

**DETECÇÃO DOS GENES DE BIOFILME, DA
LEUCOCIDINA PANTON-VALENTINE E DA
RESISTÊNCIA À METICILINA EM AMOSTRAS
DE *Staphylococcus aureus* E ESTAFILOCOCOS
COAGULASE-NEGATIVA**

Artigo de Iniciação Científica
apresentado ao Departamento de
Microbiologia e Imunologia do
Instituto de Biociências,
Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho" – UNESP,
campus de Botucatu, para obtenção
do título de Bacharel em Ciências
Biológicas – Modalidade Médica

Aline Aki Tanikawa

Orientadora: Prof. Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Botucatu – SP

2008

Universidade Estadual Paulista
Instituto de Biociências de Botucatu

**DETECÇÃO DOS GENES DE BIOFILME, DA
LEUCOCIDINA PANTON-VALENTINE E DA
RESISTÊNCIA À METICILINA EM AMOSTRAS
DE *Staphylococcus aureus* E ESTAFILOCOCOS
COAGULASE-NEGATIVA**

Aline Aki Tanikawa

Orientadora: Prof. Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Botucatu – SP

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO

DA INFORMAÇÃO

DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Tanikawa, Aline Aki.

Detecção dos genes de Biofilme, da leucocidina Panton-Valentine e da resistência a Meticilina em amostras de *Staphylococcus aureus* e Estafilococos Coagulase-Negativa / Aline Aki Tanikawa. - Botucatu [s.n], 2008.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas – Modalidade médica) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2008

Orientadora: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

1. Microbiologia médica 2. Bacteriologia

Palavras-chave: Biofilme; Estafilococos Coagulase-Negativa; leucocidina Panton-Valentine; *mecA*; *Staphylococcus aureus*

Dedicatória

Aos meus pais... amigos e conselheiros.

À vó Flor... pessoa que até hoje sinto saudades.

Agradecimientos

Agradeço imensamente aos meus pais, que permitiram que eu chegasse até onde estou graças a seus esforços e generosidade. Obrigada pela educação proporcionada, pelas virtudes ensinadas, pela fé demonstrada e pela confiança nunca duvidosa. Pelos conselhos e por terem me ensinado a não permitir que quedas, inseguranças e insucessos afetassem o meu caminhar, minhas boas atitudes.

Aos meus irmãos, Addison e Arianna, grandes companheiros e verdadeiros amigos.

A minha orientadora, professora Dra. Maria de Lourdes, pela oportunidade de realizar o estágio de iniciação científica em seu laboratório, pelos ensinamentos e paciência.

A todos do Departamento de Microbiologia e Imunologia, principalmente ao Pedro, Tino, Dê e Luís. À Sônia e Nice. Aos companheiros de laboratório por toda a ajuda dada.

Às amigas, que foram compreensivas proporcionando momentos agradáveis mesmo nas horas mais difíceis. Que estiveram mais do que nunca próximas.

Às companheiras de república: Alice, Tatiana e Érika. Engraçadíssimas, alegres, animadas, generosas e pessoas com uma bondade inigualável. Agradeço pelos três anos de convivência, por terem sido tão amigas em suas atitudes e pela compreensão.

Às vizinhas: Taís, Simone e Michele. Pela amizade, momentos de alegria e por fazerem parte da república. Por estarem ao meu lado, pelas conversas, pela demonstração de carinho e pelos conselhos.

A uma pessoa querida, que tenho grande admiração e respeito: vó Flor. Obrigada por ter estado comigo durante muito tempo, por ter me ensinado a viver de maneira simples e verdadeira e por nunca ter me deixado sentir só...

Ao meu Deus, que me guia, me ajuda, me levanta e que me deu tantas coisas boas. Agradeço pela vida que tenho, por tudo que já consegui e pelo o que ainda vou alcançar devido a Sua graça.

Agradeço a todos àqueles que fizeram parte da minha vida, que nunca deixaram de confiar no meu potencial, que sempre quiseram o meu bem e que, algum dia, tentaram entender minhas escolhas. Enfim, àqueles que foram verdadeira “luz” no meu caminhar. Especial agradecimento aos amigos que, mesmo com a distância, estiveram comigo demonstrando amizade e carinho, simples e sinceros...

Meus agradecimentos a todos os colegas que permitiram que esses quatro anos de faculdade se tornassem inesquecíveis e adoráveis!

*"Senhor dá-me serenidade para aceitar
tudo aquilo que não pode e não deve ser mudado.
Dá-me força para mudar tudo o que pode
e deve ser mudado. Mas, acima de tudo,
dá-me sabedoria para distinguir
uma coisa da outra."*

TÍTULO RESUMIDO: Detecção dos genes *mecA*, *pvl* e *ica*

TÍTULO: Detecção dos genes de biofilme, da leucocidina Panton-Valentine e da resistência à meticilina em amostras de *Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase-negativa

AUTORES: Aline Aki Tanikawa, Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

AFILIAÇÃO INSTITUCIONAL:

Aline Aki Tanikawa

Laboratório de Bacteriologia

Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biociências

Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil

Caixa Postal 510, CEP 18618-000

RESUMO

Uma coleção de 57 amostras de *Staphylococcus aureus* e 30 de estafilococos coagulase-negativa isoladas de recém-nascidos (RN) foram estudadas em relação à presença dos genes *pvl*, *mecA* e *ica*. Das 57 amostras de *S. aureus*, 31,6% apresentaram o gene *mecA* e 17,5% os genes *pvl*, sendo que dentre estas somente uma amostra foi *mecA* e *pvl* positiva. Os ECN apresentaram 36,7% de amostras *mecA* positivas, 93,3% *ica* positivas e nenhuma amostra *pvl*. Foi observada uma queda no número de amostras resistentes à meticilina no período de 1991-2005 para os *S. aureus* e também no período de 1990-1996 para os ECN, porém a diferença não foi significativa. Também foram estudadas dez amostras de *S. aureus* isoladas de fossa nasal e nenhuma apresentou o gene *mecA* ou *pvl*. Já entre as dez amostras de ECN isoladas de fossa nasal, todas apresentaram o gene

ica, porém nenhuma foi resistente à meticilina. A análise dos dados clínicos dos RN revelou que o uso de cateter e outros corpos estranhos aumentam o risco de infecção por *S. aureus* e ECN. Assim, a produção de biofilme por ECN foi um importante fator de virulência presente em mais de 90% das amostras, confirmando a importância deste na ocorrência de infecções relacionadas com cateteres, e, apesar dos genes *mecA* e *pvl* estarem presentes concomitantemente em apenas uma amostra de *S. aureus*, esta revelou ter importância significativa.

Palavras chaves: biofilme, estafilococos coagulase-negativa, Leucocidina Pantone-Valentine, *mecA*, *Staphylococcus aureus*.

INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus assim como os estafilococos coagulase-negativa (ECN) são patógenos que vêm apresentando uma alta importância médica devido à capacidade de causar danos aos seres humanos e, principalmente, ao aumento da resistência aos antibióticos adquirida por eles (Becker et al., 2007).

Os estafilococos são responsáveis por diversas alterações biológicas, incluindo infecções da pele e tecidos moles, infecções de sítios cirúrgicos, endocardite e bacteremia hospitalar (Casey et al., 2007).

Staphylococcus aureus é o principal responsável por infecções, tanto no âmbito hospitalar como no da comunidade. Ele possui uma ampla variedade de fatores de virulência e pode causar danos em muitas regiões anatômicas (Trilla et al., 1995).

Os estafilococos coagulase-negativa (ECN) são os patógenos mais importantes em infecções relacionadas a implantes de materiais estranhos (Olsson et al., 2007). A

bactéria se adere ao biopolímero do cateter e produz um biofilme que a protege contra antibióticos, imunoglobulinas e opsoninofagocitose (De Silva et al., 2002).

Nos últimos anos, um fator de virulência da espécie *Staphylococcus aureus* que vem sendo estudado com atenção e citado na literatura, demonstrando assim sua importância, é a leucocidina Panton-Valentine (LPV ou PVL). Esta é um componente citotóxico que destrói leucócitos pela atividade de formação de poros na membrana celular (Bocchini et al., 2007).

A LPV é específica de células polimorfonucleares (PMNs) e macrófagos de coelhos e humanos (Lina et al., 1999), gerando uma resposta inflamatória “in vitro” que envolve fatores quimiotáticos e vasodilatadores (Moussa et al., 1999). É codificada pelos genes *pvl*, *lukS-PV* e *lukF-PV*, que são carregados em um profago integrado ao genoma da bactéria. Clinicamente tem sido ligada a uma forma severa de pneumonia necrosante e lesões necróticas da pele, como furúnculos e carbúnculos (Bocchini et al., 2007).

A toxicidade da LPV requer a interação do componente S (31 a 32 kDa) com o receptor de membrana de PMN, seguida da ligação do componente F (35 kDa). A ligação seqüencial das proteínas S e F à superfície da membrana alvo induz diversas respostas da célula, formando assim poros, os quais são específicos para o tráfico de cátions monovalentes (Pédelacq et al., 1999). A ligação, oligomerização, formação do pré-poro e a inserção nas membranas são geralmente admitidas como etapas essenciais antes da formação do poro funcional (Moussa et al., 1999).

Em estudos recentes, a LPV vem sendo associada ao *Staphylococcus aureus* da comunidade resistente à meticilina (CA-MRSA – community-acquired methicillin-resistant *S. aureus*) (Baba et al., 2002). Durante as últimas duas décadas, formas

epidêmicas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) se disseminaram amplamente (Zetola et al., 2005).

Os tipos mais recentes de CA-MRSA descritos possuem diversas características que os distinguem do MRSA nosocomial. Primeiro, a maioria não é multidrogas resistente, ao contrário da resistência a várias drogas dos tipos de MRSA encontrados no âmbito hospitalar. Segundo, a resistência à meticilina é conferida pelo porte do gene *mecA* no recentemente identificado “cromossomo cassete *mec* estafilocócico (staphylococcal cassette chromosome *mec* – SCC*mec*) elemento tipo IV”. Terceiro, eles carregam genes para a leucocidina Pantón-Valentine, que está associada às infecções da pele e tecidos moles (SSTIs – skin and soft tissues infections) e também a outras infecções mais severas. E último, esta combinação de características aparece em linhagens de *S. aureus* dispersas geograficamente com bases genéticas não relacionadas, indicativo de múltiplas origens clonais independentes. Todas estas informações unidas, sugerem a emergência de novas linhagens de *S. aureus* carregando o elemento SCC*mec* tipo IV e PVL, que são particularmente bem adaptados para a sobrevivência no grupo da comunidade (Diep et al., 2004).

Os MRSA isolados de pacientes pertencentes ao cenário da comunidade são interessantes na sua tendência a serem susceptíveis a maioria dos antimicrobianos não β -lactâmicos, em contraste aos HA-MRSA (hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), e eles são frequentemente resistentes somente à meticilina (Chambers, 2001).

Devido à importância do *Staphylococcus aureus* nas infecções, tanto hospitalares como da comunidade, à sua associação com o fator de virulência leucocidina e também à ascensão dos estafilococos coagulase-negativa resistentes à meticilina provocando

sérios problemas infecciosos, nota-se que mais estudos são necessários para compreender adequadamente os mecanismos que causam danos ao hospedeiro e, desta forma, chegar a procedimentos que possam amenizar e/ou eliminar a participação bacteriana no surgimento e agravamento de patologias. Assim, este trabalho tem como principal objetivo a detecção dos genes *lukS*-PV e *lukF*-PV que codificam a toxina LPV, os genes *ica*, de biofilme e o gene *mecA* de resistência à oxacilina em amostras de *S. aureus* e ECN isoladas de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

MATERIAIS e MÉTODOS

Amostras – Para a detecção dos genes foram utilizadas 67 amostras de *Staphylococcus aureus* e 40 amostras de estafilococos coagulase-negativa (ECN), sendo que 57 amostras de *S. aureus* e 30 de ECN foram isoladas de diferentes materiais clínicos (sangue, cateter, cânula, dreno torácico e secreções diversas) de recém-nascidos (RN) internados na Unidade de Tratamento Intensivo da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu. As demais foram isoladas de fossa nasal de pessoas normais.

As amostras incluídas no estudo foram previamente isoladas no período de 1991 a 2005 e mantidas estocadas a -70°C na Coleção de Culturas do Departamento de Microbiologia e Imunologia, IB, UNESP, Botucatu. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu em março de 2005 (OF.26/2005-CEP).

Relevância Clínica – As 57 amostras de *S. aureus* foram isoladas de 52 recém-nascidos e classificadas em dois grupos: infecção e colonização.

- Infecção: amostras de RN que não utilizaram antibiótico adequado e foram a óbito, foram incluídas no grupo classificado como infecção, assim como, aquelas que fizeram uso de antibiótico adequado e tiveram bom prognóstico, tendo alta hospitalar.
- Colonização: amostras de recém-nascidos ou crianças que não fizeram uso de nenhum antibiótico e apresentaram melhora, tendo alta hospitalar.

Obtivemos, então, 45 amostras de *S. aureus* classificadas no grupo da infecção e 12 no grupo de colonização.

As 30 amostras de ECN foram isoladas de 28 recém-nascidos e também foram classificadas em significativas e contaminantes (Cunha et al., 2002):

- Significativas: linhagens isoladas de recém-nascidos que apresentaram três ou mais dos seguintes critérios: fatores de risco para infecção, quadro clínico, alteração hematológica e antibioticoterapia adequada. Também foram consideradas significativas as linhagens isoladas de pacientes que apresentaram apenas dois dos critérios e não receberam antibioticoterapia adequada, mas foram a óbito.
- Contaminantes: linhagens isoladas de recém-nascidos que apresentaram somente fatores de risco para infecção e/ou apenas um dos demais critérios (quadro clínico ou alteração hematológica ou antibioticoterapia adequada). As linhagens isoladas de recém-nascidos que apresentaram três critérios, mas que tiveram evolução satisfatória do quadro infeccioso sem a administração de antibióticos

adequados, também foram consideradas contaminantes. O isolamento de outro agente etiológico de fluídos internos e corpos estranhos, na mesma época do isolamento de ECN, também foi usado como critério para a classificação de contaminação.

Assim, tivemos 17 amostras de ECN classificadas como causadoras de infecção e 13 como contaminantes.

Para análise dos dados clínicos foram consideradas 54 informações de 52 RN que tiveram amostras de *S. aureus* isoladas. Como amostras do mesmo RN foram coletadas em períodos distintos e informações clínicas e moleculares diferiram consideravelmente, os microrganismos isolados foram considerados distintos. Para os ECN, as mesmas considerações foram mantidas tendo, então, 29 informações de dados clínicos provenientes de 28 RN.

Identificação de S. aureus e Staphylococcus coagulase-negativa – Os microrganismos incluídos no estudo foram semeados em ágar sangue e corados pelo método de Gram objetivando-se sua pureza e a observação de sua morfologia e coloração específica. Após a confirmação dessas características, as linhagens foram submetidas às provas de catalase. O gênero *Staphylococcus* foi diferenciado de *Micrococcus* com base na prova de oxidação e fermentação da glicose e pela resistência à bacitracina, (0,04 U) indicada pela ausência de halo de inibição ou formação de halo de até 9 mm, e pela sensibilidade à furazolidona (100 µg) caracterizada por halos de inibição de 15 a 35 mm de diâmetro (Koneman et al. 1997). Para diferenciação da espécie *S. aureus* dos ECN foi realizada a prova da coagulase (Koneman et al., 1997). A identificação das espécies dos ECN foi

realizada utilizando o método simplificado proposto por Cunha et al., (2004). Para controle dos resultados dos testes foram utilizadas as seguintes linhagens de ECN de referência internacional: *S. epidermidis* (ATCC 12228), *S. simulans* (ATCC 27851), *S. warneri* (ATCC 10209) e *S. xyloso* (ATCC 29979). Posteriormente à confirmação da espécie as amostras foram conservadas em caldo nutriente com glicerol a -70°C.

Deteção do gene mecA de resistência à meticilina em S. aureus e Staphylococcus coagulase-negativa

Extração do ácido nucléico – O ácido nucléico total foi extraído a partir de linhagens de *Staphylococcus* cultivadas em ágar sangue e inoculadas individualmente em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) e incubadas a 37°C por 24 h. O início da extração consistiu na digestão das células de estafilococos com lisozima (10 mg/ml) e proteinase K (20 mg/ml). Posteriormente foi utilizado o Kit GFX (Amersham Pharmacia Biotech) conforme especificado pelo fabricante: 500 µl da solução de extração foi adicionada à mistura e esta centrifugada a 5.000 x g por 1 min. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para a coluna GFX e centrifugado a 5.000 x g por 1 min. O líquido coletado foi descartado e 500 µl de solução de extração foi adicionado novamente à coluna. Após a centrifugação e descarte do líquido coletado, 500 µl da solução de lavagem foi adicionada à coluna e esta submetida à centrifugação a 14.000 x rpm por 3 min. A coluna foi transferida para um tubo de 1,5 ml e 200 µl de água Milli Q aquecida a 70°C foi utilizada para a eluição. As amostras foram centrifugadas novamente a 5000 x g por 1 minuto, e a coluna de GFX desprezada. O DNA extraído foi guardado sob refrigeração a 4°C.

Amplificação do ácido nucléico (PCR) – As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 ml em volumes totais de 25 µl contendo 1µM de cada primer (tabela 1), 2,0 U de Taq polimerase, 100 µM de desoxiribonucleotídeos trifosfatados e 150 ng de ácido nucléico. A incubação foi realizada em termociclador apropriado, empregando os parâmetros descritos por Murakami et al. (1991) que consistiram de: 40 ciclos de desnaturação a 94°C por trinta segundos, anelamento dos *primers* a 55,5°C por trinta segundos e extensão a 72°C por um minuto. Após completado os 40 ciclos, os tubos foram incubados a 72°C por cinco minutos antes de resfriar à 4°C. Em todas as reações realizadas foram utilizadas linhagens de referência internacional com controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591) e negativo (*S. aureus* ATCC 25923).

Tabela I: Oligonucleotídeos para a detecção do gene *mecA*

Função	Nome	Seqüência de nucleotídeos 5'a 3'	Produto amplificado
Primer	<i>mecA1</i>	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG	533 pb
Primer	<i>mecA2</i>	AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG	533 pb

Fonte: Murakami et al., 1991.

Detecção dos genes lukS-PV – lukF-PV da leucocidina Panton-Valentine em S. aureus e Staphylococcus coagulase-negativa

Amplificação do ácido nucléico (PCR) – As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 ml em volumes totais de 25 µl contendo 1µM de cada primer (tabela 2), 2,0 U de Taq polimerase, 100 µM de desoxiribonucleotídeos trifosfatados e

150 ng de ácido nucléico. A incubação foi realizada em termociclador apropriado, sendo que a amplificação consistiu na técnica descrita por Lina et al. (1999), ou seja, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por trinta segundos, anelamento dos *primers* a 55°C por trinta segundos e extensão a 72°C por um minuto. Após completado os 40 ciclos, os tubos foram incubados a 72°C por cinco minutos antes de resfriar à 4°C. Em todas as reações realizadas foram utilizadas linhagens de referência internacional com controle positivo (*S. aureus* ATCC 49775) e negativo (*S. aureus* ATCC 29213).

Tabela II: Oligonucleotídeos para a detecção dos genes *lukS*-PV e *lukF*-PV

Função	Nome	Seqüência de nucleotídeos 5'a 3'	Produto amplificado
Primer	<i>Luk</i> -PV-1	ATC ATT AGG TAA AAT GTC TGG ACA TGA TCCA	433 pb
Primer	<i>Luk</i> -PV-2	GCA TCA AST GTA TTG GAT AGC AAA AGC	433 pb

Fonte: Lina et al., 1999.

Detecção de genes icaA, icaD e icaC específicos para produção de biofilme

Amplificação do ácido nucléico (PCR) – As reações foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 ml em volumes totais de 25 µl contendo 10 pmol de cada *primer* (tabela 1), 2,0 U de *Taq* polimerase, 100 µM de desoxiribonucleotídeos trifosfatados e 20 mM de Tris-HCl ph 8,4, 0,75 mM MgCl e 3mg de ácido nucléico. A incubação foi realizada em termociclador apropriado, empregando os parâmetros descritos por Arciola et al. (2001) que consistiram de: 94°C por cinco minutos para o primeiro ciclo, seguido por 50 ciclos de desnaturação a 94°C por trinta segundos, anelamento dos *primers* a

55,5°C por trinta segundos e extensão a 72°C por trinta segundos. Após completado os 50 ciclos, os tubos foram incubados a 72°C por um minuto antes de resfriar à 4°C. Em todas as reações realizadas foram utilizadas linhagens de referência internacional como controle positivo, *S. epidermidis* ATCC 35984, e um controle negativo *S. epidermidis* ATCC 12228.

Tabela III: Oligonucleotídeos para a detecção dos genes *ica A*, *ica D* e *ica C*

<i>Função</i>	<i>Nome</i>	<i>Seqüência</i>	<i>Produto amplificado</i>
Primer	<i>icaA1</i>	ACA GTC GCT ACG AAA AGA AA	103
Primer	<i>icaA2</i>	GGA AAT GCC ATA ATG ACA AC	103
Primer	<i>icaD1</i>	ATG GTC AAG CCC AGA CAG AG	198
Primer	<i>icaD2</i>	CGT GTT TTC AAC ATT TAA TGC AA	198
Primer	<i>icaC1</i>	TAA CTT TAG GCG CAT ATG TTT	400
Primer	<i>icaC2</i>	TTC CAG TTA GGC TGG TAT TG	400

Fonte: Arciola et al., 2005.

Visualização dos produtos amplificados – A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 2% preparado em tampão TBE 1,0 X e corado com Sybr safe. O tamanho dos produtos amplificados foi comparado com o padrão de 100 pb e posteriormente fotografados sob transiluminação UV.

Análise estatística – Para a verificação dos dados referentes aos grupos de ECN - classificados como significativo e colonização – e de *S. aureus* - classificados como

infecção e colonização – em relação ao tipo de material clínico, presença dos genes *mecA*, *pvl* e *ica*, foi utilizado o Teste de Proporção. Os dados relativos à relevância clínica de linhagens de ECN e de amostras de *S. aureus* foram analisados pelo teste de qui-quadrado. Porém, para análise da mediana de peso e de idade entre os grupos, o teste Wilcoxon foi o escolhido. Dados que pela análise univariada apresentaram valor de $p < 0,10$ foram submetidos à análise pelo modelo de regressão logística com a finalidade de avaliar a influência de cada variável na incidência de infecção pelos *S. aureus* e ECN. O nível de significância para todos os testes foi fixado em $p < 0,05$ (McCullagh & Nelder, 1992). Os programas utilizados para realizar os dados estatísticos foram: o SAS versão 9.1 for Windows e R versão 25.1.

RESULTADOS

Amostras

Foram identificadas 67 amostras de *S. aureus* e 40 de estafilococos coagulase-negativa. Dentre as 30 amostras de ECN isoladas de recém-nascidos da Unidade Neonatal, foi obtido uma maior porcentagem de *S. epidermidis*, com 19 (63,3%) isolados, seguido por *S. warneri* com 4 (13,3%); *S. lugdunensis*, *S. hominis* e *S. haemolyticus* com número igual de amostras, 2 (6,7%) cada e *S. simulans*, com uma (3,3%) amostra. No grupo classificado como significativo, também foi obtido maior número de amostras de *S. epidermidis*, assim como no grupo dos contaminantes. As demais espécies isoladas do primeiro grupo foram *S. warneri*, *S. lugdunensis* e *S.*

hominis e no segundo, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. simulans* e *S. lugdunensis* (Figura 1).

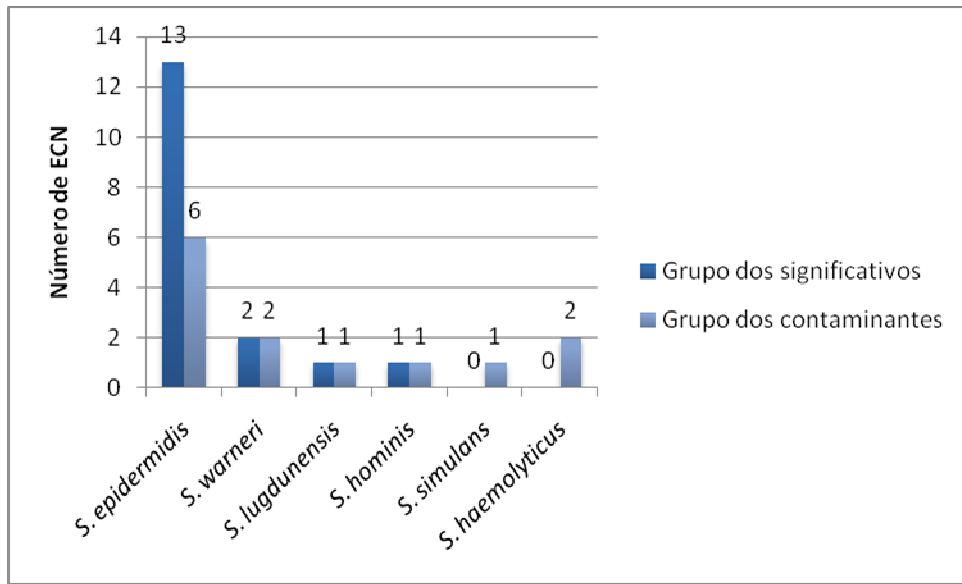


Figura 1: Distribuição de amostras de ECN, segundo a espécie, para os grupos classificados como significativo e contaminante.

As dez amostras de ECN isoladas de fossa nasal de pessoas normais foram identificadas como *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus cohnii* e *Staphylococcus warneri* (Figura 2).

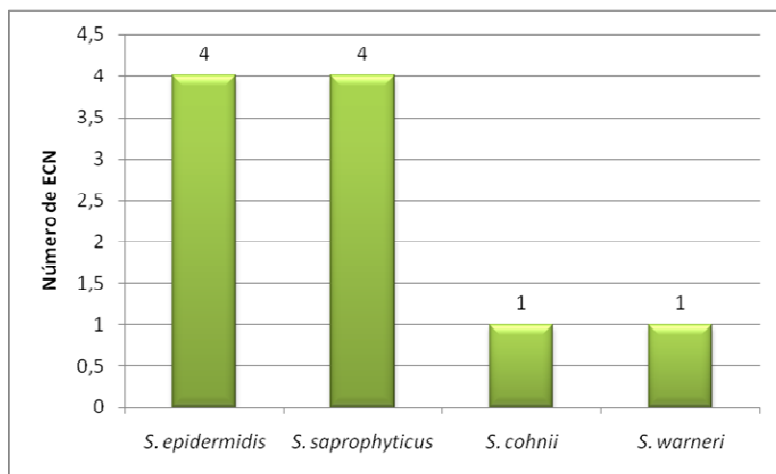


Figura 2: Distribuição de amostras de ECN isoladas de fossa nasal, segundo a espécie.

A Tabela IV representa a distribuição das espécies de ECN isoladas de diferentes materiais clínicos de RN, como sangue, cateter, cânula, secreção e dreno torácico. Novamente, a espécie mais comumente isolada de amostras providas de hemocultura, cateter e cânula foi *S. epidermidis*. Amostras providas de secreções foram positivas para *S. lugdunensis* e *S. simulans* e a única amostra de dreno torácico também foi positiva para *S. epidermidis*.

Tabela IV: Amostras de ECN distribuídas por espécie e material clínico.

Material Clínico	Sangue	Cateter	Cânula	Secreção	DR	Total
<i>S. epidermidis</i>	9	6	3	-	1	19
<i>S. lugdunensis</i>	1	-	-	1	-	2
<i>S. warneri</i>	1	2	1	-	-	4
<i>S. hominis</i>	-	1	1	-	-	2
<i>S. simulans</i>	-	-	-	1	-	1
<i>S. haemolyticus</i>	2	-	-	-	-	2
Total (n = 30)	13	9	5	2	1	30

DR: dreno torácico

No grupo de amostras classificadas como significativas foram obtidos cinco *S. epidermidis* de hemocultura, cinco de cateter, dois de cânula e um de dreno torácico; as duas amostras de *S. warneri* foram isoladas de hemocultura e cânula; a única amostra de *S. lugdunensis* e de *S. hominis* foi proveniente de hemocultura e cânula, respectivamente (Figura 3).

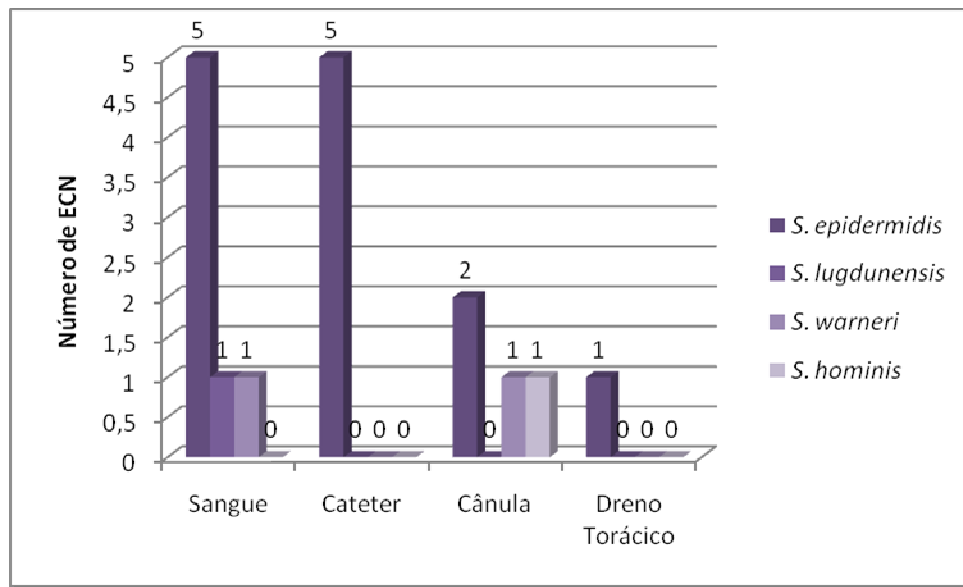


Figura 3: Distribuição de espécies de ECN do grupo classificado como significativo em relação ao material clínico.

Já no grupo dos contaminantes, das seis amostras isoladas de hemocultura, quatro foram *S. epidermidis* e duas *S. haemolyticus*; das quatro amostras providas de cateter, duas foram de *S. warneri*, uma de *S. epidermidis* e de *S. hominis*; a única amostra isolada de cânula foi *S. epidermidis*; as espécies isoladas de secreção foram *S. lugdunensis* e *S. simulans* (Figura 4). Não foi constatada diferença significativa em relação ao material clínico e as espécies dos diferentes grupos de ECN isolados de RN.

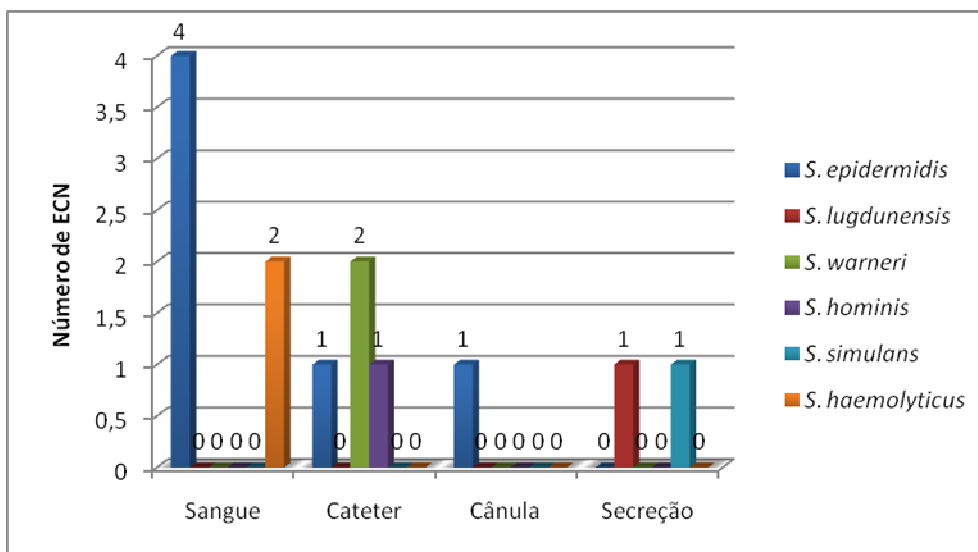


Figura 4: Frequência das amostras de ECN do grupo dos contaminantes em relação ao material clínico.

Na Figura 5 encontra-se a distribuição de amostras de *Staphylococcus aureus* provindas de diversos materiais clínicos. Observa-se maior percentual de amostras isoladas de secreção, seguido de hemocultura, cateter, cânula e dreno torácico.

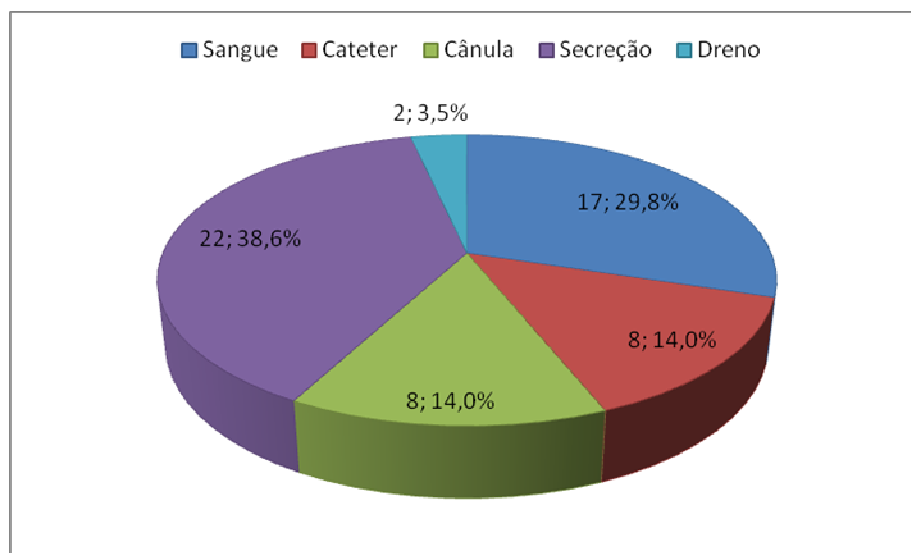


Figura 5: Distribuição de amostras de *S. aureus* isoladas de diferentes materiais clínicos.

Entre o grupo de *S. aureus* classificado como infecção foi possível verificar que o maior percentual de amostras foi isolado de hemocultura, com 16 (35,6%), seguido de secreção 15 (33,3%), sete de cânula (15,6%), cinco de cateter (11,1%) e duas (4,4%) de dreno, totalizando 45 amostras (Figura 6). Já no grupo classificado como colonização, foram isoladas sete (58,3%) amostras de secreção, três (25,0%) de cateter, uma amostra (8,3%) de hemocultura e uma (8,3%) de cânula, totalizando 12 amostras (Figura 7).

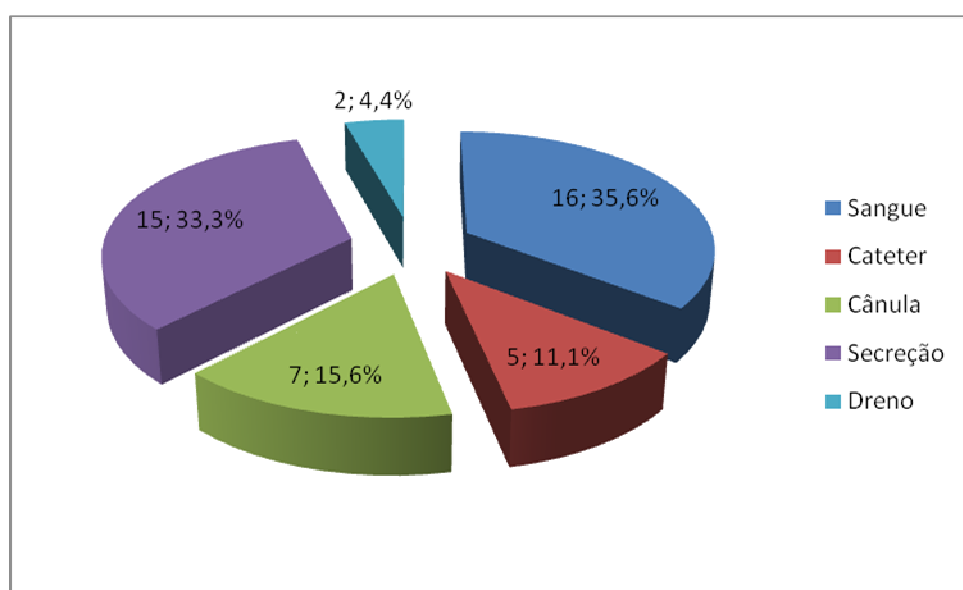


Figura 6: Representação do número e percentual de amostras de *S. aureus* classificadas como causadoras de infecção em relação ao tipo de material clínico.

Em relação aos materiais clínicos houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos de *S. aureus* em relação às amostras isoladas de sangue, secreção e cânula, mostrando que, as amostras classificadas como colonizantes foram mais comumente isoladas de secreção, diferentemente das classificadas como infecção, que tiveram maior percentual de isolados provenientes hemocultura.

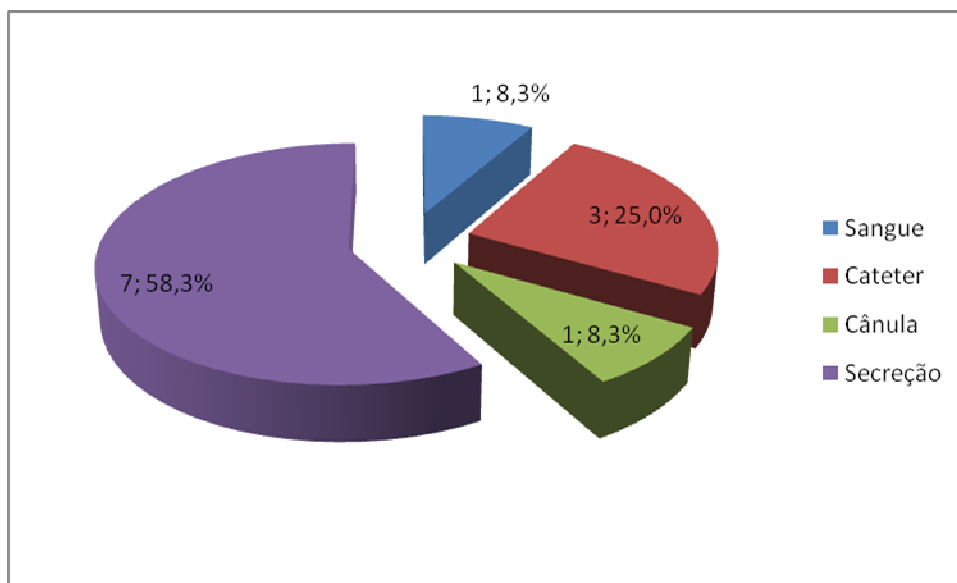


Figura 7: Representação do número e percentual de amostras de *S. aureus* classificadas como colonizantes em relação ao tipo de material clínico.

Relevância Clínica

Informações referentes a dados clínicos dos RN pertencentes aos grupos dos ECN classificados como significativos e contaminantes foram obtidos com o objetivo de avaliar possíveis fatores de risco para o desenvolvimento de infecção. Na Tabela V tem-se a distribuição percentual de RN dos dois grupos de ECN conforme a idade gestacional, peso ao nascimento e outros dados pessoais. Dos 16 RN do grupo significativo, 13 (81,3%) eram prematuros, sendo três prematuros extremos (idade gestacional menor que 31 semanas), comparados com dois do grupo dos contaminantes. Em relação à idade gestacional, não houve diferença significativa entre os grupos.

A variável peso menor que 1.500 g entre os ECN foi estatisticamente significativa. Observou-se que, no grupo classificado como significativo houve maior percentual (50%) de RN com peso ao nascimento menor que 1.500 g do que no grupo classificados como contaminação (15,4%). A mediana das idades também apresentou

diferença estatisticamente significativa, sendo maior no grupo dos significativos (17,5 dias) do que no grupo dos contaminantes (2 dias). Não houve diferença significativa quanto à mediana do peso ao nascimento, sexo e procedência do RN entre os grupos estudados.

Tabela V: Dados pessoais dos recém-nascidos que tiveram ECN como patógeno isolado.

Dados pessoais	Significativo		Contaminação		Total		Valor de p
	N	%	N	%	N	%	
IG < 31	3	18,8	2	15,4	5	17,2	ns
IG 31-36	9	56,3	6	46,2	15	51,7	ns
IG 37	1	6,25	2	15,4	3	10,3	ns
IG ≥ 38	1	6,25	2	15,4	3	10,3	ns
PN < 1.500g	8	50,0	2	15,4	10	34,5	0,02535*
Mediana PN (g)	1.490		2.080		2.020		ns
Mediana Idade (dias)	17,5		2		6		0.0031*
Sexo (M)	8	50,0	5	38,5	13	44,8	ns
Nascido no HC/FMB	9	56,3	7	53,8	16	55,2	ns
Total	16	55,2	13	44,2	29	100,0	

IG: Idade gestacional (semanas). Obs: 2 recém-nascidos com idade gestacional desconhecida.

ns: sem significância estatística ($p > 0,05$), RN: recém-nascido.

PN: peso ao nascimento. Obs: 1 recém-nascido com PN desconhecido.

M: masculino, HC/FMB: Hospital das Clínicas de Medicina de Botucatu

Os fatores perinatais de risco para infecção que, a partir da análise univariada demonstraram ter diferença significativa entre os grupos de RN classificados como significativos e contaminantes, foram: internação na UTI, utilização de cateter, de dreno e de dois ou mais corpos estranhos (Tabela VI).

Tabela VI: Fatores perinatais de risco para infecção por ECN

Fatores de risco	Significativo		Contaminação		Total		Valor de p
	N	%	N	%	N	%	
Internação na UTI	16	100	7	53,8	23	79,3	0,01832*
Cateter	13	81,3	5	38,5	18	62,1	0,01963*
Complicação de cateter	1	6,25	0	0	1	3,5	ns
Dreno	5	31,3	0	0	5	17,2	0,01141*
Ventilação mecânica	7	43,8	3	23,1	10	34,5	ns
Nutrição parenteral	7	43,8	2	15,4	9	31	ns
Não remoção dos corpos estranhos	7	43,8	5	38,5	12	41,4	ns
Cirurgia	2	12,5	1	7,7	3	10,3	ns
Diálise	1	6,25	0	0	1	3,5	ns
Ruptura de membrana > 24 horas	5	31,3	3	23,1	8	27,6	ns
Dois ou mais corpos estranhos	10	62,5	3	23,1	13	44,8	0,01860*
Total RN	16	55,2	13	44,8	29	100,0	

RN: recém-nascido, ns: sem significância estatística ($p > 0,05$).

Obs: 2 RN com informação desconhecida.

Dados hematológicos e bioquímicos não apresentaram diferença significativa entre os grupos pesquisados (Tabela VII).

Tabela VII: Dados laboratoriais dos recém-nascidos que tiveram ECN como patógeno isolado

Dados laboratoriais	Significativo		Contaminação		Total		Valor de p
	N	%	N	%	N	%	
Sem alteração	1	6,25	4	30,8	5	17,2	ns
Plaquetopenia	1	6,25	0	0	1	3,4	ns
Leucopenia	1	6,25	3	23,1	4	13,8	ns
Leucocitose	2	12,5	0	0	2	6,9	ns
Neutrofilia	6	37,5	3	23,1	9	31,0	ns
Neutropenia	2	12,5	0	0	2	6,9	ns
Desvio à esquerda (DE)	1	6,25	2	15,4	3	10,3	ns
PCR positiva	6	37,5	6	46,2	12	41,4	ns
Total RN	16	55,2	13	44,8	29	100	

RN: recém-nascido, ns: sem significância estatística ($p > 0,05$).

Obs.: 3 RN com hemograma, PCR desconhecidos.

Os fatores de risco significativos na incidência de infecção por ECN estão representados na Tabela VIII, com os respectivos valores de razão de chance (*Odds ratios*). O cálculo realizado através do modelo de Regressão Logística demonstrou que a utilização de cateter pelo recém-nascido aumenta o risco de infecção em 20,8 vezes quando comparado com aqueles que não fizeram uso do corpo estranho. Já em relação à idade do RN, quanto menor for, maior o risco de desenvolver infecção.

Tabela VIII: Fatores de risco para o desenvolvimento de infecção por ECN e suas razões de chance.

	Valor de p	<i>Odds ratio</i>	Intervalo de confiança (95%)	
			LI	LS
Cateter	0,0104	20,800	2,043	211,791
Idade (dias)	0,0305	0,509	0,276	0,938

A análise dos dados clínicos dos RN que apresentaram infecção ou colonização por *S. aureus* também foi realizada para verificar possíveis fatores de risco que estavam envolvidos nos casos de infecção.

Dos 42 RN com infecção, 26 (61,9%) eram prematuros, sendo seis prematuros extremos, comparado com um dos RN do grupo classificado como colonização. Os valores de idade gestacional menor que 31 semanas e entre 31 a 36 semanas apresentaram diferença significativa entre os grupos classificados como infecção (14,3% e 42,9%, respectivamente) e colonização (8,3% e 41,7%). Peso menor que 1.500 g também foi uma variável que mostrou ser significativamente diferente, além da mediana do peso, sexo e procedência (Tabela IX).

Tabela IX: Dados pessoais dos recém-nascidos que tiveram *S. aureus* como patógeno isolado.

Dados pessoais	Com infecção		Colonização		Total		Valor
	N	%	N	%	N	%	
IG < 31	6	14,3	1	8,3	7	13,0	0,03251*
IG 31-36	18	42,9	5	41,7	23	42,6	0,0004022*
IG 37	2	4,8	0	0	2	3,7	ns
IG ≥ 38	6	14,3	5	41,7	11	20,4	ns
PN < 1.500g	16	38,1	1	8,3	17	31,5	1,57.10 ⁻³ *
Mediana PN (g)	2.050		2.940		2.320		0.0356*
Mediana Idade (dias)	6		4		6		ns
Sexo (M)	24	67,1	5	41,7	29	53,7	2,28.10 ⁻³ *
Nascido no HC/FMB	23	54,8	6	50,0	29	53,7	2,65.10 ⁻³ *
Total	42	77,8	12	22,2	54	100,0	

IG: Idade gestacional (semanas). Obs: 11 recém-nascidos com idade gestacional desconhecida.

ns: sem significância estatística ($p > 0,05$), RN: recém-nascido.

PN: peso ao nascimento, M: masculino, HC/FMB: Hospital das Clínicas de Medicina de Botucatu

Obs: 5 recém-nascidos sem dados clínicos.

Os fatores perinatais que possivelmente contribuíram para o advento da infecção e que foram estatisticamente significativos foram: internação na UTI, utilização de cateter, dreno, ventilação mecânica, nutrição parenteral, dois ou mais corpos estranhos, a não remoção de corpos estranhos, cirurgia e ruptura de membrana maior que 24 horas (Tabela X).

Tabela X: Fatores perinatais de risco para infecção por *S. aureus*.

Fatores de risco	Com infecção		Colonização		Total		Valor de p
	N	%	N	%	N	%	
Internação na UTI	30	71,4	9	75,0	39	72,2	5,92.10 ^{-3*}
Cateter	30	71,4	6	50,0	36	66,7	5,92.10 ^{-5*}
Complicação de cateter	2	4,8	2	16,7	4	7,4	ns
Dreno	17	40,5	1	8,3	18	33,3	5,73.10 ^{-4*}
Ventilação mecânica	19	45,2	4	33,3	23	42,6	3,65.10 ^{-2*}
Nutrição parenteral	20	47,6	3	25,0	23	42,6	2,38.10 ^{-6*}
Não remoção dos corpos estranhos	15	35,7	7	58,3	22	40,7	0,03481*
Cirurgia	9	21,4	0	0	9	16,7	0,0001624*
Diálise	2	4,8	0	0	2	3,7	ns
Ruptura de membrana > 24 horas	11	26,2	4	33,3	15	27,8	0,02846*
Dois ou mais corpos estranhos	26	61,9	3	25,0	29	53,7	7,58.10 ^{-6*}
Total RN	42	77,8	12	22,2	54	100,0	

RN: recém-nascido, ns: sem significância estatística (p>0,05).

Obs: 5 recém-nascidos sem dados clínicos.

Dados laboratoriais referentes a alterações hematológicas, como plaquetopenia, neutrofilia, neutropenia, além de bioquímicas, como PCR, foram os fatores que demonstraram diferenças significativas entre os grupos (Tabela XI).

Tabela XI: Dados laboratoriais dos recém-nascidos que tiveram a espécie *S. aureus* como patógeno isolado.

Dados laboratoriais	Com infecção		Colonização		Total		Valor de p
	N	%	N	%	N	%	
Sem alteração	2	4,8	5	41,7	7	13,0	ns
Plaquetopenia	5	11,9	0	0	5	9,3	0,01141*
Leucopenia	2	4,8	0	0	2	3,7	ns
Leucocitose	1	2,4	0	0	1	1,9	ns
Neutrofilia	9	21,4	1	8,3	10	18,5	0,001745*
Neutropenia	9	21,4	3	25,0	12	22,2	0,04123*
Desvio à esquerda (DE)	0	0	1	8,3	1	1,9	ns
Eosinofilia	3	7,1	0	0	3	3,7	ns
Policitemia	1	2,4	0	0	1	1,9	ns
Neutrofilia e DE	3	7,1	0	0	3	3,7	ns
PCR positiva	18	42,9	0	0	18	33,3	1,46.10 ⁻⁵ *
Total RN	42	77,8	12	22,2	54	100,0	

RN: recém-nascido, ns: sem significância estatística ($p > 0,05$).

Obs: 5 recém-nascidos sem dados clínicos.

Para a espécie *S. aureus* os fatores de risco significativos para o desenvolvimento de infecção foram cateter e dreno. Pacientes que fizeram uso de corpos estranhos, como cateter e dreno, tiveram um risco de 5 e 11 vezes, respectivamente, maior na aquisição de infecções pelos *S. aureus* (Tabela XII).

Tabela XII: Fatores de risco para o desenvolvimento de infecção por *S. aureus* e suas razões de chance.

	Valor de p	<i>Odds ratio</i>	Intervalo de confiança (95%)	
			LI	LS
Cateter	0,0275	5,0	1,195	20,922
Dreno	0,0292	10,99	1,275	94,862

Detecção gênica

Detecção do gene mecA

Das 57 amostras de *S. aureus* isoladas de recém-nascidos, 18 (31,6%) foram positivas para o gene *mecA*; das 10 amostras isoladas de fossa nasal de pessoas normais, nenhuma foi positiva. No grupo classificado como infecção foram detectadas 16 (35,6%) amostras positivas, em um total de 45, já no grupo classificado como colonização, somente duas amostras apresentaram o gene, em um total de 12. Assim, em relação às 18 amostras positivas de *S. aureus*, 88,9% foram referentes ao grupo classificado como infecção e 11,1% ao grupo classificado como colonização (Figura 8).

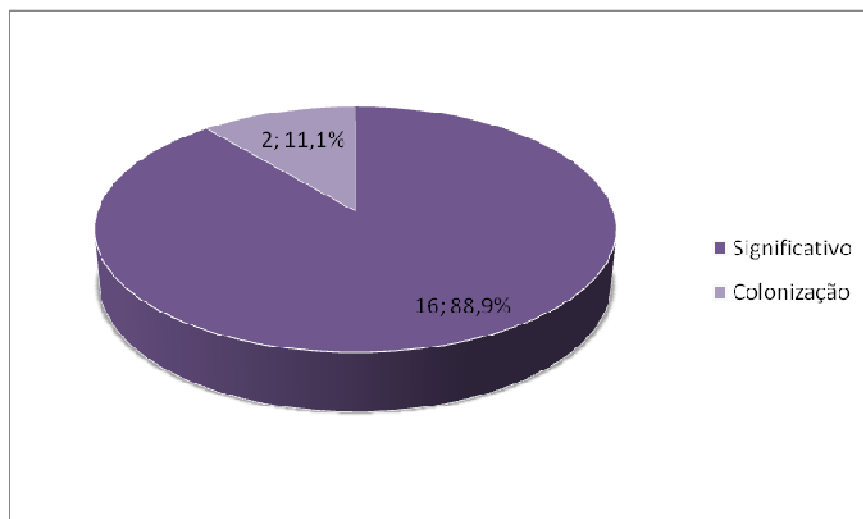


Figura 8: Distribuição das amostras *mecA* positivas em relação aos grupos de *S. aureus*.

Foi verificado que, entre os anos de 1991-2005, houve uma queda no número de amostras positivas para o gene *mecA* entre as amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de recém-nascidos, porém, a diferença relatada não teve valor estatisticamente significativo (Tabela XIII).

Tabela XIII: Distribuição de amostras de *Staphylococcus aureus* positivas e negativas para o gene *mecA* no período de 1991 a 2005.

Ano	Número de amostras	<i>mecA</i> + (%)		<i>mecA</i> – (%)	
		N	%	N	%
1991-1993	18	9	50,0	9	50,0
1994-1997	32	8	25,0	24	75,0
1999-2005	7	1	14,3	6	85,7

A Figura 9 demonstra a queda no número de amostras de *S. aureus* resistentes à meticilina e, conseqüentemente, o aumento de amostras sensíveis.

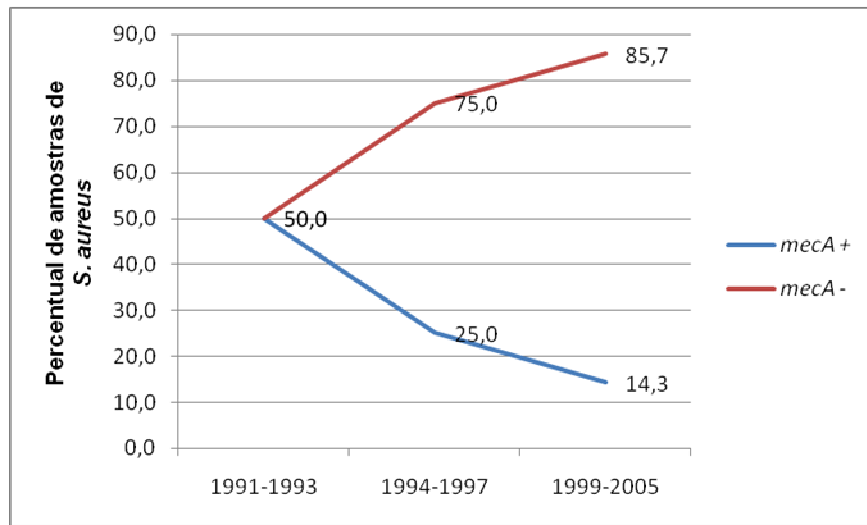


Figura 9: Distribuição de amostras de *S. aureus* positivas e negativas para o gene *mecA* no período de 1991-2005.

No grupo classificado como infecção a variação no percentual de amostras positivas e negativas para o gene *mecA* teve o perfil mostrado na Figura 10, que indica a queda em relação à presença do gene. No período de 1991-1993, a frequência de amostras de *S. aureus* resistentes era de 57,1%, no segundo período – 1994 a 1997 – passou para 28%, terminando no ano de 2005 com frequência de 16,7%.

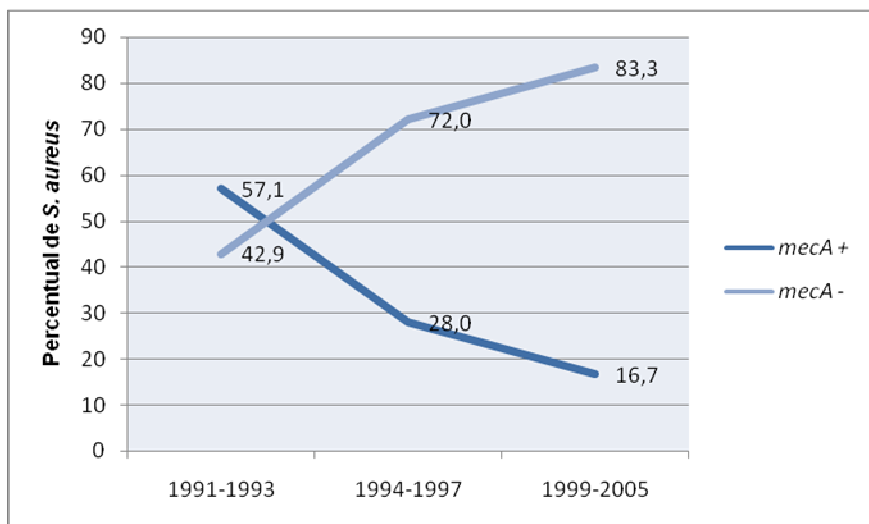


Figura 10: Frequência da presença do gene *mecA* no grupo de *S. aureus* classificado como infecção no período de 1991-2005.

Em 12 amostras de *S. aureus* do grupo classificado como colonização, foi obtida uma amostra *mecA* positiva no período de 1991-1993; uma no período de 1994-1997 e nenhuma em 1999-2005 (Figura 11).

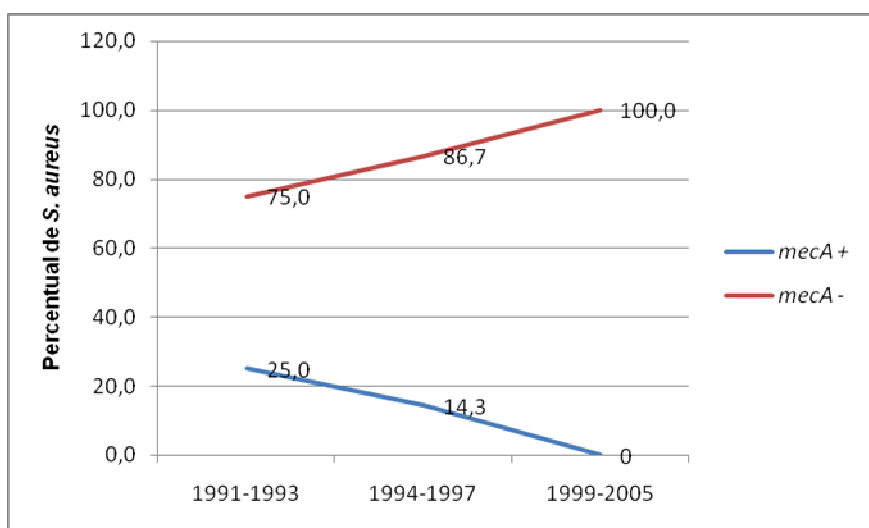


Figura 11: Distribuição de amostras de *S. aureus* classificadas como colonização positivas e negativas para o gene *mecA* no período de 1991-2005.

Em relação aos diferentes tipos de materiais clínicos, as amostras de *S. aureus* classificadas como infecção tiveram 25% de isolados *mecA* positivos de hemocultura; 57,1% de corpos estranhos e 26,7% de secreção (Figura 12). O grupo classificado como colonização apresentou somente duas amostras de corpos estranhos positivas (Figura 13).

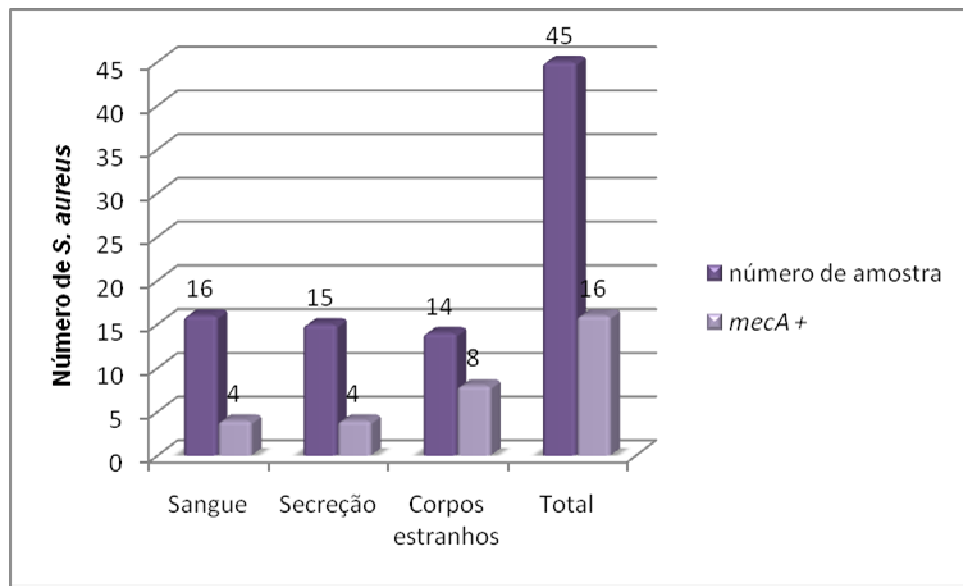


Figura 12: Distribuição de amostras de *S. aureus* do grupo classificado como infecção em relação ao material clínico e presença do gene *mecA*.

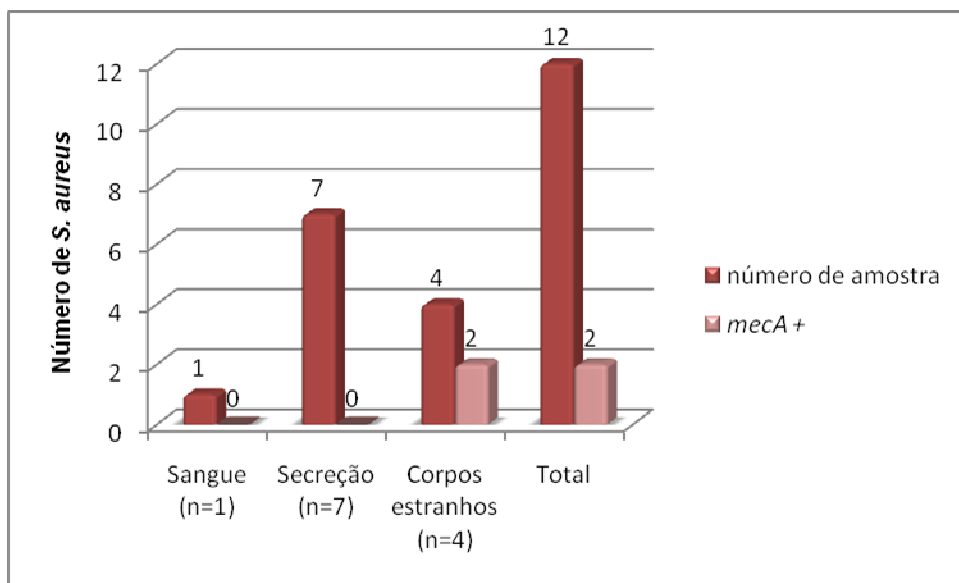


Figura 13: Distribuição de amostras de *S. aureus* do grupo classificado como colonização em relação ao material clínico e presença do gene *mecA*.

Entre as 30 amostras de ECN isoladas de recém-nascidos, 11 (36,7%) apresentaram o gene *mecA*; das dez isoladas de fossa nasal, duas (20,0%) foram positivas. A Tabela XIV indica os resultados obtidos em relação à presença do gene *mecA* nas diferentes espécies de ECN, isoladas de recém-nascidos. Amostras de *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. hominis* e *S. haemolyticus* apresentaram resistência à metilina, porém *S. lugdunensis* e *S. simulans* não foram positivas para o gene.

Tabela XIV: Amostras de ECN isoladas de recém-nascidos positivas para o gene *mecA*.

Espécie	<i>mecA</i> + (%)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (n = 19)	6 (31,6)
<i>Staphylococcus lugdunensis</i> (n = 2)	-
<i>Staphylococcus warneri</i> (n = 4)	1 (25,0)
<i>Staphylococcus hominis</i> (n = 2)	2 (100,0)
<i>Staphylococcus simulans</i> (n = 1)	-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (n = 2)	2 (100,0)
Total (n = 30)	11 (36,7)

A Figura 14 representa a distribuição de amostras *mecA* positivas no grupo dos ECN classificados como significativos. Foi observado que nesse grupo seis amostras foram positivas e que entre as 13 amostras de *S. epidermidis*, quatro foram positivas; *S. warneri* e *S. hominis* tiveram uma amostra cada positiva e o *S. lugdunensis* não apresentou positividade.

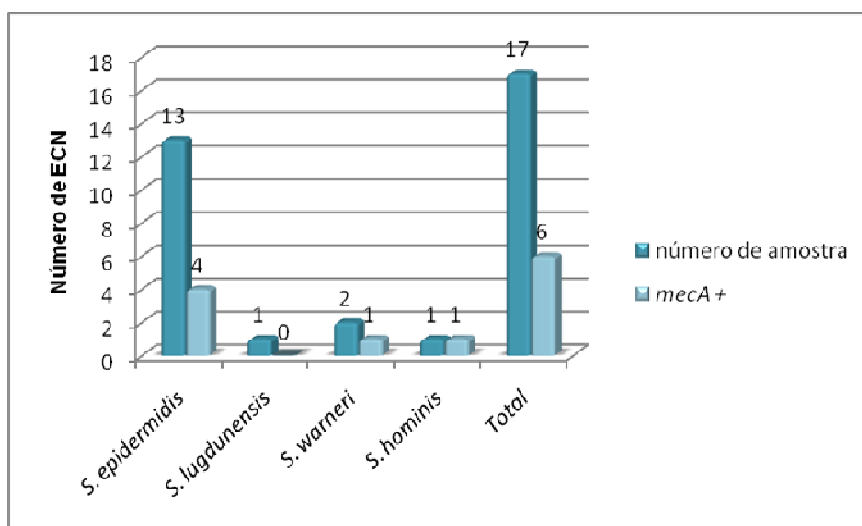


Figura 14: Distribuição de espécies de ECN do grupo classificado como significativo em relação à presença do gene *mecA*.

Os ECN classificados como contaminação tiveram um total de cinco isolados positivos. Somente as espécies *S. epidermidis*, *S. hominis* e *S. haemolyticus* tiveram amostras resistentes à meticilina (Figura 15).

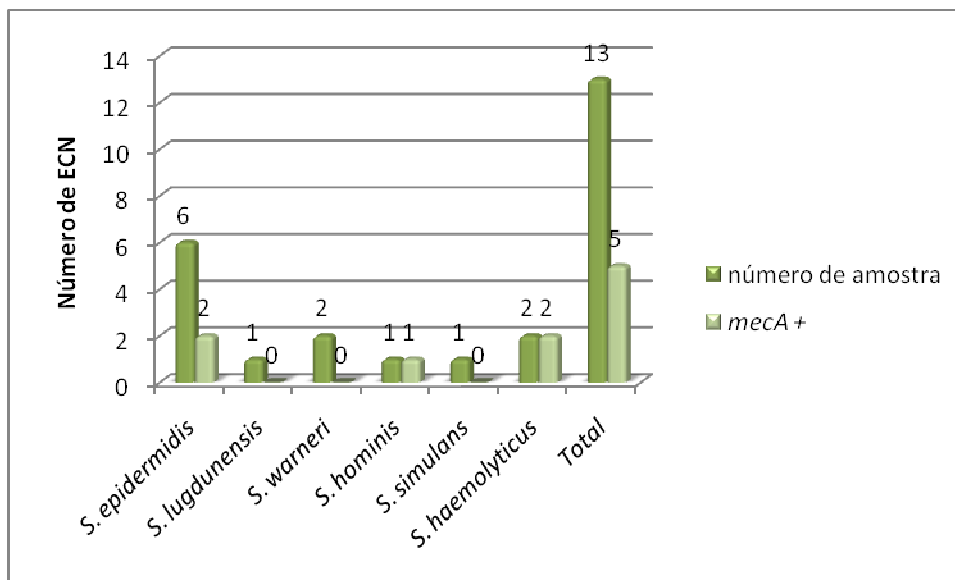


Figura 15: Distribuição de espécies de ECN do grupo classificado como contaminante em relação à presença do gene *mecA*.

Os resultados da Tabela XV são referentes aos ECN isolados de fossa nasal e à presença do gene *mecA*. Foram encontradas duas (20,0%) amostras *mecA* positivas, uma da espécie *S. epidermidis* e outra da *S. cohnii*; as espécies *S. saprophyticus* e *S. warneri* não foram positivas.

Tabela XV: Distribuição de amostras de ECN isoladas de fossa nasal positivas para o gene *mecA*.

Espécie	<i>mecA</i> + (%)
<i>S. epidermidis</i> (n=4)	1 (25,0)
<i>S. saprophyticus</i> (n=4)	-
<i>S. cohnii</i> (n=1)	1 (100,0)
<i>S. warneri</i> (n=1)	-
Total (n=10)	2 (20,0)

A Figura 16 representa a distribuição de amostras de ECN isoladas de fossa nasal positivas para o gene *mecA* e a Figura 17 a queda em relação à presença do gene *mecA* em amostras isoladas de RN, durante o período de 1990 a 1996. Observa-se que, no período de 1990-1991, foi constatada a presença do gene em quatro (44,4%) amostras em um total de nove; no período de 1992-1994, com seis amostras, duas (33,3%) foram positivas; nos anos de 1995-1996, cinco (33,3%) apresentaram o gene, em um total de 15 isolados, mantendo assim, a frequência de amostras *mecA* positivas do período anterior. Contudo, essas diferenças encontradas durante os períodos analisados não foram estatisticamente significativos.

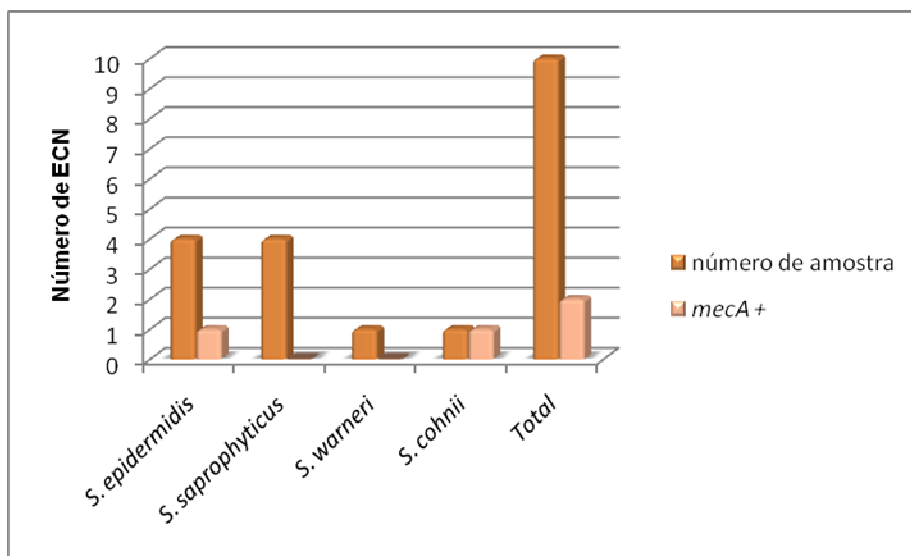


Figura 16: Representação da distribuição de amostras de ECN isoladas de fossa nasal positivas para o gene *mecA*.

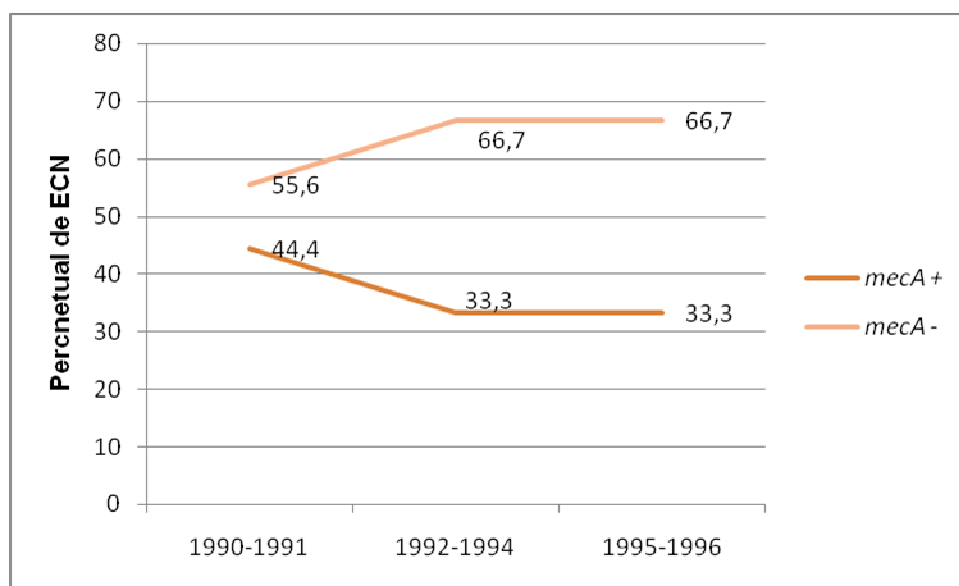


Figura 17: Distribuição de amostras de ECN positivas e negativas para o gene *mecA* no período de 1990 a 1996.

Na Tabela XVI têm-se a distribuição de amostras de ECN isoladas de RN e positivas para o gene, em relação aos diferentes materiais clínicos. Sete (53,8%) amostras de hemocultura foram positivas e quatro (26,7%) de corpos estranhos (cateter, cânula e dreno torácico). Nenhuma amostra de secreção foi positiva.

Tabela XVI: Distribuição de amostras de ECN provenientes de materiais clínicos distintos e positivas para o gene *mecA*.

Material Clínico	<i>mecA</i> + (%)
Sangue (n = 13)	7 (53,8)
Cateter (n = 9)	2 (22,2)
Cânula (n = 5)	2 (40,0)
Secreção (n = 2)	-
Dreno torácico (n = 1)	-
Total (n = 30)	11 (36,7)

Dos sete ECN do grupo significativo isolados de hemocultura, três foram positivos para o gene *mecA* e das dez amostras provindas de corpos estranhos, três apresentaram positividade (Figura 18). No grupo classificado como contaminante, foram obtidos cinco isolados *mecA* positivos, sendo que quatro foram de hemocultura e uma de corpo estranho (Figura 19).

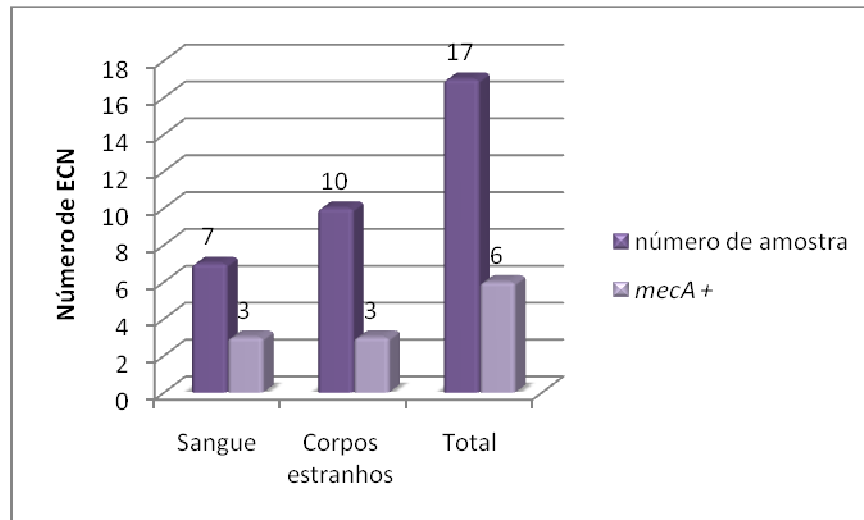


Figura 18: Distribuição de amostras de ECN do grupo classificado como significativo positivas para o gene *mecA*, em relação ao material clínico.

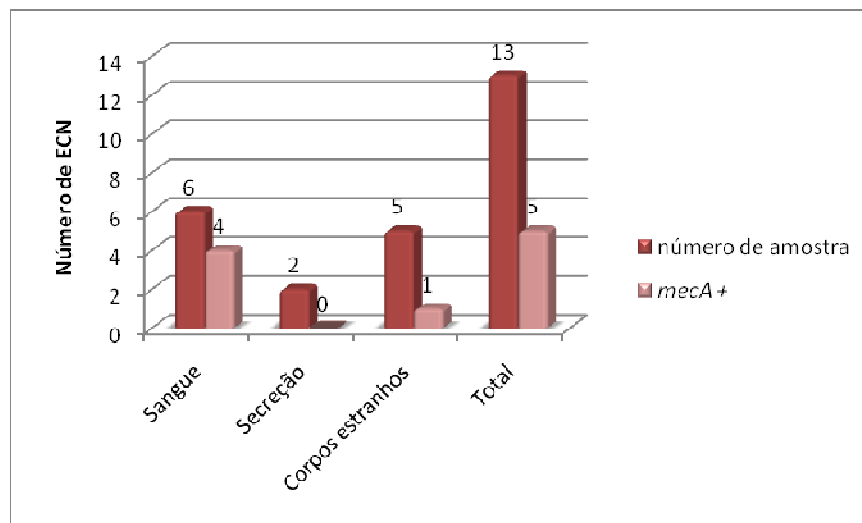


Figura 19: Frequência de amostras de ECN do grupo classificado dos contaminantes positivas para o gene *mecA*, em relação ao material clínico.

A Figura 20 representa o resultado obtido da amplificação realizada pela PCR e pela análise por eletroforese do gel de agarose. O produto amplificado possui 533 pb.

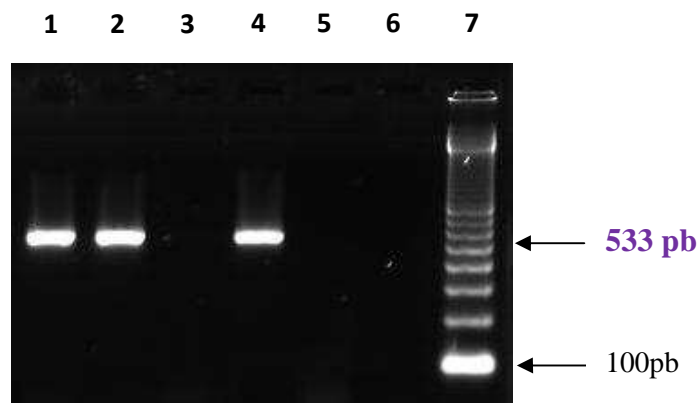


Figura 20: Detecção do gene *mecA* (533 pb) pela reação em cadeia da polimerase e pela análise por eletroforese da reação em gel de agarose 2%. Linhas 1 e 2, amostras positivas de *S. aureus*; linha 3, amostra negativa de *S. aureus*; linha 4, controle positivo (ATCC 33591); linhas 5 e 6, controles negativos (ATCC 25923 e água); linha 7, marcador de peso molecular (100 pb).

Amostras de ECN e de *S. aureus* não tiveram diferença significativa em relação à presença do gene *mecA*.

Detecção dos genes pvl

Das 57 amostras de *S. aureus* isoladas, 10 (17,5%) apresentaram os genes *pvl*; das dez amostras de *S. aureus* isoladas de fossa nasal de pessoas normais, nenhuma foi positiva. Entre os diferentes grupos, oito amostras classificadas como infecção obtiveram positividade para os genes *pvl*. Já no grupo classificado como colonizante, duas foram positivas (Figura 21).

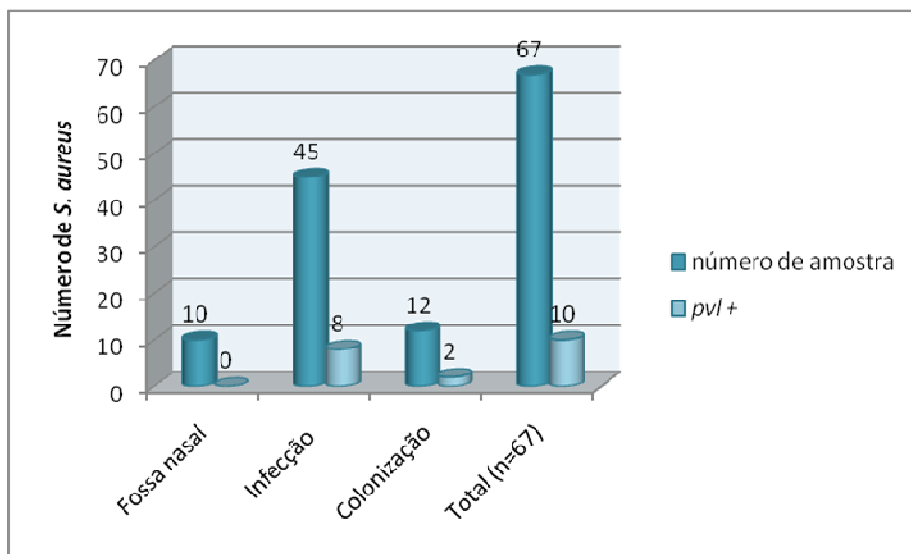


Figura 21: Distribuição dos diferentes grupos de *Staphylococcus aureus* positivos para a toxina leucocidina Panton-Valentine.

A Tabela XVII mostra a distribuição de amostras positivas para os genes *pvl* segundo os diferentes materiais clínicos, sendo possível observar que amostras isoladas de sangue e secreção obtiveram maior percentual de positividade quando comparadas com os materiais cateter.

Tabela XVII: Distribuição de amostras de *S. aureus* isoladas de diferentes materiais clínicos e positivas para os genes *pvl*.

Material Clínico	<i>pvl</i> + (%)
Sangue (n = 17)	4 (23,5)
Cateter (n = 8)	1 (12,5)
Cânula (n = 8)	-
Secreção (n = 22)	5 (22,7)
Dreno torácico (n = 2)	-
Total (n = 57)	10 (17,5)

No grupo classificado como infecção, amostras isoladas de sangue tiveram maior percentual (50,0%) em relação à presença dos genes *pvl* do que os isolados de secreção (37,5%) e corpos estranhos (12,5%) (Figura 22). Já no grupo classificado como colonização somente amostras de secreção apresentaram os genes (Figura 23).

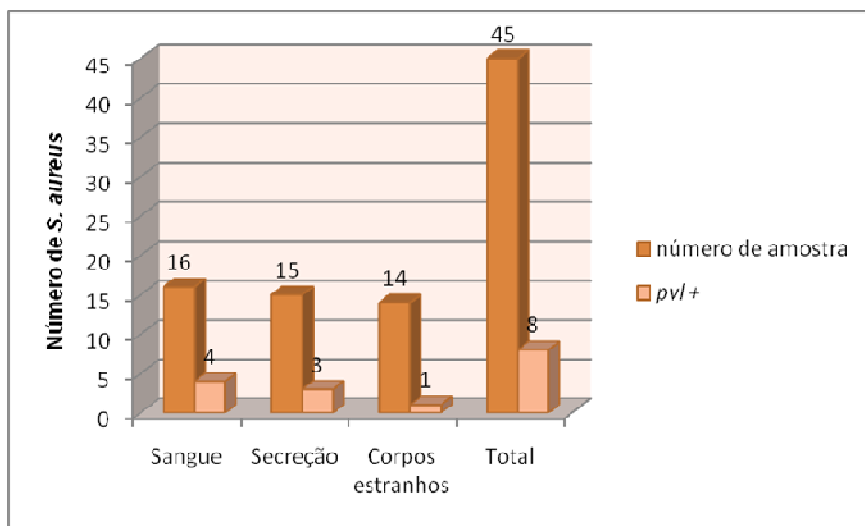


Figura 22: Frequência de amostras de *S. aureus* do grupo classificado como infecção e *pvl* positivas em relação ao material clínico.

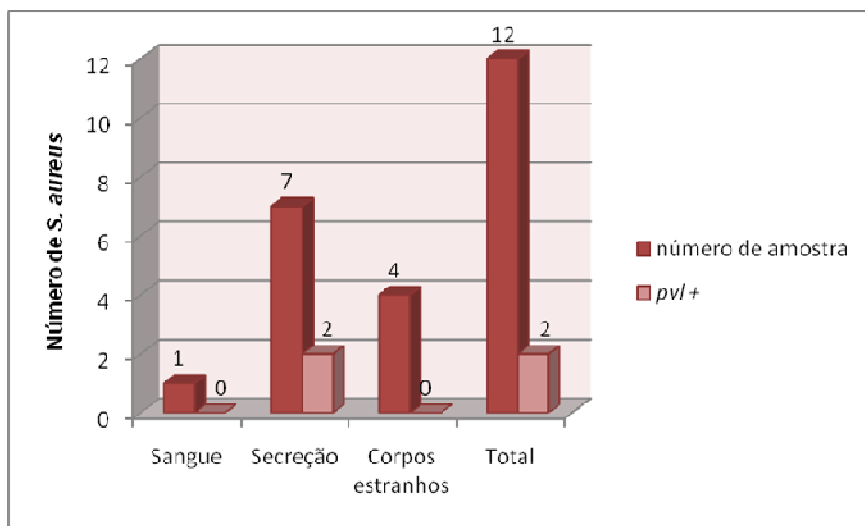


Figura 23: Distribuição de amostras de *S. aureus* do grupo classificado como colonização e *pvl* positivas em relação ao material clínico.

Em relação às amostras de estafilococos coagulase-negativa, não foram encontrados isolados positivos para os genes *pvl*.

A Figura 24 demonstra o resultado da PCR dos genes *pvl* através da eletroforese da reação em gel de agarose, onde pode-se verificar o produto amplificado de 433 pb.

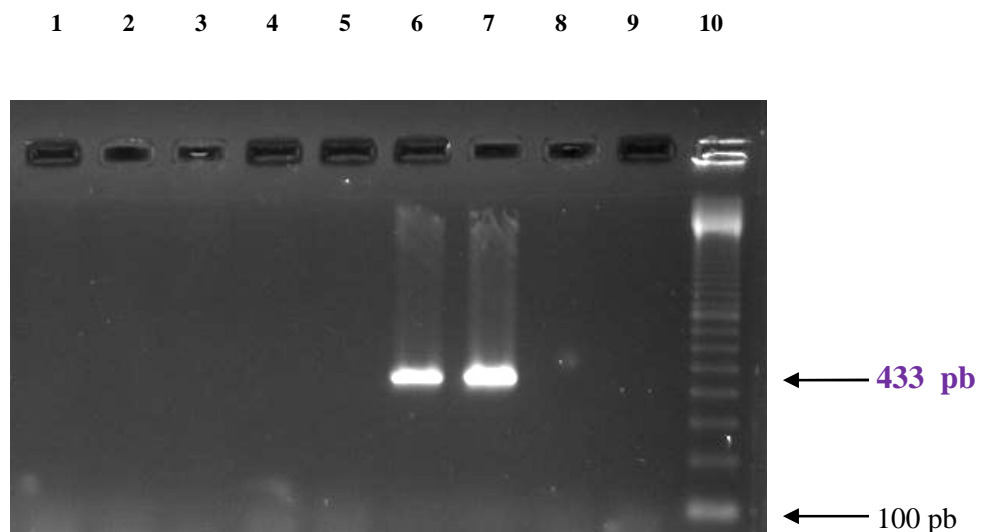


Figura 24: Detecção dos genes *pvl* (433 pb) pela reação em cadeia da polimerase e pela análise por eletroforese da reação em gel de agarose 2%. Linhas 1-5, amostras negativas de *S. aureus*; linha 6, amostra positiva de *S. aureus*; linha 7, controle positivo (ATCC 49775); linhas 8 e 9, controles negativos (ATCC 29213 e água); linha 10, marcador de peso molecular (100 pb).

Detecção dos genes icaA, icaD e icaC

Através da reação de PCR verificou-se que, das 30 amostras de ECN, 28 (93,3%) foram positivas para um ou mais genes *ica*. Uma amostra apresentou somente o gene *icaA* (3,3%); uma os genes *icaA* e *icaD* (3,3%) e as demais apresentaram os três genes

(86,7%). Na Tabela XVIII encontra-se a distribuição de amostras de ECN, segundo a espécie, positivas para os genes *ica*.

Tabela XVIII: Distribuição de amostras de ECN positivas para os genes *ica*, segundo a espécie.

Espécie	<i>icaA</i> +		<i>icaA</i> + e <i>icaD</i> +		<i>icaA</i> +, <i>icaC</i> + e <i>icaD</i> +	
	<i>N</i>	%	<i>N</i>	%	<i>N</i>	%
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (n = 19)	-	-	-	-	18	94,7
<i>Staphylococcus lugdunensis</i> (n = 2)	-	-	-	-	2	100,0
<i>Staphylococcus warneri</i> (n = 4)	-	-	-	-	4	100,0
<i>Staphylococcus hominis</i> (n = 2)	-	-	-	-	1	50,0
<i>Staphylococcus simulans</i> (n = 1)	-	-	1	100,0	-	-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (n = 2)	1	50,0	-	-	1	50,0
Total (n = 30)	1	3,3	1	3,3	26	86,7

Na Tabela XIX encontram-se as espécies de ECN dos grupos classificados como significativo e contaminante e a presença dos genes *ica*.

Tabela XIX: Distribuição das espécies de ECN positivas para os genes *ica*.

Espécie	Significativo		Contaminante	
	N	<i>ica</i> +	N	<i>ica</i> +
<i>S. epidermidis</i>	13	12	6	6
<i>S. lugdunensis</i>	1	1	1	1
<i>S. warneri</i>	2	2	2	2
<i>S. hominis</i>	1	1	1	-
<i>S. simulans</i>	-	-	1	1
<i>S. haemolyticus</i>	-	-	2	2
Total	17	16	13	12

Entre as dez amostras de fossa nasal, seis (60,0%) foram *icaA* e *icaD* positivas e quatro (40,0%) *icaA*, *icaC* e *icaD* positivas. Os *Staphylococcus epidermidis* e *S. saprophyticus* apresentaram maior percentual de isolados *icaA* e *icaD* positivos, enquanto que as únicas amostras de *S. warneri* e *S. cohnii* foram positivas para os três genes (Tabela XX).

Tabela XX: Distribuição de amostras de ECN isoladas de flora normal positivas para os genes *ica*.

Espécie	<i>icaA</i>+ e <i>icaD</i>+ (%)	<i>icaA</i>+, <i>icaC</i>+ e <i>icaD</i>+ (%)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (n = 4)	3 (75,0)	1 (25,0)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (n = 4)	3 (75,0)	1(25,0)
<i>Staphylococcus warneri</i> (n = 1)	-	1 (100,0)
<i>Staphylococcus cohnii</i> (n = 1)	-	1 (100,0)
Total (n = 10)	6 (60,0)	4 (40,0)

As Figuras 25, 26 e 26 demonstram os resultados das ampliações dos genes *icaA*, *icaD* e *icaC*, resultando em produtos de 103 pb, 198 pb e 400 pb, respectivamente.

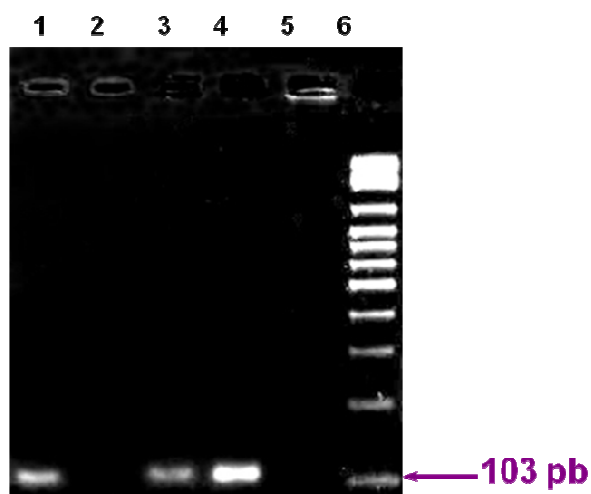


Figura 25: Detecção do gene *icaA* pela reação em cadeia da polimerase e pela análise por eletroforese da reação em gel de agarose 2%. Linhas 1 e 3, amostras positivas de ECN; linhas 2 e 5, amostra negativa de ECN e controle negativo (ATCC 12228); linha 4, controle positivo (ATCC 35984); linha 6, marcador de peso molecular (100 pb).

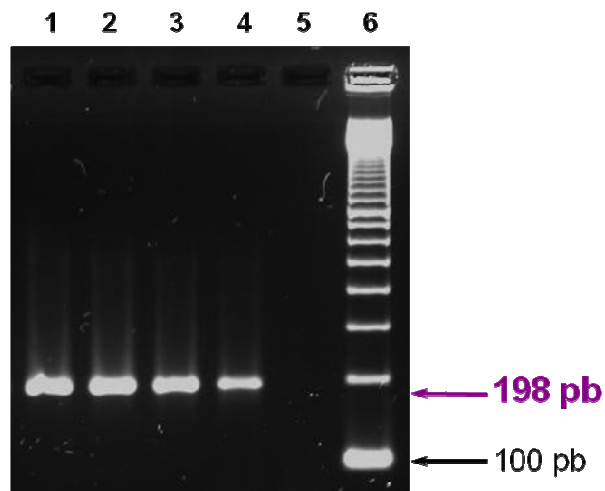


Figura 26: Detecção do gene *icaD* pela reação em cadeia da polimerase e pela análise por eletroforese da reação em gel de agarose 2%. Linhas 1-3, amostras positivas de ECN; linha 4, controle positivo (ATCC 35984); linha 5, controle negativo (ATCC 12228); linha 6, marcador de peso molecular (100 pb).

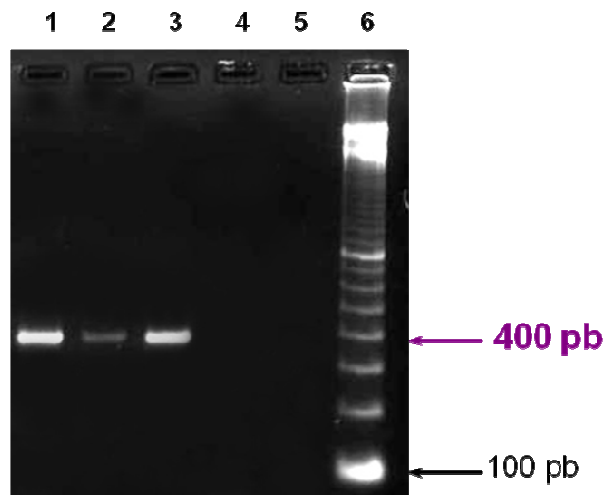


Figura 27: Detecção do gene *icaC* pela reação em cadeia da polimerase e pela análise por eletroforese da reação em gel de agarose 2%. Linhas 1 e 2 , amostras positivas de ECN; linha 3, controle positivo (ATCC 35984); linhas 4 e 5, controles negativos (ATCC 12228 e água); linha 6, marcador de peso molecular (100 pb).

A análise conjunta das amostras de *S. aureus* em relação à presença dos genes *mecA* e *pvl*, mostrou que somente uma amostra apresentou os dois genes concomitantemente, sendo esta isolada de hemocultura.

Em relação à presença dos genes *ica* e *mecA* no grupo de ECN, foi verificado que das 30 amostras isoladas de RN, dez (33,3) apresentaram os dois genes concomitantemente, sendo que seis (60,0%) corresponderam ao grupo classificado como significativo e quatro (40,0%) ao grupo dos contaminantes. No grupo de amostras isoladas de fossa nasal somente dois isolados apresentaram os dois genes. No total, foram obtidas 12 (30,0%) amostras positivas para ambos os genes em um total de 40 isolados (Figura 28).

Duas amostras isoladas de RN que não foram positivas para os três genes *ica* pertenciam ao grupo dos contaminantes. As duas únicas amostras negativas para os genes *ica* foram isoladas uma de cada grupo.

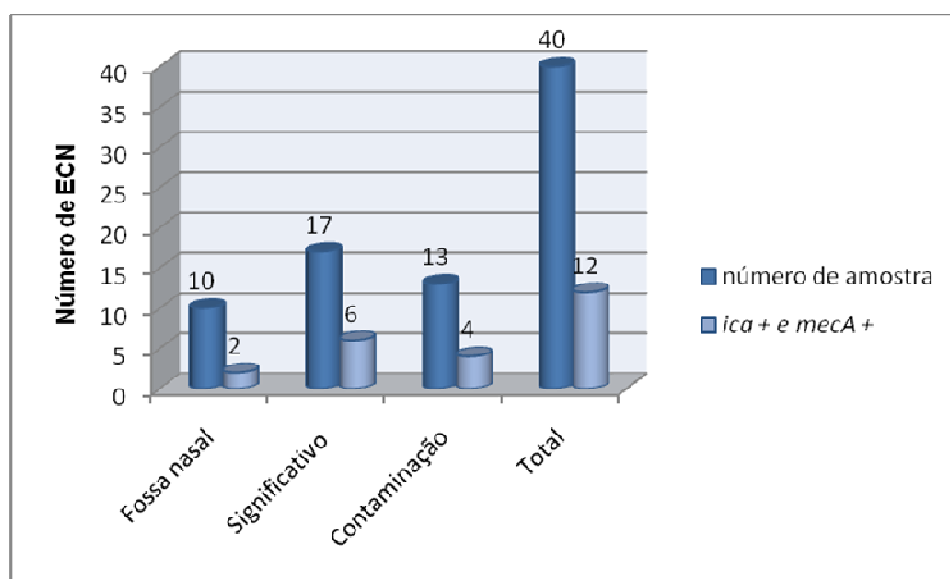


Figura 28: Distribuição de amostras de ECN dos diferentes grupos classificados positivas para os genes *ica* e *mecA*.

DISCUSSÃO

As amostras isoladas e identificadas mostraram um maior percentual de *S. epidermidis* (63,3%) entre os estafilococos coagulase-negativa. Em 2002, Cunha et al., utilizando amostras de ECN isoladas de materiais clínicos de recém-nascidos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu no período de 1990-1996, também descreveram um percentual de 77,8% de isolados da espécie *S. epidermidis*. Porém, nos últimos anos está ocorrendo uma diminuição no isolamento de *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. cohnii* e *S. xylosus*, e um aumento de *S. hominis* e *S. saprophyticus* (Cuevas et al., 2004; Piette et al., 2008). As espécies *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. hominis* são as espécies de ECN mais comumente isoladas de amostras clínicas (Piette et al., 2008), dado este que concorda com o resultado obtido em relação à identificação de amostras isoladas de materiais clínicos de RN e de fossa nasal de pessoas normais, pois nesta, somente as espécies *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. warneri* e *S. cohnii* foram identificadas.

Como descrito na literatura, os *S. epidermidis* foram também a espécie mais freqüentemente isolada de materiais clínicos como sangue, cateter e cânula. A colonização de corpos estranhos está relacionada com cerca de 50 a 70% dos casos de infecções (Huebner & Goldmann, 1999) e a participação em infecções nosocomiais da corrente sanguínea é de 31% (Wisplinghoff et al., 2004). Em relação a esse tipo de infecção, os *S. aureus* também possuem importante participação, contribuindo como agente em 12% dos casos (Dalton & Allison, 1967). O aumento da incidência de bacteremia causada pelos ECN está intimamente associado ao aumento do uso de cateteres nas Unidades Pediátricas de Tratamento Intensivo. Maldini et al. (2007)

relataram que os ECN foram os patógenos mais comumente isolados nos casos de bacteremia do Hospital Escola da Croácia e o uso de cateter intravascular foi descrito como a fonte mais comum associada com bacteremias, correspondendo a 22,6%, seguida do trato respiratório e do trato geniturinário como sítios de infecções primárias.

Entre os *S. aureus*, o grupo classificado como infecção apresentou mais isolados de hemocultura (35,6%) comparado com grupo de colonizantes (8,3%), que mostrou um número maior de amostras isoladas de secreção e de cateter (58,3% e 25%, respectivamente). Como os humanos são reservatórios naturais de *S. aureus* e cerca de 30 a 50% de adultos saudáveis apresentam 10 a 20% de colonização persistente por esses microrganismos (Noble et al., 1967; Casewell & Hill, 1986), é fundamental a avaliação dos dados clínicos dos pacientes para diferenciação desses microrganismos como agentes causadores de infecção ou colonizantes.

A análise dos fatores de risco para a aquisição de infecção por ECN mostrou que as variáveis idade, utilização de corpos estranhos, antibioticoterapia prévia, internação na UTI entre outras, apresentaram diferença estatisticamente significativa. A utilização de cateter aumentou em 20 vezes o risco do RN desenvolver infecção, o que concorda com dados da literatura que citam os cateteres como principal fonte de ECN (Auriti et al, 2002; Maldini et al. 2007). No trabalho de Cunha et al. (2002) também foi verificado que o uso de cateter foi significativamente mais freqüente nos recém-nascidos com infecção por ECN do que nos contaminados.

Entre os *S. aureus* o uso de cateter também foi uma variável que apresentou diferença estatisticamente significativa, assim como peso menor que 1.500g, dreno, antibioticoterapia prévia, entre outras. A utilização de cateter e de dreno aumenta o risco do paciente desenvolver infecção em 5 e 11 vezes. Auriti et al. (2002), em seu trabalho

referente aos fatores de risco para infecções nosocomiais em unidades neonatais de tratamento intensivo, descreveu que a baixa idade gestacional e a utilização de cateteres intravasculares foram importantes fatores de risco para a aquisição de infecção.

O gene *mecA* foi encontrado em 18 (31,6%) amostras de *S. aureus* em um total de 57. Dos 45 isolados classificados no grupo infecção, 16 (35,6%) foram positivos para o gene, e entre os 12 isolados do grupo classificado como colonização, dois apresentaram positividade. Considerando somente as amostras *mecA* positivas, foi observado que 88,9% foram classificadas como agentes associados com infecção e 11,1% como colonizantes, indicando assim que, amostras relacionadas com infecção apresentaram maior resistência à metilina. Em nosso estudo, nenhuma amostra de *S. aureus* isolada de fossa nasal apresentou o gene *mecA*. Pereira & Cunha. (2008), estudando amostras de fossa nasal de pessoas normais, também não encontraram isolados *mecA* positivos.

A prevalência de *S. aureus* resistentes à metilina em diferentes regiões do mundo varia consideravelmente. Em uma pesquisa SENTRY com 3051 amostras de *S. aureus* isoladas de 25 hospitais universitários distribuídos entre 15 países da Europa Central e Sudeste, 25% eram MRSA. A maior porcentagem descrita foi encontrada em hospitais de Portugal (54%) e Itália (entre 43 e 58%); o menor percentual foi na Suíça e Holanda (2% cada) (Fluit et al., 2001). No Brasil, Cavalcanti et al. (2005), verificaram a prevalência de *S. aureus* e MRSA no Hospital Universitário Oswaldo Cruz, em Recife. Foram constatadas, em 87 isolados de *S. aureus* de pacientes admitidos na UTI, a presença de 30 (34,5%) MRSA. Pereira & Cunha (2008) também no Brasil, estudaram 100 amostras de *S. aureus* isoladas de materiais clínicos provenientes de pacientes internados na Unidade Neonatal e Pediátrica do HC da Faculdade de Medicina de Botucatu no período de 1991 a 2007, e encontraram 18 (18%) amostras positivas. Entre

as amostras isoladas da Unidade Neonatal, 10 (16,1%) foram *mecA* positivas, sendo três provenientes de hemocultura, quatro de secreções e três de cateteres. Da Unidade Pediátrica, oito (21%) isolados apresentaram resistência à meticilina, entre estes sete eram de hemocultura e uma de líquido pleural.

Os *S. aureus* resistentes à meticilina têm emergido durante os 30 últimos anos como um importante patógeno responsável por infecções hospitalares, principalmente em unidades perinatais, e, mais atualmente, comunitárias. Os fatores de risco associados com a aquisição de MRSA incluem nascimento prematuro, baixo peso, problemas respiratórios, imunodeficiência, uso profilático de antimicrobianos, tempo de hospitalização longo, infecções do trato respiratório, diagnósticos invasivos e procedimentos cirúrgicos (Loureiro et al., 2000).

Embora não tenha verificado diferença estatisticamente significativa a análise da evolução de resistência à oxacilina em amostras de *S. aureus* de acordo com os anos os resultados revelaram uma queda entre os anos de 1991-2005. Resultados similares foram verificados por Pereira & Cunha (2008), utilizando amostras isoladas de pacientes internados na Unidade Neonatal e Pediátrica do HC de Botucatu no período de 1991 a 2007, observando um declínio na porcentagem de amostras de *S. aureus* resistentes à meticilina no período de 1995-2000, um posterior aumento em 2001-2004 e novamente um declínio nos anos seguintes. Dados de uma pesquisa realizada na Inglaterra e País de Gales durante 1993-2002 demonstrou que, apesar do número de bacteremias causadas por MSSA estar relativamente constante, a taxa destas por MRSA cresceu significativamente, resultando em um aumento global de casos de bacteremias pelos *S. aureus*. (Griffiths et al., 2004)

Das 30 amostras de ECN estudadas 11 (36,7%) apresentaram positividade para o gene *mecA*, comparado com duas (20,0%) das dez amostras isoladas de fossa nasal. Das 19 amostras de *S. epidermidis* isoladas de RN, seis (31,6%) foram resistentes à meticilina; das quatro cepas de *S. warneri*, uma (25%) apresentou o gene e das duas amostras de *S. hominis* e de *S. haemolyticus*, todas foram positivas. O maior percentual de resistência à oxacilina em *S. epidermidis* também foi encontrado por Cunha & Martins (2008) com 83,3% dos *S. epidermidis* isolados de pacientes do HC de Botucatu, *mecA* positivos. Em amostras clínicas, foram reportadas taxas de resistência à meticilina variando de 55 a 77% e até 86% em Unidades de Cuidados Intensivos (UTI). Bernardi et al. (2007), trabalhando com 27 cepas de ECN isoladas de cateter venoso central, encontraram 90% das cepas de *S. epidermidis* resistentes à oxacilina, 75% de *S. haemolyticus* e 75% de *S. warneri*. Neste trabalho, nenhuma amostra de *S. lugdunensis* e de *S. simulans* demonstrou ter o gene.

Foram encontradas seis amostras *mecA* positivas no grupo dos ECN classificados como significativos, sendo quatro da espécie *S. epidermidis*, uma *S. warneri* e uma *S. hominis*. No grupo dos contaminantes, dos cinco isolados resistentes à meticilina, dois eram *S. epidermidis*, dois *S. haemolyticus* e um *S. hominis*.

O percentual mais elevado de amostras *mecA* positivas no grupo dos ECN do que nos *S. aureus* tem sido descrito por outros autores (Cuevas et al. 1999, Bouza et al. 2004) e no Brasil, Cunha & Martins (2008) estudando 150 amostras de *S. aureus* e de ECN isoladas de pacientes do Hospital das Clínicas de Botucatu, encontraram 46 (45,1%) *S. aureus mecA* positivos e 37 (81,2%) ECN positivos.

Com referência a pesquisa do gene *pvl*, do total de 57 amostras de *S. aureus* analisadas, 10 (17,5%) foram positivas, sendo duas (20%) do grupo de *S. aureus*

classificado como colonização e 80% do grupo com infecção. O maior percentual de positividade, referente à origem das amostras isoladas de diferentes materiais clínicos, foi encontrado no grupo de hemocultura (23,5%), seguido do grupo de secreção (22,7%) e de corpos estranhos (5,6%). Estes dados não diferem dos já descritos na literatura, que associam a presença da toxina com casos de infecções sistêmicas e locais (Lina et al. 1999, Issartel et al. 2005). Em seu trabalho, Lina et al. (1999) encontraram 93% de amostras associadas com furunculose positivas para os genes da leucocidina Pantone-Valentine (LPV) e 85% em amostras associadas a casos de severa pneumonia necrótica hemorrágica. No Japão, das 161 cepas de *S. aureus* isoladas de lesões de pele de pacientes do Departamento de Dermatologia da Universidade de Medicina de Okayama, 20 (12,4%) apresentaram os genes (Yamasaki et al., 2005). Já no trabalho de Chini et al. (2005), analisando amostras de pacientes da enfermagem e do ambulatório de diferentes hospitais da Grécia, os autores verificaram a presença da toxina em 287 (27%) das 1058 amostras. As amostras de fossa nasal não foram positivas para a toxina, dado este que está de acordo com o de Kilic et al. (2008). Entre os ECN nenhuma amostra pesquisada demonstrou ter a presença dos genes *pvl* (Nakagawa et al., 2005; Reischl et al. 2007).

Somente uma amostra de *S. aureus* foi positiva para os genes *mecA* e *pvl*. Esta amostra foi isolada de hemocultura e o RN apresentou vários fatores de risco, como uso de cateter e dreno, neutropenia, antibioticoterapia prévia e apesar do uso de antibiótico adequado (vancomicina) foi a óbito devido à insuficiência respiratória aguda, broncopneumonia e choque séptico, mostrando a importância da virulência da bactéria e fatores do hospedeiro na evolução do quadro clínico.

A detecção dos genes *icaA*, *icaD* e *icaC* responsáveis pela síntese de biofilme pelos ECN isolados de RN mostrou que das 30 amostras estudadas, 28 (93,3%) foram

positivas para um ou mais genes. As dez amostras isoladas de fossa nasal também foram positivas, sendo que seis (60,0%) apresentaram os genes *icaA* e *icaD* e quatro (40,0%) os três genes pesquisados. Abassi et al. (2008) relataram a presença dos genes *icaA* e *icaC* em 63,3% das cepas de *S. epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE) isoladas de hemocultura e de cateter intravascular. Nossos resultados revelaram que das 13 amostras isoladas de hemocultura, todas foram positivas para esses genes; das 15 amostras isoladas de corpos estranhos, 13 (86,7%) foram positivas, bem como as duas únicas amostras de secreção. Das 17 amostras do grupo classificado como significativo, 16 foram *ica* positivas, sendo que 12 (75%) amostras pertenciam a espécie *S. epidermidis*, uma (6,25%) aos *S. hominis* e *S. lugdunensis* e duas (12,5%) a *S. warneri*. No grupo classificado como contaminante, de um total de 13 amostras, 12 foram positivas para os genes de biofilme, tendo seis (50%) *S. epidermidis*, dois (16,7%) *S. haemolyticus* e *S. warneri*, um (8,3%) *S. lugdunensis* e *S. simulans*.

A resistência à meticilina em ECN foi relatada como sendo significativamente maior em isolados biofilme positivos (81,0%) do que em isolados biofilme negativos (57,0%) (Koksál et al., 2007) porém, no presente trabalho, em um total de 30 ECN isolados de RN, 35,7% apresentaram os genes *mecA* e *ica* concomitantemente, ou seja, foi verificado um percentual mais baixo em relação à presença do genes *ica* nas amostras *mecA* positivas, entretanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa comparada com as amostras sensíveis. Entretanto, bactérias que possuem capacidade de produzir biofilme são mais resistentes à ação de antibióticos, pois estes não conseguem agir diretamente no microrganismo e, não necessariamente, porque possuem o gene *mecA*. Em um trabalho com 92 amostras de ECN, 45 amostras clínicas e 47 ambientais, Alcaráz et al. (2003) estudaram a produção de biofilme pelas bactérias e a presença do

gene *mecA*. Foi observado que não houve diferença na produção de biofilme entre amostras clínicas e ambientais e que a maior parte dos ECN produtores de biofilme também tinham o gene *mecA*.

Diferentemente do resultado encontrado no trabalho de Bradford et al. (2006) e de Frebourg et al. (2000) que citaram diferenças na distribuição dos genes *ica* entre isolados invasivos e comensais, não encontramos diferença entre os grupos. De Silva et al. (2002) também não encontraram nenhuma diferença significativa entre os isolados invasivos e contaminantes ou de flora da pele.

A análise de produção de biofilme de acordo com o material clínico não mostrou diferenças significativas em relação à presença dos genes *ica*, entretanto Allori et al. (2006), verificaram produção de biofilme somente por ECN isolados de urocultura e cateter; com nenhuma amostra de hemocultura positiva.

Com os resultados obtidos, é possível concluir que o uso de cateteres ou outros corpos estranhos constitui fator de risco importante na ocorrência de infecções por *S.aureus* e ECN. *S. epidermidis* é ainda a espécie de ECN mais comumente isolada de amostras clínicas e amostras de *S. aureus* causadoras de infecção são mais comumente isoladas de hemocultura, comparado com isolados colonizantes que estão presentes em secreções, mostrando assim, uma relação entre material clínico e significância amostral. Os genes *mecA* e *pvl* estão presentes principalmente em amostras de *S. aureus* causadoras de infecção, indicando a importância desse fator de virulência na patogenicidade bacteriana e da resistência à meticilina, que dificulta o tratamento. Os genes *ica* encontrados em mais de 90% dos ECN isolados de RN e em todas as amostras de fossa nasal, demonstra ser um fator de virulência importante em casos de infecções relacionadas à utilização de corpos estranhos, uma vez que os ECN da própria

microbiota possuem potencial para produzir o biofilme, facilitando a colonização, persistência e proteção contra células do sistema imune do hospedeiro e ação de antimicrobianos utilizados no tratamento das infecções relacionadas com esses dispositivos.

Agradecimentos

A todos do Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu e ao apoio financeiro da FAPESP.

Referências Bibliográficas

Abassi MS, Bouchami O, Touati A, Achour W, Hassen AB 2008. Clonality and occurrence of genes encoding antibiotic resistance and biofilm in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from catheters and bacteremia in neutropenic patients. *Curr Microbiol* 57:442-448.

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

Allori MRG, Jure MA, Romero C, Castillo MEC 2006. Antimicrobial resistance and production of biofilms in clinical isolates of coagulase-negative *Staphylococcus* strains. *Biol Pharm Bull* 29:1592-1596.

Arciola CR, Baldassari, L, Montanaro, L 2001. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of Staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J. Clin. Microbiol.* 39:2151-2156.

Arciola CR Gamberini S, Campoccia D, Visai L, Speziale P, Baldassarri L, Montanaro L 2005. A multiplex PCR method for the detection of all five individual genes of *ica* locus in *Staphylococcus epidermidis*. A survey on 400 clinical isolates from prosthesis-associated infections. *J Biomed Mater Res A.* 75:408-13

Auriti C, Maccallini A, Di Liso G, Di Ciommo V, Ronchetti MP 2002. Risk factors for nosocomial infections in a neonatal intensive-care unit. *J Hosp Infect.* 53:25-30.

Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K, Oguchi A, Nagai Y, Iwama N, Asano K, Naimi T, Kuroda H, Cui L, Yamamoto K, Hiramatsu K 2002. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet* 359:1819-1827.

Baba-Moussa L, Werner S, Colin DA, Mourey L, Pédelacq JD, Samama JP, Sanni A, Monteil H, Prévost G 1999. Decoupling the Ca^{2+} -activation from the pore-forming function of the bi-component Panton-Valentine leucocidin in human PMNs. *FEBS Letter* 461:280-286.

Becker K, Bierbaum G, Von Eiff C, Engelmann S, Götz F, Hacker J, Hecker M, Peters G, Rosenstein R, Ziebuhr W 2007. Understanding the physiology and adaptation of staphylococci: a post-genomic approach. *International Journal of Medical Microbiology* 297:483-501.

Bernardi ACA, Pizzolitto EL, Pizzolitto AC 2007. Detecção da produção de slime por estafilococos coagulase-negativa isoaldos de cateter venoso central. *J Basic App Pharmac Sciences* 28:57-66.

Bocchini CE, Hulten KG, Mason EO, Gonzalez BE, Hammerman WA, Kaplan SL 2006. Panton-valentine leukocidin genes are associated with enhanced inflammatory response and local disease in acute hematogenous *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in children. *Pediatrics* 117:433-440 [cited 2007 august 18]. Available from: <http://www.pediatrics.org>

Bouza E, San Juan R, Munoz P, Pascau J, Voss A, Desco M 2004. Cooperative group of the European nosocomial infections (ESGNI). A European perspective on intravascular catheter-related infections: report on the microbiology workload, aetiology and antimicrobial susceptibility (ESGNI-005 Study). *Clin. Microbiol. Infect.* 10:838-842.

Bradford R, Manan RA, Daly AJ, Pearce C, Ramalingam A, D'Mello D, Mueller Y, Uahwatanasakul W, Qu Y, Grando D, Garland S, Deighton M 2006. Coagulase-negative staphylococci in very-low-birth-weight infants: inability of genetic markers to

distinguish invasive strains from blood cultures contaminants. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 25:283-290.

Casewell MW, Hill RLR 1986. The carrier state: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 18:Suppl A:1-12.

Casey AI, Lambert PA, Elliott TSJ. Staphylococci. *Int J Antimicrobial Agents* 2007; 29 (suppl. 3): S23-S32 Int

Cavalcanti SMM, França ER, Cabral C, Vilela MA, Montenegro F, Menezes D, Medeiros ACR 2005. Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a university hospital. *Braz J Infect Dis.* 9(1):56-63.

Chambers HF 2001. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerging Infectious Diseases* 7:178-82.

Chini V, Petinaki E, Foka A, Paratiras S, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I 2006. Spread of *Staphylococcus aureus* clinical isolates carrying Pantone-Valentine leukocidin genes during a 3-year period in Greece. *Clin Microbiol Infect* 12:29-34.

Cuevas O, Cercenado E, Vindel A, Guinea J, Sanchez-Conde M, Sanchez-Somolinos M, Bouza E 2004. Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. in Spain: five nationwide prevalence studies. *Antimicrob. Agents Chemother* 48:4240-4245.

Cunha MLRS, Lopes CAM, Rugolo LMSS, Chalita LVAS 2002. Significância clínica de estafilococos coagulase-negativa isolados de recém-nascidos. *Jornal da Pediatria* 78:279-288.

Cunha MLRS, Martins A. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci [Apresentado à EHRlich II – 2nd Word Conference on Magic Bullets; 2008 oct 3-5; Alemanha]

Cunha MLRS, Sinzato YK, Silveira LVA 2004. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative staphylococcus. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 855-860.

Dalton HP, Allison MJ 1967. Etiology of bacteremia. *Appl Microbiol* 15:808-814.

De Silva GD, Kantzanou M, Justice, Massey RC, Wilkinson AR, Day NP, Peacock SJ 2002. The ica operon and biofilm production in coagulase-negative staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* 40:382-8.

Diep BA, Sensabaugh GF, Somboona NS, Carleton HA, Perdreau-Remington F 2004. Widespread skin and soft-tissue infections due to two methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains harboring the genes for panton-valentine leucocidin. *J Clin Microbiol* 42:2080-2084.

Fluit AC, Wielanders CL, Verhoef J, Schmitz FJ 2001. Epidemiology and susceptibility of 3,051 *Staphylococcus aureus* isolates from 25 University Hospitals participating in the European SENTRY Study. J. Clin. Microbiol. 39:3727-3732

Frebourg NB, Lefebvre S, Baert S, Lemeland JF 2000. PCR-based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. J Clin Microbiol 38:877-880.

Griffiths C, Lamagni TL, Crowcroft NS, Duckworth G, Rooney C 2004. Trends in MRSA in England and Wales: analysis of morbidity and mortality data for 1993-2002. Health Stat Q Springs:15-22

Huebner J, Goldmann DA 1999. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. Annu. Rev. Med. 50:223-36

Issartel B, Tristan A, Lechevallier S, Bruyère F, Lina G, Garin B, Lacassin F, Bes M, Vandenesch F, Etienne J 2005. Frequent carriage of Panton-Valentine Leucocidin genes by *Staphylococcus aureus* isolates from surgically drained abscesses. J Clin Microbiol 43:3203-3207.

Killic A, Mert G, Senses Z, Bedir O, Aydogan H, Basustaoglu, Appelbaum PC 2008. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal isolates from Turkey. Antonie van Leeuwenhoek 94:615-619.

Koksal F, Yasar H, Samasti M 2007. Antibiotic resistance patterns of coagulase-negative staphylococcus strains isolated from blood cultures of septicemic patients in Turkey. *Microbiol Res.*578:290-296.

Koneman EW, Allen, SD, Janda, WM, Schreckenberger, PC, Winn Jr, WC 1997. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 5th ed., Lippincott, Philadelphia, + 1395pp.

Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, Vandenesch F, Etienne J 1999. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clinical Infections Diseases* 29:1128-32.

Loureiro MM, Moraes BA, Quadra MRR, Pinheiro GS, Suffys PN, Asensi MD 2000. Molecular epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from newborns in a Hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95:777-782.

Maldini B, Antolić S, Šakić-Zdravčević K, Karaman-Ilić M, Janković S 2007. Evaluation of bacteremia in a pediatric intensive care unit: epidemiology, microbiology, sources sites and risk factors. *Coll. Antropol.* 4:1083-1088.

McCullagh P, Nelder JA. *Generalized linear models*. London: Chapman and Hall, 1992.

Murakami, K.; Minamide, K.; Wada, K.; Nakamura, E.; Teraoka, H.; Watanabe, S 1991. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 29:2240-2244.

Nakagawa S, Taneike I, Mimura D, Iwakura N, Nakayama T, Emura T, Kitatsuji M, Fujimoto A, Yamamoto T 2005. Gene sequences and specific detection for Pantone-Valentine leukocidin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 328:995-1002.

Noble WC, Valkenburg HA, Wolters CHL 1967. Carriage of *Staphylococcus aureus* in a random samples of a normal population. *J Hyg (Lond)* 65:567-73

Olsson E, Friberg Ö, Venizelos N, Koskela A, Källman J, Söderquist B 2007. Coagulase-negative staphylococci isolated from sternal wound infections after cardiac surgery: attachment to and accumulation on sternal fixation stainless steel wires. *APMIS* 115:142–151.

Pédélecq JD, Maveyraud L, Prévost G, Baba-Moussa L, González A, Courcelle E, Shepard W, Monteil H, Samama JP, Mourey L 1999. The structure of a *Staphylococcus aureus* leukocidin component (LukF-PV) reveals the fold of the water-soluble species of a family of transmembrane pore-forming toxins. *Structure* 7:277-287.

Pereira EPL, Cunha MLRS. *Staphylococcus* resistentes à oxacilina em estudantes do curso de enfermagem [Apresentado ao 1º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica; 2008 out 18; Gramado].

Pereira VC, Martins A, Cunha MLRS 2008. Detection of Oxacillin Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolated from the Neonatal and Pediatric Units of a Brazilian Teaching Hospital [in press].

Piette A, Verschraegen G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. Vet Microbiol 2008 [serial on the Internet]. 2008 Sept [cited 2008 Dec 04]. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science>

Reischl U, Tuohy MJ, Hall GS, Procop GW, Lehn N, Linde H 2007. Rapid detection of panton-valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* by real-time PCR targeting the *lukS-PV* gene. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 26:131-135.

Trilla A, Miro JM. Identifying high risk patients for *Staphylococcus aureus* infections: skin and soft tissue infections 1995. J Chemother 7(suppl. 3):37-43.

Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. Clin. Infect. Dis. 39:309-317.

Yamasaki O, Kaneko J, Morizane S, Akiyama H, Arata J, Narita S, Chiba JI, Kamio Y, Iwatsuki K 2005. The association between *Staphylococcus aureus* strains carrying Panton-Valentine Leukocidin genes and the development of deep-seated follicular infection. Clin Infect Dis 40:381-5.

Zetola N, Francis JS, Nuermberger EL, Bishai WR 2005. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. Lancet Infect Dis 5:275-286.