



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Paula Marcele Afonso Pereira

**Ocorrência e caracterização de Estafilococos coagulase negativos isolados
de recém-nascidos com bacteremias em unidade de terapia intensiva
neonatal no HUPE-UERJ**

Rio de Janeiro

2012

Paula Marcele Afonso Pereira

Ocorrência e caracterização de Estafilococos coagulase negativos isolados de recém-nascidos com bacteremias em unidade de terapia intensiva neonatal no HUPE-UERJ

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ana Luiza de Mattos Guaraldi

Rio de Janeiro

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

P436 Pereira, Paula Marcele Afonso.

Ocorrência e caracterização de Estafilococos coagulase negativos isolados de recém-nascidos com bacteremias em unidade de terapia intensiva neonatal no HUPE-UERJ / Paula Marcele Afonso Pereira.
98 f. : il.

Orientador: Ana Luiza de Mattos Guaraldi.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto Faculdade de Ciências Médicas. Pós-Graduação em Ciências Médicas.

1. Staphylococcus haemolyticus. 2. Resistência em microorganismos - Teses. 3. UTI – Crianças – Teses. 4. Eletroforese em gel de campo pulsado. 5. Recém-nascidos – Cuidado e higiene. 6. Infecções relacionadas a cateter. 7. Infecção hospitalar – Teses. I. Guaraldi, Ana Luiza de Mattos. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.94-022.7:616.053.31

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Paula Marcele Afonso Pereira

Ocorrência e caracterização de Estafilococos coagulase negativos isolados de recém-nascidos com bacteremias em unidade de terapia intensiva neonatal no HUPE-UERJ

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia.

Aprovada em 25 de maio de 2012.

Orientadora:

Prof.^a Dra. Ana Luiza de Mattos Guaraldi
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Luíz Muniz Bandeira Duarte
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Alessandra Mattos Saliba
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Eliezer Menezes Pereira
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro - IFRJ

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas contribuíram para a minha evolução profissional e pessoal. Agradeço a todos que participaram deste percurso, carinhosamente, a minha gratidão a estas pessoas tão especiais.

À Deus, pois sem fé, eu não chegaria em lugar nenhum.

Minha família, que sempre me incentivou na busca de uma evolução profissional, principalmente meu marido Felipe Ribeiro que sempre me apoiou em tudo, me dando força e confiança sempre.

Aos meus pais, Paulo e Sueli, que me ensinaram a caminhar pelo lado bom da vida.

Minha irmã, me ajudando sempre em que precisei, e meu cunhado Rafael pelo apoio.

Aos meus orientadores, Professora Ana Luiza de Mattos Guaraldi, que confiou em mim e me ensinou tudo que sei, e pelo seu apoio nas horas em que precisei, e professor José Augusto Adler Pereira, que me acompanha desde a graduação e agora nesta etapa da minha vida, sempre me apoiando e ajudando sempre que preciso.

A Professora Kátia Santos (UFRJ), pela orientação e possibilidade de realizar diagnósticos e a técnica de PFGE, e sua equipe sem os quais parte deste trabalho não seria possível.

Ao Professor Eduardo A. Castro por me orientar em relação a coleta das amostras e obtenção dos dados clínicos dos pacientes.

Ao Professor José Luíz Muniz Bandeira Duarte, pela oportunidade de conhecer a UTI Neonatal do HUPE e permitir que eu realizasse esse trabalho.

Meus verdadeiros amigos que sempre compartilham momentos importantes como este, em especial minha amiga Vanessa Binatti.

Minhas colegas de laboratório, Verônica, Bruna, Vanessa, e toda equipe dos laboratórios 6 e 3 que me ajudaram.

Ao colega Cláudio Simões, que me ajudou muito no tempo em que passei na UFRJ.

Aos professores da PG-CM e da Microbiologia, sempre atenciosos.

Equipe da Coordenação da Secretaria Acadêmica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, sempre atenciosos, em especial ao Dr. Mário Fritz.

Ao CNPq, FAPERJ, CAPES, PRONEX e SR2-UERJ pelo apoio financeiro oferecido para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos *Staphylococcus* sp. por me ajudarem a concluir este trabalho e auxiliar na ciência. Vocês são realmente incríveis!!!!!!

Viver é acalentar sonhos e esperanças,
fazendo da fé a nossa inspiração maior. E
buscar nas pequenas coisas, um grande
motivo para ser feliz!

Mário Quintana

RESUMO

Pereira, Paula Marcelle Afonso. *Ocorrência e caracterização de estafilococos coagulase negativos isolados de recém-nascidos com bacteremias em unidade de terapia intensiva neonatal no HUPE-UERJ*. 2012. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Staphylococcus coagulase-negativo (SCN) estão frequentemente envolvidos em infecções nosocomiais associadas com o uso de cateteres e outros procedimentos médicos invasivos. A habilidade de aderir às superfícies abióticas e de produzir biofilme tem sido reconhecida entre os principais fatores de virulência dos SCN, especialmente de *S. epidermidis*, a principal espécie responsável por infecções relacionadas à assistência a saúde - IRASs. Dentre as demais espécies de SCN capazes de produzir biofilme, *S. haemolyticus* tem sido relacionado com quadros de infecções em recém-nascidos (RNs). O presente estudo teve como objetivo principal investigar aspectos microbiológicos e epidemiológicos dos processos infecciosos invasivos relacionados com SCN em neonatos internados em unidade de terapia intensiva neonatal (UTIN) de um hospital universitário do município do Rio de Janeiro (2008-2010). A técnica de PCR multiplex-mPCR foi empregada na determinação das espécies de 40 amostras de SCN isoladas de hemoculturas de RNs fazendo uso de cateteres intravenosos e submetidos à terapia antimicrobiana empírica com vancomicina e/ou gentamicina. A fenotipagem foi realizada por três métodos distintos: Simplificado em microplaca, Vitek 2 e API-Staph. Os perfis de resistência aos antimicrobianos foram verificados através do teste de disco-difusão, determinação de CIM (Oxacilina) e presença do gene *mecA*. A capacidade de produção de biofilme foi investigada pelos testes do Ágar Vermelho do Congo e ensaios de aderência em superfícies abióticas (poliestireno e vidro) além da PCR para os genes *icaAB*, *atlE* e *aap*. O perfil genômico dos micro-organismos foi determinado pela técnica de PFGE. Os resultados demonstraram o isolamento de *S. haemolyticus* (77%), *S. epidermidis* (15%), *S. captis* (5%) e *S. warneri* (3%). A análise comparativa dos resultados obtidos pelo m-PCR com métodos fenotípicos demonstrou uma concordância de 97,5% com o esquema simplificado e de ~40% com o Vitek 2 e o API Staph. A maioria (82,5%) das amostras apresentou perfis variados de multiresistência aos 16 antimicrobianos testados e resistência a oxacilina, apesar de 25% destas não apresentarem o gene *mecA*. Apesar da maioria das amostras de SCN ter apresentado capacidade de produzir *slime* e/ou biofilme não foi observada total correlação com a presença dos genes *mecA*, *icaAB*, *aap*, *atlE*, enfatizando a natureza multifatorial da produção de biofilme de SCN. Diferente do observado para as demais espécies, algumas amostras de *S. haemolyticus* foram incapazes de aderir ao vidro e ao poliestireno e/ou apresentaram os genes *aap* (38,7%), *atlE* (42%) além de *icaAB* (71%). Na UTIN foi detectada a presença de seis diferentes tipos clonais da espécie prevalente, indicando a disseminação de *S. haemolyticus* nesta unidade hospitalar e a endemicidade em nossa comunidade.

Palavras-chave: *S. haemolyticus*. Multirresistência. Biofilme. PFGE. Neonatos. Cateter. Diagnóstico laboratorial.

ABSTRACT

Coagulase-negative staphylococci (CNS) are often involved in nosocomial infections associated with catheters and other invasive medical procedures. The ability to adhere to abiotic surfaces and produce biofilms has been recognized among the major virulence factors of the SCN, especially *Staphylococcus epidermidis*, the main species responsible for infections related to health care - IRASs. Among the other species capable of producing biofilm, *Staphylococcus haemolyticus* has been associated with cases of infections in neonates. Here in, we investigated the microbiological and epidemiological aspects of invasive infections related to CNS in the neonatal intensive care unit (NICU) of a university hospital located at Rio de Janeiro metropolitan area (2008-2010). PCR multiplex-mPCR was used in the determination of the species of 40 CNS strains isolated from blood cultures of neonates making use of intravenous catheters and subjected to empirical antimicrobial therapy with vancomycin and / or gentamicin. Phenotyping was performed by three different methods: Simplified scheme in microplates, Vitek 2 and API-Staph. Antimicrobial resistance profiles were verified by the disk diffusion test, oxacillin MIC determination and PCR for *mecA* gene. Evaluation of biofilm production was performed by PCR for genes *icaAB*, *atlE* and *aap* and the tests on Congo Red Agar plates and abiotic surfaces (polystyrene and glass). Clonality was determined by PFGE technique. Data revealed the isolation of *S. haemolyticus* (77%), *S. epidermidis* (15%), *S. captis* (5%) and *S. warneri* (3%). The comparative analysis of the results obtained by mPCR and phenotypic methods showed 97.5% concordance with the simplified scheme and ~40% with the Vitek 2 and API Staph systems. Different multidrug resistance profiles to 16 antimicrobials, including resistance to oxacillin was observed for 82.5% of the CNS isolates, although the *mecA* gene was not detected in 25% of these strains. Although most of the CNS isolates showed the ability to produce *slime* and/or biofilm, a complete correlation with the presence of *mecA*, *icaAB*, *aap*, *atlE* genes was not observed, emphasizing the multifactorial nature of biofilm production of SCN. Different from other CNS species, some strains of *S. haemolyticus* were unable to adhere to glass and polystyrene surfaces and/or to exhibit *aap* (38.7%), *atlE* (42%), *icaAB* (71%) genes. PFGE analysis revealed the presence of six different clonal types of the prevalent species, indicating the dissemination in this hospital and endemicity in our community of *S. haemolyticus*.

Keywords: *S. haemolyticus*. Multidrug resistance. Biofilm. PFGE. Neonates. Catheter. Laboratory diagnostic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formação de Biofilme de <i>S.epidermidis</i>	24
Figura 2 - Biofilme bacteriano observado por microscopia confocal	24
Figura 3 - Distribuição das espécies de SCN	50
Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose a 1.5% do produto da reação de PCR-multiplex das amostras identificadas para <i>S.epidermidis</i> e <i>S.haemolyticus</i> , com identificação simultânea do gene <i>mecA</i>	50
Figura 5 - Número de amostras de SCN resistentes aos diferentes antimicrobianos testados	57
Figura 6 - Multiresistência das espécies de SCN isoladas de neonatos	59
Figura 7 - CIM (Concentração Inibitória Mínima) para oxacilina das espécies de SCN ...	60
Figura 8 - Formação de biofilme na superfície do vidro e do poliestireno por amostras de SCN	63
Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose a 2% do produto da reação de PCR para os genes (A) <i>icaAB</i> ; (B) <i>atlE</i> e (C) <i>aap</i>	64
Figura 10 - Relação do gene <i>icaAB</i> com a produção de <i>slime</i> e biofilme das espécies de SCN	65
Figura 11 - Dendrograma das espécies de <i>S.haemolyticus</i>	68
Figura 12 - Dendrograma das espécies de <i>S.epidermidis</i>	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tipos de SCC _{mec}	28
Tabela 2 - Amostras-controle de <i>Staphylococcus</i> spp. utilizadas em diferentes etapas do estudo	35
Tabela 3 - Origem das amostras de SCN e dados obtidos nos prontuários dos recém-nascidos internados na UTIN/HUPE/UERJ (período de 2008-2010)	37
Tabela 4 - Método simplificado para identificação de <i>Staphylococcus</i> spp	41
Tabela 5 - Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo	45
Tabela 6- Dados clínico-microbiológicos dos recém-nascidos internados na UTIN/HUPE/UERJ	49
Tabela 7 - Tabela de identificação dos SCN em três diferentes métodos: Sistema Vitek 2, Microplaca e PCR	52
Tabela 8 - Resultados da identificação dos SCN pelos 3 métodos utilizados	53
Tabela 9 - Perfis bioquímicos das amostras de SCN isoladas de neonatos	53
Tabela 10 - Resultados do método de Identificação pelo sistema API Staph, Vitek 2 e PCR-multiplex de 20 amostras de SCN isoladas de neonatos	54
Tabela 11 - Perfil de resistência aos antimicrobianos das espécies de SCN isoladas de neonatos	55
Tabela 12 - Comparação entre as CIM (oxacilina) e gene <i>mecA</i> das amostras de SCN isoladas de neonatos	58
Tabela 13 - Espécies de SCN quanto ao método de produção de <i>slime</i> e produção de biofilme	61
Tabela 14 - PCR dos genes <i>icaAB</i> , <i>atlE</i> , <i>aap</i> e <i>mecA</i> para as diferentes espécies de SCN isoladas de neonatos	65
Tabela 15 - Correlação dos métodos para formação de biofilme entre os SCN isolados de neonatos	66
Tabela 16 - Correlação dos genes <i>icaAB</i> e <i>mecA</i> das espécies de SCN isoladas de neonatos	67
Tabela 17 - Diferentes perfis biológicos relacionados com a resistência a oxacilina e a capacidade de produção de biofilme apresentados pelos pulsotipos de amostras de <i>S. haemolyticus</i> isoladas de neonatos internados na UTIN/HUPE/UERJ	70

Tabela 18 - Propriedades biológicas de amostras atípicas de <i>S. haemolyticus</i> (manose-positivas e trealose-negativas) e de <i>S. epidermidis</i> (manose-negativas) isoladas de neonatos internados na UTIN/HUPE/UERJ.....	71
Tabela 19 - Perfil de multiresistência aos antimicrobianos das espécies de SCN isoladas de neonatos	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aap –	Proteína associada ao acúmulo
<i>aap</i> –	Proteína associada ao acúmulo gene
ATCC –	American Type Culture Collection
<i>AtlE</i> –	Gene que codifica a principal autolisina de <i>S.epidermidis</i>
Bap –	Proteína associada ao biofilme
CAZ –	Ceftazidima
CDC –	Disease control and prevention
CEFOX –	Cefoxitina
CF–	Fator clumping
CIM –	Concentração Inibitória Mínima
CIP –	Ciprofloxacina
CLIN –	Clindamicina
CLO –	Cloranfenicol
CLSI –	National committee for clinical laboratory standards
DEF –	Desferrioxamina
DMIP –	Departamento de microbiologia, imunologia e parasitologia
D.O –	Densidade ótica
DNA –	Ácido desoxirribonucléico
Embp –	Extracellular matrix-binding protein (proteína de ligação a fibronectina)
ERI –	Eritromicina
ETP –	Ertapenem
Fbe –	Fibrinogen-binding adhesion (proteína de ligação ao fibrinogênio)
FOS –	Fosfatase
GEM –	Gentamicina
HUPE –	Hospital Universitário Pedro Ernesto
<i>ica</i> –	Intercelular adhesin gene (gene que codifica a síntese de PIA)
IRASs –	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
M.H –	Meio de cultura agar Muller Hinton
MAN –	Manose
<i>mecA</i> –	Gene que codifica resistência a meticilina/oxacilina
MER –	Meropenem
MLST –	Multilocus Sequence Typing

MR –	Multiresistência
MRSA –	<i>S.aureus</i> resistente a meticilina
MR-SCN –	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo resistente a meticilina
MUP –	Mupirocina
NAOH –	Hidróxido de sódio
Nacl –	Cloreto de sódio
NEO –	Neomicina
ND –	Não detectado
NOV –	Novobiocina
NHSN –	National healthcare safety network
OXA –	Oxacilina
P –	Penicilina
PBP –	Penicillin-binding protein (proteína de ligação a penicilina)
PCR –	Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)
PIA –	Polissacharide intercellular adhesion (adesina polissacarídica intercelular)
PFGE –	Pulsed-Field Gel Electrophoresis (Eletroforese em gel submetido a Campo Pulsado)
PYR –	Pirrolidonil arilamidase
PBS –	Tampão salina fosfato
R –	Resistente
RN –	Recém-nascido
RFLP –	Restriction Fragment-Length Polymorphism
SCC _{mec} –	Staphylococcal cassette chromosome mec
SCN –	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo
S –	Sensível
ST –	sequence type
TET –	Tetraciclina
TOB –	Tobramicina
TRE –	Trealose
TSB –	Trypic Soy Broth (Caldo Tripticaseína Soja)
UTIN –	Unidade de tratamento intensivo neonatal
V –	Variável
VAN –	Vancomicina
URE –	Urease

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	ASPECTOS GERAIS DE MICRO-ORGANISMOS PERTENCENTES AO GÊNERO <i>STAPHYLOCOCCUS</i>	15
1.1	Identificação Laboratorial dos SCN por métodos fenotípicos	17
1.2	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRASs) em Recém-nascidos	18
1.3	Biofilme	21
1.4	Resistência Bacteriana aos agentes antimicrobianos	25
1.5	Caracterização de SCN e epidemiologia molecular	29
1.6	Justificativas e relevância da proposta	32
2	OBJETIVOS	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1	Desenho do estudo	34
3.2	Amostras bacterianas	34
3.3	Obtenção de dados clínico-epidemiológicos das amostras de SCN	36
3.4	Identificação bacteriana	36
3.4.1	<u>Identificação do gênero <i>Staphylococcus</i></u>	36
3.4.2	<u>Metodologia automatizada de identificação das espécies de SCN</u>	36
3.4.3	<u>Metodologia Semi-automatizada de identificação das espécies de SCN</u>	38
3.4.4	<u>Metodologia convencional de identificação das espécies de SCN</u>	38
3.4.5	<u>Método molecular para identificação das espécies de <i>Staphylococcus</i> e detecção do gene <i>mecA</i> - PCR multiplex</u>	40
3.5	Determinação do Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos e Concentração Inibitória Mínima (CIM) para oxacilina em placas de microtitulação	42
3.6	Produção de Biofilme	42
3.6.1	<u>Pesquisa de polissacarídeos extra-celulares: Teste no meio de Vermelho do Congo</u>	42
3.6.2	<u>Teste quantitativo da produção de biofilme em placas de poliestireno</u>	43
3.6.3	<u>Ensaio de aderência ao vidro</u>	44
3.6.4	<u>Detecção dos genes <i>ica</i>, <i>aap</i>, <i>atlE</i>(fatores de adesão) por técnica de PCR</u>	44

3.7	Técnica de Pulsed-Field Gel Eletroforese (PFGE) -Determinação da relação clonal	46
3.8	Análise Estatística	47
4	RESULTADOS	48
4.1	Dados clínicos-epidemiológicos das amostras de SCN.....	48
4.2	Identificação das espécies de SCN	48
4.2.1	<u>Métodos Convencional e Molecular</u>	48
4.2.2	<u>Métodos automatizados de identificação de SCN.....</u>	51
4.3	Resistência Bacteriana e Concentração Inibitória Mínima (CIM) para oxacilina.....	51
4.4	Produção de <i>slime</i> e formação de biofilme	56
4.4.1	<u>PCR para os genes <i>icaAB</i>, <i>aap</i> e <i>atLE</i>.....</u>	62
4.5	Relação clonal entre as amostras de SCN através da técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)	66
5	DISCUSSÃO	73
6	CONCLUSÃO	83
	REFERÊNCIAS.....	85
	ANEXO A - Comitê de Ética e Pesquisa	96

INTRODUÇÃO

1. ASPECTOS GERAIS DE MICRO-ORGANISMOS PERTENCENTES AO GÊNERO *STAPHYLOCOCCUS*

O gênero *Staphylococcus*, pertencente à família *Staphylococcaceae*, atualmente compreende 46 espécies e 24 subespécies. Dezesete espécies podem ser isoladas de amostras biológicas humanas (EUZEBY, 2012). Alguns estafilococos patogênicos produzem a enzima coagulase, cuja detecção é realizada em laboratório para identificação das espécies coagulase-positivas e coagulase-negativas (SCN) através do teste de coagulação de plasma de coelho (KONEMAN *et al*, 2001).

Após o emprego terapêutico dos antibióticos as infecções causadas por estafilococos alastraram-se pelo mundo, causando problemas graves para a humanidade. Entre os anos de 1950 e 1965, a maioria das amostras de SCN isoladas de pacientes hospitalizados era referida como *Staphylococcus albus*. Posteriormente foram descritas outras espécies de importância médica, como *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus saccharolyticus*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus lugdunensis* e *Staphylococcus schleiferi* (MAYHALL, 2004).

S. epidermidis é a espécie mais prevalente e persistente da pele e membranas mucosas (narinas), representando 65% a 90% das amostras de estafilococos observadas nesses sítios. *S. hominis* é o segundo mais frequente, enquanto *S. saccharolyticus* é o único anaeróbio estrito do gênero encontrado na microbiota da pele humana. Outras espécies de estafilococos, como *S. haemolyticus*, *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. lugdunensis* e *S. cohnii*, que são encontradas em menor frequência na microbiota residente podem fazer parte da microbiota transitória da pele. *S. capitis*, *S. auricularis* e *S. saprophyticus* são espécies que colonizam nichos específicos como cabeça, canal auditivo e trato geniturinário, respectivamente (BERNARDI, 2005).

Staphylococcus aureus pode estar relacionado com quadros de supuração, formação de abscessos, várias infecções piogênicas, até mesmo, septicemia fatal apesar de também serem capazes de colonizar as superfícies cutâneo-mucosas sem necessariamente causar infecção. O

papel da coagulase na patogênese das doenças estafilocócicas é ainda, de certa forma, especulativo, mas acredita-se que essa enzima poderia levar à formação de uma camada de fibrina formando o abscesso, localizando assim a infecção e, provavelmente, protegendo o micro-organismo da fagocitose e da ação de drogas antimicrobianas (ARCHER, 2000).

Os SCN são membros da microbiota normal da pele e mucosa dos humanos e comumente considerados como meros contaminantes. Embora atualmente tenham sido reconhecidos como verdadeiros patógenos que podem estar associados com graves morbidades e identificados com fatores de virulência (KHATIB *et al*, 1995), os SCN foram reconhecidos durante muito tempo como patógenos oportunistas (HUEBNER & GOLDMAN, 1999). A capacidade desses micro-organismos causarem infecções tornou-se ainda mais acentuada nas últimas décadas em decorrência da ampla utilização de dispositivos médicos invasivos (cateteres intravasculares, urinários e de diálise, marcapassos, válvulas protéticas e articulares) e da melhoria da qualidade de vida de indivíduos imunocomprometidos e consequente aumento de internações nos hospitais (BRITO *et al*, 2006; CASEY *et al*, 2007). Atualmente, o número de relatos de casos de infecções hospitalares causadas por SCN ultrapassou o número causado por *S. aureus* (BERNARDI, 2005).

Estudos epidemiológicos têm sido necessários para definir o significado clínico dessas bactérias (BRITO *et al*, 2006). No início de 1990, os SCN responderam por 11% dos casos de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde – IRASs. Dados do NNIS indicaram que o grupo de SCN ocupava o 3º lugar entre os patógenos mais comuns em IRASs depois de *Escherichia coli* e *S. aureus*. O aumento da importância como patógenos nosocomiais foi devido à elevada frequência desses micro-organismos em quadros de infecções primárias na corrente sanguínea e infecções em centros cirúrgicos. Quadros de infecção nosocomial por SCN incluem bacteriemia primária como secundária. A incidência de infecção primária na corrente sanguínea por SCN varia consideravelmente dependendo do tipo e tamanho da instituição (MAYHALL, 2004).

O aumento da incidência de infecções causada por SCN tem sido parcialmente atribuída à sua particular afinidade aos materiais implantáveis e capacidade de formar biofilme (BERNARDI, 2005). A sepse associada a cateter vascular é confirmada através da presença de SCN na hemocultura e cultivo de ponta de cateter em pacientes febris com abscesso vascular profundo, e em algumas situações, antibioticoterapia são os recursos de tratamento (TANURE *et al*, 2007). Infecções graves, como a osteomielite, podem resultar de uma bacteriemia ou de infecção por contigüidade, tendo *S. aureus* e *S. epidermidis* como

agentes etiológicos. A espécie *S.epidermidis* é capaz de formar biofilme nas superfícies de dispositivos implantáveis fazendo com que os tratamentos das infecções com agentes antimicrobianos não tenham êxito, sendo necessária a remoção do dispositivo em muitas oportunidades (MCCANN *et al*, 2008). Seguida de *S.epidermidis*, *S. haemolyticus* corresponde à segunda a espécie mais comumente isolada de humanos, frequentemente a partir de hemoculturas colhidas de pacientes fazendo uso de cateteres. Cepas resistentes a oxacilina têm sido associadas a dispositivos implantáveis. Dentre os SCN, *S.haemolyticus* foi a primeira espécie a ser detectada com susceptibilidade diminuída a teicoplanina e a vancomicina (FALCONE *et al*, 2006).

1.1 Identificação laboratorial dos SCN por métodos fenotípicos

A identificação precisa das espécies é essencial para o diagnóstico acurado, o tratamento efetivo dos pacientes, e para confirmar as falhas na terapêutica. A emergência de SCN, não somente como patógeno humano, mas também como reservatório de genes de resistência aos antimicrobianos, demonstra a necessidade do desenvolvimento de métodos acurados de identificação (COUTO *et al*, 2001).

Os estafilococosestão entre os micro-organismos mais isolados no laboratório de microbiologia clínica, sendo que a identificação é comumente limitada à realização de um grupo de testes rápidos que visam a identificação de *S.aureus*: morfologia colonial, coloração de Gram, produção de catalase e de coagulase. Entretanto, nos casos de infecções por SCN, os resultados obtidos são insuficientes para a escolha de uma conduta médica adequada (CUNHA, SINZATO & SIVEIRA, 2004).

Os SCN podem ser diferenciados por meio de reações bioquímicas convencionais utilizando testes como: coagulase, crescimento anaeróbio em tioglicolato, endonuclease termoestável, produção de fosfatase, arginina diidrolase, ornitina descarboxilase, pirrolidonil arilamidase, produção de acetoína, redução de nitratos, urease, β -glicosidase, β -galactosidase e oxidase modificada. Além destes testes, a produção de ácido a partir de carboidratos como maltose, fructose, sacarose, lactose, D-manitol, rafinose, D-trealose, D-celobiose, D-xilose, ribose, D-turanose e L-arabinose também pode ser utilizado para a especificação destas bactérias (KEIM, 2005). Entretanto, alguns esquemas simplificados de identificação, baseados em métodos convencionais têm sido propostos, pois esses métodos possuem um menor número de testes e fornecem resultados em menor tempo, comparado com o método convencional.

Contudo, esquemas simplificados têm apresentado grande acurácia na identificação das espécies prevalentes nas infecções humanas (IORIO *et al*, 2007).

Os sistemas automatizados são métodos fenotípicos baseados em provas bioquímicas e de sensibilidade aos antimicrobianos, apesar do alto custo são usados em laboratórios de rotina, devido principalmente à rapidez dos resultados. Porém sua acurácia na identificação dos estafilococos é discutível (CAIERÃO *et al*, 2006). Um dos sistemas mais utilizados em laboratórios de rotina é o MicroScan WalkAway, que é constituído por um conjunto de provas bioquímicas. O Vitek foi o primeiro sistema automatizado a ser desenvolvido. Possui cartões de identificação de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas fermentadoras e não fermentadoras de glicose, leveduras e bactérias anaeróbias. Os cartões para a avaliação da sensibilidade às drogas antimicrobianas são separados dos cartões de identificação. Tanto a identificação bacteriana como a leitura do teste de susceptibilidade antimicrobiana são obtidas após 2 a 15 horas (KEIM, 2005).

1.2 Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRASs) em recém-nascidos:

O termo infecção hospitalar vem sendo substituído por IRASs, definido pelo “Center for Disease Control and Prevention”(CDC), como infecção adquirida pelo paciente no curso de um tratamento específico para outra enfermidade associado aos cuidados médicos (CDC, 2008).

A incidência de IRASs pode variar bastante de acordo com os tamanhos dos hospitais, a especialidade de cada enfermaria, além de fatores como, o tempo de internação dos pacientes, uso de antimicrobianos e condições de higiene. Alguns fatores de risco contribuem para aquisição da infecção, tais como: extremos de idade, presença de comorbidades, antibioticoterapia, intervenções cirúrgicas e uso de procedimentos médicos invasivos (PITTET *et al*, 1999).

Muitos dados sobre as taxas de IRASs e seus impactos são divulgados em países desenvolvidos, porém, poucas são as informações sobre essas infecções em países em desenvolvimento. A infecção hospitalar acresce em média, 5 a 10 dias ao período de internação. Além disso, os gastos relacionados aos processos diagnósticos e terapêuticos fazem com que o custo seja elevado (MACHADO *et al*, 2001). Cabe lembrar, no entanto, que o índice de infecção hospitalar varia significativamente, pois está diretamente relacionada com o nível de atendimento e complexidade de cada hospital (ANVISA, 2005). As infecções

associadas aos cuidados de saúde são aquelas adquiridas em centros de tratamento de saúde por profissionais saudáveis, pacientes ou outros que entrem nos locais de tratamento de saúde. Estima-se que ocorram anualmente mais de 2 milhões de infecções associadas com a atenção de saúde, com 90 mil mortes (ESTRIDGE *et al*, 2011).

Nos Estados Unidos, a incidência de infecções hospitalares varia de 5 a 10%. Essas infecções são adquiridas pelo contato com pessoas infectadas, visitantes, outros pacientes ou equipamentos contaminados. Infecções hospitalares geralmente ocasionam mais problemas do que infecções adquiridas na comunidade, devido ao fato de os pacientes hospitalizados serem, em geral, mais sensíveis a infecções; procedimentos invasivos como o uso de cateteres ou cirurgia, que fornecem uma porta de entrada para infecção. Já a incidência de infecções associadas aos cuidados de saúde que podem ser minimizados pelo uso de boas práticas para o controle da infecção, como: adesão total as precauções-padrão; uso adequado de precauções baseadas na transmissão; imunização dos trabalhadores de saúde contra doenças que podem ser prevenidas por vacinas (ESTRIDGE *et al*, 2011).

No Brasil, a taxa média de infecção hospitalar é de cerca de 15%, ao passo que nos EUA e na Europa é em torno de 10%. Os dados apresentados pelo Ministério da Saúde mostram que, a cada dia, 1.500 pacientes hospitalizados são acometidos de uma complicação infecciosa, sendo que 2% destes pacientes morrem em decorrência destas infecções (PRADO *et al*, 1995). Além destes fatos, as complicações infecciosas representam um custo adicional na assistência prestada ao paciente, podendo levar a um aumento, em até três vezes, o tempo de permanência do paciente no hospital e, em cerca de sete vezes os custos da assistência médica (CAMPOS, 2001).

Os SCN também são capazes de causar processos inflamatórios ou bacteriemias em recém-nascidos (RNs), além de acometer pacientes imunocomprometidos que foram submetidos a procedimentos invasivos em neurocirurgias, enxertos ortopédicos além de implantação cateteres venosos centrais, peritoniais ou nutrição parenteral (CORDEIRO, 2007). As complicações mais frequentemente observadas são as infecções de sítio cirúrgico, do trato respiratório (representada principalmente pela pneumonia), do trato urinário e as sepses. Estas quatro topografias representam cerca de 80,0% de todas as complicações infecciosas hospitalares (KEIM, 2005).

Desde os anos 80, os SCN têm emergido como causa importante de sepse tardia nos RNs de unidades de terapia intensiva neonatal (UTIN). O progresso da medicina está permitindo uma vida maior para esses pacientes, especialmente prematuros e de baixo peso,

pela instalação de nutrição parenteral prolongada, dispositivos endovenosos, ventilação mecânica, que são potenciais vetores de risco para infecção bacteriana (CORDEIRO, 2007). São exceções aquelas infecções adquiridas por via transplacentária, e outras como AIDS e hepatite B, ou associadas à ruptura de membrana amniótica por período superior a 24 horas antes do parto. O CDC considera de origem materna aquelas infecções que ocorrem até 48 horas de vida e de origem ambiental aquelas ocorridas após 48 horas do nascimento. É definida como sepse precoce aquela que se manifesta em até 72 horas de vida, e sepse tardia quando se manifesta após 72 horas de vida, a maior susceptibilidade a infecção durante o período neonatal se deve as deficiências no desenvolvimento no sistema de defesa do RN, tanto local como sistêmica (MALICK *et al*, 2003).

A incidência de bacteriemia associada a cateter venoso central é maior em crianças do que em adultos, principalmente nas UTINs e UTIs pediátricas, onde são maiores do que nas outras unidades de serviço de hospitalização. Os pacientes de idade inferior a 2 meses, a bacteriemia associada a cateter venoso central representa aproximadamente 34% das infecções associadas à atenção sanitária. Segundo dados do National Healthcare Safety Network (NHSN), a incidência média de bacteriemia associada a cateter venoso central é de 5,3 e de 2,9% de bacteriemias por 1.000 cateter-dia nos anos de 2006 e 2007, respectivamente (ESPIAU *et al*, 2011).

A gravidade do SCN como principal patógeno nosocomial, tanto para o recém-nascido de baixo-peso quanto para o prematuro, passou a ser considerada progressivamente. Os SCN representam 31% de todas as infecções nosocomiais em UTIN é o agente mais comum de septicemia e bacteriemia nesta unidade (MAYHALL, 2004). O aumento do número de SCN com baixa sensibilidade aos antibióticos mostrou a importância do conhecimento da epidemiologia das infecções por SCN, para o controle da sua disseminação e da resistência desses agentes aos antimicrobianos. A simples identificação das espécies passou a ser insuficiente para distingui-los como agentes de uma infecção ou de colonização (CORDEIRO, 2007).

Infecções nosocomiais podem ser causadas por cepas endógenas ou adquiridas no hospital de SCN que colonizaram o paciente durante um procedimento invasivo. SCN que colonizam as superfícies íntegras da pele não são completamente removidos pelas técnicas assépticas aplicadas no momento de realização de procedimentos invasivos. Acredita-se que amostras de SCN que se encontram próximas aos sítios de inserção de cateteres sejam, muitas vezes, responsáveis pelo quadro infeccioso. Cepas de SCN adquiridas na comunidade também

podem ser agentes causais de infecções hospitalares em indivíduos que permaneceram em curto período pré-operatório e não tiveram a oportunidade de ser colonizados por cepas de origem hospitalar. A maioria das cepas comunitárias que colonizam os indivíduos ou causam IRAS são sensíveis à meticilina. Entretanto, 20% das amostras de origem comunitária podem apresentar resistência à meticilina. Pacientes colonizados por cepas SCN meticilina-resistentes enquanto hospitalizados, poderão futuramente servir como fonte de transmissão desses patógenos (CAMPOS, 2001; MAYHALL, 2004).

As taxas de infecção da corrente sanguínea em neonatos são de 3 a 20 vezes maiores em países em desenvolvimento, e alguns países, aproximadamente metade dos pacientes de UTI Neonatal adquire uma infecção, nos casos de fatalidade as taxas podem chegar a 52%, pois muitos bebês nascem e podem morrer fora do hospital. As elevadas taxas de infecções em neonatos em países em desenvolvimento, e os tipos de infecção comumente identificados como infecção da corrente sanguínea, fortemente sugere que falta higiene apropriada durante o trabalho de parto e cuidados pós-natais, são os fatores que mais contribuem para a morbidade em recém-nascidos (NINO MACHARASHIVILLE *et al*, 2009).

1.3 Biofilme

A patogenia das infecções causadas por SCN é complexa e apresenta vários os fatores de virulência envolvidos. Os fatores de virulência e patogenicidade dos SCN envolvem a sua adesão, agregação e a formação do biofilme a superfícies abióticas diversas, permitindo a colonização de cateteres, válvulas cardíacas protéticas, próteses articulares e marca-passos, além de outros (KEIM, 2005; CORDEIRO, 2007) (**Figuras 1 e 2**). Desde 1960, quando os pesquisadores notaram a produção de um material aderente e mucóide por cepas de SCN foi iniciado o estudo do glicocálix (*slime*) bacteriano e da capacidade de formação de biofilme nas próteses médicas (CHRISTENSEN *et al*, 1994).

A presença do biofilme foi previamente documentada na superfície de lentes de contato, cateteres venosos centrais, tubos endotraqueais, dispositivos intrauterinos, valvas cardíacas mecânicas, marca-passos, cateteres de diálise peritoneal, próteses articulares, tubos de timpanostomia, cateteres urinários e de derivação ventrículo-peritoneal (KEIM, 2005).

A contaminação do biomaterial pode ocorrer durante a implantação cirúrgica não só a partir de bactérias presentes na pele ou em membranas mucosas do paciente, mas ainda, a

partir das mãos da equipe cirúrgica ou clínica durante os procedimentos de manutenção destes dispositivos (DOLAM, 2001).

A formação de biofilme é provavelmente mais dependente da adesão célula a célula, do que da quantidade de células aderidas à superfície. Essa adesão intercelular pode ser quantificada pela aglutinação das hemácias, que tem papel importante na patogenicidade das infecções associadas aos dispositivos médicos (CERCA & PIER *et al*, 2005).

Os genes *icaADBC* atuam na formação de biofilme, tanto na agregação celular quanto na fase de acúmulo de células de estafilococos. Ambas as etapas são mediadas por uma adesina polissacarídica intercelular (“polissaccharide intercellular adhesin”, PIA), composta por um homopolímero de *N*-acetilglicosamina com porções de resíduos deacetilados. A produção do PIA está associada a expressão do opéron *ica* (“intercelular adhesion”), compreendendo os genes *icaA*, *icaD*, *icaB*, *icaC* regulados pelo gene regulatório *icaR* (VUONG *et al*, 2004).

O efeito dos fatores ambientais na transcrição do opéron *ica* em *S. epidermidis* tem sido estudado. Foi verificado que concentrações submínimas inibitórias de tetraciclina e quinupristina-dalfopristina, bem como elevadas temperaturas e osmolaridade, aumentavam a atividade do promotor do operon *ica*. O biofilme é formado sobre quase todos os tipos de cateteres e sobre muitos outros dispositivos médicos e implantes. O processo de infecção por um corpo estranho realiza-se através de duas etapas importantes: aderência bacteriana à superfície do polímero e acumulação de biofilme (ARAUJO, 2006).

Independente de PIA, na formação de biofilme estão envolvidas: (i) a proteína associada ao acúmulo (Aap) codificada pelo gene *aap* que exerce atividade de adesina intercelular responsável pelo acúmulo de biofilme; (b) a proteína homóloga ao Bap (Bhp) que é sintetizada pelo gene *bhp*, que é uma proteína ancorada na superfície da parede celular (HUSSAIN *et al*, 1997). Segundo TORMO e cols (2005), Bap foi descrita como proteína de *S. epidermidis* presente na amostra ATCC 35984 que apresentava homologia com a proteína Bap de *S. aureus* associada à produção de biofilme por exibir atividade promotora de ligação primária da célula bacteriana a superfícies abióticas (CUCARELLA *et al*, 2001).

Estudos mostram que cepas não produtoras de biofilme podem estar presentes em infecções associadas a cateteres, sugerindo com isso que elas utilizam formas alternativas de adesão. Por outro lado, a deficiência de biofilme pode acontecer pelo acúmulo de proteases produzidas na bactéria, clivando as proteínas de superfície e evitando sua aderência (ARCIOLA *et al*, 2001). A autolisina AtlE é considerada como a principal adesina dos estafilococos e codificada pelo gene cromossômico *atlE*. AtlE exibe papel nos estágios

iniciais da aderência dos SCN às superfícies hidrofóbicas dos dispositivos médicos (CORDEIRO, 2007). Outras séries de adesinas podem ser encontradas na espécie *S.epidermidis*, como a expressão do gene *fbe* que resulta em uma proteína de superfície celular, Fbe (“fibrinogen-binding adhesin”), que se liga ao fibrinogênio no hospedeiro. A proteína Embp (“Extracellular matrix-binding protein”), codificada pelo gene *embp*, se liga a fibronectina (WILLIANS *et al*, 2002).

A presença do biofilme tem um significado clínico importante. A experiência clínica mostra que os mecanismos de defesa do hospedeiro, bem como as drogas antimicrobianas para as quais a bactéria mostra-se sensível, *in vitro*, são incapazes de eliminar os estafilococos do local. Assim, acredita-se que a presença do biofilme pode fazer a célula bacteriana tornar-se 10 a 1.000 vezes mais resistente aos efeitos das drogas antimicrobianas (KEIM, 2005).

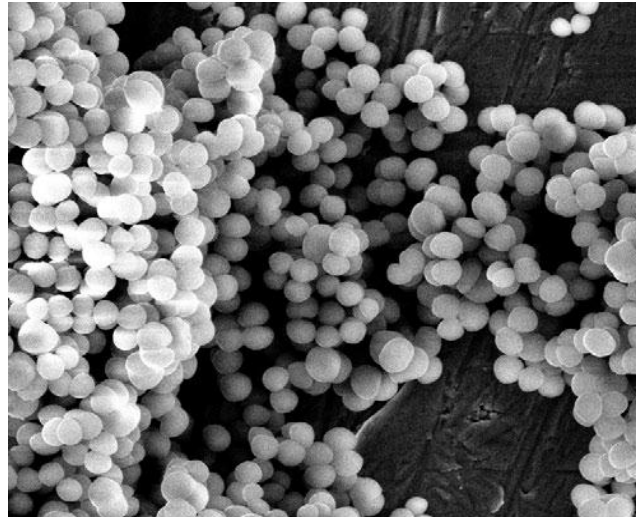


Figura1. Formação de biofilme de *Staphylococcus epidermidis*.
Fonte: Dustin L.W *et al*, 2010.

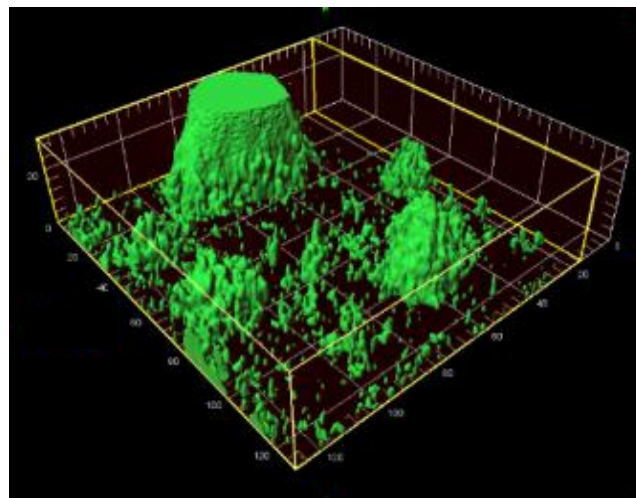


Figura 2. *Staphylococcus* formando biofilme bacteriano observado por microscopia confocal.
Fonte: <http://cgb.indiana.edu/research/projects/4>

Ao contrário de *S. epidermidis*, a base molecular da virulência de *S. haemolyticus* em geral e no contexto de dispositivos médicos implantados associados à infecção é em grande parte desconhecida. Recentemente, um polissacarídeo capsular foi proposto por ser um importante fator de virulência em *S. haemolyticus*. A formação de biofilmes em *S. haemolyticus in vitro* tem sido relatada, mas os mecanismos moleculares envolvidos não foram elucidados. A presença de um operon em *S. haemolyticus* tem sido relatada, mas até o momento a sua contribuição para a formação de biofilme não é clara (FREDHEIM *et al*, 2009).

1.4 Resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos

A gravidade dos SCN como patógeno nosocomial em RN passou a ser considerada progressivamente. O aumento do número de SCN com baixa sensibilidade aos antibióticos nos mostra a importância do conhecimento da epidemiologia das infecções por SCN, para o controle da sua disseminação e da resistência desses agentes aos antimicrobianos (CORDEIRO, 2007).

Além de sua importância como patógeno em infecções relacionadas a cateter e da dificuldade de identificação das espécies, outra questão a ser discutida com relação aos SCN é a resistência aos antimicrobianos. A resistência dos SCN à oxacilina está, geralmente, acompanhada da resistência a múltiplos agentes antimicrobianos, e este fato tem como consequência o aumento no uso de glicopeptídeos para terapia empírica e até mesmo para a profilaxia. No entanto, a seleção de resistência aos glicopeptídeos e a potencial transmissão de tal resistência entre espécies tem nos mostrado a necessidade do uso mais restrito e cuidadoso desses antimicrobianos (De GIUSTI, 1999).

As cepas com resistência à metilina ou à oxacilina, relacionadas com o gene *mecA*, apresentam resistência simultânea aos demais betalactâmicos (cefalosporinas, cefamicinas, oxacefemas e carbapenêmicos), e geralmente se relacionam com multiresistência aos antibióticos não betalactâmicos, tais como aminoglicosídeos, macrolídeos, quinolonas e tetraciclina (KEIM, 2005).

Em geral, o critério interpretativo para oxacilina pode produzir resultados inexatos, principalmente por *S. saprophyticus* e *S. lugdunensis* (MAYHALL, 2004). O CLSI (National Committee for Clinical Laboratory Standards) recomenda que isolados com oxacilina apresentando zonas inibitórias ≤ 25 mm sejam categorizadas como sensíveis, e quando mostrando zonas ≥ 24 mm sejam considerados resistentes. Isolados com a concentração

inibitória mínima (CIM) $\leq 0.25 \mu\text{g/mL}$ são definidos como sensíveis, e a CIM $\geq 0.5 \mu\text{g/mL}$ são definidos como resistentes a oxacilina (CLSI, 2012).

A presença de estafilococos resistentes aos antimicrobianos pôde ser constatada logo após a introdução da penicilina na clínica, na década de 1940. Já no final desta, com o uso continuado deste antimicrobiano, ocorreu a seleção de cepas resistentes.

No final da década de 1950, os estafilococos adquiriram resistência a praticamente todos os antibióticos disponíveis, tais como a eritromicina, estreptomicina e tetraciclina. Assim, para combater as infecções estafilocócicas, surgiram as penicilinas semi-sintéticas antiestafilocócicas: a oxacilina em 1959 e a meticilina em 1960, as quais não são inativadas pelas betalactamases estafilocócicas. No entanto, surgiram estafilococos resistentes a estas drogas, resistência esta que envolve a produção de uma nova proteína ligadora de penicilina (PBP, do inglês: *Penicillin-Binding Protein*), a PBP2a ou PBP2', que apresenta uma diminuição de sua afinidade à maioria dos antibióticos β -lactâmicos. Esta PBP2a é codificada pelo gene *mecA*, o qual confere resistência à meticilina/oxacilina (EIFF, 1998).

Algumas cepas de estafilococos produzem uma grande quantidade de β -lactamase (hiperprodutoras) que rapidamente hidrolisam a penicilina, este excesso de enzima pode ainda hidrolisar parcialmente as penicilinas resistentes às penicilinases.

O gene *mecA* é um segmento de DNA de 2,1 kb que se encontra inserido em um grande bloco de DNA exógeno, conhecido como elemento *mec* ou cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*: *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*). O SCC*mec* é um elemento genético móvel, integrado ao cromossomo de *S.aureus* resistentes à meticilina (MRSA), flanqueado por sequências diretas e repetidas (LIVERMORE, 2000).

Este segmento de DNA, variando de 21-67 Kb, carrega o gene *mecA* e os genes *mecRI* e *mecI* que codificam o indutor MecR e a proteína repressora MecI, respectivamente (complexo gene *mec*). Em adição, esse elemento carrega ainda o complexo gene *ccr*, o qual codifica recombinases responsáveis pela mobilidade do SCC*mec*. Além do gene *mecA*, o SCC*mec* pode carrear outros genes de resistência a drogas. Assim, devido às características citadas acima, o SCC*mec* pode ser definido como uma ilha de resistência a antibióticos. A presença do gene *mecA*, no entanto, não é exclusivo dos *S. aureus*, uma vez que outras espécies deste mesmo gênero também o adquiriram. Acredita-se que foram os SCN, em especial os *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, os principais responsáveis pela transferência desse gene para o *S. aureus* (HIRAMATSU *et al*, 2002).

Os tipos de SCC*mec* são classificados de acordo com a combinação de dois elementos: o complexo *ccr* e o complexo *mec*, resultando em diferentes tipos de SCC*mec*; foram

relatados também vários subtipos de SCC*mec*. As sequências entre os complexos ou depois deles foram classificadas como regiões “junkyard” ou região J (HANSEN *et al*, 2005; IWG-SCC, 2009). Segundo dados do IWG-SCC, 2011, são descritos onze tipos de SCC*mec*, tipo I ao XI, classificados de acordo com o tipo do complexo *mec* e do complexo *ccr* (**Tabela 1**).

O SCC*mec* pode apresentar elementos genéticos móveis, como transpósons e plasmídios, responsáveis pela resistência a outros antimicrobianos. O plasmídio pUB110 carrega o gene *ant* (4'), que confere resistência a vários aminoglicosídeos, enquanto o plasmídio pT181 está envolvido na resistência a tetraciclina. O transpósion Ψ Tn554 apresenta o gene *ermA*, sendo responsável a resistência aos macrolídeos. Esses elementos genéticos podem incorporar-se ao cromossomo bacteriano através das sequências de inserção (ITO *et al*, 2001 e 2003).

Os SCN, em especial cepas de *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* e *S. haemolyticus*, que são os mais frequentemente isolados em espécimes de humanos, passaram a apresentar resistência à oxacilina e a outros antimicrobianos como macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprima e fluoroquinolonas (DOLAM, 2001). Assim, os antibióticos do grupo dos glicopeptídios (vancomicina e teicoplanina) passaram a constituir uma das principais opções terapêuticas nas infecções estafilocócicas em ambiente hospitalar. A vancomicina foi introduzida na clínica em 1958, a utilização desta droga aumentou dramaticamente nos últimos 20 anos, em decorrência do aumento na prevalência de *S. aureus* e SCN resistentes à oxacilina. Após o reconhecimento, em 1988, de enterococos resistentes à vancomicina, a emergência de *S. aureus* e SCN resistentes a esta estava sendo aguardada. A transferência de material genético contido no gene de resistência à vancomicina (*vanA*), do *Enterococcus faecalis* para o *S. aureus*, foi demonstrada em laboratório em 1992 (KEIM, 2005).

Tabela 1: Tipos de SCC*mec*

Tipos de SCC <i>mec</i>	Tipo de complexo <i>ccr</i>	Tipo de complexo <i>mec</i>
I	1	B
II	2	A
III	3	A
IV	2	B
V	5	C2
VI	4	B
VII	5	C1
VIII	4	A
IX	1	C2
X	7	C1
XI	8	E

Disponível em IWG-SCC, 2011

O CLSI (2012) define estafilococos com CIM para vancomicina ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$ como sensível, de 4 $\mu\text{g/mL}$ à 8 $\mu\text{g/mL}$ de sensibilidade intermediária, e aqueles com CIM ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ como resistente. Para teicoplanina, os estafilococos apresentam CIM de 8 $\mu\text{g/mL}$ são definidos como sensíveis, CIM de 16 $\mu\text{g/mL}$ são intermediários, e aqueles com CIM ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$, como resistentes.

Segundo ARAUJO (2006), resultados do programa SENTRY de vigilância antimicrobiana, realizado no período de 1997 a 1999, envolvendo Estados Unidos, Canadá, América Latina, Europa e região do Pacífico Asiático mostraram que a resistência à meticilina em cepas de *S. aureus* variou, entre os países participantes, de 1,8 % (Suíça) a 73,8 % (China), enquanto entre as cepas de SCN todas as taxas encontradas foram superiores a 70 %. Além disso, esses estudos revelaram que entre os SCN, cepas de *S. haemolyticus* têm apresentado as maiores taxas de resistência à meticilina (86,2 %) seguidas de *S. epidermidis* (73,8 %) e de *S. hominis* (57,1 %).

Os estafilococos apresentam uma grande capacidade de desenvolver resistência aos agentes antimicrobianos. Esse problema da resistência bacteriana precisa ser abordado através da utilização adequada dos fármacos, e com o desenvolvimento de novos antimicrobianos. Com o resultado de uma disseminada resistência a vários agentes anti-estafilocócicos, os glicopeptídeos, vancomicina e teicoplanina, passaram a ser os antimicrobianos de escolha no tratamento das infecções por cepas resistentes aos β -lactâmicos, principalmente para os SCN com taxas mais elevadas de resistência (CASEY *et al*, 2007).

A precisão e a rapidez na detecção da resistência a meticilina em estafilococos é importante para o controle endêmico dos MRSA e MR-SCN, conseqüentemente implicando no sucesso do controle de infecção hospitalar.

1.5 Caracterização de SCN e epidemiologia molecular

Os métodos moleculares podem apresentar alta sensibilidade e especificidade para a identificação de estafilococos, porém, ainda não estão disponíveis em laboratórios de rotina, esses métodos são baseados na detecção de espécie-específicas, ou nas variações de sequência de elementos (BARROS *et al*, 2007).

Nas últimas décadas, estudos epidemiológicos utilizando análises moleculares têm avançado, apresentando vários métodos de tipagem bacteriana que detectam as características expressas pelas bactérias, e técnicas genotípicas, envolvendo diretamente o DNA bacteriano,

têm sido utilizados. Para os estafilococos, os métodos de caracterização molecular mais comumente utilizados são baseados na análise do polimorfismo dos tamanhos dos fragmentos de DNA, clivados com enzima de restrição (RFLP: *Restriction Fragment-Length Polymorphism*) ou na amplificação de sequência do DNA genômico, através da reação em cadeia da polimerase (PCR: *Polymerase Chain Reaction*) (KLOOS, 1997).

Outra técnica que também utiliza o princípio de RFLP é o sistema de eletroforese em campo pulsado (PFGE: *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*), que após clivagem com enzimas de restrição cortam o cromossomo bacteriano em fragmentos grandes, os quais são separados sob um campo elétrico alternado. O PFGE é considerado técnica de referência, apresentando um excelente poder discriminatório (TENOVER *et al*, 1997).

Nas investigações de surtos, a análise molecular dos plasmídios (DNA) identifica, com boa sensibilidade e especificidade, os estafilococos, essas cepas têm perfis plasmidiais característicos, devido aos seus diferentes plasmídios, o que permite diferenciá-los (BJORKQVIST *et al*, 2002). O método de PCR e eletroforese em gel de agarose (PFGE) têm sido utilizados na determinação das espécies, com especificidade e sensibilidade comparáveis aos métodos fenotípicos.

Técnicas moleculares vêm sendo utilizadas para a caracterização epidemiológica de infecções microbianas por apresentarem um melhor poder discriminatório de amostras do que as técnicas convencionais (SECHI *et al*, 1999). Em 1983, foi desenvolvida uma técnica molecular que consiste na mudança de pulsos elétricos, periodicamente, permitindo a separação de grandes fragmentos de DNA, conhecida como eletroforese em gel de campo pulsado (“Pulsed Field Gel Electrophoresis – PFGE”) (SCHWARTZ *et al*, 1983 *apud* SNELL; WILKINS, 1986). Esses fragmentos são obtidos depois de tratamento do DNA total com enzimas de restrição específicas.

LINHARDT e colaboradores (1992) demonstraram pela primeira vez a importância do PFGE como método de análise epidemiológica de amostras de SCN. Os autores verificaram que a técnica discriminou sete genótipos de *S. epidermidis* em 13 amostras comensais isoladas de profissionais da saúde. Desde então, essa técnica vem sendo utilizada em estudos epidemiológicos com o objetivo de determinar a prevalência de clones de SCN entre amostras hospitalares (TOLDOS *et al*, 1997; NUNES *et al*, 2005).

Outro método é a caracterização molecular por sequenciamento multilocus (MLST: *Multilocus Sequence Typing*) que é um método de referência para macro-estudos epidemiológicos como, estudos sobre clonalidade de bactérias abrangendo populações bacterianas separadas por ampla distância geográfica, relacionada com o tempo ou com a

epidemiologia (STRUELENS, 2002). Alguns autores utilizaram técnicas de tipagem por sequenciamento de múltiplos “locus” (MLST) que se apresentaram pouco discriminatórias na análise evolutiva de *S.epidermidis* (WISPLINGHOFF *et al*, 2003; KOZITSKAYA *et al*, 2005).

Um estudo comparou três métodos moleculares, PFGE, MLST e determinação do SCC*mec*, na tipagem de 216 amostras de *S.epidermidis*, com o objetivo de direcionar a escolha do método mais apropriado para a caracterização desta espécie. Os autores concluíram que a técnica de PFGE é o método mais discriminatório, seguido pelo MLST e tipagem do cassete SCC*mec*. Os resultados obtidos pela combinação de PFGE e SCC*mec* permitiram pressupor os resultados de MLST quanto a complexidade clonal com alta precisão (MIRAGAIA *et al*, 2008). Esses autores observaram que amostras de MRSE pertencentes ao mesmo genótipo, definido por PFGE, podem apresentar diferentes “sequence type” (ST), bem como, amostras do mesmo tipo de complexo clonal, ST ou PFGE podem albergar diferentes tipos de SCC*mec*.

A análise epidemiológica de amostras de SCN por PFGE foi demonstrado pela primeira vez em 1992 (LINHARDT *et al*, 1992). Desde então, está análise tem ajudado a definir linhas de transmissão e formas mais eficazes de controlar a disseminação da resistência entre os *Staphylococcus* (MIRAGAIA *et al*, 2002). Poucos estudos relatam características que justifiquem a disseminação de genótipos de *S.epidermidis* caracterizados por PFGE no ambiente hospitalar (MIRAGAIA *et al*, 2002; KLINGENBERG *et al*, 2007).

1.6 Justificativa e relevância da proposta:

SCN têm sido encontrados como importantes agentes de infecções hospitalares, despertando o interesse de investigadores no conhecimento de aspectos relacionados à sua patogenicidade e resistência aos antimicrobianos. Esses micro-organismos são os mais frequentes isolados de hemoculturas de pacientes hospitalizados, principalmente em neonatos, por serem vulneráveis a infecções, devido a sua baixa imunidade e a necessidade de utilizar dispositivos médicos invasivos, o que favorece a colonização destes micro-organismos.

Conhecer a epidemiologia das infecções por SCN no ambiente hospitalar e a evolução clínica dos pacientes é fundamental, para que se elaborem diagnósticos mais acurados e se melhore a indicação de antimicrobianos específicos, subsidiando favoravelmente a decisão de tratamento das infecções. Medidas terapêuticas mais acertadas e específicas, com o uso mais racional da terapêutica com antibióticos, propiciarão a redução do aparecimento de bactérias multiresistentes e melhores prognósticos para estes pacientes.

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo geral, descrever os aspectos clínico-epidemiológicos e microbiológicos dos processos infecciosos invasivos relacionados com *Staphylococcus* coagulase-negativo isolados de hemoculturas de neonatos da Unidade de terapia intensiva neonatal (UTIN) do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE/UERJ).

Neste trabalho foram desenvolvidos os seguintes objetivos específicos:

- Identificação em nível de espécie das amostras de SCN obtidos de hemoculturas de neonatos, através de métodos fenotípicos e genotípicos.
- Determinação do perfil de resistência aos antimicrobianos das cepas de SCN.
- Avaliação da produção de biofilme em diferentes substratos e a presença dos genes *icaAB*, *aap* e *atlE* relacionados a esta atividade.
- Comparação dos métodos fenotípicos e genotípicos, como antibiograma, CIM (Concentração inibitória mínima) para oxacilina, a presença do gene *mecA*, relacionados a resistência, e genes *ica*, *aap* e *atlE* para detectar fatores de adesão.
- Avaliação da relação entre o gene *mecA*, padrões de resistência, e capacidade de produção de biofilme nas diferentes espécies de SCN.
- Análise do perfil genotípico bacteriano através da técnica de Pulsed-Field em Gel de Eletroforese (PFGE).
- Correlação das espécies de SCN e suas características microbiológicas com a topografia das infecções nos pacientes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido na Disciplina de Microbiologia e Imunologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (DMIP) da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) em colaboração com o Laboratório de Infecção Hospitalar sob a coordenação da Prof^a Dr^a Kátia R.N.Santos do Instituto de Microbiologia Prof^o Paulo de Góes (IMPPG) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

3.1 Desenho do estudo

O estudo foi transversal, observacional, descritivo e laboratorial, avaliando características fenotípicas e genotípicas de amostras de SCN isoladas de neonatos internados na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE/UERJ; hospital terciário com 600 leitos). As amostras de SCN foram obtidas no período de 2008 a 2010 e foram alocadas por conveniência. O estudo foi autorizado pelo Comitê de Ética em pesquisas com seres humanos do Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ (**Anexo 1**). O estudo envolveu apenas a utilização de amostras de SCN analisadas na rotina bacteriológica do Laboratório de Bacteriologia (LABAC) do HUPE/UERJ.

3.2 Amostras bacterianas

Foram analisadas 40 amostras de SCN isolados de 47 hemoculturas de 40 recém-nascidos internados na UTIN-HUPE/UERJ. As amostras de SCN foram isoladas e caracterizadas preliminarmente no Laboratório de Bacteriologia (LABAC) do HUPE/UERJ.

Os micro-organismos foram mantidos estocados em solução de GC-Glicerol a 20% (Medium Base, Difco Labs, Detroit, MI, USA), mantendo-se os estoques a -20°C (até o momento da realização dos testes). Para os testes empregados no estudo foram utilizadas as amostras controle listados na **Tabela 2**.

Tabela 2: Amostras-controle de *Staphylococcus* spp. utilizadas em diferentes etapas do estudo

Espécie	Amostra	Descrição	Referência
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	Padrão para antibiograma;	CLSI, 2010
<i>S. aureus</i>	ATCC 29213	Padrão para testes de susceptibilidade (determinação da CIM)	CLSI, 2010
<i>S.aureus</i>	ATCC 33591	Padrão para o gene <i>mecA</i>	Santos <i>et al</i> , 1999
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 35984	Padrão para PCR (biofilme)	ATCC
<i>S.hominis</i>	ATCC 27844	Amostra tipo – controle de testes fenotípicos de identificação	ATCC
<i>S.saprophyticus</i>	ATCC 15305	Amostra tipo – controle de testes fenotípicos de identificação	ATCC
<i>S. aureus</i>	ATCC 12600	Amostra tipo – controle de testes fenotípicos de identificação	ATCC
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 12228	Amostra tipo – controle de testes fenotípico de identificação, biofilme ePCR	ATCC
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 14990	Amostra tipo – controle de testes fenotípicos de identificação	ATCC
<i>S. haemolyticus</i>	ATCC 29970	Amostra tipo – controle de testes fenotípicos de identificação e PCR	ATCC
<i>S. warneri</i>	ATCC 10209	Amostra tipo – controle de testes fenotípicos de identificação	ATCC

ATCC – American Type Culture Collection; CLSI – Clinical Laboratory Standard Institute.

3.3 Obtenção de dados clínico-epidemiológicos das amostras de SCN

Foram avaliados dados clínicos e epidemiológicos das amostras de SCN de RNs, para o diagnóstico de infecção bacteriana, classificado segundo CDC (1992), onde o clínico considerou uma série de dados para a suspeita de infecção por SCN significativo para dar início a uma terapia antimicrobiana, tais como: N° de hemoculturas positivas, febre, tempo de internação. Nos casos de infecção por SCN, os RNs haviam sido tratados com antibióticos empiricamente.

As seguintes informações foram obtidas através da revisão do prontuário médico-laboratorial de pacientes que apresentaram cultura positiva para SCN: indicações clínicas de suspeita de infecção (rastreamento infeccioso-febre, sepse, nascimento prematuro sem causa, baixo peso, piora clínica e abscesso mamário), tempo de internação, data de coleta da amostra, número de hemoculturas positivas, uso de cateter vascular e antibioticoterapia (**Tabela 3**).

3.4 Identificação bacteriana

3.4.1 Identificação do gênero *Staphylococcus*

As amostras foram semeadas inicialmente, em agar sangue de carneiro (Plast Labor, RJ-Brasil) e incubadas a 35°C, por até 72h, para análise de pureza, morfologia colonial e verificação da produção de hemólise. Posteriormente, as amostras de SCN foram submetidas a testes preliminares de identificação, como: Coloração Diferencial-Método de Gram, Prova da catalase, Coagulase, Teste da DNase (KONEMAN *et al*, 2001).

3.4.2 Metodologia automatizada de identificação das espécies de SCN

As amostras de SCN provenientes de hemocultura foram inicialmente identificadas pelo método automatizado Vitek 2® System (BioMérieux Vitek, Inc, Hazelwood, MO, EUA) utilizado na rotina do LABAC/HUPE/UERJ, segundo metodologia do fabricante.

Tabela 3: Origem das amostras de SCN e dados obtidos nos prontuários dos recém-nascidos internados na UTIN/HUPE/UERJ (período de 2008-2010)

Nºamostra	Nº HC	Data (Período em dias) internação	Data coleta	Indicação clínica *	Tratamento empírico
1)5184	1	14/12/08 (16 d)	28/01/09	RI	1º Amp + Gen; 2º Van +Caz
2)5578	2	24/01/08 (7 d)	02/02/08	RI	Amp + Gen
3)5913	1	31/01/08 (12 d)	12/02/08	RI (sepse)	Cef + Van
4)7444	2	01/03/08 (13 d)	13/03/08	RI(febre)	Van
5)74	1	10/04/08 (25 d)	05/05/08	RI (febrea)	Van
6)937	1	28/04/08 (21 d)	19/05/08	RI (febrea)	Van
7)2426	2	15/06/08 (1 d)	16/06/08	RI (febrea-sepse)	Van
8)3971	1	10/07/08 (1 d)	11/07/08	Abscesso mamário (febrea)	Van
9)4998	2	03/08/08 (3 d)	28/07/08	RI	Van
10)5717	1	14/08/08 (3 d)	11/08/08	Piora clínica	Gen + Amp
11)6963	1	12/09/08 (10 d)	02/09/08	RI (febrea)	Van + Gen
12)9265	1	27/10/08 (12 d)	15/10/08	RI (febrea)	Van
13)9849	2	07/11/08 (10 d)	28/10/08	Febrea	Van + Gen
14)2272	1	21/12/08 (10 d)	11/12/08	Sepse	Van + Gen
15)2236b	1	13/12/08 (2 d)	11/12/08	RI	Gen
16)3324	2	08/01/09 (2 d)	06/01/09	Prematuro+taquipnéia- febrea variável	Van + Gen
17)6654	1	08/03/09 (5 d)	03/03/09	RI (febrea)	Van
18)7449	1	13/04/09 (20 d)	24/03/09	RI	Van + Gen
19)7931	1	06/04/09 (4 d)	02/04/09	RI	Van
20)7734	1	12/04/09 (10 d)	02/04/09	Febrea	Van + Gen
21)2024	1	02/07/09 (20 d)	12/06/09	RI (febrea)	Van + Gen
22)6671	1	15/11/09 (61 d)	15/09/09	RI (febrea)	Van
23)8703	1	11/10/09 (13 d)	28/09/09	RI (febrea)	Van
24)6131	1	30/12/09 (30 d)	30/11/09	RI (febrea)	Van
25)5747	1	31/01/10 (20 d)	11/01/10	RI (febrea)	1ºAmp + Gen; 2ºVan
26)4328	1	21/01/10 (9 d)	12/01/10	RI (febrea)	Não tratado
27)4024	1	12/01/10 (6 d)	06/01/10	Sepse suspeita	Van
28)7373	2	18/03/10 (10 d)	08/03/10	Sepse	Van
29)8850	1	02/05/10 (30 d)	02/04/10	RI (febrea)	Van
30)9268	1	05/07/10 (92 d)	05/04/10	RI (febrea)	Van
31)9455 ^a	1	08/11/09 (103 d)	08/04/10	RI (febrea)	Van
32) 4439	1	09/01/10 (91 d)	10/04/10	RI	Van
33)6518	1	10/05/10 (30 d)	10/04/10	RI (febrea)	Van + Gen
34)5563	1	21/04/10 (29 d)	01/04/10	Baixo peso	Não tratado
35)5182	1	20/03/10 (45 d)	05/05/10	RI (febrea)	Amp + Gen
36)3939	1	11/03/10 (91 d)	12/06/10	RI -abdome agudo	Amp + Gen
37)5026	1	31/05/10 (30 d)	30/06/10	RI (febrea)	Não tratado
38)7734	1	23/07/10 (3 d)	20/07/10	RI (febrea)	Van
39)3918	1	25/08/10 (10 d)	15/08/10	RI (febrea)	Van
40)4391	1	10/06/10 (60 d)	10/08/10	RI (febrea desde o nascimento)	Van

*Todos os RNs usavam cateteres; HC – Hemocultura; RI – Rastreo infeccioso; Van- vancomicina; Gen- Gentamicina; Amp- Ampicilina; Caz- Cefazidima; Cef- Cefipime.

3.4.3 Metodologia semi-automatizada de identificação das espécies de SCN - Sistema API Staph

O sistema API Staph (bioMérieux, Lyon, France), foi usado neste estudo para identificação a nível de espécie de 20 amostras de SCN. O sistema API WEB (<https://apiweb.biomerieux.com>) foi usado para análise dos resultados.

3.4.4 Metodologia convencional de identificação das espécies de SCN - Técnica Simplificada Miniaturizada

Os testes utilizados para identificação em nível de espécie foi realizada através da utilização da Técnica Simplificada Miniaturizada, segundo Iorio *et al* (2007), em microplaca de poliestireno de 96 poços (Imulon 2, Dynathec Laboratories, Alexandria, VA) (**Tabela 4**).

Inicialmente as amostras foram crescidas em ágar sangue (48h/35°C), e submetidas aos seguintes testes:

Expressão de fator “clumping”-A produção de “fator clumping” foi verificada utilizando-se o sistema comercial “Slidex Staph Plus” (bioMérieux, Paris, França), segundo recomendação do fabricante. A amostra padrão utilizada como controle positivo foi *S. aureus* ATCC 25923, e como controle negativo *S. epidermidis* ATCC 12228.

Susceptibilidade à novobiocina e desferrioxamina - Uma suspensão bacteriana, com uma turbidez equivalente a 1,0 da escala McFarland foi preparada em salina 0,85% e semeada em ágar Müeller-Hinton (Difco Laboratories) utilizando-se um “swab”. Foi depositado sobre o meio um disco contendo 5µg de novobiocina (CECON) e um disco de papel de filtro impregnado com 10µg de desferrioxamina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). O meio foi incubado a 35°C, por 24h. Um halo menor ou igual a 16mm foi indicativo de resistência à novobiocina (BANNERMAN & PEACOCK, 2007). As amostras que apresentaram qualquer halo de inibição no disco de desferrioxamina foram consideradas susceptíveis (MONSEN *et al*, 1998). As amostras utilizadas como controles dos testes foram *S. saprophyticus* ATCC 15305 (resistente à novobiocina) e *S. epidermidis* ATCC 14990 (sensível à novobiocina), *S. warneri* ATCC 10209 (resistente à desferrioxamina) e *S. hominis* ATCC 27844 (sensível à desferrioxamina).

No ensaio da microplaca em poliestireno, foram inoculadas alíquotas de 45µL de suspensão bacterina com uma turbidez equivalente a 0,5 da escala McFarland em 180µL de meios de culturas específicos para cada teste descrito a seguir. Para a leitura, os testes foram avaliados nos períodos de incubação de 24 e 48 horas, à 35° C.

Expressão da enzima fosfatase (FOS) - Foi verificada em caldo PDP (Difosfato de fenolftaleína), segundo MACFADDIN (1977), com modificações (IORIO *et al*, 2007) [0,37% (p/v) de extrato de carne; pH 7,5], adicionado de 2% (v/v) de solução PDP [0,5% (p/v) de difosfato de fenolftaleína] (Reagen, Quimibrás Indústrias Químicas S.A., Rio de Janeiro, Brasil). A leitura foi realizada após a adição de 10µL da solução reveladora de NaOH a 40% (v/v), após 24h de incubação, a 35°C, observando-se o aparecimento de coloração rosa para amostras positivas. As amostras controles utilizadas foram *S. aureus* ATCC 12600 (controle positivo) e *S. haemolyticus* ATCC 29970 (controle negativo).

Produção da enzima pirrolidonil arilamidase (PYR) - A expressão da enzima pirrolidonil arilamidase foi verificada em caldo TSB (“Trypticase Soy Broth”, Oxoid), contendo 0,006% (p/v) de L-pirroglutamil-β-naftilamina (Sigma Aldrich). A leitura do teste foi realizada pela adição de 50µL da solução reveladora, contendo dimetilaminocinamaldeído a 1% (p/v) (Sigma Aldrich), após 24h de incubação, a 35°C. O aparecimento de uma coloração rosa ou púrpura, em até 10min após a adição do reativo foi considerado resultado positivo. Como controle positivo foi usado a amostra *S. haemolyticus* ATCC 29970 e como controle negativo *S. aureus* ATCC 12600.

Fermentação da manose e trealose (MAN e TRE) - A fermentação dos carboidratos manose e trealose foi verificada em caldo vermelho de fenol, confeccionado segundo MACFADDIN (1977), com modificações (IORIO *et al*, 2007): (1,3% [p/v] de peptona, 0,13% [p/v] de extrato de carne, 0,66% [p/v] de NaCl e 0,0024% [p/v] de vermelho de fenol, pH 7,4). Os carboidratos 1,25 (p/v) de manose e 1,25 (p/v) de trealose (Vetek Química Fina LTDA, Rio de Janeiro, Brasil) foram adicionados após filtração. A leitura foi realizada em 24 e 48h de incubação, a 35°C. A modificação da coloração do meio para amarela foi indicativa de resultado positivo. Como controles das reações foram utilizadas as amostras *S. aureus* ATCC 12600, como controle positivo, e *S. haemolyticus* ATCC 29970 e *S. epidermidis* ATCC 14990, controles negativos para manose e trealose, respectivamente.

Expressão da enzima uréase (URE) - A expressão da enzima uréase foi verificada em caldo uréia de Rustigian & Stuart, segundo MACFADDIN (1977) com modificações (IORIO *et al*, 2007), conforme descrito a seguir: 1,2% (p/v) KH_2PO_4 , 2,4% (p/v) de Na_2HPO_4 , 0,14% (p/v) de extrato de levedura e 0,014% (p/v) de vermelho de fenol, pH 7,6. O caldo foi autoclavado, e a seguir, a uréia 2,5% (p/v) (VETEC, Química e Representações LTDA, Rio de Janeiro, Brasil) foi adicionada após filtração. A leitura foi realizada em até 48h de incubação, a 35°C. A ausência de alteração na coloração do meio (amarela) foi considerada como resultado negativo. As amostras *S. epidermidis* ATCC 14990 foi utilizada como controle positivo, e *S. haemolyticus* ATCC 29970 foi utilizada como controle negativo.

3.4.5 Método molecular para identificação das espécies de *Staphylococcus* e detecção do gene *mecA* - PCR multiplex (mPCR)

A liberação do DNA bacteriano através de lise térmica foi realizada de acordo com SCHUENCK e colaboradores (2008) com modificações. Três a cinco colônias de cada amostra cultivada em ágar sangue foram transferidas para 100 μL de tampão TE (10mM Tris [Sigma], 1mM EDTA [Sigma], pH 7,8). Esta suspensão foi mantida à temperatura de ebulição, em torno 100°C, por 10 min e, em seguida centrifugada por 1min, a 7.000 x g. foram coletados em seguida os sobrenadantes com DNA liberado e usados para a reação de PCR. A identificação das espécies *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* foi realizada pela detecção de segmentos genômicos específicos de cada espécie, com detecção simultânea do gene *mecA*, conforme descrito por PEREIRA e colaboradores (2007). Foram utilizados os oligonucleotídeos SH_F e SH_R para o gene *mvaA* de *S. haemolyticus* (SCHUENCK *et al*, 2008); SE_1 e SE_2 para *S. epidermidis* (PEREIRA, 2007); MRS_1 e MRS_2 para detecção do gene *mecA* (SANTOS *et al*, 1999), os oligonucleotídeos utilizados estão descritos na **Tabela 5**. A amplificação foi realizada em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient), utilizando volume total de 50 μL para a reação composta de 10 μL de DNA liberado, 200 μM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) (Life Technologies), 0,25 μM de cada um dos oligonucleotídeos SH_F e SH_R , SE_1 e SE_2 e MRS_1 e MRS_2 , 1,5U de *Taq* DNA polimerase (Biotools, Madrid, Espanha), 5 μL do tampão da enzima 10X (10 mM Tris HCl, 25mM KCl) e 2 mM de MgCl_2 .

Após realização de uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 3 min, foram realizados 30 ciclos de amplificação com desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 55°C

por 1 min e extensão a 72°C por 2 min, seguido de uma etapa final de extensão, realizada a 72°C por 5 min.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em TBE (0,89 M Tris [Sigma], 0,89 M ácido bórico [Madison], 2,5 mM EDTA [Sigma], pH 8,2), a 80V por 1:30 h. A coloração do gel foi realizada posteriormente, com a imersão do mesmo em uma solução de brometo de etídio (0,5µg/mL) por aproximadamente 45 min, sendo o gel capturado sob luz ultravioleta em um fotodocumetador (Vilber Lourmat). Como padrão de DNA para a corrida eletroforética foi utilizado o padrão 100 pb DNA ladder (Biotools).

Tabela 4: Método simplificado para identificação de *Staphylococcus* spp. (IORIO *et al*, 2007)

Espécies	Resultado com o teste bioquímico								
	CF	PYR	URE	FOS	MAN	TRE	XYL	NOV	DEF
<i>S. aureus</i>	+	-	v	+	+	+	-	s	r
<i>S. epidermidis</i>	-	-	+	+	+	-	-	s	s
<i>S. haemolyticus</i>	-	+	-	-	-	+	-	s	r
<i>S. lugdunensis</i>	+	+	v	-	+	+	-	s	ND
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	+	+	-	+	+	v	-	s	ND
<i>S. wamery</i>	-	-	+	-	-	+	-	s	r
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	-	-	-	-	+	-	-	s	ND
<i>S. capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i>	-	v	+	-	+	-	-	s	ND
<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	-	-	+	-	-	v	-	s	s
<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i>	-	-	+	-	-	-	-	r	s
<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	-	-	+	-	-	+	-	r	ND
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	-	-	-	-	v	+	-	r	ND
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticus</i>	-	v	+	+	+	+	-	r	ND
<i>S. sciuri</i>	-	-	-	+	v	+	v	r	ND
<i>S. xylosus</i>	-	v	+	v	+	+	+	r	ND

CF: fator clumping; PYR: pirrolidonil arilamidase; URE: urease; FOS: fosfatase; MAN: manose; TRE: trealose; XYL: xylose; NOV: novobiocina; DEF: desferrioxamina; s: sensível; r: resistente; ND: não detectado, v: variável.

3.5 Determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e concentração inibitória mínima (CIM) para oxacilina em placas de microtitulação:

O perfil de sensibilidade para os seguintes antimicrobianos foi realizada pela técnica de Disco-Difusão, segundo CLSI 2010, os antibióticos a serem testados foram: Penicilina (10µg), Oxacilina (1µg), Cefoxitina (30µg), Gentamicina (10µg), Ciprofloxacina (5µg), Cloranfenicol (30µg), Ceftazidima (30µg), Ertapenem (10µg), Meropenem (10µg), Tobramicina (10µg), Mupirocina (5µg), Tetraciclina (30µg), Neomicina (30µg) e Vancomicina (30µg) (SENSIFAR), e os antibióticos: Eritromicina (15µg) e Clindamicina (2µg) foram obtidos da Oxoid (OXOID, Hants, UK). Foi considerado 3 ou mais grupos de antimicrobianos para definir multiresistência das espécies de SCN.

Para a realização do teste da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em placas de microtitulação, foi utilizado o antibiótico oxacilina (Sigma Aldrich), e o controle utilizado para esse teste foi: *S. aureus* ATCC 29213. Após a obtenção de turvação equivalente a escala 0,5 de McFarland, a suspensão bacteriana foi diluída 1:10 em solução salina a 0,85%, para obtenção de uma suspensão de aproximadamente 10^7 UCF/mL. Os antibióticos foram diluídos em caldo Müeller-Hinton (Difco Laboratories) de acordo com as recomendações do CLSI, partindo de uma concentração de 512 µg/mL e, após diluições seriadas, foi atingida a concentração de 0,25 µg/mL para oxacilina. Posteriormente, em uma placa de microtitulação foram adicionados 200 µL de caldo contendo as diferentes concentrações de antimicrobianos, e em seguida, 10 µL da suspensão bacteriana da amostra em análise. Em seguida, a placa foi vedada com um filme plástico para evitar contaminação e ressecamento, e incubada na estufa a 37°C por 24 horas. A leitura do teste foi realizada visualmente, de acordo com os valores estabelecidos pelo CLSI (2010).

3.6 Produção de Biofilme

3.6.1 Pesquisa de polissacarídeos extra-celulares: Teste no meio de Vermelho do Congo:

A expressão da produção de *slime* foi avaliada através do método de crescimento em Agar vermelho do Congo (CRA), segundo CHAIEB *et al* (2005). As bactérias foram isoladas

através de técnica de semeadura por esgotamento, em meio de cultura Muller Hinton Ágar (MH ágar – Difco Labs), uma colônia de cada amostra bacteriana foi semeada, em triplicata, em forma de *spot* em meio de cultura Vermelho Congo (CRA; Sigmal Chemical Company, St Louis, MO, USA). A análise ocorreu após 24 horas em estufa, a 37°C, e em condições aeróbicas, e em seguida, após 24 horas, em temperatura ambiente. Colônias negras demonstraram resultado positivo e colônias vermelhas ou rosa-avermelhadas negativo. Os controles utilizados foram: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

3.6.2 Teste quantitativo da produção de biofilme em placas de poliestireno:

A produção de biofilme foi avaliada quantitativamente através de uma modificação do método descrito previamente por STEPANOVIC (2000). As amostras foram inicialmente crescidas em meio TSA à 37°C por 48h e suspensas em caldo tripticase de soja (TSB) com turvação equivalente 0.5 McFarland, e cultivadas à 37°C por 24h. Uma alíquota de 200µl de suspensão bacteriana em TSB foi dispensada em poço de uma placa de microtitulação de poliestireno de 96 poços. As placas foram incubadas a 37°C por 24h e, em seguida, lavadas duas vezes com 200µl em tampão salina fosfato (PBS) e, posteriormente 200µl de metanol foram adicionados a cada poço e mantidos por 15 minutos. Em seguida, o metanol foi retirado e a placa deixada em temperatura ambiente para secagem, 200µl de cristal violeta a 0.2% foram colocados em cada poço por 5 minutos e a placa foi lavada exaustivamente com água destilada. Depois de secos, se adicionou aos poços 200µl de ácido acético a 33%, a fim de eluir o corante. A avaliação de formação de biofilme foi realizada através da leitura de cada poço utilizando espectrofotômetro (570nm). Foram utilizados como controle positivo para o teste as amostras de *S. epidermidis* ATCC 12228 e como controle negativo, TSB estéril. As amostras podem ser classificadas em quatro categorias com base na DO: não aderente – DO obtida menos que a DO do controle negativo (DOc); fracamente aderente – $DOc < DO \leq (2xDOc)$; moderadamente aderente $(2x) DO < DO \leq (4xDOc)$ e fortemente aderente – $DO > (4xDOc)$. Todos os ensaios foram feitos em triplicata e repetidos ao menos em três ocasiões diferentes.

3.6.3 Ensaio de aderência ao vidro:

Foram utilizados tubos 13 x 100 mm contendo TSB (5mL) para verificar a capacidade de aderência ao vidro, que foi observada através da deposição de uma camada bacteriana na face interna do tubo de vidro (MATTOS-GUARALDI & FORMIGA,1991). Para tal, foram feitos os seguintes procedimentos: as bactérias, previamente crescidas em TSB, foram ressuspensas em meio TSB em turvação equivalente a 0.5 McFarland; a cada 48 hs o meio foi retirado e uma nova partida de igual volume acrescentada. Este procedimento se repetiu mais duas vezes e, então, verificamos o padrão apresentado por cada amostra.

As amostras foram classificadas de acordo com os padrões: I- bactérias aderidas nas laterais do tubo de vidro e na interface entre o meio de cultura e o ar; II- bactérias aderidas nas laterais do tubo de vidro; III- bactérias formando um anel na interface entre o meio de cultura e o ar; IV- ausência de bactérias aderidas (MOREIRA *et al*, 2003).

3.6.4 Detecção dos genes *ica*, *aap*, *atlE* (fatores de adesão) portécnica de PCR:

A detecção da presença dos genes *ica*, *aap* e *atlE* foi realizada através da técnica de PCR. O DNA cromossômico foi extraído através de lise térmica, como descrito por SCHUENCK *et al*, 2008.

A reação de PCR realizada para os genes *icaAB* foi, 5µL do DNA bacteriano, 5 µL de tampão 10X Buffer (Sigma), 2 µL de dNTPs, 20 pmol de cada primer *forward* e *reverse* (1 µL), 28,5 µL de água bidestilada estéril, 50 mM de MgCl₂ e 1,5 U de Taq polimerase, volume final da reação 50 µL. A reação de amplificação realizada foi programado para desnaturação inicial de 94°C por 3 min, 30 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min, extensão final de 72°C por 5 min.

A reação de PCR para os genes *aap* e *atlE* foram, 3µL do DNA bacteriano, 2.5 µL de tampão 10X Buffer (Sigma), 1 µL de dNTPs, 25 pmol de cada primer *forward* e *reverse* (1 µL) , 14µL de água bidestilada estéril, 50 mM de MgCl₂ e 1,0 U de Taq polimerase, volume final da reação 25 µL. A reação de amplificação realizada foi programado para desnaturação inicial de 94°C por 5 min, 30 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min, extensão final de 72°C por 5 min.

Os primers usados para amplificação dos genes *aap*, *atlE*, *ica*, estão descritos na **Tabela 5**.

Os produtos foram analisados em gel de agarose a 2% em tampão Tris-Borato EDTA adequado para análise de produtos de PCR que apresentam tamanho inferior à 1Kb. As condições de corrida de eletroforese foram 100V, 100mA por aproximadamente 1 h, em cubaeletroforética. No preparo do gel foi adicionado o corante Syber (5 µg/ml - invitrogen®). A visualização dos produtos de amplificação foi feita em transluminador de luz ultravioleta e, posteriormente, o gel foi fotografado.

Tabela 5: Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo

Gene	Sequência do Primer 5'→ 3'	Tamanho do Amplicon(bp)	Referência
<i>SH-F</i>	GGTCGCTTAGTCGGAACAAT	285 pb	Schuenck <i>et al</i> ,2008
<i>SH-R</i>	CACGAGCAATCTCATCACCT	285 pb	Schuenck <i>et al</i> ,2008
<i>SE-1</i>	CAGTTAATCGGTATGAGAGC	218 pb	Pereira,2007
<i>SE-2</i>	CTGTAGAGTGACAGTTTCGGT	218 pb	Pereira,2007
<i>MRS1</i> (<i>mecA</i>)	TAGAAATGACTGAACGTCCG	154 pb	Santos <i>et al</i> ,1999
<i>MRS2</i> (<i>mecA</i>)	TTGCGATCAATGTTACCTAG	154 pb	Santos <i>et al</i> ,1999
<i>icaAB</i>	TTA TCA ATG CCG CAG TTG TC	546 pb	Frebourg <i>et al</i> , 2000
<i>icaAB</i>	GTT TAA CGC GAG TGC GCT AT	546 pb	Frebourg <i>et al</i> , 2000
<i>atlE-F</i>	GCTAAGGCACCAGTAAAAAGT	480 pb	Araujo <i>et al</i> , 2006
<i>atlE-R</i>	GACCTCATCTTGTTTTACCCA	480 pb	Araujo <i>et al</i> , 2006
<i>aap-F</i>	CAACGAAGGCAGAAGAAGGA	719 pb	Araujo <i>et al</i> , 2006
<i>aap-R</i>	CATCCCCATCTTTCTTGCTG	719 pb	Araujo <i>et al</i> , 2006

3.7 Técnica de Pulsed-Field Gel Eletroforese (PFGE) - Determinação da relação clonal:

A análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico das amostras de *Staphylococcus* foi realizada, após separação, por PFGE, dos fragmentos gerados após tratamento com as enzimas de restrição *SmaI*. Utilizou-se a técnica descrita por VIVONI *et al*, (2006), com modificações. As amostras inicialmente foram cultivadas em meio de ágar sangue a 37°C, por 48 hs. Posteriormente, 15 colônias isoladas foram inoculadas em 5 mL de caldo TSB (Oxoid) e incubadas durante 4 h a 37°C para obtenção de crescimento bacteriano com turbidez correspondente à do tubo 2 da escala de McFarland ($\sim 6.0 \times 10^8$ UFC/mL). A seguir, 1 mL desta suspensão foi centrifugado (7000 x g por 5min) e o sedimento dissolvido em 250 µl de tampão PIV (NaCl 1M, Tris-HCl 10mM, pH 7,6). A esta suspensão foi adicionado o mesmo volume de agarose de baixo ponto de fusão (“Low Melting Point Agarose”, IBI Technical, New Haven, EUA) a 1,8%, dissolvida em tampão PIV e mantida a 58°C. Após homogeneização, a agarose foi distribuída em moldes (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Califórnia, EUA), que foram mantidos a 4°C por cerca de 10 min. Posteriormente, os blocos de agarose foram colocados em 2 mL de solução de lise EC (Tris-HCl 6mM pH 7,6, NaCl 1M, EDTA 100mM pH 7,5, Brij 58 0,5%, lauril sarcosinato de sódio 0,5%) contendo 100µl de lisozima a 10mg/mL e 100 µl de lisostafina a 1mg/mL e incubados a 37°C, sob leve agitação, durante 18 a 24 h. Após este período, a solução foi substituída por 2 mL de solução ESP [EDTA 0,4M pH 9,5, lauril sarcosinato de sódio 1% (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)] contendo 10 µl de proteinase K (Sigma Aldrich) a 20mg/mL, sendo esta mistura incubada a 50°C, em banho de imersão, sob leve agitação, durante 18 a 24 h. Ao final desta fase, os blocos de agarose foram estocados em uma solução TE (Tris-HCl 10mM pH 7,5 e EDTA 10mM) a 4°C. A digestão do DNA cromossômico foi realizada a partir de 1 par de blocos de agarose. Inicialmente, os blocos de agarose foram lavados quatro vezes em tampão TE 1X a 37°C, sendo as lavagens de 1 h cada e a última por 24 h. Após este processo, os blocos de agarose foram transferidos para uma solução contendo 150 µl do tampão específico da enzima de restrição *SmaI* (Biolabs, Beverly, USA) e incubados a 25°C por 4 horas. Em seguida, os blocos de agarose foram transferidos para um novo tampão da enzima de restrição contendo 20U da enzima *SmaI* e incubados a 25°C, durante 4 horas. Os blocos de agarose tratados com as enzimas de restrição foram fundidos a 70°C e aplicados no gel de agarose (Sigma) a 1% em tampão TBE 0,5X, realizando-se em seguida uma eletroforese em campo pulsado (CHEF DR III, Bio-Rad), utilizando um tempo de pulso crescente de 1 a 35s, durante 21 h a 6V/cm, a

13°C, com ângulo de 120°. O gel foi tratado com brometo de etídio (0,5µg/mL), por 30 min, mantido por 1 h com água destilada, observado sob luz ultravioleta e, posteriormente, a imagem foi capturada sob luz ultravioleta em um fotodocumentador (Vilber Lourmat). Os padrões de bandas foram analisados através da comparação visual entre as amostras e com auxílio da análise automatizada utilizando-se o programa Bionumerics, versão 6.0. Os padrões de bandas foram classificados de acordo com os critérios de VAN BELKUM e colaboradores (2007).

3.8 Análise estatística

A análise estatística utilizada para se testar as hipóteses formuladas a partir dos resultados obtidos neste trabalho foi feito através da comparação das proporções relativas a parâmetros de interesse, onde empregamos, quando aplicável, o teste Qui-quadrado com correção de Yates. Quando da ocorrência de frequências mais baixas nas sub-categorias, foi empregado o Teste Exato de Fischer. Para tal, utilizamos o Aplicativo **EPI INFO™ 7**CDC. Consideramos como nível de significância $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Dados clínicos-epidemiológicos das amostras de SCN

O resultado da análise de prontuário de 40 amostras de SCN de RNs isoladas de hemoculturas da UTI Neonatal do HUPE/UERJ estão representados na **Tabela 6**.

De acordo com os dados clínicos obtidos dos pacientes, todos os RNs usavam cateteres, 7/40 (17,5%) RNs tiveram indicação clínica para a solicitação da hemocultura como rastreio infeccioso, 24/40 (60%) rastreio infeccioso com febre, 5/40 (12,5%) suspeita de sepse, 1/40 (2,5%) troca de antibiótico ou piora clínica, 1/40 (2,5%) abscesso mamário-febre e 2/40 (5%) pacientes foram prematuros e/ou baixo-peso. Dentre os pacientes que tiveram SCN oxacilina resistente (2/33; 6%) considerou-se ter ocorrido contaminação da hemocultura.

Dos RNs tratados, 7 (17,5%) apresentaram 2 hemoculturas positivas, três (7,5%) pacientes apresentando apenas 1 hemocultura positiva e não foram tratados por ter sido considerada a possibilidade de contaminação no ato da coleta. Ocorreu uma alta frequência de RNs que receberam tratamento empírico 37/40 (97,5%).

4.2 Identificação das espécies de SCN

Dentre as 40 amostras de SCN isoladas de neonatos foram encontrados: 31/40 *S.haemolyticus* (77,5%), 6/40 *S.epidermidis* (15%), 2/40 *S.capitis* (5%) e 1/40 *S.warneri* (2,5%), conforme apresentada na **Figura 3**.

A identificação das amostras de SCN em nível de espécie foi realizada e comparada por quatro métodos distintos: Identificação fenotípica convencional realizada em microplaca, identificação molecular pela técnica de PCR-Multiplex, Sistema automatizado Vitek 2, e sistema semi automatizado API Staph.

4.2.1 Métodos convencional e molecular

A **Figura 4** ilustra o ensaio de PCR-Multiplex aplicado na identificação das espécies *S.epidermidis* e *S.haemolyticus* e a detecção do gene *mecA* realizado com as diferentes

Tabela 6: Dados clínico-microbiológicos dos recém-nascidos internados na UTIN/HUPE/UERJ

VARIÁVEIS CONSIDERADAS	UTI NEONATAL (40 PACIENTES)
SCN associado c/infecção	37 (92,5%)
SCN associado c/ contaminação	3 (7,5%)
Nº Hemoculturas	47
1 hemocultura	33 (82,5%)
2 ou + hemoculturas	7 (17,5%)
Uso de cateter	40 (100%)
Sem cateter	-
Pacientes tratados	37 (92,5%)
Pacientes não tratados	3 (7,5%)
SCN Oxacilina resistente	33 (82,5%)
SCN Oxacilina sensível	7 (17,5%)
Oxacilina resistente c/uso de vancomicina	27 (81,8%)
Oxacilina resistente s/uso de vancomicina	6 (18,2%)

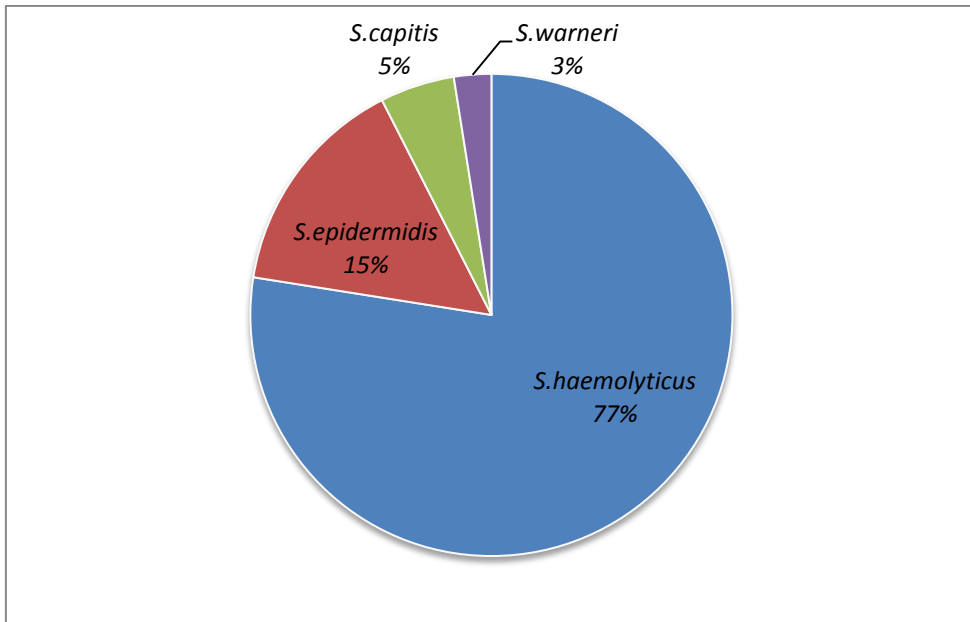
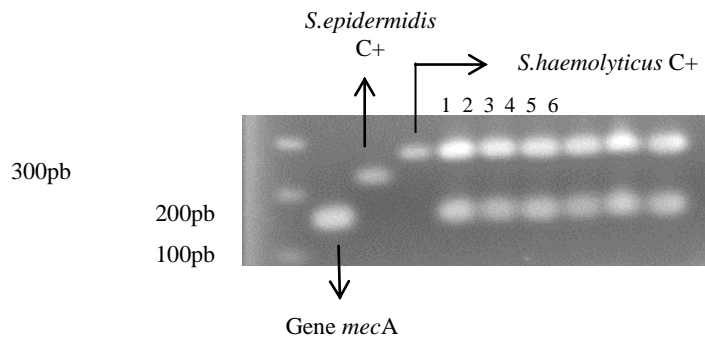


Figura 3: Distribuição das espécies de SCN pelo método de PCR



C+ - controle positivo; Linhas 1 a 6 - *S. haemolyticus* expressando o gene *mecA*.

Figura 4: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% do produto da reação de PCR-multiplex das amostras identificadas para *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, com identificação simultânea do gene *mecA*.

amostras estudadas. Os resultados dos ensaios realizados pelo método convencional e PCR multiplex estão representados nas **Tabelas 7 e 8**. Pela microplaca foram identificadas as seguintes espécies: 30/40 (75%) *S.haemolyticus*, 7/40 (17,5%) *S.epidermidis*, 2/40 *S.capitis* (5%) e 1/40 *S.warneri* (2,5%), pelo PCR multiplex (**Figura 4**) foram identificadas as espécies: 31/40 amostras *S.haemolyticus* (77,5%), 6/40 *S.epidermidis* (15%), 2/40 *S.capitis* (5%) e 1/40 *S.warneri* (2,5%) representadas. A concordância entre esses dois métodos foram de 39/40 amostras (97,5%).

A identificação fenotípica (Microplaca) das espécies de SCN identificou corretamente 39/40 amostras (97,5%), sendo 6 amostras identificadas como atípicas: 5 *S.haemolyticus*(12N, 16N, 18N, 19N, 26N, 36N) e 1 *S.epidermidis*(17N). Cepas atípicas são aquelas que mostraram resultado ao contrário para os testes que são considerados não variáveis pelo método de referência (IORIO *et al*, 2007) (**Tabela 9**).

4.2.2 Métodos automatizados de identificação de SCN

As amostras foram identificadas pelo sistema Vitek 2 e API-Staph, onde o sistema Vitek 2 identificou 40 amostras de SCN, sendo 28 (70%) *S.epidermidis*, 8 *S.haemolyticus*, 1 *S.warneri*, 1 *S.hominis*, 1 *S.saprophyticus* e 1 *S.capitis*(**Tabela 7**). Dentre as 20 amostras identificadas pelo Sistema API-Staph foram observados os seguintes resultados: 8 *S.epidermidis*, 9 *S.haemolyticus*, 1 *S.sciuri* e 2 *S.hominis*(**Tabela 10**). A **Tabela 10** mostra a comparação da identificação do Sistema API Staph e Vitek 2 com o método de PCR.

A concordância entre os métodos de identificação utilizados neste estudo foram de 37,5% entre os 3 métodos, 40% para Vitek e PCR e Vitek e Microplaca, e de 97,5% para os métodos fenotípico da microplaca e PCR, representado na **Tabela 8**.

4.3 Resistência bacteriana e Concentração Inibitória Mínima (CIM) para oxacilina:

Os perfis de resistência aos agentes antimicrobianos testados pelas amostras de SCN de neonatos estão representados na **Tabela 11**. De acordo com o teste de sensibilidade aos antimicrobianos (Teste Disco-Difusão), as amostras de SCN estudadas apresentaram resistência para os seguintes antibióticos testados: Oxacilina (33/40; 82,5%) sendo estas 25/31 *S.haemolyticus*, 5/6 *S.epidermidis*, 1/1 *S.warneri* e 1/2 *S.capitis*; Cefoxitina (30/40; 75%),

Tabela 7: Tabela de identificação dos SCN em três diferentes métodos: Sistema Vitek 2, Microplaca e PCR

Amostras	Vitek 2	Microplaca	PCR
1N	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>
2N	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>
3N	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>
4N	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>
5N	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>
6N	<i>S.saprophyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>
7N	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>
8N	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>
9N	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>
10N	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>
11N	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>
12N	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>
13N	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>
14N	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.haemolyticus</i>
15N	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.epidermidis</i>
16N	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>
17N	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.epidermidis</i>
18N	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>
19N	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>
20N	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>
21N	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>
22N	<i>S.warneri</i>	<i>S.warneri</i>	?
23N	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.epidermidis</i>
24N	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>
25N	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.epidermidis</i>
26N	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>
27N	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>
28N	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>
29N	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>
30N	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.epidermidis</i>
31N	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.epidermidis</i>
32N	<i>S.hominis</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>
33N	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>
34N	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.capitis</i>	?
35N	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>
36N	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>
37N	<i>S.capitis</i>	<i>S.capitis</i>	?
38N	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>
39N	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>
40N	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>

*Amostras atípicas

Tabela 8: Resultados da identificação dos SCN pelos 3 métodos utilizados.

ESPÉCIES (Nº)	VITEK 2	MICROPLACA (Bioquímica)	PCR
6	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.epidermidis</i>
21	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>
7	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>
1	<i>S.saprophyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>
1	<i>S.warneri</i>	<i>S.warneri</i>	<i>S.warneri</i>
1	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.capitis</i>	<i>S.capitis</i>
1	<i>S.capitis</i>	<i>S.capitis</i>	<i>S.capitis</i>
1	<i>S.hominis</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>
1	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.haemolyticus</i>

A concordância entre os métodos foram: 3 métodos 15/40 amostras (37,5%); Vitek e PCR 16/40 amostras (40%); Vitek e Microplaca 16/40 amostras(40%); Microplaca e PCR 39/40 amostras (97,5%).

Tabela 9: Perfis bioquímicos das amostras de SCN isoladas de neonatos

Espécie	PYR	FOS	URE	MAN	TRE	NOV	DES	FC	Total/Nº
<i>S.haemolyticus</i>	+	-	-	-	+	S	R	-	26
	+	-	-	+	-	S	R	-	5 *
<i>S.epidermidis</i>	-	+	+	+	-	S	S	-	5
	-	+	+	-	-	S	S	-	1 *
<i>S.warneri</i>	-	-	+	-	+	S	R	-	1
<i>S.capitis</i>	-	-	-	+	-	S	S	-	2

PYR: pirrolidonil arilamidase; FOS: fosfatase; URE: urease; MAN: manose; TRE: trealose; NOV: novobiocina; DES: desferrioxamina; FC: fator clumping; S: sensível; R: resistente; * Amostras atípicas de *S.haemolyticus*(12, 16, 18, 19, 26) e de *S.epidermidis*(17).

Tabela 10: Resultados do método de Identificação pelo sistema API Staph, Vitek 2 e PCR-multiplex de 20 amostras de SCN isoladas de neonatos

Amostras	PCR	VITEK	API-Staph	API CODE/(%ID)
1N	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.epidermidis</i>	6704013 / (89,8%)
2N	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.haemolyticus</i>	6610051/ (89,7%)
3N	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.epidermidis</i>	6604013 / (98,4%)
4N	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.hominis</i>	6610053 / (39,8%)
5N	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.epidermidis</i>	6704052 / (87,0%)
6N	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.saprophyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>	6704012 / (83,3%)
7N	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.epidermidis</i>	6704012 / (98,1%)
8N	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.haemolyticus</i>	6610051 / (89,7%)
9N	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.epidermidis</i>	6604153 / (91,4%)
10N	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>	6630011 / (68,2%)
11N	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.haemolyticus</i>	6610011 / (46,5%)
12N	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.hominis</i>	6610013 / (35,6%)
13N	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>	6610051 / (89,7%)
14N	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.epidermidis</i>	6704012 / (97,9%)
15N	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.epidermidis</i>	6704012 / (97,8%)
16N	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.haemolyticus</i>	6730151 / (47,9%)
17N	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.haemolyticus</i>	6610011 / (46,5%)
18N	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.epidermidis</i>	6734153 / (97,8%)
19N	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.sciuri</i>	6734150 / (77,7%)
20N	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>	6630011 / (68,2%)

Tabela 11: Perfil de resistência aos antimicrobianos das espécies de SCN isoladas de neonatos

Espécies	Antimicrobianos
1. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, gen, etp, mer, eri, cip, clo
2. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, tob, eri, cip, mup
3. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, gen, neo, tob, etp, mer, cip, clin, clo
4. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, gen, tob, etp, eri, cip, clo
5. <i>S.haemolyticus</i>	Cefox, P
6. <i>S.haemolyticus</i>	Eri, clo
7. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, gen, tob, etp, mer, eri, clo
8. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, gen, neo, tob, eri, cip, clin
9. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, neo, tob, etp, eri, clo
10. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, gen, mer, cip, clo, mup
11. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, tob, etp, eri, clo, mup
12. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , gen, etp, eri, cip, clo, mup
13. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, P , gen, tob, eri, clin, clo
14. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, gen, etp, mer, eri, clin, clo
16. <i>S.haemolyticus</i>	P , caz, gen, tet
40. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , clin, clo
18. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, gen, etp, mer, eri, cip, clin,
19. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, neo, tob, cip, tet
20. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, P , tob, eri, clin
21. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, P , tob, eri, clin, clo
24. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, gen, etp, cip, clin, mup
26. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, gen, etp, eri, cip, tet
27. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , gen, tob, etp, tet, mup
29. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, gen, tob, etp, mer, eri, cip, clin
32. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, gen, tob, etp, mer, eri, cip, clo
33. <i>S.haemolyticus</i>	-
35. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , gen, etp
36. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, neo, etp
38. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, gen, tob, etp, eri, cip, clin, tet
39. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, gen, tob, etp, mer, eri, cip, clin
28. <i>S.haemolyticus</i>	-
17. <i>S.epidermidis</i>	Oxa, cefox, P , caz, gen, tob, etp, mer, eri, cip, clin
15. <i>S.epidermidis</i>	P, eri
23. <i>S.epidermidis</i>	Oxa, cefox, P , caz, tob, etp, eri, tet
25. <i>S.epidermidis</i>	P, cefox , caz, tob, eri, clin, clo
30. <i>S.epidermidis</i>	Oxa, cefox, P , caz, gen, neo, tob, etp, eri, clin
31. <i>S.epidermidis</i>	Oxa, cefox, P , caz, gen, neo, tob, cip
22. <i>S.warneri</i>	Oxa, cefox, P , gen, eri
34. <i>S.capitis</i>	Oxa, P , gen, cip
37. <i>S.capitis</i>	Oxa, P , eri

Oxacilina (oxa), Cefoxitina (cefox), Penicilina (P), Eritromicina (eri), Gentamicina (gen), Ceftazidima (caz), Ciprofloxacina (cip), Clindamicina (clin), Ertapenem (etp), Tobramicina (tob), Neomicina (neo), Meropenem (mer), Cloranfenicol (clo), Tetraciclina (tet), Mupirocina (mup).

Penicilina (37/40; 92,5%), Eritromicina (25/40; 62,5%), Gentamicina (24/40; 60%), Ceftazidima (26/40; 65%), Ciprofloxacina (19/40; 47,5%), Clindamicina (14/40; 35%), Ertapenem (20/40; 50%), Tobramicina (21/40; 52,5%), Neomicina (10/40; 25%), Meropenem (10/40; 25%), Cloranfenicol (14/40; 35%), Tetraciclina (7/40; 17,5%), Mupirocina (7/40; 17,5%). Todos os isolados de SCN foram sensíveis à vancomicina (**Figura 5 e Tabela 11**).

As amostras de SCN apresentaram um alto perfil de multiresistência aos antibióticos testados (35/40; 87,5%), sendo estas 27 *S.haemolyticus*, 5 *S.epidermidis*, 1 *S.capitis* e 1 *S.warneri* (**Figura 6**).

Dentre as 40 amostras de neonatos estudadas, encontramos o gene *mecA* em 30 (75%) cepas de SCN (**Figura 4**), sendo 24/31 (77,4%) *S.haemolyticus*, 3/6 *S.epidermidis* (50%), 1/2 (50%) *S.capitis* e 1/1 (100%) *S.warneri*. Dentre as amostras 35/40 (87,5%) foram resistentes a oxacilina pelo método da CIM (CIM \geq 0,5 $\mu\text{g/mL}$). Porém, 05 amostras (12,5%) eram resistentes a oxacilina e não apresentaram o gene *mecA* (**Tabelas 12 e 17**).

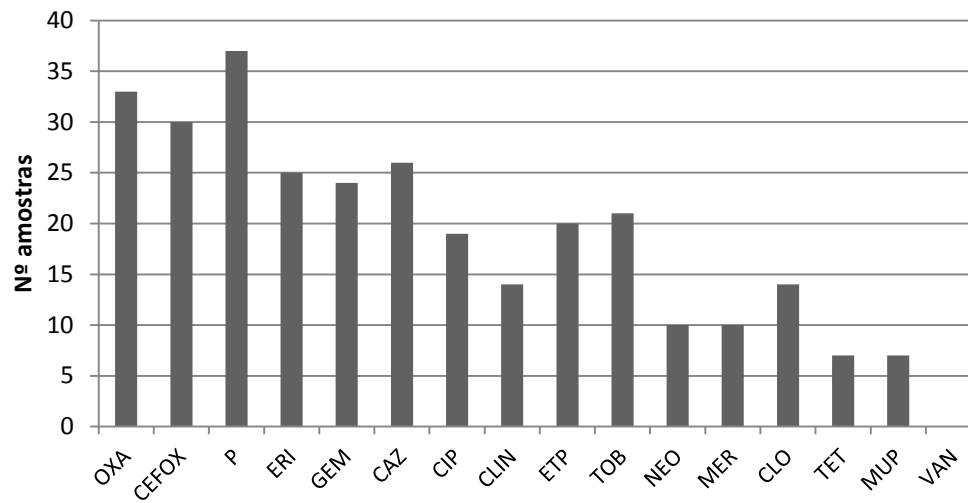
Entre as cepas de SCN estudadas, correlacionamos a presença do gene *mecA* com Oxacilina, e houve uma diferença significativa ($p < 0.02$).

As concentrações inibitórias mínimas para oxacilina encontradas entre as 40 amostras variaram de $\geq 0,25 \mu\text{g/mL}$ à $\leq 512 \mu\text{g/mL}$ (**Figura 7**). Deve-se ressaltar, que *S. haemolyticus* foi a espécie mais isolada entre os SCN estudados, sendo 17/31 (55%) delas com CIM de 512 $\mu\text{g/mL}$.

4.4 Produção de *slime* e formação de biofilme

A análise geral da expressão fenotípica de *slime* (teste vermelho do Congo) mostrou que 62,5% (25/40) das amostras avaliadas eram produtoras de *slime*. Das amostras produtoras de *slime* no teste ágar vermelho do Congo, são 21/31 (68%) *S.haemolyticus*, 4/6 *S.epidermidis* (66,6%) (**Tabela 13**).

Considerando a análise da quantificação do biofilme em relação ao método de aderência ao vidro 36/40 (90%) amostras foram produtoras de biofilme, sendo 27/31 (87%) *S.haemolyticus*, 6/6 *S.epidermidis*, 1/2 (50%) *S.capitis* e 1/1 *S.warneri*. Já em relação ao método de Microdiluição em placa 38/40 (95%) amostras produziram biofilme, sendo 30/31 (96,7%) *S.haemolyticus* e 6/6 *S.epidermidis*, 1/2 (50%) *S.capitis* e 1/1 *S.warneri* (**Tabela 13**).



OXA – Oxacilina; CEFOX – Cefoxitina; P – Penicilina; ERI- Eritromicina; GEM- Gentamicina; CAZ- Ceftazidima; CIP- Ciprofloxacina; CLIN- Clindamicina; ETP- Ertapenem; TOB- Tobramicina; NEO- Neomicina; MER- Meropenem; CLO- Cloranfenicol; TET- Tetraciclina; MUP- Mupirocina; VAN- Vancomicina

Figura 5: Distribuição dos números de amostras de SCN resistentes aos diferentes antimicrobianos testados

Tabela 12: Comparação entre as CIM (oxacilina) e gene *mecA* das amostras de SCN isoladas de neonatos

Espécie(Nº)	CIM	<i>mecA</i>
<i>S.haemolyticus</i> (2)	0.25	+
(2)		-
<i>S.epidermidis</i> (1)	1	
<i>S.capitis</i> (1)		+
<i>S.haemolyticus</i> (2)		-
<i>S.capitis</i> (1)	2	+
<i>S.epidermidis</i> (1)		+
<i>S.haemolyticus</i> (3)	4	+
(1)		-
<i>S.epidermidis</i> (1)		-
<i>S.epidermidis</i> (1)	64	+
<i>S.haemolyticus</i> (1)	128	+
(1)		-
<i>S.haemolyticus</i> (2)	256	+
<i>S.haemolyticus</i> (15)	512	+
(2)		-
<i>S.epidermidis</i> (2)		+
<i>S.warneri</i> (1)		-

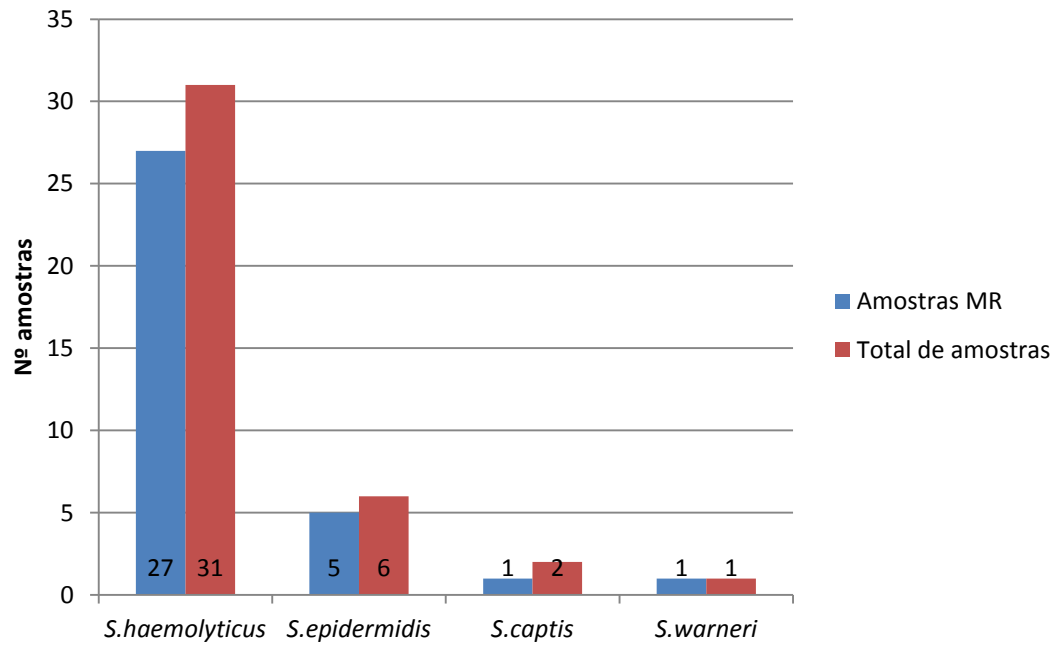


Figura 6: Multiresistência das espécies de SCN isoladas de neonatos

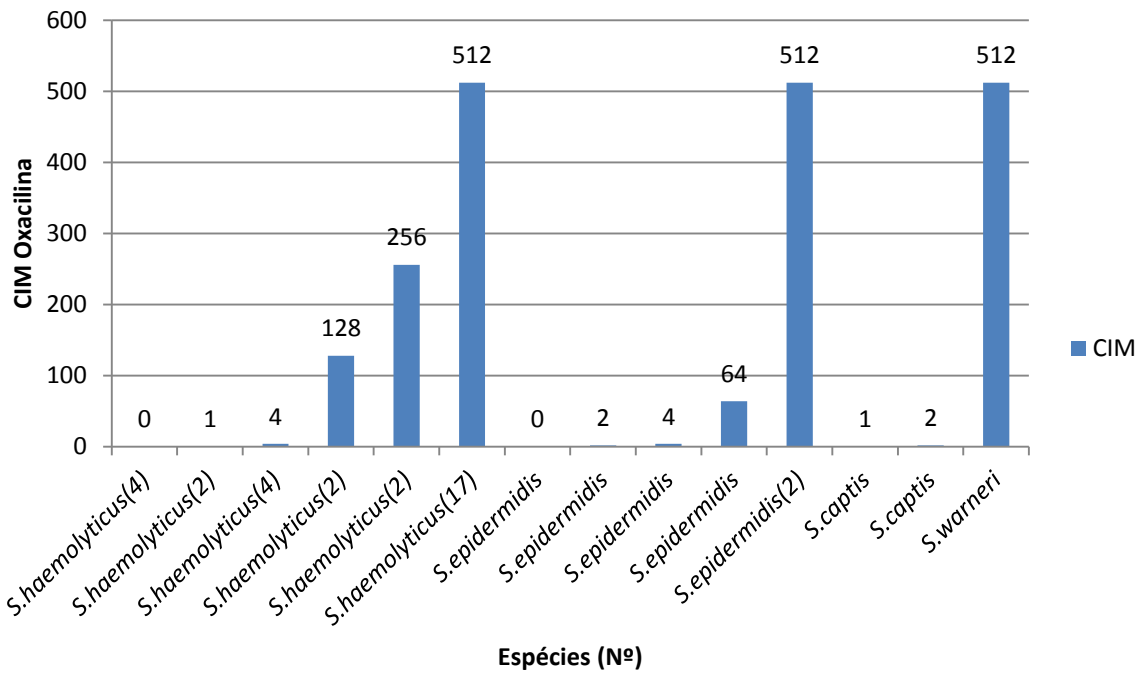


Figura 7: CIM (Concentração Inibitória Mínima) para oxacilina das espécies de SCN

Tabela 13: Espécies de SCN quanto ao método de produção de *slime* e produção de biofilme

ESPÉCIES	VERMELHO DO CONGO	ADERÊNCIA AO VIDRO	PLACA POLIESTIRENO(MICRO DILUIÇÃO)
<i>S.haemolyticus</i>	21/31 (68,0%)	27/31 (87,0%)	30/31 (96,7%)
<i>S.epidermidis</i>	4/6 (66,6%)	6/6 (100%)	6/6 (100%)
<i>S.capitis</i>	0/2	1/2 (50,0%)	1/2 (50,0%)
<i>S.warneri</i>	0/1	1/1 (100%)	1/1 (100%)

Entre as cepas de SCN estudadas, correlacionamos a presença do gene *mecA* com a produção de *slime* (método do ágar vermelho do Congo), ocorrendo uma associação estatisticamentesignificativa ($p < 0.04$).

Em relação ao método de aderência ao vidro, 22/40 (55%) amostras foram fortemente produtoras de biofilme, 14/40 (35%) amostras moderadamente produtora e 4/40 (10%) amostras não produtora. No método de microdiluição em placa, 38/40 (95%) amostras foram moderadamente produtoras e 2/40 (5%) não produtoras Não houve amostra fortemente produtora de biofilme usando-se este método (**Figura 8**).

4.4.1 PCR para os genes *icaAB*, *aap* e *atlE*

Para as 40 amostras estudadas realizamos a detecção do gene *icaAB* e observamos a presença deste gene em 28 (70%) amostras, sendo 22 destas *S.haemolyticus*, 4 *S.epidermidis* e 2 *S.capitis* (**Figura 9a**). O gene *aap* foi detectado em 16 (40%) amostras, sendo 14 *S.haemolyticus* e 2 *S.epidermidis* (**Figura 9c**). Já o gene *atlE* foi detectado em 18/40 (45%) amostras, sendo 14 *S.haemolyticus* e 4 *S.epidermidis* (**Tabela 14 e 17; Figura 9b**).

Dentre as amostras de SCN 13/40 (33%) apresentaram resultado positivo para os 3 genes testados, para verificar biofilme.

Com relação à formação de biofilme para as amostras apresentando o gene *icaAB*, produção de *slime* e produção de biofilme (aderência ao vidro e microdiluição em placa), 28/40 (70%) amostras apresentaram o gene *icaAB*, 25/40 (62,5%) produziram *slime* e 38/40 (95%) produziram biofilme (**Figura 10 e Tabela 15**).

Correlacionando as cepas de SCN com o seu perfil fenotípico de formação de biofilme e presença dos genes *mecA*, *icaAB*, *aap* e *atlE*, 11/40 (27,5%) amostras apresentaram resultado positivo para todos os testes, e não houve amostra com resultado negativo para todos estes testes. Das amostras estudadas, apresentaram resultado positivo para o genes *icaAB* e negativo para os genes *aap* e *atlE* 10/40 (25%) amostras. Apenas 4/40 (10%) amostras apresentaram resultado negativo para *icaAB* e positivo para os genes *aap* ou *atlE* (**Tabela 14**).

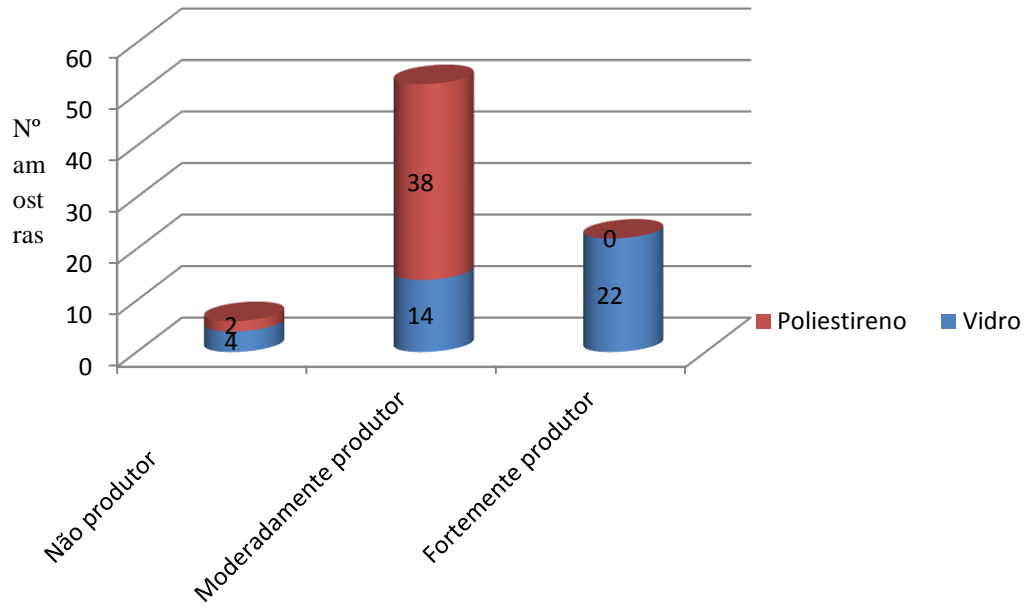


Figura 8: Formação de biofilmenas superfícies do vidro e do poliestireno por amostras de SCN

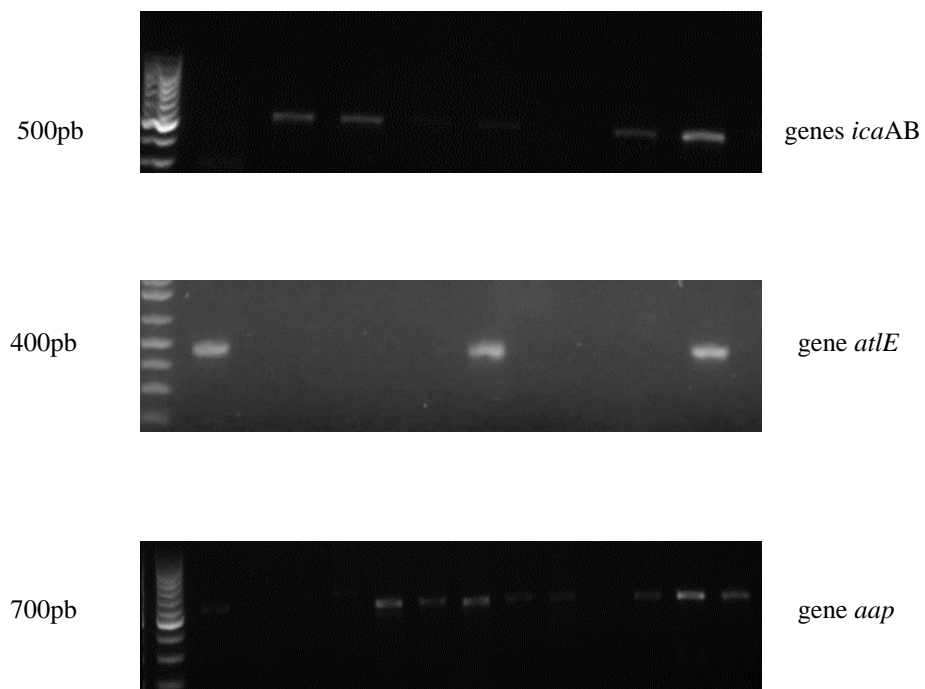


Figura 9: Eletroforese em gel de agarose a 2% do produto da reação de PCR para os genes (A) *icaAB*; (B) *atIE* e (C) *aap*

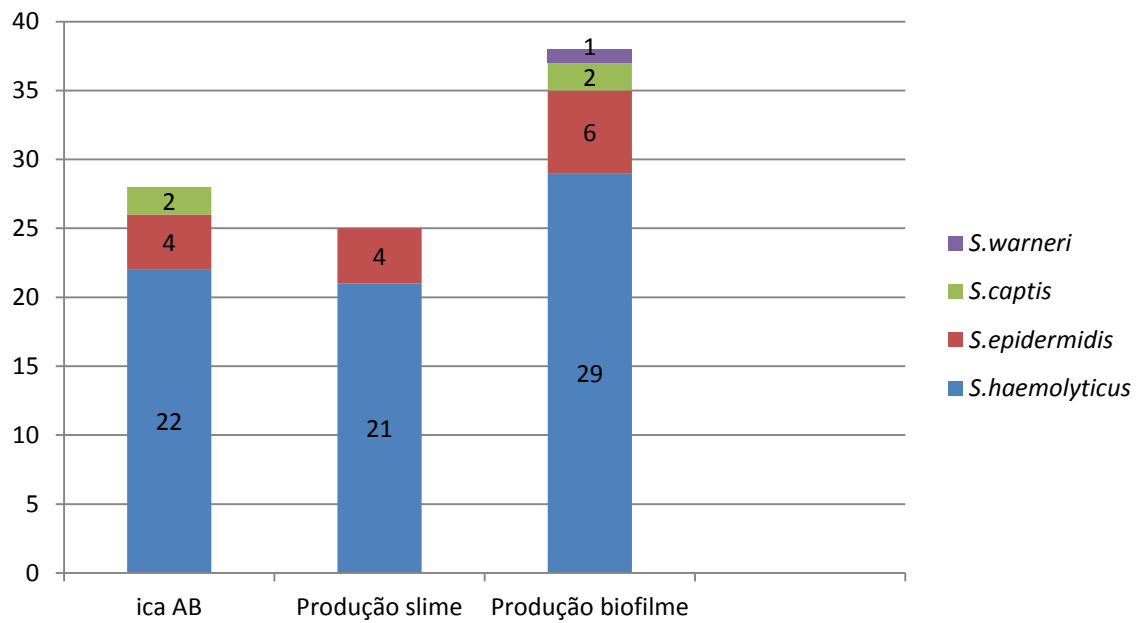


Figura 10: Relação do gene *icaAB* com a produção de *slime* e biofilme das espécies de SCN.*O teste de produção de biofilme se refere a Microplaca de poliestireno.

Tabela 14: Número das amostras pela técnica de PCR para os genes *icaAB*, *atlE*, *aap* e *mecA* para as diferentes espécies de SCN isoladas de neonatos

Espécies	<i>IcaAB</i>	<i>atlE</i>	<i>aap</i>	<i>mecA</i>
<i>S. haemolyticus</i>	22/31(71%)	14/31(45,1%)	14/31(45,1%)	24/31(77,4%)
<i>S. epidermidis</i>	4/6 (66,6%)	4/6 (66,6%)	2/6 (33,3%)	4/6 (66,6%)
<i>S. warneri</i>	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>S. captis</i>	2/2 (100%)	0/2	0/2	1/2 (50%)

Tabela 15: Correlação dos métodos para formação de biofilme entre os SCN isolados de neonatos

Espécies (Nº)	V.Congo	Aderência ao vidro	Placa poliestireno (microdiluição) - DO	<i>icaAB</i>	<i>aap</i>	<i>atlE</i>
<i>S.haemolyticus</i> (9)	+	+	+	+	+	+
<i>S.epidermidis</i> (1)						
<i>S.haemolyticus</i> (2)	-	+	+	+	+	+
<i>S.epidermidis</i> (1)						
<i>S.haemolyticus</i> (2)	-	+	+	+	-	-
<i>S.capitis</i> (1)						
<i>S.haemolyticus</i> (2)	+	+	+	+	-	-
<i>S.haemolyticus</i> (1)	+	+	+	+	-	+
<i>S.haemolyticus</i> (1)	+	+	+	-	-	+
<i>S.epidermidis</i> (2)						
<i>S.haemolyticus</i> (6)	+	+	+	-	-	-
<i>S.haemolyticus</i> (1)	-	-	+	-	-	-
<i>S.haemolyticus</i> (1)	+	-	+	-	-	-
<i>S.haemolyticus</i> (1)	-	+	+	+	-	-
<i>S.haemolyticus</i> (1)	-	+	-	+	-	-
<i>S.haemolyticus</i> (1)	-	+	+	-	+	+
<i>S.epidermidis</i> (1)						
<i>S.haemolyticus</i> (2)	+	+	+	+	-	-
<i>S.haemolyticus</i> (1)	-	+	+	+	+	-
<i>S.epidermidis</i> (1)	-	+	+	-	-	-
<i>S.warneri</i> (1)						
<i>S.capitis</i> (1)	-	-	-	+	-	-

Neste estudo, verificamos a correlação dos SCN com os genes *icaAB* e *mecA*, onde 20/40 (50%) amostras foram positivas para *icaAB* e *mecA*, sendo 17/31 (55%) *S.haemolyticus*, 2/6 (33,3%) *S.epidermidis*, 0/1 *S.warneri* e 1/2 (50%) *S.capitis* (**Tabela 16**).

Entre as cepas de SCN estudadas, correlacionamos a presença do gene *icaAB* com a produção de *slime* (método do ágar vermelho do Congo), e observamos que não houve uma diferença significativa ($p < 0.99$).

4.5. Relação clonal entre as amostras de SCN através da técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).

Na análise do perfil clonal por PFGE dos isolados clínicos identificados como *S.haemolyticus*, a espécie encontrada com maior frequência neste estudo, revelou os perfisclonais dos isolados. Todas as cepas de *S.haemolyticus* (31/40; 77,5%) foram analisadas no PFGE (**Figura 11**). Os seis (15%) isolados de *S.epidermidis* também foram analisados pela técnica de PFGE (**Figura 12**).

O dendrograma foi gerado utilizando-se o Programa Bionumerics com coeficiente de Dice, usando-se uma média de correlação com o máximo de tolerância de posição de 2%, com otimização de 0.5, e sendo selecionado um coeficiente de similaridade de 80% para definição dos tipos clonais.

Para a interpretação dos resultados foram usados os critérios de VAN BELKUM e colaboradores (2007). Letras do alfabeto diferentes (maiúscula) foram usadas para denominar os isolados clínicos de *S.haemolyticus*, e letras minúsculas para os isolados de *S.epidermidis*. Com base nesta informação, 6 diferentes perfis (tipos clonais) foram encontrados para *S.haemolyticus* e 6 para *S.epidermidis*.

Para *S.haemolyticus* os pulsotipos que englobaram o maior número de isolados foram chamados de A, B, C e D, sendo o pulsotipo A (4 amostras), B (10 amostras), C (5 amostras) e D (8 amostras). A letra seguida de números (ex:A1) foi usada para classificar os subtipos desta espécie, os quais apresentam diferenças em 2 a 4 fragmentos de DNA. Vários isolados clínicos foram classificados como pertencendo ao mesmo subtipo clonal A'1, A'2, A'3, B'1, B'2, C'1, C'2, D'1, D'2, F'1 e F'2.

Tabela 16: Correlação dos genes *icaAB* e *mecA* das espécies de SCN isoladas de neonatos

Espécies (Nº)	% amostras positivas		
	<i>icaAB</i>	<i>mecA</i>	<i>icaAB +mecA</i>
<i>S.haemolyticus</i> (31)	22 (71%)	24 (77.4%)	17 (55%)
<i>S.epidermidis</i> (6)	4 (66,6%)	4 (66,6%)	2 (33,3%)
<i>S.warneri</i> (1)	0	1	0
<i>S.capitis</i> (2)	2	1(50%)	1 (50%)

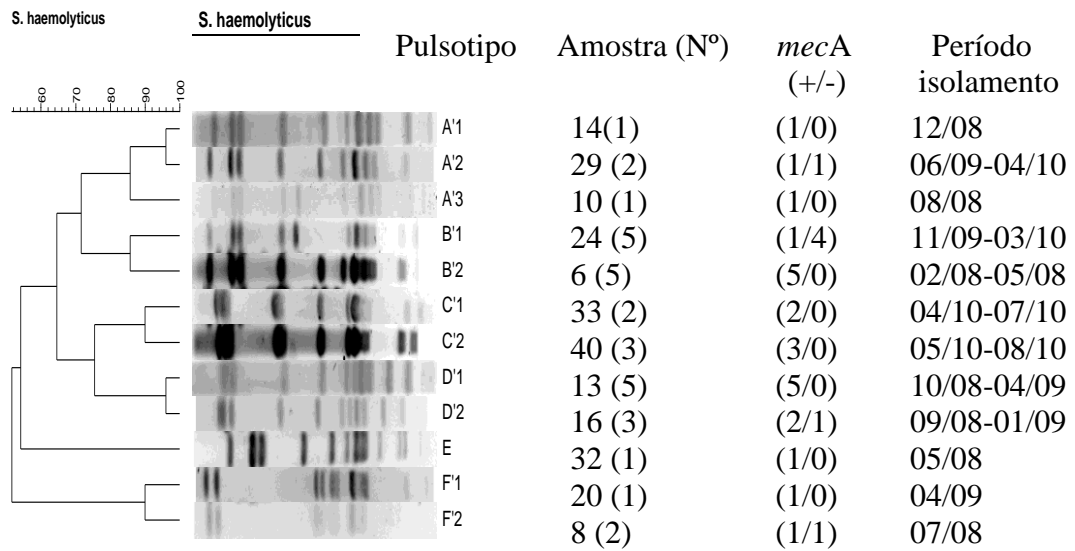


Figura 11: Dendrograma dos 31 isolados clínicos de *Staphylococcus haemolyticus* obtidos a partir do Pulsed-field em gel de eletroforese (PFGE).

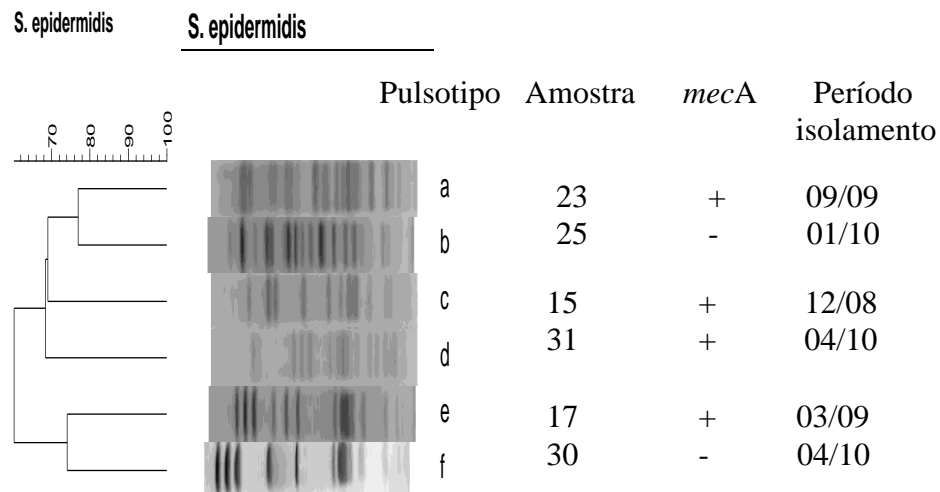


Figura12: Dendrograma dos 6 isolados clínicos de *Staphylococcus epidermidis* obtidos a partir do Pulsed-field em gel de eletroforese (PFGE).

Entretanto, quando comparados A'1 e A'2 com A'3 encontramos apenas 2 bandas de diferença, e assim considerados como clones associados, o mesmo para as cepas D'1 e D'2. Já as cepas B'1 e B'2 apresentam 3 bandas de diferença, sendo estas clones associados. Essas cepas têm um período de isolamento de 2 anos. Para as espécies de *S.epidermidis* não houve tipos clonais.

Os isolados de *S.haemolyticus* dos tipos D'1, D'2 e F'1, F'2 nos mostra uma elevada CIM (oxacilina) de $\leq 512\mu\text{g/ml}$, sendo os tipos D'1 e D'2 (6/8 isolados; 75%), e F'1 e F'2 (3/3; 100% isolados). Para *S.epidermidis*, somente os tipos (c, e) apresentaram CIM (oxacilina) de $\leq 512\mu\text{g/ml}$.

Com relação ao gene *mecA* para *S.haemolyticus*, os tipos C'1 e C'2 foram positivos para todas as amostras; D'1 e D'2 (7/8) isolados foram positivos, seguidos de B'1 e B'2 (6/10) isolados foram positivos para o gene. Enquanto que para *S.epidermidis*, apenas os tipos (b, f) não apresentaram o gene *mecA* (**Tabela 17**).

Correlacionando a atíпия das amostras de SCN com seu perfil genotípico, observamos que o pulstipo D está presente em 3 amostras de *S.haemolyticus*, predominando o subtipo D1 e que essas amostras apresentam multiresistência aos antimicrobianos testados (**Tabela 18**).

Associando a multiresistência da espécie *S.haemolyticus* com seu perfil genotípico, observamos que nos pulstipos A e D todas as amostras foram multiresistentes, e nos pulstipos B (7/10); C(4/5), E (1/1) e F (3/3). Para a espécie *S.epidermidis* somente o pulstipo (c) não expressou multiresistência (**Tabela 19**).

Tabela 17: Diferentes perfis biológicos relacionados com a resistência a oxacilina e a capacidade de produção de biofilme apresentados pelos pulsotipos de amostras de *S. haemolyticus* isoladas de neonatos internados na UTIN/HUPE/UERJ

Tipo Clonal (PFGE)	Resistência Oxacilina	Gene <i>mecA</i>	Produção de biofilme						Amostras
			V. Congo	Vidro	Poliestireno	<i>gene icaAB</i>	<i>gene aap</i>	<i>gene atlE</i>	
B1e B2// C2//D2// F2	S/R	+	+	++	+	+	+	+	1, 2, 3, 4, 5, 6//35//11//8
C2//D1// D2	R	+	+	++	+	-	-	-	16, 39//13// 40
A3//C1	R	+	+	+	+	+	-	-	10//38
D1	R	+	-	++	+	+	+	+	7
E	R	+	-	+	+	+	+	+	32
B1	R	-	+	++	+	+	-	-	26, 28
C1	S	+	+	++	+	+	+	-	33
D1	R	+	+	++	+	+	-	+	12
A1	R	+	+	++	+	-	-	+	14
D2	R	+	+	-	+	-	-	-	19
F1	R	+	-	+	+	+	-	-	20
A2	R	+	-	+	-	+	-	-	21
B1	R	-	+	++	+	-	-	-	27
B1	S	+	-	+	+	-	+	+	24
A2	R	-	-	+	+	+	+	-	29
F2	S	-	-	++	+	+	-	-	9
D2	S	-	-	-	+	+	-	-	36
D1	R	-	-	-	+	-	-	-	18

++ Fortemente aderente; + Moderadamente aderente; - Não aderente; R- resistente; S- sensível. Número de amostras por Pulsotipos: A1 (01), A2 (02), A3 (01), B1 (05), B2 (05), C1 (02), C2 (03), D1 (05), D2 (03), E (01), F1 (01) e F2 (02).

Tabela 18: Propriedades biológicas de amostras atípicas de *S. haemolyticus* (manose-positivas e trealose-negativas) e de *S. epidermidis* (manose-negativas) isoladas de neonatos internados na UTIN/HUPE/UERJ

Nº da amostra	Espécie	HC	Indicação clínica	Tratamento empírico	Perfil de MR aos antimicrobianos	Genes	Produção de biofilme	Pulsotipos PFGE
12	<i>S. haemolyticus</i>	1	RI (febre)	Van	Oxa//cefox, P, gen, etp//cip, clin, caz//mup	<i>mecA</i> // <i>icaAB, atlE</i>	VC/V/MP	D1
16	<i>S. haemolyticus</i>	2	Prematuro- (febre)	Van + Gen	Oxa//cefox, P, gen, etp//cip, clin, caz//eri, mer	<i>mecA</i>	VC/V/MP	D2
18	<i>S. haemolyticus</i>	1	RI	Van + Gen	Oxa//cefox, P, gen, etp//tob, tet, mup	-	MP	D1
19	<i>S. haemolyticus</i>	1	RI	Van	Oxa//cefox, P, gen, etp//cip, clin, caz	<i>mecA</i>	VC/MP	D1
26	<i>S. haemolyticus</i>	1	RI (febre)	NT	Oxa,cefox,gen,P,etp//caz//eri, mer, tob, clo	<i>icaAB</i>	VC/V/MP	B1
17	<i>S. epidermidis</i>	1	RI (febre)	Van	Oxa//cefox, gen, P,etp//cip, clin, caz//eri, mer, tob	<i>mecA</i> // <i>aap</i> <i>icaAB, atlE</i>	VC/V/MP	e

HC- Hemocultura; MR- Multiresistência; Van- Vancomicina; Gen- Gentamicina; Oxa- Oxacilina; Cefox- cefoxitina; P- Penicilina; Etp- Ertapenem; Mer- Meropenem; Cip- Ciprofloxacina; Clin- Clindamicina; Caz- Ceftazidima; Eri- Eritromicina; Mup- Mupirocina; Tet- Tetraciclina; Tob- Tobramicina; Clo- Cloranfenicol; VC- Vermelho do congo; V- aderência ao vidro; MP- Microplaca.

Tabela 19: Perfil de multiresistência aos antimicrobianos das espécies de SCN isoladas de neonatos

Espécies	Antimicrobianos	Nº de classes de ATBs	Perfil clonal PFGE
14. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, gen, etp, mer, eri, cip, clo	6	A1
21. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, eri, cip, tob, mup	5	A2
29. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, gen, neo, tob, etp, mer, cip, clin, clo	6	A2
10. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, gen, mer, cip, clo, mup	6	A3
1. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, gen, etp, mer, eri, cip, clo	6	B1
24. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, gen, etp, cip, clin, mup	6	B1
26. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, gen, etp, cip, eri, tet	6	B1
27. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , gen, etp, tob, tet, mup	5	B1
28. <i>S.haemolyticus</i>	-	-	B1
2. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, tob, eri, cip, mup	5	B2
3. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, gen, neo, tob, etp, mer, cip, clin, clo	6	B2
4. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, gen, tob, etp, eri, cip, clo	6	B2
5. <i>S.haemolyticus</i>	Cefox, P	1	B2
6. <i>S.haemolyticus</i>	Eri, clo	2	B2
33. <i>S.haemolyticus</i>	-	-	C1
38. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, gen, tob, etp, eri, cip, clin, tet	7	C1
16. <i>S.haemolyticus</i>	P , caz, gen, tet	3	C2
35. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , gen, etp	3	C2
39. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, gen, tob, etp, mer, eri, cip, clin	6	C2
7. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, gen, tob, etp, mer, eri, clo	5	D1
12. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , gen, etp, eri, cip, clo, mup	7	D1
13. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, P , gen, tob, eri, clin, clo	5	D1
18. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, gen, etp, mer, eri, cip, clin	6	D1
19. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, neo, tob, cip, tet	4	D1
11. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, tob, etp, eri, clo, mup	6	D2
36. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, neo, etp	3	D2
40. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , clin, clo	3	D2
32. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, gen, tob, etp, mer, eri, cip, clo	6	E
20. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, P , tob, eri, clin	4	F1
8. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, gen, neo, tob, eri, cip, clin	5	F2
9. <i>S.haemolyticus</i>	Oxa, cefox, P , caz, neo, tob, etp, eri, clo	5	F2
17. <i>S.epidermidis</i>	Oxa, cefox, P , caz, gen, tob, etp, mer, eri, cip, clin	6	e
15. <i>S.epidermidis</i>	P, eri	2	c
23. <i>S.epidermidis</i>	Oxa, cefox, P , caz, tob, etp, eri, tet	5	a
25. <i>S.epidermidis</i>	P , caz, tob, eri, clin, clo	5	b
30. <i>S.epidermidis</i>	Oxa, cefox, P , caz, gen, neo, tob, etp, eri, clin	5	f
31. <i>S.epidermidis</i>	Oxa, cefox, P , caz, gen, neo, tob, cip	3	d
22. <i>S.warneri</i>	Oxa, cefox, P , gen, eri	3	NT
34. <i>S.capitis</i>	Oxa, P , gen, cip	3	NT
37. <i>S.capitis</i>	Oxa, P , eri	2	NT

Oxacilina (oxa), Cefoxitina (cefox), Penicilina (P), Eritromicina (eri), Gentamicina (gen), Ceftazidima (caz), Ciprofloxacina (cip), Clindamicina (clin), Ertapenem (etp), Tobramicina (tob), Neomicina (neo), Meropenem (mer), Cloranfenicol (clo), Tetraciclina (tet), Mupirocina (mup); NT- Não tipada; ATBs- Antibióticos.

5. DISCUSSÃO

Até a década de 70, os micro-organismos do grupo SCN, frequentemente encontrados na microbiota anfibiótica normal das superfícies cutâneo-mucosas dos seres humanos eram considerados como bactérias comensais e desprezados como meros contaminantes nos exames microbiológicos. Nas últimas décadas, estas bactérias têm sido consideradas como patógenos verdadeiros, em crescente incidência, causando doenças clinicamente significativas e por vezes, fatais.

A maioria dos casos de infecções atribuídas aos SCN ocorre no ambiente hospitalar, tendo frequentemente como porta de entrada os sítios de inserções de catéteres intravasculares (HEILMANN & PETERS, 2000). A utilização de diversos procedimentos invasivos e o uso indiscriminado de antibióticos prolonga o tempo de internação e facilita a ocorrência de infecções nosocomiais que elevam a mortalidade e o custo nas UTIs neonatais dos hospitais. A imunidade limitada do RN, principalmente do prematuro e baixo peso, que pode estar agravada por doenças prévias e às dificuldades no diagnóstico precoce de infecção, interfere na mortalidade durante a internação (CORDEIRO, 2007). Segundo KEIM e colaboradores (2011) a maioria dos casos de sepse ocorridos em UTI neonatal (62%) foi relacionada com SCN: 57% de *S. epidermidis*, 21% *S. warneri* e 21% *S. capitis*.

No presente estudo foi documentada presença de espécies de SCN frequentemente relacionadas às IRAS em recém-nascidos internados na UTI neonatal de um hospital universitário localizado na região metropolitana do Rio de Janeiro. *S. haemolyticus* seguida de *S. epidermidis*, *S. capitis* e *S. warneri* foram associados com quadros de infecções nosocomiais em pacientes que faziam uso de cateter.

Estudos clínicos têm indicado *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri* e *S. hominis* como os SCN mais prevalentes em infecções hospitalares (KEIM *et al*, 2011). Embora *S. epidermidis* esteja entre as espécies mais isoladas nos Laboratórios de Microbiologia Clínica, *S. haemolyticus* tem sido associado com a sepse em neonatos e várias infecções em indivíduos imunocomprometidos e/ou submetidos a procedimentos médicos invasivos. Segundo diversos autores, *S. haemolyticus* tem sido responsáveis por 5-38% dos casos de infecções causadas por SCN (ISAAC *et al*, 1993; TABE *et al*, 1998; NATOLI *et al* 2009; RODRIGEZ *et al*, 2009). Em estudo realizado em diversos departamentos de Hospital Universitário em Budapeste, Hungria (KRISTOF *et al*, 2011), cepas de *S. haemolyticus* de pulsotipos variados foram responsáveis por 6% do total dos casos de infecções de corrente sanguínea e mostraram-se prevalentes em UTIs, principalmente na UTI neonatal.

Na presente investigação, 77,5% das cepas de SCN isoladas de neonatos foram identificadas como *S. haemolyticus*, representando um percentual bem mais elevado do que o observado em estudos realizados em outros países (ISAAC *et al*, 1993; TABEL *et al*, 1998; NATOLI *et al*, 2009; RODRIGEZ *et al*, 2009; KRISTOF *et al*, 2011).

O reconhecimento dos SNC como agentes patogênicos nosocomiais tem estimulado pesquisas envolvendo o desenvolvimento de mais métodos precisos para sua identificação e caracterização molecular, bem como o estudo de fatores de virulência e também o estabelecimento de critérios rigorosos para discriminar casos de infecção de contaminação da flora bacteriana (De PAULIS *et al*, 2003).

Até pouco tempo atrás, muitos laboratórios clínicos não realizavam a identificação dos SCN até o nível de espécie, porém, devido ao crescente envolvimento com bacteremias, especialmente em neonatos, indivíduos imunocomprometidos e pacientes com a utilização de cateteres e próteses, alterou essa realidade (CAIERÃO *et al*, 2006). Os avanços nas técnicas de identificação bacteriana permitiram identificar as espécies de estafilococos com potencial patogênico em humanos, como: *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi*, *S. warneri*, *S. caprae* (KLOOS & BANNERMAN, 1994).

O método de identificação proposto por KLOOS & SCHLEIFERI (1975) e modificado por BANNERMAN & PEACOCK (2003) tem sido considerado o método convencional para identificação de *Staphylococcus* apesar da dificuldade de execução e difícil aplicação na rotina laboratorial. O diagnóstico torna-se ainda mais difícil em decorrência da expressão de fenótipos atípicos apresentados por diversas amostras (LEE & PAK, 2001).

Segundo IORIO e colaboradores (2007), entre 198 amostras de *Staphylococcus* estudadas, 110 foram classificadas como cepas atípicas em pelo menos um teste do método de referência, enquanto 39 cepas mostraram perfis atípicos no método de identificação fenotípico simplificado descrito pelos referidos autores. Elevado número de cepas atípicas foram detectados principalmente nas espécies *S. haemolyticus* (63,6%), *S. epidermidis* (47,8%), *S. hominis* (40%) pelo método de referência.

Neste estudo, seis amostras exibiram fenótipos atípicos, sendo a maioria *S. haemolyticus*. A dificuldade no diagnóstico de espécies de SCN pode ser evidenciada pelo estudo comparativo de diferentes métodos de identificação incluindo o mPCR, método fenotípico simplificado além dos sistemas automatizados. Ao contrário do observado no estudo comparativo do mPCR com o método fenotípico simplificado (97,5% de acurácia), o Sistema Vitek 2 e o API Staph permitiram uma identificação correta de aproximadamente 40% das amostras, não podendo ser considerados como métodos eficazes para a identificação

laboratorial da espécie *S. haemolyticus*. O Sistema Vitek 2 identificou a maioria das amostras de SCN como *S. epidermidis* (70%), não detectando portanto, a maioria das amostras de *S. haemolyticus*. A dificuldade de identificação de SCN pelo Sistema Vitek 2 também foi previamente observada por outros autores (DE PAULIS *et al*, 2003; SINGHAL *et al*, 2006; NUNES *et al*, 2007). Segundo LAYER *et al* (2006), o sistema Vitek 2 foi capaz de identificar corretamente somente 42,3% das amostras testadas.

Segundo MAKKI *et al*(2011), o sistema API-Staph foi capaz de identificar sete espécies diferentes com uma porcentagem de identificação variando entre 44% a 99%. De acordo com os autores, as espécies *S. haemolyticus* e *S. xylosus* apresentaram os melhores resultados (80%) quando comparados com as demais espécies identificadas. Em nossas pesquisas, o sistema API-Staph identificou quatro espécies (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* e *S. sciuri*) com porcentagem de identificação variando entre 35,6% a 97,8%, embora em menor proporção que o Sistema Vitek 2, para o método semi-automatizado API-Staph também foi observado o diagnóstico incorreto para um grupo de amostras SCN. Para a espécie *S. haemolyticus* API-Staph apresentou melhor resultado do que o sistema Vitek 2.

Em diversos trabalhos disponíveis na literatura internacional têm sido observadas cepas de *S. haemolyticus* com resistência múltipla aos antimicrobianos associadas à colonização e infecção em pacientes hospitalizados (RODRIGEZ *et al*, 2009).

Em nosso estudo foi demonstrado que a maioria das amostras de SCN isoladas dos recém-nascidos apresentou multiresistência para três ou mais dos grupos de antimicrobianos testados. A presença de várias amostras multiresistentes, particularmente de *S. haemolyticus*, pode estar favorecendo a transferência de genes de resistência no ambiente hospitalar.

Conforme enfatizado em nossos estudos, o tratamento de escolha para as infecções causadas pelos SCN com frequência é a vancomicina. Devido à emergência de enterococos (BRADLEY *et al*, 1999) e estafilococos vancomicina-resistentes (HIRAMATSU, 1998; SIEVERT *et al*, 2002), a recomendação é reduzir o uso desta droga na terapia antimicrobiana (FERREIRA *et al*, 2003). O surgimento de cepas de SCN com sensibilidade diminuída à vancomicina e teicoplanina tem sido relatado em instituições de saúde, podendo contribuir para o aumento da resistência a vários outros antibióticos. KRISTOF e colaboradores (2011) observaram uma incidência de 32% de sensibilidade reduzida a teicoplanina em cepas de *S. haemolyticus* desprovidas de genes *vanA* ou *vanB*. Nossas amostras de SCN apresentaram, na sua totalidade, sensibilidade apenas à vancomicina quando avaliadas pelo método do disco, particularmente as amostras de *S. haemolyticus*. Portanto, estudos adicionais estão em andamento no sentido de investigar diferentes CIMs para vancomicina e a presença de genes

vanA e *vanB* em amostras de *S. haemolyticus* da mesma forma que o realizado para oxacilina (55% apresentaram CIMs=512µg/ml) e o gene *mecA*(77,4%).

A maioria das infecções por SCN adquirida dentro dos hospitais é causada por cepas com resistência a múltiplos antimicrobianos, como a gentamicina, trimetropim, eritromicina, cloranfenicol, e meticilina, o que reflete provavelmente a pressão seletiva do uso indiscriminado de antimicrobianos no ambiente hospitalar. SADER *et al* (2001) relataram uma frequência de 80% de resistência entre os SCN envolvidos nas infecções de corrente sanguínea. Dentre os 40 isolados estudados de SCN envolvidos nas infecções de corrente sanguínea, 82,5% das amostras foram resistentes a meticilina, 60% a gentamicina, 65% a eritromicina e 32,5% a cloranfenicol. KRISTOF e colaboradores (2011) observaram amostras de *S. haemolyticus* com CIMs elevados para oxacilina (216µg/ml), eritromicina, clindamicina, gentamicina e ciprofloxacina.

DICKINSON & ARCHER (2000) relataram que a resistência a oxacilina envolvia resistência cruzada com todos os outros antibióticos beta-lactâmicos. FERREIRA e colaboradores (2003) ressaltaram a importância do Laboratório Clínico distinguir entre as cepas de SCN oxacilina-sensíveis e oxacilina-resistentes para evitar o uso desnecessário da vancomicina nos hospitais. ALCARÁZ e colaboradores (2003) relataram que o uso indevido de um antimicrobiano, no caso vancomicina, apresenta complicações terapêuticas, alto custo e pode levar à seleção de mutantes resistentes. DICKINSON & ARCHER (2000) e RAAD e colaboradores (1998) já haviam estimado que quase 90% dos estafilococos eram penicilina-resistentes e que a resistência a oxacilina estaria aumentando desde aquele tempo.

Na presente pesquisa, os dados obtidos pelos testes fenotípicos de detecção da resistência a oxacilina demonstraram que 82,5% das cepas de SCN foram resistentes a oxacilina. Os resultados foram concordantes com aqueles obtidos por outros pesquisadores (LOUIE *et al*, 2001; FERREIRA *et al*, 2002). Em 2001, DIICKEMA e colaboradores informaram que mais de 70% das amostras de SCN no mundo apresentavam resistência a oxacilina e que as cepas hospitalares haviam se tornado resistentes a vários outros agentes antimicrobianos.

Segundo KEIM *et al* (2011), em hospitais a frequência de SCN resistentes a meticilina gira em torno de 30%-80%. Os dados dos autores revelaram uma incidência de 38% de SCN resistentes a meticilina. A maioria (86%) dos SCN multiresistentes foram resistentes a mais de 2 classes de antimicrobianos, incluindo os β-lactâmicos. A resistência a dois ou a mais grupos de antimicrobianos tem sido geralmente detectada nos SCN (DE ALLORI *et al*, 2006; NAYAK *et al*, 2007). No presente trabalho, 82,5% dos SCN foram resistentes a oxacilina. As

espécies de *S. haemolyticus* (27/31), *S. epidermidis* (6/6), *S. capitis* (1/1) e *S. warneri* (1/1) em sua grande maioria, expressaram o mesmo perfil de susceptibilidade às drogas antimicrobianas, o que poderia sugerir a possibilidade da disseminação da resistência no ambiente hospitalar entre os isolados clínicos estudados.

A resistência de estafilococos à meticilina está associada à presença do gene *mecA*, responsável pela síntese de uma proteína de ligação à penicilina com afinidade menor às drogas beta-lactâmicas, a detecção do gene *mecA* por PCR é considerada o padrão-ouro para a detecção da resistência a oxacilina em *Staphylococcus* (STAPLETON & TAYLOR, 2002). O gene está inserido em um cassete cromossômico estafilocócico chamado SCC*mec*. O SCC*mec* é um elemento genético móvel e pode representar uma fonte para o gene de resistência à meticilina para outros estafilococos (ITO *et al*, 2003; MARTINS & CUNHA, 2007). Recentemente, BERGLUND E SÖDERQUIST (2008) indicaram evidências de transferência horizontal de SCC*mec* entre *S. haemolyticus* meticilina-resistente e *S. aureus* meticilina-resistente.

Neste estudo, as cepas resistentes à oxacilina foram analisadas por dois métodos. Um dos métodos foi a detecção do gene *mecA* para a verificação da resistência à oxacilina. O gene *mecA* foi encontrado em 75% dos isolados clínicos de SCN, apresentando semelhança do observado por outros autores que encontraram 87% de SCN apresentando o gene *mecA* (HIRA *et al*, 2007).

Foi possível constatar em 3 isolados de *S. haemolyticus* que, apesar de a bactéria possuir o gene *mecA*, provavelmente não houve expressão deste gene, ou seja, a PBP2a não foi produzida. Tem sido observado que embora o gene *mecA* esteja presente nos estafilococos, alguns fatores podem interferir na expressão do gene, não sendo possível a detecção fenotípica da resistência à oxacilina mediada pela PBP2a (STAPLETON & TAYLOR, 2002).

Segundo FREDHEIM *et al* (2009), dados confirmam que *S. haemolyticus* é um patógeno importante em grupos de paciente de alto risco, tais como recém-nascidos e pacientes imunodeprimidos. Foi encontrada uma prevalência muito elevada de genes que codificam resistência aos antibióticos beta-lactâmicos e aminoglicosídeos, bem como uma proporção significativa de isolados com CIMs de vancomicina próximas do ponto definido para a resistência. Isto sublinha a importância de *S. haemolyticus* ser um patógeno multiresistente, que é difícil de tratar com antibióticos convencionais.

Tem sido sugerido que o principal fator de virulência dos SCN é a capacidade para formar biofilme sobre a superfície de dispositivos médicos (KEIM *et al*,

2011). CHRISTENSEN *et al* (1987) relataram que muitas espécies de bactérias causadoras de doenças apresentaram espontaneamente, variação fenotípica durante a colonização de uma superfície caracterizando sua virulência. Estes pesquisadores encontraram uma associação entre produção de *slime*, entre cepas de SCN que colonizam cateteres e, a patogênese de infecção favorecida por um corpo estranho.

A virulência dos *Staphylococcus*, através da produção de biofilme, nos cateteres endovenosos, é responsável pelo aumento das infecções hospitalares por Gram positivos, superando as por Gram negativos. Segundo ARAUJO *et al* (2006), estudos utilizando uma cepa nocaute para o operon *ica* sugeriram um importante papel do *ica* na formação de biofilme e patogênese de *S. epidermidis*. Alguns estudos têm demonstrado que uma reduzida capacidade de produção do biofilme pelos estafilococos levaria à diminuição da virulência dessas bactérias. Dessa forma, sem a proteção do biofilme, essas bactérias estariam susceptíveis às defesas imunológicas do hospedeiro ou mesmo aos antimicrobianos.

A maioria das amostras de *S. haemolyticus* mostrou associação entre a produção de *slime*, multiresistência e resistência aos antimicrobianos indicando o potencial patogênico no ambiente hospitalar. Nossos dados confirmam que o ambiente do biofilme parece ser favorável às transferências gênicas, uma vez que a população formada por cepas capazes de aderir à superfície do poliestireno apresentava maior índice de multiresistência.

FREEMAN *et al* (1989) propuseram o ágar Vermelho Congo, como método alternativo para detectar a produção de *slime* em SCN. No presente estudo, os ensaios usando o ágar Vermelho Congo demonstraram a produção de *slime* em 77,78% das cepas de SCN. A maioria das cepas de SCN foram oxacilina resistentes e produtoras de polissacarídeos extracelulares (*slime*) em ágar vermelho Congo, correspondendo a 71% de cepas de *S. haemolyticus* e 50% de *S. epidermidis*.

Métodos fenotípicos tais como, aderência a microplaca e formação de *slime* (Ágar Vermelho do Congo), têm sido utilizados para avaliar a produção de biofilme por *Staphylococcus*, podendo apresentar resultados discordantes, mesmo quando os genes *ica* estão presentes nas amostras (JAIN & AGARWAL, 2009). Neste estudo, 30% das amostras apresentaram resultado positivo para aderência a microplaca e/ou formação de *slime*, mas não expressaram o gene *icaAB*.

Na avaliação de produção de biofilme por cepas SCN em microplacas de poliestireno foram verificadas cepas não aderentes e moderadamente aderentes. As cepas que apresentaram não aderência foram: *S. haemolyticus* (1/31), e *S. captis* (1/2). As cepas

moderadamente aderentes foram: *S. epidermidis* (6/6), *S. haemolyticus* (30/31), *S. capitis* (1/2) e *S. warneri* (1/1).

A reação de PCR usada para detectar os genes de formação de biofilme (*icaAB*, *aap* e *atlE*) em cepas de SCN mostrou a presença desses genes em apenas 33% dos isolados. O estudo enfatiza o envolvimento parcial do operon *ica* na expressão do biofilme de *S. haemolyticus* uma vez que 70% das amostras apresentaram o gene *icaAB*. Para esta espécie, a presença dos genes *atlE* e *aap* pareceu não ser essencial para a produção de biofilme.

Além do *ica*, outros genes vêm sendo citados como importantes na produção de biofilme. Dentre esses genes incluem-se os genes *aap* e *atlE*. Tais elementos genéticos parecem estar envolvidos no acúmulo de biofilme sob superfícies de polímeros e na capacidade de ligação específica a estas superfícies, respectivamente (ARAÚJO *et al*, 2006). Esses genes também foram verificados por nós em cepas produtoras de biofilme, onde 45 % apresentaram o gene *atlE*, 40 % o *aap*, e 33 % das cepas possuíam os três genes (*ica*, *aap* e *atlE*).

Nosso estudo, utilizando cepas clínicas, confirma também a importância da presença do gene *aap* para a acumulação do biofilme, levando a formação de um biofilme mais denso. Ainda não é completamente esclarecido como a proteína AtlE efetivamente possui a capacidade de ligação específica a superfícies. KLINGENBERG *et al* (2005) verificaram em seus estudos que 17% das cepas não produtoras de biofilme analisadas apresentavam os genes *ica*, *atlE* e *aap* sugerindo que outros fatores estariam também envolvidos na produção do biofilme. Somente a presença do gene *icaAB* em 7,5% cepas não produtoras de biofilme foi detectada em nosso estudo.

Amplios métodos para o estudo *in vitro* de formação de biofilme têm sido descritos. O método de microtitulação com coloração de cristal violeta para formação de biofilme no fundo dos poços tem sido um método padrão para a avaliação de *S. epidermidis* na formação de biofilme por muitos anos. A investigação visual de biofilme de *S. haemolyticus* mostrou que eles frequentemente formam biofilme na interface líquido-ar, como foi mostrado em nosso estudo. Portanto, se recomenda o uso da técnica modificada para a quantificação de um biofilme para *S. haemolyticus* (FREDHEIM *et al*, 2009).

A produção de biofilme é considerada o mais importante fator de virulência em infecções causadas por *S. epidermidis* e outros SCN associados com procedimentos médicos invasivos. Algumas pesquisas tem investigado a produção de biofilme como relevância clínica das espécies de SCN.

Na UTIN foi detectada a presença de seis diferentes tipos clonais de *S. haemolyticus* e de *S. epidermidis* relacionados com quadros de bacteriemia em neonatos que faziam uso de cateter indicando disseminação da espécie nesta unidade hospitalar e a endemicidade em nossa comunidade.

Segundo, BOUCHAMI *et al* (2011), a caracterização molecular de *S. haemolyticus* tem demonstrado que as infecções em hospitais são causados por um número limitado de tipos de clones que têm a capacidade para persistir por vários anos em alas específicas, dado este confirmado em nosso estudo pelo tempo de coleta. Além disso, a disseminação geográfica de clones de *S. haemolyticus* multiresistentes foi observada. No entanto, apesar das altas frequências do *S. haemolyticus* multiresistentes, não se sabe se o mecanismo preferencial de disseminação de resistência a meticilina nesta espécie é através da transferência horizontal de SCCmec ou a disseminação de clones de *S. haemolyticus*, pois o papel desta espécie na evolução do SCCmec é desconhecida.

O PFGE, método considerado padrão-ouro para caracterização de *Staphylococcus*, foi utilizado nesse estudo para a realização da investigação do perfil molecular dos isolados clínicos identificados como *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, objetivando verificar a clonalidade. Utilizamos o critério de interpretação estabelecido por VAN BELKUM e colaboradores (2007), o que revelou uma considerável diversidade genética dentro da população estudada, onde foram encontrados seis perfis clonais diferentes de *S. haemolyticus*, entre as 31 cepas investigadas.

Vários estudos têm sido conduzidos com o objetivo de determinar a clonalidade entre cepas de *S. epidermidis*, principalmente associando a técnica de PFGE. Porém, as principais críticas ao PFGE se referem ao seu alto custo, e a dificuldade de interpretação e da troca de dados obtidos pela tipagem, porque de acordo com os autores, essa interpretação depende de um modelo de bandas, que apesar de possuir alto poder de discriminação, possui interpretação trabalhosa e muitas vezes subjetiva diante da existência de bandas pouco definidas presente no gel, além da difícil execução para a maioria dos laboratórios clínicos (JOHANSSON *et al*, 2006; SAIDA *et al*, 2006; IBRAHEM *et al*, 2008; MIRAGAIA *et al*, 2008).

A maioria dos relatos na literatura sobre diversidade genômica de SCN descreve clones relacionados a surtos hospitalares (NUNES *et al*, 2005; SORLOZANO *et al*, 2009) ou relatam alta diversidade genômica das diferentes espécies (MIRAGAIA *et al*, 2008; BOUCHAMI *et al*, 2011). NUNES e colaboradores (2005), ao avaliarem a diversidade clonal de 69 amostras *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* resistentes a oxacilina, isoladas de nove

hospitais brasileiros, observaram 16 genótipos para *S. epidermidis*, sendo que 52% das amostras pertenciam a apenas dois genótipos. MIRAGAIA e colaboradores (2007), estudando 217 amostras de *S. epidermidis*, concluíram que a alta diversidade genômica apresentada por esta espécie estaria relacionada à necessidade em se adaptar a diferentes ambientes, contribuindo para o aumento nas taxas de recombinação e aquisição de SCC*mec*.

Segundo KRISTOF *et al* (2011), revelou em seu estudo com a técnica de PFGE 56 genótipos, indicando nenhuma relação clonal das cepas, dado este que confirma em nosso estudo os diferentes tipos clonais para *S. epidermidis*, mas não para as cepas *S. haemolyticus*. Alguns estudos revelam elevada homogeneidade genética, se os isolados foram "cepas-surto", ou se vieram da mesma unidade do hospital (BURNIE *et al*, 1997; RAIMUNDO *et al*, 2002). Em seu estudo as cepas não mostraram nenhuma correlação entre os padrões fenotípicos de resistência a antibióticos e de genótipos de PFGE, devido a estes dados e por causa da multiresistência de *S. haemolyticus*, os padrões de resistência a antibióticos não são úteis para a investigação epidemiológica e caracterização. A capacidade de *S. haemolyticus* adquirir resistência aos antimicrobianos e seu potencial patogênico em pacientes imunocomprometidos, especialmente entre os recém-nascidos prematuros, enfatiza a importância da identificação em nível de espécies de SCN e rotineiramente em laboratórios determinar a CIM de agentes antibacterianos apropriados para estes isolados.

Neste estudo, o subtipo B2 pareceu exibir um potencial de virulência mais expressivo que os demais pulsotipos de *S. haemolyticus*, uma vez que compreendeu cinco amostras de perfis fenotípicos e genotípicos homogêneos que incluíam todos os fatores de virulência avaliados. Diferente dos demais pulsotipos, todas as amostras foram oxacilina-resistentes e exibiram sensibilidade a vancomicina além de serem portadoras dos genes de resistência a meticilina, aderência e produção de biofilme (*mecA*, *icaAB*, *aap* e *atlE*), além de produzirem biofilme em todos os substratos abióticos testados (Vermelho do Congo, poliestireno e vidro). Dentre os demais tipos clonais, apenas duas amostras pertencentes aos pulsotipos B1 e F2 exibiram estas mesmas propriedades. Os dados indicam diversidade na capacidade de produção de biofilme de *S. haemolyticus* e o envolvimento de outros fatores bacterianos e/ou ambientais que participam na expressão de *slime* e de produção de biofilme por esses patógenos, independentes dos perfis de resistência aos antimicrobianos, inclusive oxacilina e vancomicina além da presença dos genes *mecA*, *icaAB*, *aap* e *atlE*.

A capacidade dos SCN para persistir em um hospital durante longos períodos tem sido relatada por diversos autores, e é provável que o uso de antibióticos tenha sido um fator para seleção de clones em hospitais. A persistência e disseminação de clones de SCN dentro dos

hospitais têm sido explicadas mediante uma origem na comunidade ou por ser endêmicas no hospital. Isto sugere que MRSH pode ser isolado de infecções de origem nosocomial ou de origem comunitária, e assim, sua disseminação pode se realizar em ambos os sítios (ambiente hospitalar e comunitário) (NATIVIDAD *et al* , 2006). As técnicas de biologia molecular são ferramentas muito úteis na caracterização de isolamentos clínicos. No presente trabalho foram identificados clones de *S. haemolyticus* resistente a oxacilina que foram isolados de pacientes hospitalizados. Ainda que a transmissão de bactérias não necessariamente conduza a infecção, estes resultados sugerem que é necessário estabelecer programas de controle para evitar a disseminação deste patógeno multiresistente neste hospital.

A resistência cruzada entre patógenos no ambiente hospitalar é um problema sério, pois representa uma transferência de micro-organismos presentes nestes ambientes entre pacientes através de instrumentos hospitalares ou através de um intermediário, o profissional da saúde. O CDC enfatiza que medidas simples como a lavagem das mãos e o uso de antissépticos devam ser utilizadas visando reduzir a disseminação de micro-organismos hospitalares, diminuindo assim, a ocorrência das infecções hospitalares (CDC, 2002).

Temos como perspectivas futuras para esta pesquisa continuar estudando os aspectos multifatoriais da virulência dos SCN, bem como seus fatores de resistência e mais detalhadamente os fatores de virulência, além da produção de biofilme, pois a disseminação e resistência dessas amostras são informações relevantes para o hospital.

6. CONCLUSÕES

- SCN pertencentes às espécies *S.haemolyticus*, *S.epidermidis*, *S.capitis* e *S. warneri* foram isolados de hemoculturas obtidas de recém-nascidos internados na UTI Neonatal do HUPE/UERJ no período de 2008-2010;
- *S. haemolyticus* correspondeu à espécie predominantemente isolada do sangue dos recém-nascidos internados na UTIN. Todos faziam uso de cateteres e foram submetidos à terapia antimicrobiana empírica com vancomicina e/ou gentamicina;
- Ao contrário do esperado, a espécie *S. epidermidis* foi relacionada com apenas 15% dos quadros das infecções hematogênicas;
- A análise comparativa dos resultados obtidos pelo PCR-Multiplex com métodos fenotípicos convencionais e sistemas automatizados de identificação de SCN demonstrou uma concordância de 97,5% entre o teste molecular e o esquema convencional simplificado (microplaca) pelo fato de uma amostra de *S.haemolyticus* ter sido identificada como *S. epidermidis* pelo método simplificado.
- O uso dos sistemas automatizados Vitek2 e API Staph não pareceu adequado para os casos de suspeita de infecção por *S.haemolyticus* uma vez que a maioria das amostras dessa espécie pode ser identificada incorretamente como *S.epidermidis* ou como outras espécies.
- As amostras de SCN apresentaram perfis variados de multiresistência a 16 antimicrobianos testados. Foi observada sensibilidade em 100% das amostras apenas para a vancomicina. A maioria (82,5%) das amostras de SCN isoladas de sangue apresentou resistência a oxacilina, apesar de 25% destas não apresentarem o gene *mecA*. As concentrações inibitórias mínimas para oxacilina variaram de $\geq 0,25 \mu\text{g/mL}$ à $\leq 512 \mu\text{g/mL}$. CIM=512 $\mu\text{g/mL}$ foi observada em mais da metade das amostras de *S. haemolyticus*. Foram observadas amostras oxacilina-sensíveis entre as espécies *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. capitis* e *S. warneri*.
- As amostras de SCN apresentaram diferenças na capacidade de produzir biofilme em superfícies abióticas. Nenhuma amostra aderiu fortemente ao poliestireno nas condições estudadas. Todas as amostras de *S. epidermidis* aderiram ao vidro e ao plástico, apesar de apenas parte delas ter se apresentado como produtoras de *slime* em meio Vermelho do Congo. *S. capitis* e *S. warneri* não produziram *slime* em meio Vermelho do Congo apesar de terem sido capazes de aderir ao vidro e ao plástico. Diferente do observado para as demais espécies, algumas amostras de *S. haemolyticus* foram incapazes de aderir ao vidro e

ao poliestireno. A semelhança das amostras de *S. epidermidis*, parte das amostras de *S. haemolyticus* produziu *slime* em meio Vermelho do Congo. Apesar da maioria das amostras de SCN isoladas de neonatos ter apresentado capacidade de produzir *slime* e/ou biofilme, não foi observada total correlação com a presença dos genes *mecA*, *icaAB*, *aap*, *atlE*, enfatizando a natureza multifatorial da produção de biofilme de SCN. Um percentual baixo de amostras de *S. haemolyticus* apresentou os genes *aap* (38,7%), *atlE*(42%) além de *icaAB* (71%).

- Amostras de *S. haemolyticus* oxacilina-resistentes apresentaram atíпия quanto à capacidade de metabolização de manose e trealose. A maioria dessas amostras eram pertencentes ao pulsotipo D e capazes de produzir biofilme no vidro e no plástico apesar de desprovidas dos genes *aap*, *icaAB* e/ou *atlE*.
- Na UTIN foi detectada a presença de seis diferentes tipos clonais de *S. haemolyticus* e de *S. epidermidis* relacionados com quadros de bacteriemia em neonatos que faziam uso de cateter, indicando disseminação da espécie nesta unidade hospitalar e a endemicidade em nossa comunidade.

REFERÊNCIAS

ALCARÁZ, L.E.; SATORRES, S.E.; LUCERO, R.M.; PUIG DE CENTORBI, O.N. Species identification, slime production and oxacillin susceptibility in coagulase-negative Staphylococci isolated from nosocomial specimens. **Braz J Microbiol.** 34:45-51, 2003.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos. Módulo IV, 2005. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 20/08/2011.

ARAUJO, L.G. Produção de biofilme, detecção dos genes *icaAD*, *atlE* e *aap* e resistência aos antimicrobianos em cepas de *Staphylococcus epidermidis* resistentes a metilicina(MRSE). **Dissertação de mestrado**. Niterói, 2006.

ARCHER, L.G. *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci. In: Mandell, G.L.; Douglas, R.G.; Bennett, J.E.; Dolin, R editors. Principles and practice of infectious diseases. New York: **Churchill Livingstone**. 5º ed, p. 2092-100, 2000.

ARCIOLA, C. R.; BALDASSARI, L.; MONTANARO, L. Presence of *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter –associated infections. **J Clin Microbiol.** 39:2151-6, 2001.

AZEVEDO, P.A.; ANTUNES, A.L.S.; MARTINO, M.D.V & PIGNATARI, A.C.C. *Staphylococcus cohnii* spp urealyticus: relato de caso de um patógeno incomum. **Rev Soc Bras Med Trop.** 41:197-199,2009.

BANNERMAN, T.L & PEACOCK, S.J. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grown aerobically. In: **Manual of Clinical Microbiology**. 384-404, edited by Murray, P.R, Baron, E.J, Pfaller, M.A, Tenover, F.C & Yoken, R.H. 8ed. ASM Press. Washington,DC, 2003.

BANNERMAN, T.L & PEACOCK, S.J. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase-positive cocci. In: **Manual of Clin Microbiol**. Edited by Murray, P.R, Baron, E.J, Jorgensen, J.H, Landry, M.L, Pfaller, M.A. 9ed. ASM Press. Washington,DC,EUA, 2007.

BARROS, E.M.; IÓRIO, N.L.P.; BASTOS, M.C.F.; SANTOS, K.R.N & GIAMBIAGI de MARVAL, M. Species-level identifications of clinical staphylococcal isolates based on polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a partial *groEL* gene sequence. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 59: 251-7, 2007.

BERGLUND, C.; SÖDERQUIST, B. The origin of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate at a neonatal ward in Sweden-possible horizontal transfer of a staphylococcal cassette chromosome *mec* between methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus aureus*. **Clin Microbiol Infect.** 14 (11): 1048-1056, 2008.

BERNARDI, A.C.A.; PIZZOLITTO, E.L.; PIZZOLITTO, A.C. Identificação de cocos aeróbios Gram-positivos, catalase positiva com implicação em processos infecciosos. **Rev Ciênc Farm.** 22: 223-238, 2005.

BJÖRKQVIST, M.; SÖDERQUIST, B *et al.* Phenotypic and genotypic characterisation of blood isolates of coagulase -negative staphylococci in the newborn. **APMIS**.110: 332-9, 2002.

BOUCHAMI, O.; ACHOUR, W.; MEKNI, M. A.; ROLO, J. & BEN HASSEN, A. Antibiotic resistance and molecular characterization of clinical isolates of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci isolated from bacteremic patients in oncohematology. **Folia Microbiol.** 56:122–130, 2011.

BRADLEY, S.J.; WILSON, A.L.; ALLEN, M.C.; SHER, H.A.; GOLDSTONE, A.H.; SCOTT, G.M. The control of hyperendemic glycopeptide-resistant *Enterococcus* spp. on a hematology unit by changing antibiotic usage. **J Antimicrob Chemoter.** 43: 261-266, 1999.

BRITO, D.D.; OLIVEIRA, J.E.; DARINI, C.A.; ABIDALLICH, S.O.V.; GOTEJO, P.P. Outbreaks associated to bloodstream infection with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococcus spp in premature neonates in a University Hospital from Brazil. **J Bras Microbiol.** 37:101-107, 2006.

BURNIE, J.P.; NADERI-NASAB, M.; LOUDON, K.W.; MATTHEWS, R.C. An epidemiological study of blood culture isolates of coagulase-negative staphylococci demonstrating hospital-acquired infection. **J Clin Microbiol.** 35:1746-1750, 1997.

CAIERÃO, J.; SUPERTI, S.; DIAS, CA.; D'AZEVEDO, PA. Automated systems in the identification and determination of methicillin resistance among coagulase negative staphylococci. **Men Inst Oswald Cruz.** 101:277-80, 2006.

CAMPOS, L.I. Aspectos Econômicos das Infecções Hospitalares. In: Martins MA (ed.). **Manual de Infecção Hospitalar.** Epidemiologia, Prevenção e Controle. Rio de Janeiro, 2. ed .32-7, 2001.

CASEY, A.L.; LAMBERT, P.A & ELLIOTT, TS. *Staphylococci*. **Int J Antimicrob Agents.** 29:23-32, 2007.

CDC - CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. **Morb Mortal Wkly Rep Recomm Rep.**41: 1-19, 1992.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2002). Disponível em: www.cdc.gov/handhygiene .Acesso em 20/09/2004.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC, 2008). Disponível em www.cdc.gov/ncidod/healthDis.html. Acessado em 14/01/2010.

CERCA, N.; MARTINS, S. ; PIER, G. *et al.* The relationship between inhibition of bacterial adhesion to a solid surface by sub -MICs of antibiotics and subsequent development of a biofilm. **Res Microbiolol.**156: 650-5, 2005.

CHAIEB, K.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUF, A. Detection of *icaA* and *icaD* loci by polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needles in a dialysis unit. **J hosp infect.** 61:225-230, 2005.

CHRISTENSEN, G.D.; BADDOUR, L.M.; SIMPSON, W. A. Phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* slime production in vitro and in vivo. **Infect. Immun.** 55: 2870-2877, 1987.

CHRISTENSEN, G.D.; BALDASSARI, L.; SIMPSON, W.A. Colonization of medical devices by coagulase-negative staphylococci. In: BISNO, A.L.; WALDVOGEL, F.A. Infection associated with indwelling medical devices. **ASM Press**, 2º ed. Washington, p.45-78, 1994.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing– tenth edition supplement, M02-A10, Pennsylvania, USA, 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE- CLSI. Zone diameter and MIC interpretive standards for *Staphylococcus* spp. Documento M02-A11 e M07-A9. Vol 32 No.3, 2012.

CORDEIRO, D.N.G. Significância clínica da presença de *Staphylococcus* coagulase-negativo isolados de recém-nascidos de uma unidade de terapia intensiva neonatal em Brasília-DF. **Dissertação de mestrado**. Brasília-DF, 2007.

COUTO, I.; PEREIRA,S.; MIRAGAIA,M.; SANCHES,IS & DE LENCASTRE,H. Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by internal transcribed spacer PCR. **J Clin Microbiol.** 39: 3099-103, 2001.

CUCARELLA, C.; SOLANO, C.; VALLE,J.; AMORENA,B.; LASA,I & PENADÉS JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. **J Bacteriol.** 183: 288-96, 2001.

CUNHA, M.L.; SINZATO,Y.K& SILVEIRA, L.V. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative staphylococci. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 99:855-60, 2004.

DE ALLORI, M.C.G. Antimicrobial resistance and production of biofilms in clinical isolates of coagulase-negative *Staphylococcus* strains. **Biol Pharm Bull.** 29 (8): 1592-1596, 2006.

De GIUSTI, M. Phenotypic detection of nosocomial *mecA*-positive coagulase-negative staphylococci from neonates. **J Antim Chem.**44: 351-358, 1999.

DE PAULIS, A.N. Five-test simple scheme for species-level identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci. **J Clin Microbiol.** 41(3): 1219-1224, 2003.

DICKISON, T.M & ARCHER, G.L. Phenotypic expression of oxacillin resistance in *Staphylococcus epidermidis*: roles of *mecA* transcriptional regulation and resistant-subpopulation selection. **Antimicrob Agents Chemother.** 44(6):1616-23, 2000.

DIEKEMA, D.J.; PFALLER, M.A.; SCMITZ, F.J.; SMAYEVSKY, J.; JONES, R.N.; BEACH, M & SENTRY Group. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in United States, Canada,

Latin America, Europe, and the Western Pacific Region for the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997-1999. **Clin Infect Dis.** 32: 114-32, 2001.

DONLAN, R. M. Biofilms and device-associated infections. **Emerg Infect Dis.** 7: 277-281, 2001.

DUSTIN, L.; WILLIAMS & ROY, D. B. Observing the Biofilm Matrix of *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 Grown Using the CDC Biofilm Reactor. **Microsc Microanal.** 16: 143–152, 2010.

EIFF, C.V.; HEILMANN, C.; PETERS, G. *Staphylococcus epidermidis*: why is it so successful? **Clin Microbiol Infect.** 4: 297-300, 1998.

ESPIAU, M.; PUJOL, M.; CAMPIS-MARTÍ, M.; PLANES, A.M.; PENA, Y.; BALCELLS, J & ROQUETA, J. Incidencia de bacteriemia asociada a catéter venoso central en una unidad de cuidados intensivos. **An Pediatr (Barc).** 75(3):188-193, 2011.

ESTRIDGE, H.B.; REYNOLDS, P.A. **Técnicas básicas de laboratório clínico.** Editora Artmed, 5º ed, p.610-615, 2011.

EUZEBY, J.P. Listo of prokaryotic names with standing in nomenclature – Genus *Staphylococcus*. Disponível em: www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html, acesso em 20/01/2012.

FALCONE, M.; GIANNELA, M.; RAPONI, G.; MANCINI, C & VENDITTI, M. Teicoplanin use and emergence of *Staphylococcus haemolyticus*: is there a link? **Clin Microbiol Infect.** 12:96-97, 2006.

FERREIRA, R.B.; NUNES, A.P.; KOKIS, V.M.; KREPSKY, N.; FONSECA, L.S.; BASTOS, M.C.; GIAMBIAGIMM.; SANTOS, K.R. Simultaneous detection of the *mecA* and *ileS-2* genes in coagulase-negative staphylococci isolated from Brazilian hospitals by multiplex PCR. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 42:205-12, 2002.

FERREIRA, R.B.R.; IORIO, N.L.P.; MALVAR, K.L.; NUNES, A.P.F.; FONSECA, L.S.; BASTOS, C.C.R.; SANTOS, K.R.N. Coagulase-negative staphylococci: comparison of phenotypic and genotypic oxacillin susceptibility tests and evaluation of the agar screening test by using different concentrations of oxacillin. **J Clin Microbiol.** 41: 3609-3614, 2003.

FREBOURG, N.B.; LEFEBVRE, S.; BAERT, S & LEMELAND, J.F. PCR-Based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. **J Clin Microbiol.** 38(2): 877-880, 2000.

FREDHEIM, E.G.A.; CLAUS, K.; HOLGER, R.; FRANKENBERGER, S.; GAUSTARD, P.; FLAEGSTAD, T & SOLLID, J.E. Biofilm Formation by *Staphylococcus haemolyticus*. **J Clin Microbiol.** 47 (4), 1172–1180, 2009.

FREEMAN, J. et al. Birth weight and length of stay as determinants of nosocomial coagulase-negative staphylococcal bacteremia in neonatal intensive care unit populations: potential for confounding. **Am J Epidemiol.** 132 (6):1130-1140, 1989.

HANSSSEN, A.M.; FOSSUM,A.; MIKALSEN,J.; HALVORSEN,D.S.; BUKHOLM,G & ERICSON,J.U. Dissemination of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in northern Norway: sequence types 8 and 80 predominate. **J Clin Microbiol.** 43:2118-2124, 2005.

HEILMANN, C.; PETERS, G. Biology and pathogenicity of *S. epidermidis*. In: FISCHETTI, V.A.; NOVICK, R.P.; FERRETI, J.J.; PORTNOY, D.A.; ROOD, J.I. **Gram-positive pathogens**.1. ed. Washington, D.C.: ASM Press. Cap. 46:442-449, 2000.

HIRA, V. et al. Clinical and molecular epidemiology characteristics of coagulase-negative staphylococcal bloodstream infections in intensive care neonates.**Pediatr Infect Dis J.** 26(7): 607-612, 2007.

HIRAMATSU, K. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **J Antimicrob Chemother.** 40(1):135-136, 1998.

HIRAMATSU, K.; KATAYAMA, Y.; YUZAWA, H.; ITO, T. Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.**Int J Med Microbiol.** 292: 67-74, 2002.

HUEBNER, J & GOLDMANN,DA. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. **Annu Rev Med.** 50:223-36, 1999.

HUSSAIN,M.; HERRMANN, M.; VON EIFF,C.; PERDREAU-REMGTON, F & PETERS, G. A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* stains on surfaces. **Infect Immun.** 65:519-24, 1997.

IBRAHEM, S. et al. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strains from bacteraemic patients. **Clin Microbiol Infect.**14(11): 1020-1027, 2008.

IORIO, N.L.P.; FERREIRA, R.B.R.; SCHUENCK, R.P.; MALVAR, K.L.; PEREIRA, A.B.; NUNES, A.P.F.; BASTOS, C.C.R & SANTOS, K.R.N. Simplified and reliable scheme for species-level identification of clinical isolates of *staphylococcus*.**J Clin Microbiol.** 45: 2564-69, 2007.

INTERNATIONAL WORKING GROUP OF THE CLASSIFICATION OS STAPHYLOCOCCAL CASSETTE CHROMOSOME ELEMENTS (IWG-SCC). Classification of Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. **Antimicrob Agents Chemother.** 53:4961-7, 2009.

INTERNATIONAL WORKING GROUP OF THE CLASSIFICATION OS STAPHYLOCOCCAL CASSETTE CHROMOSOME ELEMENTS (IWG-SCC).Disponível em www.Sccmec.org.Acesso em 05/03/2011.

ISAAC, D.W.; PEARSON, T.A.; HURWITZ, C.A.; PATRICK, C.C. Clinical and microbiologic aspects of *Staphylococcus haemolyticus* infections.**Pediatr Infect Dis J.** 12:1018-1021, 1993.

ITO, T.; KATAYAMA, Y.; ASADA, K.; MORI, N.; TSUTSUMIMOTO,K.; TIENSASITORN, C & HIRAMATSU, K. Structural comparison of three types of

staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother.**45:1323-36, 2001.

ITO, T.; OKUMA, K.; MAX,X.; YUZAWA, H & HIRAMATSU, K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island. **SCC.Drug Resist Updat.** 6:41-52, 2003.

JAIN, A.; AGARWAL, J.; BANSAL, S. Prevalence of methicillin -resistant, coagulase-negative staphylococci in neonatal intensive care units: findings from a tertiary care hospital in India. **J Clin Microbiol.**53: 941-4, 2004.

JOHANSSON, A. Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeated Analysis for typing of *Staphylococcus epidermidis*.**J Clin Microbiol.** 41 (1): 260-265, 2006.

KEIN,L.S. Mapeamento dos estafilococos coagulase negativo no hospital universitário Antônio Pedro da universidade federal fluminense, no período de 1998 a 2002. **Dissertação de mestrado.** Nitéroi, 2005.

KEIM, L. S.; SYLVIO, R.; TORRES-FILHO.; SILVA, P.V.; LENISE A.T. Prevalence, etiology and antibiotic resistance profiles of coagulase negative staphylococci isolated in a teaching hospital. **Braz J Microbiol.** 42: 248-255, 2011.

KHATIB, R.; RIEDERIS, K.M.; CLARK, J.A.; KHATIB, S.; BRISKI, L.E.; WILSON, F.M. Coagulase-negative staphylococci in multiple blood cultures: Strain relatedness and determinants of same-strain bacteremia. **J Clin Microbiol.** 33: 816-820, 1995.

KLINGENBERG C, AARAG E, RONNESTAD A, SOLLID JE, ABRAHAMSEN TG, KJELDSEN G, FLAEGSTAD T. Coagulase-Negative staphylococcal sepsis in neonates: Association between antibiotic resistance, biofilm formation and the host inflammatory response. **Pediatr Infect Dis J.** 24:817-22, 2005.

KLINGENBERG, C.; RONNESTAD, A.; ANDERSON, A.S.; ABRAHAMSEN, T.G.; ZORMAN, J.; VILLARUZ, A.; FLAEGSTAD, T.; OTTO, M & SOLLID, J.E. Persistent strains of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: virulence factors and invasiveness. **Clin Microbiol Infect.** 13:100-111, 2007.

KLOOS,W.E & SCHLEIFER, K.H. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species.**J Clin Microbiol.** 1(1):82-88, 1975.

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

KLOOS, W.E. Taxonomy and Systematic of Staphylococci Indigenous to Humans. In: Crossey, K.B, Archer, L.G, editors. *The Staphylococci in Human Disease*. New York: **Churchill Livingstone**.p. 113-37, 1997.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHERECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. **Diagnóstico Microbiológico**. Texto e Atlas colorido. Editora Guanabara Koogan RJ, 5ªedição, cap: 11, p: 552-567, 2001.

KOZITSKAYA, S.; OLSON, M.E.; FEY, P.D.; WITTE, W.; OHLSEN, K & ZIEBUHR, W. Clonal analysis of *Staphylococcus epidermidis* isolates carrying or lacking biofilm-mediating genes by multilocus sequence typing. **J Clin Microbiol.**43:4751-7, 2005.

KRISTOF, K.; KOCSIS, E.; STABO, D. Significance of methicillin-teicoplanin resistant *Staphylococcus haemolyticus* in bloodstream infections in patients of the Semmelweis University hospitals in Hungary. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** 30: 691-699, 2011.

LAYER, F. B.; GHEBREMEDHIN, K.A.; MODER, W.; KONIG and B. Comparative Study Using Various Methods for Identification of *Staphylococcus* Species in Clinical Specimens Konig. **J Clin Microbiol.** 44 (8): 2824–2830, 2006.

LEE, M.K. & PARK, A.J. Rapid species identification of coagulase-negative staphylococci by rRNA length polymorphism analysis. **J Infect.** 45:189-194, 2001.

LINHARDT, F.; ZIEBUHR, W.; MEYER, P.; WITTE, W & HACKER, J. Pulsed-field gel electrophoresis of genomic restriction fragments as a tool for the epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. **FEMS Microbiol Lett.** 74:181-5, 1992.

LIVERMORE, D.M. Antibiotic resistance in staphylococci. **Int J Antimicrobial Agents.** 16(suppl 1):S3-10, 2000.

LOUIE, L.; MAJURY, A.; GOODFELLOW, J.; LOUIE, M.; SIMOR, A.E. Evaluation of a latex agglutination test (MRSA-Screen) for detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci. **J Clin Microbiol.**39: 4149-4151, 2001.

MACFADDIN, J.F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria.** Willuans & Wilkins Company. Baltimore, USA, 1977.

MACHADO, A.; FERRAZ, A.A.B.; FERRAZ, A.; ARRUDA, E.; NOBRE, J.; KONKEWEIZ, L.R.; PIMENTEL, M.L.; LEÃO, M.T.C.; CRIMBAUM, R. Prevenção da infecção hospitalar. **Soc Bras infect, AMB (Projeto Diretrizes)**, p: 2-23, 2001.

MAKKI, A.R.; SHARMA. S.; DUGGIRALA, A.; PRASHANTH, K.; GARG, P. T. Phenotypic and genotypic characterization of coagulase negative staphylococci (CoNS) other than *Staphylococcus epidermidis* isolated from ocular infections. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** 52: 9018-9022, 2011.

MALICK, A.; HUI, C. P. S. Beyond the complete blood cell count and C reactive protein. A systematic review of modern diagnostic tests for neonatal sepsis. **Arch Pediatr Adolesc Med.**157: 511-6, 2003.

MARTINS, A.; CUNHA, M.L. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects. **Microbiol Immunol.** 51 (9): 787-795, 2007.

MATTOS-GUARALDI, A. L.; FORMIGA, L. C. D. Hemagglutination and adhesive properties of *Corynebacterium diphtheriae* in relation to biotype and source. **Braz J Microbiol.** 23(1), 1991.

MAYHALL,C.G. **Hospital Epidemiology and Infection Control**. 2004.

MCCANN,M.T.; GILMORE,B.F.; GORMAN,S.P. *Staphylococcus epidermidis* device-related infections: pathogenesis and clinical management. **J Pharm Pharmacol**. 60: 1551-71, 2008.

MIRAGAIA, M.; COUTO, I.; PEREIRA, S.F.; KRISTINSSON, K.G.; WESTH, H.; JARLOV, JO.; CARRIÇO, J.; ALMEIDA, J.; SANTOS-SANCHES, I & DE LENCASTRE, H. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones: evidence of geographic dissemination. **J Clin Microbiol**.40: 430-8, 2002.

MIRAGAIA, M. et al. Comparison of molecular typing methods for characterization of *Staphylococcus epidermidis*: proposal for clone definition. **J Clin Microbiol**. 46(1): 118-129, 2008.

MONSEN, T.; RONNMARK, M.; OLOFSSON, C & WISTRON, J. An inexpensive and reliable method for routine identification of staphylococcal species. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. 17:327-35, 1998.

MOREIRA, L.O.; ANDRADE, A.F.B.; VALE, M.D.; SOUZA, S.M.S.; HIRATA, JR.R.; ASAD, L.M.B.; ASAD, N.R.; MONTEIRO-LEAL, L.H.; PREVIATO, J.O.; MATTOS-GUARALDI, A.L. Effects of iron limitation on adherence and cell surface carbohydrates of *Corynebacterium diphtheriae* strains. **Appl Environ Microbiol**. 69: 5907-5913, 2003.

NATIVIDAD, C.; MARÍA S. L.; AMPARO, C. NAVARRO.; ALEJANDRO, S.; JESÚS, S. Estudio molecular de *Staphylococcus haemolyticus* resistente a meticilina en un hospital de México. **Rev Invest Clin**. 58 (6): 580-585, 2006.

NATOLI, S.; FONTANA, C.; FAVARO, M.; BERGAMINI, A.; TESTORE, G. P.; MINELLI, S.; BOSSA, M.C.; CASAPULLA, M.; BROGLIO, G.; BELTRAME, A.; CUDILLO, L.; CERRETTI, R.; LEONARDIS, F. Characterization of coagulase-negative staphylococcal isolates from blood with reduced susceptibility to glycopeptides and therapeutic options. **BMC Infect Dis**. 9:83, 2009.

NAYAK, N. et al. Phenotypic and plasmid pattern analysis of *Staphylococcus epidermidis* in bacterial keratitis. **Indian J Ophthalmol**. 55(1): 9-13, 2007.

NINO MACHARASHVILI, M.S.; KOURBATOVA, M.D.E.; BUTSASHVILI, M.M.D.; TSERTSVADZE, M.D.T.; McNUTT, L & MICHAEL, K. Etiology of Neonatal Blood Stream Infections in Tbilisi, Republic of Georgia. **Int J Infect Dis**. 13(4): 499-505, 2009.

NUNES, A. P. F.; TEIXEIRA, L. M.; BASTOS, C. C. R.; SILVA, M. G.; FERREIRA, R. B. R.; FONSECA, L. S. & SANTOS, K. R. N. Genomic characterization of oxacillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* isolated from Brazilian medical centers. **J Hosp infect**. 59(1):19-26, 2005.

NUNES, A.P.F. et al. Heterogeneous resistance to vancomycin and teicoplanin among *Staphylococcus* spp. isolated from bacteremia. **Braz J Infect Dis**.11(3): 345-350, 2007.

PEREIRA, E.M. Discriminação das espécies de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus* e detecção simultânea da resistência a oxacilina através da técnica de PCR multiplex. **Dissertação mestrado**. IMPPG, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.

PITTED, D.; HABARTH, S.; RUEF, C.; FRANCIOLI, P.; SUDRE, P.; PÉTIGNAT, C.; TRAMPUZ, A & WIDMER, A. Prevalence and risk factors for nosocomial infections in four university hospitals in Switzerland. **Infect Control Hosp Epidemiol**. 20: 37-42, 1999.

PRADO, S.S.; OLIVEIRA, S.T.; RODRIGUES, R. Estudo Brasileiro da Magnitude das Infecções Hospitalares em Hospitais Terciários. **Rev Controle Inf Hosp**. 2(63):11-25, 1995.

RAAD, I. Intravascular-catheter-related infections. **Lancet**. 21: 893-898, 1998.

RAIMUNDO, O.; HEUSSLER, H.; BRUHN, J.B.; SUNTRARACHUN, S.; KELLY, N.; DEIGHTON, M.A.; GARLAND, S.M. Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococcal bacteraemia in a newborn intensive care unit. **J Hosp Inf**. 51:33-42, 2002.

RODRIGEZ-ARANDA, A.; DASKALAKI, M.; VILLAR, J.; SANZ, F.; OTERO, JR.; CHAVES, F. Nosocomial spread of linezolid-resistant *Staphylococcus haemolyticus* infections in an intensive care unit. **Diagn Microbiol Infect Dis**. 63:398-402, 2009.

SADER, H.S.; GALES, A.C.; PFALLER, M.A.; MENDES, R.E.; ZCOLLI, C.; BARTH, A.; JONES, R.N. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Braz J Infect Dis**. 5: 200-214, 2001.

SAIDA, N.B. et al. Clonality of clinical methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolates in a neonatal intensive care unit. **Pathol Biol**. 54 (6): 337-342, 2006.

SANTOS, K.R.N.; TEIXEIRA, L.M.; LEAL, G.S.; FONSECA, L.S & GONTIJO-FILHO, P.P. DNA typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: isolates and factors associated with nosocomial acquisition in two Brazilian university hospitals. **J Med Microbiol**. 48:17-23, 1999.

SCHUENCK, R.P.; PEREIRA, E.M.; IORIO, N.L & SANTOS, K.R. Multiplex PCR assay to identify methicillin resistance of *staphylococcus haemolyticus*. **FEMS Immunol Med Microbiol**. 52:431-5, 2008.

SECHI, L.A.; PINNA, A.; PUSCEDDU, C.; FADDA, G.; CARTA, F & ZANETTI, S. Molecular characterization and antibiotic susceptibilities of ocular isolates of *Staphylococcus epidermidis*. **J Clin Microbiol**. 37: 3031-33, 1999.

SIEVERT, D.M.; BOULTON, M.L.; STOLMAN, D.J.; STOBIEFSK, M.G.; DOWNES, F.P.; SOMSEL, P.A.; RUDRIK, J.T.; BROWN, W.; HAFEEZ, W.; LUNDSTROM, T.; FLANAGAN, E.; JOHNSON, R.; MITCHELL, J. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin-United States 2002. **Morb Mortal Wkly Rep**. 565-567, 2002.

SINGHAL, R. Species distribution & antimicrobial susceptibility of coagulase negative *Staphylococci* in a tertiary care hospital. **Indian J Med Res**. 123: 569-570, 2006.

SNELL, R.G.; WILKINGS, R.J. Separation of chromosomal DNA molecules from *C.albicans* by pulsed-field gel electrophoresis. **Nucleic Acids Res.** 14(11): 4401-6, 1986.

SORLOZANO, A.; GUTIERREZ, J.; MARTINEZ, T.; YUSTE, M. E.; PEREZ-LOPEZ, J. A.; VINDEL, A.; GUILLEN, J. & BOQUETE, T. Detection of new mutations conferring resistance to linezolid in glycopeptide-intermediate susceptibility *Staphylococcus hominis* subspecies *hominis* circulating in an intensive care unit. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** 2009.

STAPLETON, P.D.; TAYLOR, P.W. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. **Sci Prog.** 85(1): 57-72, 2002.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAVIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M.A modified microtiter-plate test for quantification of Staphylococcal biofilm formation. **J Microbiol Methods.** 40, 175-179, 2000.

STRUELENS, M. Molecular typing: a key tool for the surveillance and control of nosocomial infection. **Opinion Infect Dis.** 15(4):383-94, 2002.

TABE, Y.; NAKAMURA, A.; OGURI, T.; IGARI, J. Molecular characterization of epidemic multiresistant *Staphylococcus haemolyticus* isolates. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 32:177-183, 1998.

TANURE, I.Q.; CHEBARO, A.; NACUL, F.E. Antibioticoterapia para infecções por bactérias Gram-positivas no paciente grave. **J Bras Med.** 92:21-29, 2007.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. **Infect Control Hosp Epidemiol.** 18(6):426-39, 1997.

TOLDOS, C.M.; YAGUE, G.; ORTIZ, G.; SEGOVIA, M. Assesment of multiple coagulase-negative staphylococci isolated in blood cultures using pulsed-field gel electrophoresis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** 16(8): 581-6, 1997.

TORMO, M.A.; KNECHT, E.; GOTZ, F.; LASA, I & PENADÉS JR. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? **Microbiology.** 151:2465-75, 2005.

VAN BELKUM A.; TASSIOS P.T.; DIJKSHOORN L.; HAEGGMAN S.; COOKSON B.; FRY N.K., & EUROPEAN SOCIETY OF CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES (ESCMID) STUDY GROUP ON EPIDEMIOLOGICAL MARKERS (ESGEM). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clin Microbiol Infect.** 13 Suppl 3:1-46, 2007.

VIVONI, A.M.; DIEP, B.A.; DE-GOUVEIA-MAGALHÃES, A.C.; SANTOS, K.R.N.; RILEY, L.W.; SENSABAUGH, G.F. & MOREIRA, B.M. Clonal composition of *Staphylococcus aureus* isolates at a Brazilian University Hospital: identification of international circulation lineages. **J Clin Microbiol.** 44(5), 1686-1691, 2006.

VUONG, C.; KOCIANOVA,S.; VOYICH,J.M.; YAO,Y.; FISCHER,E.R.; DELEO,F.R & OTTO,M. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence.**J Biol Chem.** 279:5481-6, 2004.

WILLIAN, R.J.; HENDERSON, B.; SHARP, L.J & NAIR, S.P. Identification of a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus epidermidis*.**Infect Immun.** 70:6805-10, 2002.

WISPLINGHOFF, H.; ROSATO, A.E.; ENRIGHT, M.C.; NOTO, M.; CRAIG, W & ARCHER, G.L. Related clones containing SCC mec type IV predominate among clinically significant *Staphylococcus epidermidis* isolates. **Antimicrob Agents Chemother.** 47:3574-9, 2003.

ANEXO A - Autorização do Comitê de Ética e Pesquisa



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**



Rio de Janeiro, 21 de maio de 2010

Do: Comitê de Ética em Pesquisa
Prof.: Wille Oigman
Para: Aut. Paula Marcele. A. Pereira – Orient. Profa. Ana Luiza M. Guaraldi / PG-FCM

Registro CEP/HUPE: 2673 (este número deverá ser citado nas correspondências referentes ao projeto)
CAAE: 0118.0.228.000-10

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto, "ESTUDO DE ASPECTOS FENOTÍPICO E GENOTÍPICO DE STAPHYLOCOCCUS COAGULASE NEGATIVO E SUAS IMPLICAÇÕES EM INFECÇÕES NOSOCOMIAIS" aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde.

O pesquisador deverá informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética solicita a V. S^a., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

Dr. Wille Oigman
Coordenador Clínica Médica
CRM 52-22403-7
(21) 2587-6531


Prof. Wille Oigman
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa