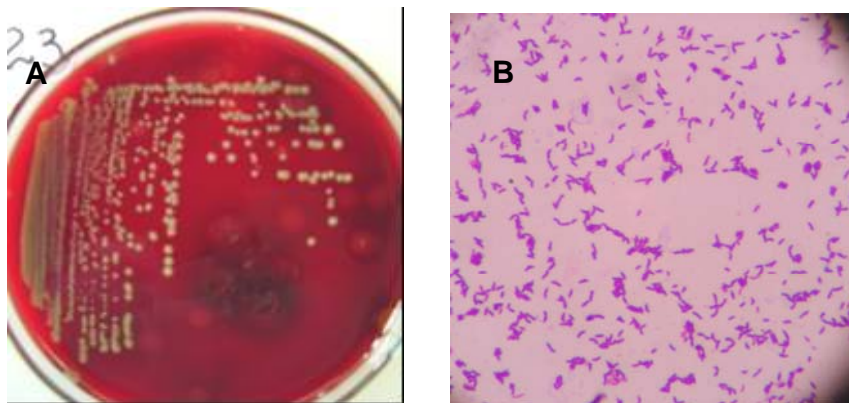


Figura 4: **A. *Microbacterium sp.*** colônias não hemolíticas de em AS, pigmentadas inicialmente de amarelo claro que se tornam laranja em três dias. **B. Coloração de Gram (100x)** com bacilos Gram positivos pleomórficos.

Uma paciente com câncer de pulmão foi a óbito devido à septicemia por BGPs, o microrganismo foi identificado como pertencente ao gênero *Microbacterium*. Segundo Lau et al. (2002) as infecções associadas ao *Microbacterium* possuem significante grau

de mortalidade e morbidade, e este gênero deve ser considerado sempre que se isolar uma espécie de corineforme de pigmentação amarela, em paciente hospitalizado, imunodeprimido e com cateter venoso central.

Um óbito foi registrado por septicemia devido a BGPs em uma paciente da unidade oncológica, que apresentava quadro de neutropenia severa e fazia uso de cateter venoso central. A cepa posteriormente foi identificada como pertencente ao gênero *Brevibacterium*.

As colônias de *Brevibacterium* (Figura 5A, B e C) tinham odor semelhante a queijo, e tornavam-se amareladas com o tempo. O metabolismo das espécies foi oxidativo, cresceram em NaCl 6,5% (halotolerantes), eram imóveis e não produziam ácido a partir dos carboidratos. Não hidrolisavam a gelatina, uréia e esculina. De acordo com os autores os isolados que possuem estas características e exibem um odor forte semelhante ao dos queijos ou ao dos pés são sugestivos de *Brevibacterium* spp. (FUNKE et al 1997; JANDA 1998b; WAUTERS et al., 2004). *Brevibacterium* está entre os gêneros que há poucos anos foi associado a infecções oportunistas. Basicamente a maioria das espécies é isolada da pele, entretanto relatos recentes descrevem o isolamento deste gênero em hemoculturas, como neste estudo, líquidos de diálise, e ainda como agente causador de osteomielite (ANTHONY et al., 1992 FUNKE & CARLOTT, 1994; WAUTERS et al., 2004).

As espécies de *Cellulomonas* (Figura 5D) isoladas apenas de hemocultivos (Tabela 6), apresentaram-se como delgados bacilos irregulares de aparência cocóide em colônias velhas e aspecto opaco, convexas e com pigmento inicial amarelo. A utilização dos açúcares ocorreu pela via fermentativa, e a produção de ácido ocorreu a partir da glicose, sacarose, maltose e xilose. Motilidade e hidrólise da esculina foram positivas, enquanto que a urease negativa (FUNKE et al., 1995b). A cepa também era tolerante ao NaCl 6,5%. O gênero *Cellulomonas* não é definido como patogênico (LAU et al., 2002).

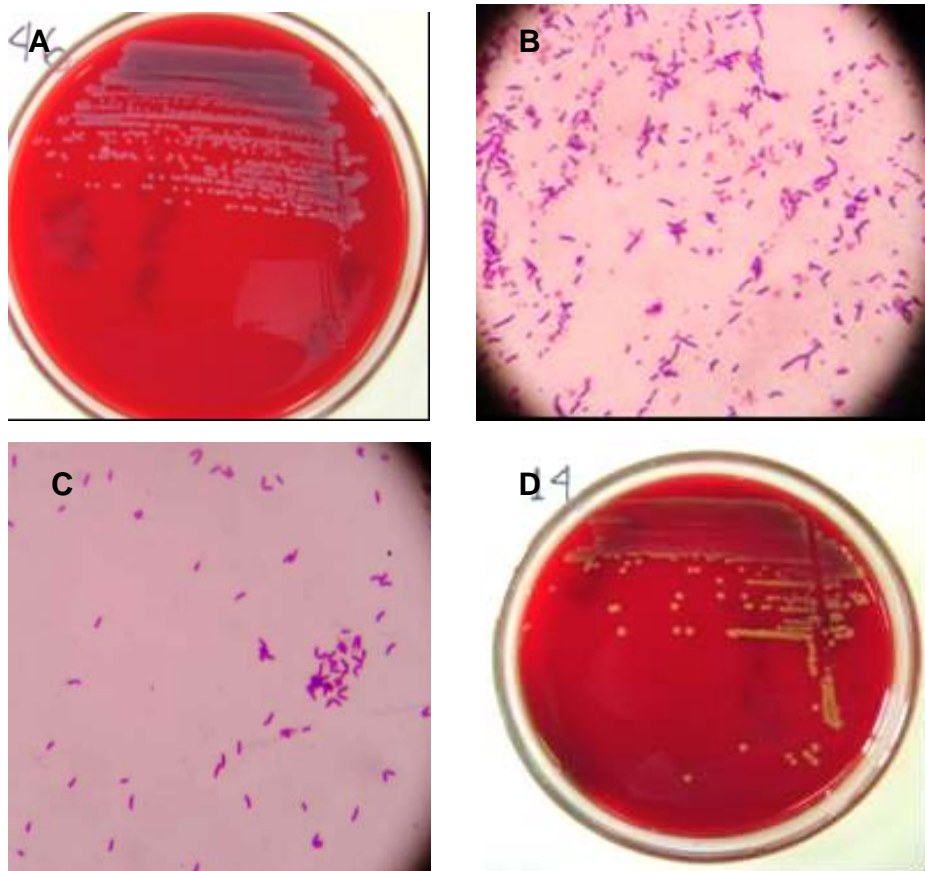


Figura 5: **A.** *Brevibacterium* sp. colônias branco acinzentadas em 24h de incubação β -hemólise negativa em AS e catalase positiva. **B e C.** Coloração de Gram (100x) de *Brevibacterium* sp. **B.** células jovens de colônias com menos de 24h de incubação apresentaram-se como bacilos Gram positivos irregulares alongados (visualização de um ciclo morfológico com bacilos em culturas novas e cocos em cultivos velhos). **C.** morfologia celular cocóide após 48h de incubação. **D.** *Cellulomonas* sp. colônias opacas e convexas em AS, não hemolíticas com pigmento inicial amarelo.

As reações bioquímicas encontradas nas amostras de *Arthrobacter* sp. e de *Brevibacterium* foram semelhantes no que diz respeito ao metabolismo oxidante dos açúcares. Entretanto, segundo as referências literárias, a ausência do odor característico das colônias e a motilidade positiva, diferencia o gênero *Arthrobacter* do gênero *Brevibacterium* (FUNKE et al., 1996). As espécies de *Arthrobacter* têm sido isoladas de líquidos nobres e existem relatos de bacteremias, endocardites e endoftalmites (JANDA, 1998b). A única cepa encontrada deste gênero foi isolada de uma hemocultura (Tabela 6).

Os sítios de isolamento das espécies de *Corynebacterium* estão especificados na Tabela 7. Das 11 cepas isoladas, apenas 4 (36%) foram identificadas ao nível de

espécie utilizando os testes bioquímicos propostos. As outras 7 cepas foram identificadas apenas ao gênero. Neste contexto, pode-se afirmar que a dificuldade na identificação destas espécies se deve à semelhança entre as reações fenotípicas e a ausência das técnicas moleculares de identificação (BERNARD, 2005).

TABELA 7 - Espécies de *Corynebacterium* isoladas e respectivas amostras biológicas

Cultura	Espécies	N	%
Hemocultura (4)	<i>Corynebacterium</i> sp.	3	27,5%
	<i>C. minutissimum</i>	1	9%
SFO (1)	<i>C. amycolatum</i>	1	9%
SOD (4)	<i>C. amycolatum</i>	1	9%
	<i>Corynebacterium</i> sp.	3	27,5%
Ponta de cateter venoso central (1)	<i>C. amycolatum</i>	1	9%
Ponta de cateter de diálise (1)	<i>Corynebacterium</i> sp.	1	9%

Legenda:

SOD: secreção de origem desconhecida

SFO: secreção de ferida operatória

Número de microrganismos: 11(100%)

As cepas de *C. amycolatum* (Figura 6) apresentavam colônias secas e pálidas, de contorno irregular e rugoso, levemente acinzentadas que fermentavam a glicose e maltose com teste de CAMP negativo, estando de acordo com Hudspeth et al. (1998). Com freqüência a identificação desta espécie é confusa, devido às semelhanças das reações bioquímicas com outras espécies como *C. minutissimum* e *C. striatum* (OTEO et al., 2001, MARTÍN et al., 2003). Entretanto, a morfologia das colônias serve para a diferenciação entre as espécies, pois as colônias de *C. minutissimum* e *C. striatum* são de aspecto úmido, cremosas e maiores (FUNKE et al., 1997;). De acordo com a literatura, *C. amycolatum* é o *Corynebacterium* mais isolado de amostras clínicas e com freqüência causa bacteremia, sepse, infecções em feridas cirúrgicas e em dispositivos protéticos (LAGROU et al., 1998; BERNARD, 2005).

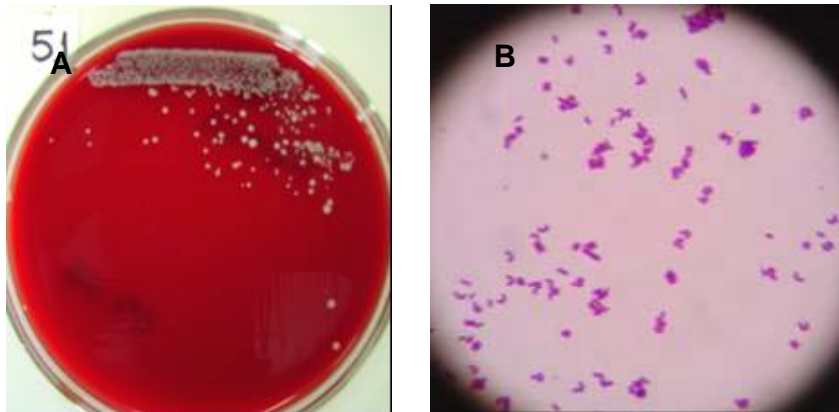


Figura 6: **A.** *C. amycolatum* colônias secas e pálidas, de contorno irregular, levemente acinzentadas em AS, β -hemólise negativa. **B.** Coloração de Gram (100x) de *C. amycolatum*, visualização de BGPs em paliçadas, em forma de V e L.

A espécie de *C. minutissimum* (Figura 7) apresentou colônias branca acinzentadas, brilhosas e úmidas, com contorno regular, que se tornavam largas após 72h de incubação (Figura 7B) (RENAUD et al., 1998). Na coloração de Gram visualizaram-se microrganismos tipicamente difteroides isolados, aos pares em forma de letras chinesas (FUNKE et al., 1997). A cepa exibia metabolismo fermentativo, com produção de ácido a partir maltose e xilose, com reações negativas para sacarose e manitol (GRANOK et al., 2002), com crescimento positivo em NaCl 6,5%.

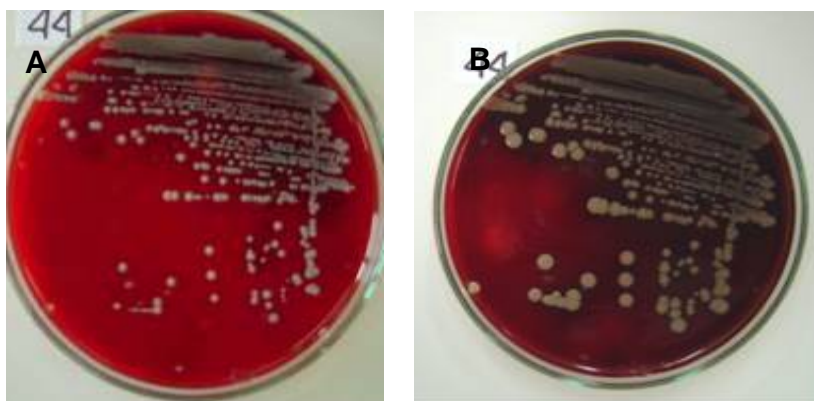


Figura 7: **A.** *C. minutissimum* colônias branca acinzentadas, brilhosas e úmidas, com contorno regular em AS após 24h de incubação. **B.** *C. minutissimum* as colônias tornaram-se amareladas e largas após 72h de incubação.

Os BGPs regulares (Tabela 4) identificados pela metodologia convencional constaram de uma espécie de *L. monocytogenes* e uma *Listeria* sp. (Figura 8) (Tabela 5).

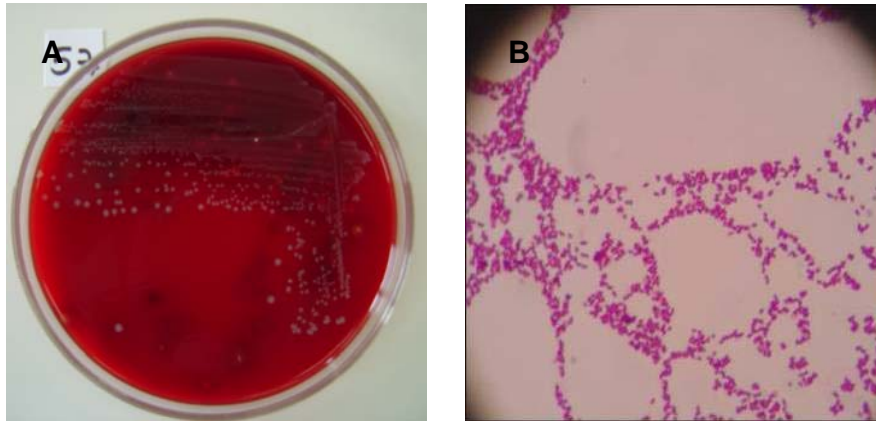


Figura 8: **A.** *Listeria* sp. com colônias de coloração levemente branca e bordas transparentes e ausência de β -hemólise em AS. **B.** Coloração de Gram (100x) a partir das colônias, demonstrando os cocobacilos Gram positivos.

A *L. monocytogenes* (Figura 9A e B) isolada de hemocultivo (Tabela 1), apresentou prova da catalase, CAMP (Figura 9D) e fermentação dos açúcares positivas, entretanto a produção de ácido a partir do manitol e da xilose foi negativa. As provas da urease e gelatinase também foram negativas. A tolerância ao NaCl 6,5% e a hidrólise da esculina foram positivas, assim como a motilidade, que apresentou forma de guarda-chuva à temperatura ambiente (25°C) e à 37°C (Figura 9C). Ao contrário do que diz Koneman et al. (2001) as reações nos tubos de TSI foram positivas. No exame direto da amostra microrganismos intracelulares não foram visualizados.

A *L. monocytogenes* ATCC 15313 utilizada para o controle das reações, não apresentou motilidade de guarda-chuva a 25°C e nem a 37°C, a prova da urease foi positiva, o que contradiz os manuais de bacteriologia (BILLE et al., 2003).

De acordo com a literatura, a identificação deste gênero é baseada em um número limitado de marcadores bioquímicos, entre os quais a hemólise é essencial para a diferenciação entre *L. monocytogenes* da espécie não patogênica mais freqüentemente isolada, a *L. innocua*. Devem ser observados também: morfologia no

Gram, reação de catalase positiva, hidrólise da esculina e produção de ácido a partir da glicose (KERR et al., 1993; BILLE et al., 2003).

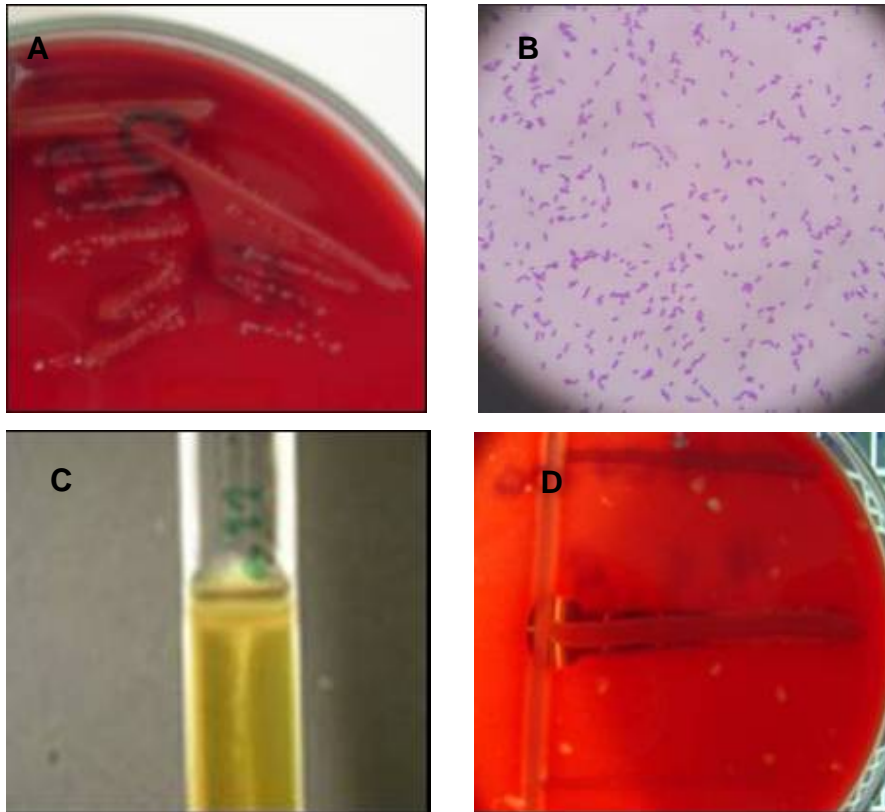


Figura 9: **A.** *L. monocytogenes* colônias pequenas (menores que 1mm de diâmetro), lisas e translúcidas, de coloração acinzentada com pequeno halo de β -hemólise. **B.** **Coloração de Gram (100x)** a partir da colônia foram visualizados pequenos cocobacilos Gram positivos não esporulados agrupados em paliçadas, pequenas cadeias, isolados e aos pares. **C.** **Motilidade** em forma de guarda-chuva característica do gênero. **D.** **Prova de CAMP** positiva formando uma ponta de flecha. Demonstra o sinergismo da hemólise entre β -hemolisina secretada pelo *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)(microrganismo semeado verticalmente na placa de AS) e o fator CAMP secretado pela *L. monocytogenes*.

A ocorrência de infecções por *L. monocytogenes* em indivíduos saudáveis normalmente está associada à ingestão de alimentos contaminados ou produtos de laticínios. Entretanto, os casos de bacteremia ocorrem em populações bem definidas como idosos, gestantes, recém nascidos e pacientes com doenças imunossupressoras. A habilidade da *Listeria* em penetrar na mucosa intestinal parece ser o fator singular para o início da bacteremia em indivíduos predispostos (BEBEE & KONEMAN, 1995).

Os BGPs esporulados foram facilmente identificados através da bateria de testes proposta, e as espécies encontradas foram na maioria aquelas pertencentes ao Grupo 1 ou Grupo do *Bacillus cereus*, concordando com os isolados citados por diversos autores (DROBNIIEWSKI, 1993; PRIEST et al., 2004; TURNBULL et al., 2004; von GRAEVENITZ, 2001).

A Tabela 8 mostra o predomínio das espécies de *Bacillus* em hemocultivos (91%). Todas as espécies deste gênero apresentaram halo de β -hemólise e prova da catalase positiva. A grande maioria das cepas mostrou-se Gram variável, podendo facilmente ser confundidas com os bacilos Gram negativos, entretanto o crescimento no ágar sangue azida, permitiu a distinção entre os organismos Gram positivos e Gram negativos.

As espécies de *B. cereus* (Figura 10) isoladas apresentaram reações idênticas às do *B. cereus* ATCC 14579, com utilização dos açúcares pela via fermentadora, produção de ácido a partir da glicose, sacarose e maltose. Provas do citrato, motilidade, gelatinase, hidrólise da esculina e crescimento a 42°C positivas. Segundo Koneman et al. (2001) a morfologia das colônias, reação hemolítica fraca ou negativa e ausência de motilidade distinguem o *B. cereus* do *B. mycoides*.

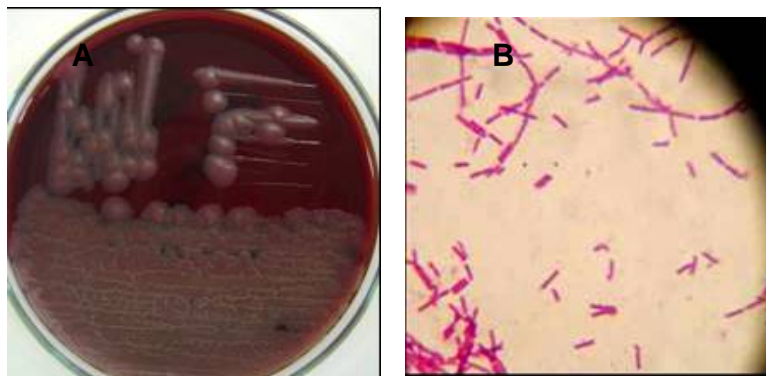


Figura 10: **A.** *B. cereus* colônias grandes e irregulares com grande halo de β -hemólise em AS. **B.** Coloração de Gram (100x) das colônias de *B. cereus*, com BGPs grandes, com extremidades quadradas, ocorrendo isolados ou em cadeias.

TABELA 8 - Espécies de BGPs esporulados identificados pela metodologia convencional

Grupo	N	%	Espécies identificadas	n	Amostras
Grupo 1 ou Grupo do <i>Bacillus cereus</i>	13	60%	<i>B. cereus</i>	5	Hemocultura
			<i>B. mycoides</i>	1	Hemocultura
			<i>B. megaterium</i>	2	Hemocultura SFO
			<i>B. licheniformis</i>	2	Hemocultura
			<i>B. thuringiensis</i>	2	Hemocultura
			<i>B. subtilis</i>	1	Hemocultura
Grupo 2	4	18%	<i>B. brevis</i>	2	Hemocultura SFO
			<i>B. coagulans</i>	1	Hemocultura
			<i>B. macerans</i>	1	Hemocultura
Grupo 3	4	18%	<i>B. sphaericus</i>	4	Hemocultura
Sem grupo	1	4%	<i>Bacillus</i> sp.	1	Hemocultura

Número total de microrganismos: 22(100%)

Durante o período do estudo 2 óbitos foram registrados, o primeiro caso foi de uma gestante adolescente que apresentava bacteremia por *B. cereus*, e o segundo registro de uma paciente oncológica, com neutropenia severa e quadro febril não superior a 38°C. A paciente foi a óbito devido septicemia por *B. sphaericus*.

B. cereus sempre esteve associado tanto com infecções alimentares como com infecções não gastrointestinais. Entretanto, recentemente, as infecções são usualmente, oportunistas e às vezes muito severas e de avanço rápido, oferecendo riscos à vida do paciente (TURNBULL et al., 2004).

A implicação de *B. thuringiensis* em infecções é rara, porém acontece, enquanto que o *B. mycoides* parece ser não patogênico (TURNBULL et al., 2004).

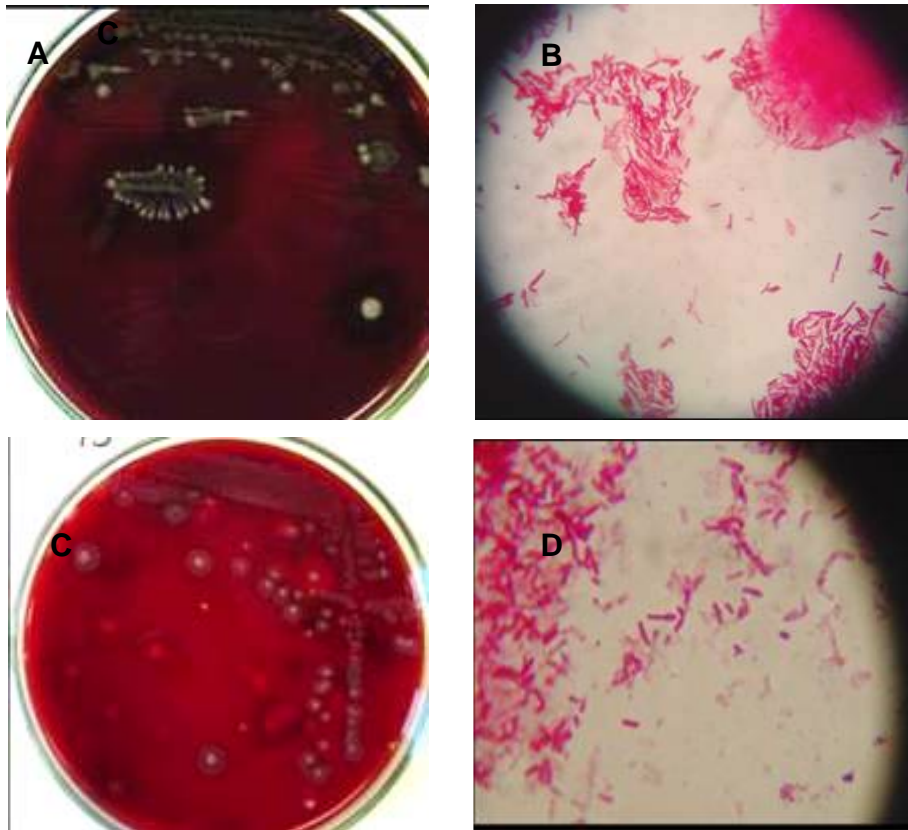


Figura 11: **A.** *B. mycooides* colônias grandes e rizóides, semelhantes a raízes que invadem o AS. **B.** **Coloração de Gram (100x)** de colônias de *B. mycooides*, a análise microscópica mostrou bacilos Gram positivos largos com endoesporos. **C.** *Bacillus* sp. colônias coloração cinzenta e bordas irregulares com grande halo de β -hemólise em AS. **D.** **Coloração de Gram (100x)** de colônias de *Bacillus* sp., com células Gram variáveis, que permitem a visualização de endoesporos terminais.

Relatos ocasionais têm implicado *B. thuringiensis*, *B. licheniformis*, *B. macerans*, *B. sphaericus* e *B. subtilis* em infecções sistêmicas e gastrointestinais (DROBNIIEWSKI, 1993). As espécies *B. coagulans*, *B. sphaericus*, *B. macerans* e *B. subtilis* têm causado septicemia, *B. subtilis* e *B. sphaericus* também estão relacionados a casos de endocardites e meningites (DROBNIIEWSKI, 1993 SANTINI et al., 1995; HERNANDEZ et al., 1998).

As espécies de *Bacillus*, outras que não o *B. anthracis* causam sérias infecções que, freqüentemente estão associadas ao trauma pós-cirúrgico e os casos de queimaduras, em indivíduos com condições pré disponentes como câncer, alcoolismo, diabetes e outros. Neoplasias bem como o uso de drogas endovenosas, hemodiálise, cateterização intravenosa, e diabetes são fatores significativos e que devem ser

considerados. Estas espécies possuem baixa patogenicidade, necessitando de uma porta de entrada e de um sistema imune comprometido para produzir uma infecção. A bacteremia com complicações sépticas é o tipo infecção predominante, sendo seguida pela pneumonia o que, sustenta a tese de que a inalação dos esporos é o modo de transmissão neste grupo de imunodeprimidos (BEBEE & KONEMAN, 1995).

Os 2 BGPs ramificados (Tabela 4) encontrados constaram exclusivamente de espécies de *Rhodococcus* isolados apenas de secreções traqueais (Tabela 1), em que as cepas mostraram-se praticamente não reativas aos testes bioquímicos, com exceção à prova da catalase e urease. A álcool-ácido resistência parcial citada por diversos autores não foi observada em ambos isolados (PRESCOTT, 1991, Mc NEIL & BROWN, 2003).

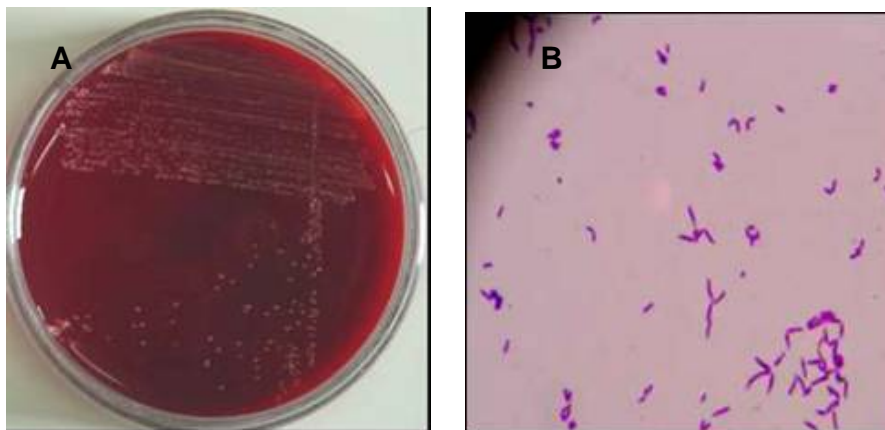


Figura 12: **A.** *Rhodococcus* sp. colônias de coloração salmão em AS após 24h de incubação. **B.** Coloração de Gram (100x) de colônias jovens de *Rhodococcus* sp., demonstrando formas cocobacilares.

4.3 Identificação dos BGPs pelo sistema API Coryne

As cepas identificadas pelo sistema API Coryne incluíram além dos microrganismos corineformes, os BGPs regulares não esporulados e os ramificados, totalizando 28 cepas.

O sistema comercial identificou 26 (92,8%) das 28 cepas isoladas, excetuando-se os BGPs esporulados. Os resultados foram obtidos seguindo-se exatamente as instruções do fabricante.

Os resultados dos testes bioquímicos encontrados utilizando as tiras do API Coryne foram lançados na base de dados do sistema API web DATABASE 2.0, e a partir das identificações obtidas através deste sistema, os microrganismos foram separados em 7 grupos (de A a G) como está demonstrado na Tabela 9.

TABELA 9 - Microrganismos identificados pelo sistema API Coryne DATABASE 2.0 distribuídos em grupos

Grupo	Identificação API	N=28	%
A	<i>Brevibacterium casei</i>	3	46%
	<i>Brevibacterium epidermidis</i>	1	
	<i>C. amycolatatum/striatum</i>	3	
	<i>C. jeikeium</i>	1	
	<i>C. minutissimum</i>	3	
	<i>Listeria innocua</i>	1	
	<i>L. monocytogenes</i>	1	
B	<i>Cellulomonas/Microbacterium</i>	5	18%
C	Fraca discriminação	4	14,4 %
D	<i>C. urealyticum</i>	1	3,6%
E	<i>Arthobacter</i> sp.	1	3,6%
F **	Perfil inaceitável	2	7,2%
G	<i>Brevibacterium</i> sp.	1	7,2%
	<i>Cellulomonas/Microbacterium</i>	1	

Legenda:

**Espécies não identificadas pela metodologia comercial

Número total de microrganismos: 28 (100%).

O grupo A (GA) corresponde a 46% (n=13) dos microrganismos que foram corretamente identificados ao nível de gênero, entretanto, testes adicionais foram necessários para a identificação correta até espécie.

O grupo B (GB) corresponde a 18% (n=5) dos isolados que tiveram boa identificação no gênero (maior que 90%), entretanto houve possibilidade de mais de uma interpretação devido às sobreposições de resultados bioquímicos de gêneros relacionados como *Microbacterium/Cellulomonas* e *Leifsonia aquatica* (Tabela 10), da mesma forma testes adicionais foram realizados para a correta identificação do gênero (BARREAU et al., 1993). Entretanto o resultado final permitiu ainda dupla interpretação para os gêneros *Microbacterium/Cellulomonas*, que de acordo com Lau et al. (2002) é um resultado comum para estes microrganismos, uma vez que o sistema comercial não distingue estes gêneros (LAU et al., 2002).

O grupo C (GC) refere-se a 14,4% (n=4) das identificações que apresentaram fraca discriminação entre os gêneros, de acordo com Gavin et al. (1992) este grupo deve ser considerado como não identificado pelo sistema API.

Já o grupo D (GD) refere-se a 3,6% (n=1) que foi corretamente identificado ao nível de espécie sem testes adicionais, e o grupo E (GE) a 3,6% (n=1) ao nível de gênero, enquanto que o grupo F (GF) representou 7,2% (n=2) correspondendo àqueles microrganismos que apresentaram perfil numérico inaceitável, ou seja, não pertencente a nenhum microrganismo constante no banco de dados do sistema (SOTO et al., 1994). O grupo G (GG) corresponde a 7,2% (n=2) em que os resultados do sistema API não concordavam com os da identificação manual, neste contexto e de acordo com Soto et al. (1994), foram considerados como incorretamente identificados. Da mesma forma, somando-se os grupos C e F, tem-se uma porcentagem de 21,6% (n=6) de microrganismos não identificados pelo sistema comercial.

Das 28 cepas de BGPs identificadas pelo sistema API Coryne, apenas 7,2% (n=2) foram identificadas corretamente a nível de espécie (GD) ou gênero (GE) sem testes adicionais. Em 65,3% (n=18) das cepas, testes suplementares foram necessários para uma correta identificação ou do gênero ou da espécie. No total, o sistema API Coryne forneceu: 71,2% (n=20) de identificações corretas (GA, GB, GD e GE), 21,6% (n=6) de cepas não identificadas (GC e GF) e 7,2% (n=2) identificadas incorretamente (GG). Funke et al. (1997b) encontraram 90,5% de identificações corretas pelo sistema API, sendo que para 55,1% testes adicionais foram efetuados, enquanto que 5,6% das cepas não foram identificadas e 3,8% tiveram identificações incorretas. Freney et al.

(1991) reportaram a necessidade de execução de testes complementares em 31,8% dos isolados, enquanto que Gavin et al. (1992) executaram testes suplementares para apenas 4% dos isolados. Em contraste, neste estudo 64% dos isolados necessitaram de testes complementares. Esta discrepância encontrada se deve ao fato de alguns resultados das provas bioquímicas convencionais e do sistema API serem divergentes para as provas da urease, gelatinase e hidrólise da esculina. Para a prova da urease a diferença encontrada foi de 43,2% (n=12) onde todos os 28 microtubos do sistema API apresentaram resultados negativos. Para a gelatinase os resultados divergiram em 25,2% (n=7), sendo que as provas manuais foram negativas, enquanto que os do sistema comercial foram positivas. Para a hidrólise da esculina a porcentagem de diferença foi de apenas 10,8% (n=3). Segundo Bernard (2005) as provas da gelatinase e hidrólise da esculina são essenciais para a identificação correta dos gêneros.

Os testes adicionais efetuados foram os mesmos citados por diversos autores, e constaram de morfologia e pigmentação das colônias, crescimento a 42%, prova de CAMP, tolerância ao NaCl 6,5%, hemólise, tipo de metabolismo (FRENEY et al., 1991; GAVIN et al., 1992; KERR et al., 1993; SOTO et al., 1994; VON GRAEVENITZ et al., 1994; FUNKE et al., 1997).

A Tabela 10 compara os resultados da identificação convencional proposta aos do sistema API Coryne. Da mesma forma que na Tabela 9, os isolados aparecem divididos nos mesmos grupos, entretanto os resultados divergentes encontrados para os gêneros nos grupos C e G estão indicados.

A análise da Tabela 10 permite concluir que em 68,4% (n=19) das análises, os gêneros identificados pela metodologia convencional foram os mesmos encontrados através do sistema API Coryne; em 25,2% (n=7) os resultados foram divergentes, enquanto que em 7,2% (n=2) ambos os métodos fenotípicos não identificaram o gênero. Os resultados divergentes citados acima incluem a cepa não identificada pela metodologia convencional (GA), os 4 microrganismos não identificados pelo API (GC) e os 2 integrantes do grupo G que foram erroneamente identificados pelo sistema comercial.

TABELA 10 - Comparação entre os resultados das identificações obtidos pelo sistema API Coryne e pelos testes bioquímicos convencionais

GRUPO	API	MANUAL	N
A	<i>Brevibacterium casei</i>	<i>Brevibacterium</i> sp.	2
	<i>Brevibacterium epidermidis</i>	<i>Brevibacterium</i> sp.	1
	<i>Brevibacterium casei</i> .	**	1
	<i>C. amycolatum/striatum</i>	<i>C. amycolatum</i>	1
	<i>C. amycolatum/striatum</i>	<i>Corynebacterium</i> sp.	1
	<i>C. jeikeium</i>	<i>Corynebacterium</i> sp.	2
	<i>C. minutissimum</i>	<i>C. amycolatum</i>	1
	<i>C. minutissimum</i>	<i>Corynebacterium</i> sp.	1
	<i>Corynebacterium urealyticum</i>	<i>Corynebacterium</i> sp.	1
	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria</i> sp.	1
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	1
B	<i>Cellulomonas/Microbacterium</i> <i>Leifsonia aquatica</i>	<i>Microbacterium</i> sp.	3
	<i>Cellulomonas/Microbacterium</i> <i>Leifsonia aquatica</i>	<i>Cellulomonas</i> sp.	2
C	<i>Brevibacterium/Microbacterium/Rhodococcus</i>	<i>Corynebacterium</i> sp.	1
	<i>Brevibacterium/Rhodococcus/Corynebacterium</i>	<i>Microbacterium</i> sp.	1
	<i>Cellulomonas/Microbacterium/Arthrobacter</i>	<i>Rhododoccus</i> sp.	2
D	<i>Corynebacterium urealyticum</i>	<i>Corynebacterium</i> sp.	1
E	<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>Arthrobacter</i> sp.	1
F	*	**	2
G	<i>Brevibacterium</i> sp.	<i>Corynebacterium</i> sp.	1
	<i>Cellulomonas/Microbacterium</i>	<i>C. minutissimum</i>	1

*Espécies não identificadas pela metodologia comercial

** Espécies não identificadas pela metodologia convencional

Número total de microrganismos: 28 (100%).

O sistema API Coryne identificou 49,6% (n=14) das cepas a nível de espécie, 21,6% (n=6) a nível de gênero, 21,6% (n=6) dos isolados não foram identificados assim como 7,2% (n=2) das identificações estavam erradas (GAVIN et al., 1994). Enquanto

que a metodologia convencional identificou 18% (n=5) a nível de espécie, 71,2% (n=20) a nível de gênero e não conseguiu identificar 10,8% (n=3).

A superioridade do sistema API Coryne na identificação das espécies deve às 11 enzimas que podem ser testadas nas tiras, enquanto que a na metodologia convencional apenas 3 destas enzimas foram avaliadas (bile-esculinase, gelatinase e urease). Entretanto a metodologia convencional identificou corretamente a nível de gênero mais de 50% das cepas, utilizando provas que não constam na tiras do API Coryne, porém, sendo mesmas sugeridas para os testes complementares. Neste contexto, a bateria convencional, permitiu a realização destas provas de uma só vez, enquanto que para o sistema API Coryne são efetuadas em tempo superior à 24h.

4.4 Teste de sensibilidades aos antimicrobianos

Os estudos de susceptibilidade aos antimicrobianos contra BGPs ainda são pouco relatados na literatura internacional, e os existentes não possuem uma homogeneidade de técnica, uma vez que estes testes não possuem uma padronização nem pontos de corte estabelecidos e aprovados pelo CLSI. Neste contexto, as referências bibliográficas reportam ensaios variados (MARTÍNEZ et al., 1995; WEISS et al., 1996), que utilizam a disco-difusão ou microdiluição para avaliar a sensibilidade destas cepas, utilizando os “break-points” para estreptococos, estafilococos ou listérias. Entretanto os métodos de microdiluição permanecem como os padrões mais utilizados (Von GRAEVENITZ, 2001).

Henandez et al. (1998) citam boa correlação entre os resultados das MICs obtidos com o E-test com os halos da disco-difusão para algumas espécies de *Bacillus*, utilizando os breakpoints sugeridos pelo CLSI para os *Staphylococcus*.

A Tabela 11, a seguir, indica os grupos dos BGPs isolados e o perfil de sensibilidade frente aos antimicrobianos testados, expresso em porcentagem de cepas sensíveis.

TABELA 11 - Suscetibilidade aos antimicrobianos dos grupos de BGPs expressa em porcentagem de cepas sensíveis

Antimicrobiano	BGPs irregulares (24)		BGPs esporulados (22)	BGPs regulares (2)	BGPs ramificados (2)
	Corineformes (13)	<i>Corynebacterium</i> (11)	<i>Bacillus</i>	<i>Listeria</i>	<i>Rhodococcus</i>
AMC	54	64	75	100	50
AMI	77	73	80	100	0
AMP	46	36	50	0	0
AZI	69	36	85	100	100
CAZ	30	45	45	0	50
CFO	38	27	60	0	0
CIP	46	54	95	0	50
CLI	30	9	20	0	50
CRO	46	45	75	50	50
CTX	38	5	65	0	50
GEN	61	6	95	100	100
IPM	61	63	100	100	50
LZD	61	72	95	100	100
MER	61	63	100	100	50
OXA	15	9	45	0	0
PEN	15	9	45	0	0
SUT	69	45	85	100	100
TET	61	54	80	0	0
VAN	87	100	100	100	50

Legenda:

AMI, amicacina; AMC, amoxicilina/ácido clavulânico; AMP, ampicilina; AZI, azitromicina; CAZ, ceftazidime; CTX, cefotaxime; CFO, cefoxitina; CRO, ceftriaxone; CIP, ciprofloxacina; CLI, clindamicina; GEN, gentamicina; IMI, imipenem, LDZ, linezolida, MER, meropenem; OXA, oxacilina; PEN, penicilina; SFT, sulfametoxazol/trimetoprima; TET, tetraciclina e VAN vancomicina.

Números de microrganismos:50(100%)

De acordo com a Tabela 11 a maioria das espécies de *Corynebacterium* exibiu perfil de sensibilidade heterogêneo frente aos antimicrobianos testados, com resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos, entretanto todas as espécies foram sensíveis à vancomicina (CAMELLO et al., 2003).

As espécies de *C. amycolatum*, *C. urealyticum*, *C. jeikeium*, *C. minutissimum*, foram espécies que apresentaram multirresistência. Da mesma forma, este perfil de resistência é comumente citado na literatura (GARCIA-BRAVO, et al., 1995; JANDA, 1998a; LAGROU et al., 1998; NIETO et al., 2000; MOOKADAM et al., 2006).

Alguns autores (GARCIA-BRAVO et al., 1996; WEINSTOCK & BROWN, 2002) sugerem que a múltipla resistência dos BGPs é adquirida diretamente do ambiente

hospitalar e que o uso abusivo de antibióticos como medida profilática, favorece o surgimento da resistência entre os microrganismos. Santamaría (1985) relatou o isolamento de cepas de *C. urealyticum* sensíveis a muitos antibióticos, o que não mais ocorre atualmente, pois os isolados encontrados recentemente desenvolveram resistência a diversos antimicrobianos de uso hospitalar (NIETO et al., 2000).

Para estas espécies intrinsecamente resistentes como *C. jeikeuim* e *C. urealyticum* os glicopeptídeos (vancomicina ou teicoplanina) parecem ser os únicos antibióticos efetivos para o tratamento (von GRAEVENITZ, 2001).

As espécies de *Brevibacterium* mostraram sensibilidade a amicacina, tetraciclina, vancomicina, linezolida e sulfametoxazol/trimetoprima, com resistência ao β -lactâmicos, ciprofloxacina e clindamicina (FUNKE et al., 1997b; TROXLER et al., 2001).

As espécies de *Cellulomonas* apresentaram perfis de sensibilidades variados, entretanto mostraram sensibilidade à tetraciclina, vancomicina, linezolida e aos carbapenêmicos, entretanto foram resistentes à oxacilina (FUNKE et al., 1997b).

O perfil de sensibilidade encontrado para o gênero *Microbacterium* é o mesmo relatado por Funke (1997) e Lau (2001) onde os isolados eram resistentes aos β -lactâmicos e aos aminoglicosídeos.

Dos 3 microrganismos corineformes não identificados pelas 2 metodologias, 2 cepas apresentaram multirresistência aos antibióticos, inclusive à vancomicina, linezolida e aos carbapenêmicos, entretanto foram sensíveis apenas ao sulfametoxazol/trimetoprima. A cepa restante era sensível a todos antimicrobianos testados, inclusive às penicilinas. A resistência encontrada pela disco-difusão foi confirmada pelas tiras de E-test vancomicina.

A resistência encontrada para a penicilina e ampicilina frente às espécies de *Listerias* (Tabela 11) diverge dos resultados citados por alguns autores que utilizaram a microdiluição em caldo, método este sugerido como padrão pelo CLSI para a realização do TSA destas espécies. As cepas testadas por Charpentier & Courvalin (1999) foram sensíveis a estes antimicrobianos (von GRAEVENITZ, 2001). Esta diferença pode ser devido aos diferentes métodos empregados para a realização do TSA e os “break-points” utilizados. Para os demais antibióticos, os resultados foram concordantes, com resistência para as cefalosporinas, clindamicina e tetracilina (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ

et al., 2001), e sensibilidade para os carbapenêmicos, ciprofloxacina, linezolida, vancomicina, sulfametoxazol/trimetoprima e gentamicina. Penicilina ou ampicilina em associação à gentamicina são as drogas de escolha para o tratamento das infecções por *Listeria* spp. Em pacientes alérgicos ou em cepas resistentes, a outra opção é a associação ao sulfametoxazol/trimetoprima (DROBNIIEWSKY, 1993; von GRAEVENITZ, 2001).

O perfil de sensibilidade encontrado através da disco-difusão para as espécies do grupo dos BGPs esporulados (Tabela 11), foi semelhante aos citados por outros autores para os métodos de microdiluição (HERNANDEZ et al., 1998; ANDREWS & RISE, 2002; TURNBULL et al., 2004). Onde as cepas do *B. cereus* e as espécies afins apresentaram resistência à maioria dos antibióticos β -lactâmicos (dado não mostrado) devido à presença das β -lactamases intrínsecas comumente encontradas entre estas espécies, entretanto, todas as cepas foram sensíveis aos carbapenêmicos (imipenem e meropenem) já que estes antimicrobianos são resistentes a estas enzimas. As outras espécies também apresentaram resistências às penicilinas, clindamicina e às cefalosporinas de 3ª geração (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona) (von GRAEVENITZ, 2001). Ciprofloxacina, gentamicina, linezolida, imipenem, meropenem e vancomicina foram bastante ativas contra os microrganismos deste grupo, sendo boas alternativas para o tratamento e profilaxia.

As amostras de *Rhodococcus* testadas apresentaram perfil de suscetibilidade semelhante aqueles encontrados por alguns autores para as espécies de *R. equi*, onde os microrganismos são tipicamente resistentes às penicilinas (Tabela 11) (von GRAEVENITZ, 2001), com isolados sensíveis à gentamicina (PRESCOTT, 1991; McNEIL & BROWN, 1994) e a linezolida (BOWERSOCK et al., 2000), enquanto que um padrão variado de sensibilidade frente à amicacina, ciprofloxacina, imipenem, meropenem, sulfametoxazol/trimetoprima e vancomicina são citados por Nordman & Ronco (1992), com seleção de mutantes resistentes a estes antimicrobianos, devido à monoterapia sucessiva com estes agentes. A confirmação da resistência para a vancomicina foi confirmada pela fita de E-test vancomicina. Esta resistência encontrada para a vancomicina não é um fato isolado, sendo também citada por Hsueh (1998), que isolou de 7 cepas de *R. equi* em Taiwan, onde 3 destes isolados foram resistentes à

vancomicina, enquanto que na Itália as 12 cepas testadas foram sensíveis à vancomicina (WEINSTOCK & BROWN, 2002). Segundo os autores as variações geográficas também influenciam o padrão de sensibilidade destes microrganismos, e deve ser um fator considerado no momento da seleção dos antibióticos para a terapia empírica (WEINSTOCK & BROWN, 2002). Além disso, estas espécies têm a capacidade de adquirir resistência após o tratamento empírico com múltiplas drogas, incluindo penicilina, eritromicina, vancomicina, sulfametoxazol/trimetoprima, entre outros.

O tratamento das infecções por BGPs corineformes e ramificados dos gêneros *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Microbacterium* e *Rhodococcus*, entre outros, ainda são restritos, entretanto os testes de sensibilidade são necessários, principalmente após o surgimento de resistência à vancomicina em cepas de *Aureobacterium*, *Leifsonia aquatica* (anteriormente denominada *C. aquaticum*)(FUNKE et al., 1994b; NOLTE et al., 1995) e *Rhodococcus*.

5. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho de pesquisa permitem concluir que:

A bateria de testes bioquímicos proposta:

- Mostrou-se um sistema útil e prático para a identificação dos BGPs aeróbios, não identificando apenas 10,8% dos microrganismos.

O sistema API Coryne:

- Não foi eficiente para a identificação de 28,8% dos microrganismos isolados.

Ao compararmos as metodologias:

- Em relação às identificações observou-se concordância de resultados em 68,4% das amostras; em 25,2% dos casos houve divergência de resultados.
- Quanto aos custos o sistema API Coryne mostrou-se mais dispendioso que a metodologia convencional.
- Quanto à validade das baterias bioquímicas, os frascos dos reagentes de cor do sistema API Coryne degradam em tempo inferior a 30 dias, enquanto que os tubos com meio de cultura utilizados na metodologia convencional podem ser armazenados sob refrigeração por até 6 meses.

Utilização na rotina laboratorial:

- Os testes propostos mostraram-se uma boa opção de metodologia para a identificação de BGPs em laboratórios de pequeno a médio porte, podendo facilmente ser absorvido pela rotina laboratorial.
- A identificação fenotípica de alguns gêneros permanece complexa, pois muitas espécies só podem ser identificadas por técnicas genômicas ou quimiotaxônicas, ou ainda encontra-se em revisões taxonômicas.

Em relação à suscetibilidade:

- Conclui-se que a metodologia da disco-difusão não é um bom método para a avaliação da sensibilidade do gênero *Listeria*.
- A multirresistência detectada em algumas espécies e os óbitos ocorridos, são achados clínicos que sinalizam a necessidade de maior atenção na identificação dos processos infecciosos oportunistas causados pelos BGPs

- Embora os métodos para a avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos não possuam ainda padronização, estes testes devem ser efetuados, no intuito de que um tratamento antimicrobiano inapropriado não seja instituído.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREWS, J. M.; WISE, R. Susceptibility testing of *Bacillus* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49(6), p. 1039-1046, 2002.

ANTHONY, R. M.; NOBLE, W. C.; PITCHER, D. G. Characterization of aerobic non-lipophilic coryneforms from human feet. **Clinical Experimental Dermatology**, v.17, p. 102-105, 1992.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Manual de Microbiologia Clínica para o controle de infecção em serviços de saúde** - Módulo V- p.45-55, 2004.

BEBEE, J. L.; KONEMAN, E. W. Recovery of uncommon bacteria from blood: association with neoplastic disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8(3), p. 336-356, 1995.

BERNARD, K. A. et al. Characteristics of rare or recently described *Corynebacterium* species recovered from human clinical material in Canada. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40(11), p.4375-4381, 2002.

BERNARD, K. A. *Corynebacterium* species and Coryneforms: an update on taxonomy and disease attributed to these taxa. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 27(2), p. 9-18, 2005.

BILLE, J.; ROCOURT, J.; SWAMINATHAN, B. *Listeria* and *Erysipelothrix*. In Murray, P. R.; Baron, E. J.; Tenover, F. C.; Tenover, F. C.; Tenover, F. C.; Yolken, R. H. M. **Manual of Clinical Microbiology**, 8^a Ed. American Society for Microbiology: Washington, 2003, p.461-471.

BOWERSOCK, T. L. et al. MICs of oxazolidones for *Rhodococcus equi* strains isolated from human and animal. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 1367-1369, 2000.

BROWN, J. M.; McNEIL, M. M. *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Actinomadura*, *Streptomyces*, and other aerobic Actinomycetes. In Murray, P. R.; Baron, E. J.; Tenover, F. C.; Tenover, F. C.; Yolken, R. H. M. **Manual of Clinical Microbiology**, 8^a Ed. American Society for Microbiology: Washington, 2003, p.502-535.

CAMPBELL, P. B.; PALLADINO, S.; FLEXMAN J. P. Catheter-related septicemia caused by vancomycin-resistant Coryneform CDC group A-5. **Pathology**, v. 26, p. 56-58, 1994.

CAMELLO, T. C. F. et al. Nondiphtherial *Corynebacterium* species isolated from clinical specimens of patients in a university hospital, Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 39-44, 2003.

CARRATALÀ, J. et al. Randomized, double-blind trial of an antibiotic-lock technique for prevention of Gram positive central venous catheter-related infection in Neutropenic patients with cancer. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43(9), p. 2200-2204, 1999.

CARTWRIGHT, C. P. et al. Rapid method presumptive identification of *Corynebacterium jeikeium*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31(12), p. 3320-3322, 1993.

CHARPENTIER, E.; COURVALIN, P. Antibiotic resistance in *Listeria* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43(9), p. 2103-2109, 1999.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI – formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards- NCCLS). **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; Approved Standard – Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 , Wayne, Pa. USA, 2005.

COYLE, M. B.; LIPSKY, B. A. Coryneform bacteria in infectious disease: clinical and laboratory aspects. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3(3), p. 227-246, 1990.

CUMMINS, A. J.; FIELDING, A. K.; McLAUCHLIN, J. *Listeria ivanovii* infection in a patient with AIDS. **Journal of Infectology**, v. 3(3), p. 227-246, 1990.

DAMGAARD, P. H., et al. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from infections in burn wounds. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 18(1), p. 47-53, 1997.

DE BRIEL, D., et al. High-performance liquid chromatography of corynomicolic acids as a tool in identification of *Corynebacterium* species and related organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30(6), p.1407-1417, 1992.

FUNKE, G.; von GRAEVENITZ, A.; WEISS, N. Primary identification of *Aureobacterium* spp. Isolated from clinical specimens as "Corynebacterium aquaticum". **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32(9), p. 2686-2691, 1994.

FUNKE, G.; FALSEN, E.; BARREAU, C. Primary identification of *Microbacterium* spp. Encountered in clinical specimens as CDC Coryneform group A-4 and A-5 bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 188-192, 1995a.

FUNKE, G.; RAMOS, C. P.; COLLINS, M. D. Identification of some clinical strains of CDC Coryneform group A-3 and A-4 bacteria as *Cellulomonas* species and proposal of *Cellulomonas hominis* sp. nov. for some group A-3 strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33(8), p. 2091-2097, 1995b.

FUNKE, G. et al. Isolation of *Arthrobacter* spp. from clinical specimens and description of *Arthrobacter cumminsii* sp. nov. *Arthrobacter woluwensis* sp. nov. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34(14), p. 2356-2363, 1996.

FUNKE, G. et al. Clinical microbiology of Coryneform bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10(1), p. 125-129, 1997a.

FUNKE, G. et al., Multicenter evaluation of the update and extended API (RAPID) Coryne database 2.0. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35(12), p. 3122-3126, 1997b.

FUNKE, G. et al. *Aureobacterium resistens* sp. nov. exhibiting vancomycin resistance and teicoplanin susceptibility. **FEMS Microbiology Letters**, v. 158, p. 89-93, 1998a.

FUNKE, G. et al. Characteristics of *Arthrobacter cumminsii*, the most frequently encountered *Arthrobacter* species in human clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36(6), p. 1539-1543, 1998b.

GALANOS, J. et al. Bacteremia due to three *Bacillus* species in a case of Munchausen's syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41(5), p. 2247-2248, 2003.

GASANOV, U.; HUGHES, D.; HANSBRO, P. M. Methods for a isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 851-875, 2006.

GAVIN, S. E. et al. Evaluation of rapid CORYNE identification system for *Corynebacterium* species and other Coryneforms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30(7), p. 1692-1695, 1992.

GRANOK, A. B.; BENJAMIN, P.; GARRET, L. S. *Corynebacterium minutissimum*: bacteriemia in an immunocompetent host with cellulitis. **Clinical Infectious Disease**, v. 35, p. 40-42, 2002.

GROSS, P. A. et al. Quality standart for treatment of bacteriemia. **Clinical Infection Diseases**, v. 18, p. 428-430, 1994.

GRUNER, E. et al. Human infectious caused by *Brevibacterium casei*, formely CDC Groups B-1 and B-3. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32(6), p. 1511-1518, 1994.

HAN, C. S. et al. Pathogenomic sequence analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates closely related to *Bacillus anthracis*. **Journal of Bacteriology**, v. 188(9), p. 3382-3390, 2006.

HERNANDEZ, E. et al. *Bacillus thuringiensis* subsp. *konkukian* (serotype H34) superinfection: case report and experimental evidence of pathogenicity in immunossupressed mice. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36(7), p. 2138-2139, 1998.

HORN, K. G. V.; GEDRIS, A. C.; RODNEY, K. M. Selective isolation of vancomicina resistant enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34(4), p. 924-927, 1996.

HÖRNER, R., CAMELLO, T. C. F., DAL FORNO, N. F. Endocardite por *Bacillus cereus*: relato de caso. In: **38° Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial** Florianópolis, Brasil, 2004. CD ROOM.

HSUEH, P. R. et al. Report of invasive *Rhodococcus equi* infections in Taiwan, with an emphasis on the emergence of multidrug-resistant strains. **Clinical Infection Diseases**, v. 27(2), p. 370-375, 1998.

HUDSPETH, M. K. et al. Evaluation of rapid CB plus system for identification of *Corynebacterium* species and other Gram positive rods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36(2), p. 543-547, 1998.

KONEMAN E. W, et al. **Diagnóstico Microbiológico** - Texto e atlas colorido, 5ª Edição, MEDSI. Rio de Janeiro, RJ, 2001.

MARTÍN, M. C. et al. Septicemia due to *Corynebacterium striatum* molecular confirmation of entry via the skin. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, p. 599-602, 2003.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L. et al. Phenotypic characteristics of 31 strains of *Corynebacterium striatum* isolated from clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33(9), p. 2458-2461, 1995.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L., ORTEGA, M. C., SUÁREZ, I. A. Comparison of E-test with broth microdilution and disk diffusion for susceptibility testing of Coryneform bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33(5), p. 1318-1321, 1995.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L., et al. Activities of gemifloxacin and five other antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* and coryneform bacteria isolated from clinical samples. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45(8), p. 2390-2392, 2001.

McNEIL, M. M.; BROWN, J. M. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7(3), p. 357-417, 1994.

MOOKADAM, F. et al. *Corynebacterium jeikeium* endocarditis: a systematic overview spanning four decades. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease**, v.25, p. 349-353, 2006.

MURRAY, P. R. **Microbiologia Médica**, 4ª Edição, Guanabara-Koogan, Aparecida, SP,. 2004.

NIETO, E. et al. Biochemical, antimicrobial susceptibility and genotyping studies on *Corynebacterium urealyticum* isolate from diverse sources. **Journal Medical Microbiology**, v. 49, p. 759-763, 2000.

NOLTE, F. S. et al. Vancomycin-resistant *Aureobacterium* species cellulitis and bacteremia in a patient with acute myelogenous leukemia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34(8), p. 1992-1994, 1996

NORDMAN, P.; RONCO, E. In vitro antimicrobial susceptibility of *Rhodococcus equi*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 29, p. 383-393, 1992.

OTEO, J. et al. Bacteriemias significativas por *Corynebacterium amycolatum*: um patógeno emergente. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 19, p. 103-106, 2001.

PENNA, T. C. V., MACHOSHVILI, I. A. Esterilização térmica. Conceitos básicos da cinética da morte microbiana. **Revista Farmácia e Bioquímica** Universidade de São Paulo, v. 1, p.1-5, 1997.

PRESCOTT, J. F. *Rhododcoccus equi*: an animal and human pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, p. 20-34, 1991.

PRIEST, F. G. et al. Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. **Journal of Bacteriology**, v. 186 (23), p. 7959-7970, 2004.

RAAD, I. et al. Antibiotics and prevention of microbial colonization of catheters. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v. 39(11), p. 2397-2400, 1995.

RAAD, I. et al. Differential time to positive: a useful method for diagnosing catheter-related bloodstream infections. **Annals of Internal Medicine**, v. 140(1), p. 18-25, 2004.

RASMUSSEN, T.T. et al. Resident aerobic microbiota of the adult human nasal cavity. **APMIS**, v. 108(10), p. 663-675, 2000.

RICHTER, S. S. et al. Minimizing the workup of blood culture contaminants: implementation and evaluation of a laboratory-based algorithm. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40(7), p. 2437-2444, 2002.

SANTAMARÍA, M. et al. Antimicrobial susceptibility of *Corynebacterium* group D2. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v. 28, p. 845-846, 1985.

SANTINI, F. et al. *Bacillus licheniformis* prosthetic aortic valve endocarditis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33(11), p. 3070-3073, 1995.

SHUKLA, S. K. et al.; *Corynebacterium nigricans* sp nov.: proposed name for a black-pigmented *Corynebacterium* species recovered from the human female urogenital tract. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41(9), p. 4353-4358, 2003.

SILVA, C. H. P. M.; NEUFELD, P. M. **Bacteriologia e Micologia para o Laboratório Clínico**. Revinter. Rio de Janeiro, RJ, 2006.

SJÖDEN, B. et al. Description of some Coryneform bacteria isolated from human clinical specimens as *Corynebacterium falsenii* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 69-74, 1998.

TANG, Y. W. et al. Identification of Coryneform bacterial isolates by ribosomal DNA sequence analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38(4), p. 1676-1678, 2000.

TON-THAT, H.; SCHNEEWIND, O. Assembly of pili in Gram positive bacteria. **TRENDS in Microbiology**, v. 12(5), p. 228-234, 2004.

TROXLER, R. et al. Natural antibiotic susceptibility of recently established Coryneform bacteria. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease**, v.20, p. 315-323, 2001.

TURNBULL, P. C. B. et al. MICs of selected antibiotics for *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, and *Bacillus mycoides* from a range of clinical and environmental sources as determined by the E-test. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42(8), p. 3626-3634, 2004.

VÁSQUEZ-BOLAND, J. A. et al. *Listeria* pathogenesis and molecular determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14(3), p. 584-640, 2001.

VERVILLE, T. D. et al. *Rhododoccus equi* in humans: 12 cases and review of the literature. **Medicine**, v. 73(3), p. 119-132, 1994.

VISCOLI, C.; VARNIER, O.; MACHETTI, M. Infections in patients with febrile neutropenia: epidemiology, microbiology, and risk stratification. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40(4), p. 240-245, 2005.

VON GRAEVENITZ, A. Antimicrobial therapy of infections with aerobic Gram positive rods. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 7(4), p. 43-46, 2001

WAUTERS, G. et al. Identification of a novel *Brevibacterium* species isolated from humans and description of *Brevibacterium sanguinis* sp. nov. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42(6), p. 2829-2832, 2004.

WEISTOCK, D. M.; BROWN, A. E. *Rhododoccus equi*: an emerging pathogen. **Clinical Infection Diseases**, v. 34, p. 1379-1385, 2002.

WEISS, K.; LAVERDIÈRE, M.; RIVEST, R. Comparison of antimicrobial susceptibility of *Corynebacterium* species by microdilution and disk diffusion methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40(4), p. 930-933, 1996.

ZOCCOLI, C.; et al. **Procedimentos básicos em Bacteriologia Clínica**. Sarvier. Rio de Janeiro, RJ, 2004.