

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 26.01.2020.

Significância clínica e epidemiologia molecular de *Staphylococcus* spp. nas infecções da corrente sanguínea em UTI neonatal

DANILO FLÁVIO MORAES RIBOLI

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração 21202010.

Profa. Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

**BOTUCATU – SP
2018**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**Significância clínica e epidemiologia molecular de *Staphylococcus*
spp. nas infecções da corrente sanguínea em UTI neonatal**

DANILO FLÁVIO MORAES RIBOLI

MARIA DE LOURDES RIBEIRO DE SOUZA DA CUNHA
ORIENTADORA

JOÃO CÉSAR LYRA
CO-ORIENTADOR

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *21202010*.

Profa. Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

BOTUCATU – SP
2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Riboli, Danilo Flávio Moraes.

Significância clínica e epidemiologia molecular de
Staphylococcus spp. nas infecções da corrente sanguínea em
UTI neonatal / Danilo Flávio Moraes Riboli. - Botucatu,
2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Coorientador: João César Lyra

Capes: 21201021

1. Fatores de Virulência. 2. Tipagem de Sequências
Multilocus. 3. Eletroforese em campo pulsátil. 4. Anti-
Infecciosos. 5. Hemocultura. 6. Estafilococos. 7.
Virulência (Microbiologia). 8. *Staphylococcus aureus*
resistente à meticilina.

Palavras-chave: Fatores de virulência; MLST; PFGE;
Resistência antimicrobiana; hemocultura.

*Se você quiser ir rápido, vá sozinho. Se quiser
ir longe, vá acompanhado.*

- Provérbio africano

Dedicatória

Dedico esse trabalho a meus pais **Luiz Henrique Riboli** e **Vera Lúcia Moraes Riboli**, que sempre me mostraram, por seu exemplo, o melhor caminho a ser seguido, me apoiaram e me incentivaram durante toda minha vida, aconselhando e dando forças nos momentos mais difíceis e juntamente se alegrando nos momentos felizes, pessoas sem os quais não seria possível conseguir tudo que alcancei.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por, em todos os momentos, colocar em meu caminho tantas pessoas com quem sempre pude contar.

À minha família, meu pai Luiz Henrique Riboli, minha mãe Vera Lucia Moraes Riboli e meu irmão Fábio Henrique Riboli, por todo apoio, incentivo e pela compreensão nos momentos de ausência.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha pela amizade, orientação e pelos ensinamentos valiosos em todos esses anos que levarei pelo resto da vida, pessoa com quem sempre pude contar em todos os momentos.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. João César Lyra por todo o apoio, conselho e ensinamentos que, sem dúvida, contribuíram muito durante todo o andamento desse projeto.

A todos os meus amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Bacteriologia, Ana Cláudia Moro, Lígia Maria Abraão, Luiza Pinheiro, Nathália Teixeira, Priscila Mello, Thaís Alves Barbosa, Valéria Cataneli Pereira e tantos outros, com quem passei a maior parte desse tempo, pelo companheirismo nas horas boas e nas horas de dificuldade e por tornar o laboratório um ambiente tão agradável e acolhedor para se trabalhar.

E também meus amigos biomédicos, Alexandre Tanimoto, Bianca Gregorio e Evandro Katsui Utsunomia pessoas com quem passei tantos momentos inesquecíveis, sou grato pelo que vivi com vocês e pelo que ainda viverei, por todo incentivo nos momentos difíceis e comemorações nos momentos felizes.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia, em especial José Maurício Sforcin, com quem tive o privilégio de compartilhar tantos momentos bons, e Terue Sadatsume, pela amizade, apoio e ensinamentos em todos esses anos.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Aline Missio, Ivana Castilho, Larissa Ragozo, Luiz Alquati, Luiz Severino dos Santos e Rafael Capra, pela amizade e ajuda prestada ao departamento.

À secretária do Departamento de Microbiologia e Imunologia Ana Claudia Acerra, que muito me ajudou e sempre me atendeu tão bem, pela amizade e pelo excelente serviço prestado ao departamento por todos esses anos.

A todos os funcionários da Seção Técnica de Pós-Graduação, em especial Davi Barcello de Oliveira Muller, por toda ajuda prestada e pelo ótimo atendimento que sempre recebi de vocês nas tantas vezes que precisei.

A todos os funcionários da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal da Faculdade de Medicina de Botucatu que, sempre prezando pelo bem estar dos pacientes, também fizeram esse projeto possível.

Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia da Seção de Laboratórios Clínicos do Hospital das Clínicas de Botucatu por, gentilmente, cederem as amostras coletadas para finalidade desse estudo.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante o período de realização do doutorado.

Sumário

Resumo	3
Abstract	5
1. Introdução	7
2. Justificativa	17
3. Objetivos.....	17
3.1. Objetivo Geral	17
3.2. Objetivos Específicos.....	17
4- Materiais e métodos	18
4.1. Delineamento do estudo	18
4.2. Obtenção das amostras	18
4.3 Coleta de dados clínicos	19
4.4 Identificação de <i>S. aureus</i>	19
4.5 Extração do DNA das amostras isoladas de hemoculturas	20
4.6 Identificação genotípica dos <i>Staphylococcus</i> coagulase negativos pela técnica de ITS-PCR	23
4.7 Detecção do gene <i>mecA</i> por PCR em Tempo Real	23
4.8 Detecção dos genes <i>icaA</i> , <i>icaB</i> , <i>icaC</i> e <i>icaD</i> por PCR em Tempo Real	23
4.9 Detecção dos genes de enterotoxinas estafilocócicas e da Toxina da Síndrome do Choque Tóxico por PCR em Tempo Real	24
4.10 Detecção do gene da Leucocidina Pantón Valentine por PCR em Tempo Real	24
4.11 Detecção dos genes de hemolisinas por PCR em Tempo Real	25
4.12 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)	26
4.13 MLST – <i>Multilocus Sequence Typing</i>	27
4.14 Reação de sequenciamento.....	29
4.15 <i>spa typing</i>	30
4.16 Análise estatística.....	31
5- Resultados	31
5.1 Incidência de ICS por <i>Staphylococcus</i> spp.....	31
5.2 Dados clínicos	31
5.3 Amostras	34
5.4 Identificação.....	34

5.5 Virulência e resistência	35
5.6 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)	38
5.7 <i>Multilocus Sequence Typing</i>	44
5.8 <i>spa typing</i>	44
6. Discussão	44
7. Conclusão	54
7. Referências bibliográficas	56
Anexo I – Parecer do comitê de ética em pesquisa.....	68
Anexo II – Protocolo ICS e dados clínicos	71

Resumo

Introdução: o isolamento de estafilococos coagulase negativos (ECN) de pacientes em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) pode representar, muitas vezes, uma contaminação ao invés de bacteremia. O padrão ouro para o diagnóstico de sepse neonatal é a positividade de duas hemoculturas coletadas num intervalo de 48 horas associada às manifestações clínicas sugestivas de sepse. A resistência aos antimicrobianos e a formação de biofilme são fatores seletivos na persistência de cepas de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*. A técnica de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE), altamente discriminatória, é frequentemente usada para a investigação de surtos. A tipagem por *Multilocus Sequence Typing* (MLST) se tornou o método de escolha no estudo epidemiológico em longo prazo. Objetivos: esse estudo teve como objetivos caracterizar o perfil das infecções de corrente sanguínea por *Staphylococcus* spp. em RNs internados na UTIN, os fatores de risco para infecção, perfil de virulência e resistência antimicrobiana dos estafilococos isolados, bem como a presença de clones prevalentes na unidade. Resultados: foram isolados 72 *Staphylococcus* spp. de hemoculturas de 54 recém-nascidos de Março de 2014 a Agosto de 2015. Foram confirmados 37 episódios de Infecção da Corrente Sanguínea (ICS) causados por *Staphylococcus* spp., sendo 27 associados a espécie *S. epidermidis*, 3 *S. haemolyticus*, 2 *S. capitis* e 5 *S. aureus*. A maioria dos Recém-nascidos (RN) possuía extremo baixo peso, nasceu com menos de 31 semanas de gestação (72,2%), fazia uso de cateter e ventilação mecânica. Das 72 amostras de *Staphylococcus* spp. analisadas, 55 (76,4%) possuíam o gene *mecA* de resistência à meticilina. Em 19 (26,4%) amostras foi encontrado o gene *sea*, 13 (18,1%) o gene *seb*, 13 (18,1%) o gene *sec* e 8 (11,1%) o gene *sed*. Em 13 das amostras foram encontrados os genes do operon *icaADBC* completo. Os genes para produção de hemolisinas *hla*, *hly* e *hld* foram encontrados em

43 (59,7%), 40 (55,5%) e 34 (47,2%) do total de isolados, respectivamente. Foram observados dois *clusters* majoritários de *S. epidermidis* na técnica de PFGE, um com 26 amostras (43,3%) e outro com 16 amostras (26,7%). Dentre os *S. haemolyticus* isolados, constatou-se que as três amostras possuíam 100% de similaridade. Foi feito o MLST de uma amostra de cada *cluster* de *S. epidermidis* sendo encontrado ST59 e ST2. O *spa typing* das amostras de *S. aureus* tipadas por essa técnica foram t002 e t0084. Conclusão: a capacidade de formar biofilme, de resistência a antibióticos e de produção de fatores de virulência podem fazer com que cepas endêmicas permaneçam por longos períodos no ambiente hospitalar. A detecção de cepas específicas pode ajudar no diagnóstico precoce de infecções mais graves sendo um diagnóstico preciso, combinando a detecção do micro-organismo no hospedeiro com o quadro clínico sugestivo, fundamental no tratamento dessas infecções por esses micro-organismos.

Palavras chave: hemocultura, fatores de virulência, *mecA*, PFGE, MLST.

Abstract

Introduction: The isolation of coagulase negative staphylococci (CoNS) of Neonatal Intensive Care Unit (NICU) patients can often represent contamination instead of bacteremia. The golden standard for the diagnosis of sepsis is the positivity of two blood cultures, collected within a 48-hour gap, associated to clinic manifestations suggestive of sepsis. Resistance to antimicrobials and biofilm formation are selective factors to *S. epidermidis* and *S. haemolyticus* strains to persist. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), a highly discriminatory technique, is often used in investigating outbreaks. Multilocus Sequence Typing (MLST) has become the preferred method when it comes long-term epidemiologic studies. Objectives: this research aimed to characterize the profile of infections caused by *Staphylococcus* spp. at NICU, the virulence profile and antimicrobial resistance of isolated staphylococci, as well as the presence of clusters prevalent in the unit. Results: 72 *Staphylococcus* spp. have been isolated from blood cultures taken from 54 newborns from March 2014 to August 2015. Thirty-seven bloodstream infection (BSI) episodes caused by *Staphylococcus* spp. were confirmed, 27 of which are associated to *S. epidermidis*, 3 to *S. haemolyticus*, 2 to *S. capitis* and 5 to *S. aureus*. Most newborns presented extremely low weight, were born before the 31st week of pregnancy (72.2%), used catheter and mechanical ventilation. From the 72 samples of *Staphylococcus* spp. under analysis, 55 (76.4%) had the *mecA* gene of resistance to methicillin. The *sea* gene was found in 19 samples (26.4%); the *seb* gene in 13 (18.1%), the *sec* gene in 13 (18.1%); and the *sed* gene in 8 (11.1%). In 13 samples the complete *operon icaADBC* genes were found. The genes for the production of hemolysin *hla*, *hly* and *hld* were found in 43 (59.7%), 49 (55.5%) and 34 (47.2%) of isolated totals respectively. Two majoritarian clusters of *S. epidermidis* have been observed in the PFGE technique, one of them involving 26 samples (43.3%) and

another one involving 16 samples (26.7%). From the *S. haemolyticus* isolated, the three samples had 100% similarity. MLST was made of a sample from each cluster of *S. epidermidis* and ST59 and ST2 were found. The spa typing of *S. aureus* samples were t002 and t0084. Conclusion: biofilm formation, resistance to antibiotics and the production of virulence factors can make endemic strains to remain for long periods within hospital environment. The detection of specific strains can help in the early diagnosis of more serious infections, combining the detection of the microorganism in the host with the suggestive clinical situation, is fundamental in treating such infections.

Key words: blood culture, virulence factors, *mecA*, PFGE, MLST

1. Introdução

Globalmente, infecções ainda causam a morte de 1,6 milhões de Recém-nascidos (RNs) anualmente, representando 40% de todas as causas de morte neonatal [1,2]. Cerca de 12% das crianças nascem prematuramente no mundo, incluindo cerca de 2% com extremo baixo peso. Juntas, prematuridade e infecções neonatais representam a maior fração dos óbitos neonatais em geral [3].

Na América do Norte, organismos Gram positivos são os principais responsáveis pelos casos de sepse neonatal (mais de 70%). Sepse causada por Gram negativos (15-20%) e fungos (10%) é menos frequente [4,5]. Os estafilococos coagulase negativos (ECN) são os principais patógenos envolvidos nas infecções nosocomiais. É estimado que cada episódio de sepse prolonga a duração da permanência do recém-nascido no hospital por cerca de duas semanas, resultando num aumento no custo de USD\$25.000 [6]. Estima-se que infecções da corrente sanguínea nosocomiais aumentam o custo da hospitalização de RNs com extremo baixo peso ao nascimento (VLBW) em 26%, e entre o grupo com maior peso em 80% [7].

Nas primeiras semanas de vida, neonatos já são rapidamente colonizados por micro-organismos do ambiente [8,9]. Durante esse período, o risco de infecção por ECN aumenta substancialmente com o uso de cateter venoso central, ventilação mecânica e nutrição parenteral, além da exposição a outros procedimentos invasivos na pele e mucosas [10, 11, 12].

Os ECN comumente habitam a pele e mucosas; ainda assim, uma pequena proporção de RNs adquire os ECN por transmissão vertical, sendo que a aquisição horizontal ocorre primariamente [13, 14]. Consequentemente, RNs admitidos no hospital adquirem a maioria dos micro-organismos do ambiente hospitalar, de seus pais e equipe médica [15]. A transmissão pelas mãos da equipe médica pode ajudar cepas já

endêmicas a circular por períodos maiores [16, 17]. Como os ECN são comensais ubíquos na pele, autores assumem que colonizações da pele e de cateteres são importantes fontes de sepse [18]. A resistência aos antimicrobianos em cepas presentes na pele tem sido encontrada em menor número ao nascimento, mas com um rápido aumento durante a primeira semana de hospitalização [19]. Assim, a pressão seletiva como resultado da exposição a antibióticos ao nascimento é um fator adicional que influencia o espectro e a resistência aos antimicrobianos de micro-organismos isolados de RNs [20].

Os ECN apresentam um dilema no diagnóstico das infecções da corrente sanguínea (ICS) por seu isolamento de uma única hemocultura em pacientes em Unidades de Terapia Intensiva Neonatais (UTIN) representar, muitas vezes, uma contaminação ao invés de bacteremia. A dificuldade inerente em distinguir infecções reais através de culturas potencialmente contaminadas resulta em superestimação da incidência de sepse por ECN em UTIN, apesar dos esforços em definir infecção usando parâmetros clínicos e laboratoriais ou da duração da terapia antimicrobiana [21, 22].

A contaminação de amostras pode ocorrer no momento da coleta ou durante seu processamento devido à presença ubíqua do *S. epidermidis* na pele dos pacientes e profissionais da saúde [23]. A presença desses micro-organismos na pele, faz com que estes também sejam os mais frequentemente associados com infecções relacionadas a cateteres. Os cateteres venosos centrais, que são muito utilizados em RNs pré-termo, podem promover a persistência dos ECN, levando à persistência de uma infecção [24]. O isolamento desse micro-organismo do sangue coletado do cateter e de um acesso periférico pode contribuir para a distinção de infecções clínicas e contaminação [25].

A superestimação de infecções por ECN pelos erros de classificação de culturas sanguíneas contaminadas contribui para a percepção errada de que infecções por ECN

são benignas e isso enfatiza a importância da avaliação de recém-nascidos com infecção com pelo menos duas culturas sanguíneas [10]. As infecções da corrente sanguínea (ICS) associadas a ECN são mais prevalentes particularmente em recém-nascidos pesando menos de 1500g ao nascimento e recém-nascidos com baixa idade gestacional [26].

A sepse neonatal é clinicamente diagnosticada pela combinação dos sinais clínicos (como instabilidade térmica, bradicardia, apneia, hipoatividade/letargia, intolerância alimentar), testes inespecíficos laboratoriais e pela confirmação microbiológica pela detecção da bactéria na cultura sanguínea. Sinais clínicos de sepse em RNs são, geralmente, inespecíficos e, muitas vezes, imperceptíveis [27]. O padrão ouro para o diagnóstico de sepse neonatal por *Staphylococcus* spp. é a positividade de duas hemoculturas coletadas de locais diferentes num intervalo máximo de 48 horas associada às manifestações clínicas sugestivas de sepse. Entretanto, em muitos casos esse teste encontra problemas para ser realizado, como o baixo volume sanguíneo obtido, principalmente em RNs pré-termo. Esse volume, frequentemente, é menor que o 1mL recomendado como limite mínimo de detecção, podendo aumentar a proporção de testes falso-negativos [28, 29].

Consequentemente, a natureza não-específica dos sinais clínicos em RNs pode levar a um abuso no uso de antimicrobianos de largo espectro com o potencial de selecionar fungos e bactérias resistentes, principalmente em RNs pré-termo. Além disso, a abundância de ECN na pele pode elevar a frequência de contaminações da cultura sanguínea e consequentemente uma superestimação de casos de sepse neonatal [30,31].

S. aureus é a espécie mais patogênica e uma das principais causas de morte em infecções nosocomiais, particularmente em pacientes imunocomprometidos [32]. A habilidade dessa bactéria de causar doenças é associada a um grande número de fatores

de virulência permitindo a colonização e persistência, disseminação no hospedeiro e evasão do sistema imune. *S. aureus*, particularmente, secretam numerosas exotoxinas, como polipeptídeos capazes de danificar a membrana plasmática de células do hospedeiro. Esses polipeptídeos incluem toxinas formadoras de poros (alfa-hemolisina, beta-hemolisina, gama-hemolisina, leucocidina Pantón Valentine, e modulinas fenol solúveis) [33].

Esse grande número de fatores de virulência que incluem hemolisinas, exotoxinas, leucocidinas, superantígenos e enzimas, permitem ao *S. aureus* driblar as defesas do hospedeiro [34]. A lise das células sanguíneas por *S. aureus* é mediada pelas fator nas sepses, artrite séptica, abscesso e pneumonia [35,36].

Recentemente, infecções invasivas por *S. aureus* têm aumentado no hospital e na comunidade. A importância da hemólise na virulência de *S. aureus* tem sido amplamente caracterizada [33]. As toxinas citolíticas de *S. aureus* incluindo a leucocidina, alfa-toxina e modulinas fenol-solúveis tem sido associadas à gravidade das infecções [34].

S. aureus também podem produzir uma grande quantidade de toxinas que funcionam como superantígenos e podem interferir com quase todos os mecanismos da resposta imune do hospedeiro [35, 36]. Notavelmente, as toxinas são os principais determinantes de virulência e agressividade desses micro-organismos. Algumas cepas de *S. aureus* podem causar doenças relacionadas a toxinas específicas como a síndrome do choque tóxico associada à Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1) e à síndrome da pele escaldada associada à produção de esfoliatinas [37]. Apesar da grande quantidade de espécies de *Staphylococcus*, a maioria das toxinas aparentam ser limitadas a *S. aureus*. Entretanto, vários achados indicam que *S. aureus* adquirem outros

fatores que facilitam sua sobrevivência durante a infecção, como resistência aos antibióticos de *S. epidermidis* ou outros ECN [33].

Muitos determinantes de virulência e resistência aos antimicrobianos em *S. aureus* estão localizados em elementos genéticos móveis, como ilhas de patogenicidade, cassetes cromossômicos, transposons ou plasmídeos [38]. A transferência de genes de virulência e resistência aos antimicrobianos são frequentemente descritos em *S. aureus* [39]. Mas há evidências de transferência entre espécies como, por exemplo, entre ECN e *S. aureus* [40].

A resistência à Oxacilina em *Staphylococcus* spp. é codificada no cassette estafilocócico *mec* (SCC*mec*) [41]. Os elementos do SCC*mec* são classificados baseados em diferenças em seus componentes chave, a resistência à Oxacilina (complexo *mec*), genes recombinantes (*ccr*) e composição genética global [42]. A resistência à Oxacilina é devida ao gene *mecA*, que codifica uma proteína ligadora de penicilina modificada com baixa afinidade à droga [43], sendo a detecção do gene *mecA* um marcador molecular útil de resistência à oxacilina [44, 45]. Os tipos de SCC*mec* I, II e III são presentes predominantemente nos isolados de *Staphylococcus* spp. resistentes à oxacilina em ambiente hospitalar, enquanto os tipos IV e V são encontrados na comunidade [46].

ECN podem possuir vários fatores de virulência encontrados mais frequentemente em *S. aureus* [30]. Comparado com o *S. aureus*, *S. epidermidis* produzem menores quantidades de toxinas [47]. Entretanto, *S. epidermidis* contam com outros mecanismos como a produção de biofilme para evadir da resposta imune do hospedeiro [20].

A formação de biofilme, um processo multifásico que ocorre em quatro fases; adesão, acumulação, maturação e destacamento [48], é um importante determinante de virulência durante infecções associadas a cateter. Bactérias que formam biofilme são

sabidamente mais difíceis de erradicar sendo mais resistentes aos antibióticos quando comparadas com sua fase planctônica [49].

A formação de biofilme funciona como o principal modo de evasão dos ECN [50]. Esses agregados multicamada de bactérias se aderem fortemente a objetos inanimados como dispositivos médicos. Essa capacidade é a chave de seus mecanismos de patogênese, particularmente em relação a infecções relacionadas a cateter [51]. Biofilmes agem como barreiras físicas não seletivas que obstruem a difusão do antibiótico e impedem uma resposta celular e humoral do hospedeiro [52].

A terapia antimicrobiana é guiada pelos resultados obtidos a partir de testes antimicrobianos convencionais de bactérias em fase planctônica. No entanto, isso pode não refletir, necessariamente, a suscetibilidade dessas bactérias quando estão em biofilmes [53].

Bactérias liberadas dos biofilmes mantêm as características de suscetibilidade a antibióticos de bactérias livres ao invés de associadas aos biofilmes, o que implica que o mecanismo de resistência não é a mudança genética, indicando a importância dos testes de determinação de suscetibilidade aos antimicrobianos no biofilme. Uma série de fatores têm sido postulados para explicar a maior resistência no biofilme, incluindo a ligação de antibióticos com o biofilme, a pobre penetração do antibiótico, o crescimento lento dos micro-organismos, a alta densidade de bactérias, e as alterações na expressão gênica em bactérias no biofilme [54].

O biofilme de *Staphylococcus* spp. consiste de camadas de células agrupadas e embutidas em uma matriz de polissacarídeo denominado *Polysaccharide Intercellular Adhesin* (PIA) [55]. A produção do PIA é mediada por produtos do gene cromossomal *ica* (*intercelular adhesion*), organizados em uma estrutura *operon*. Este *operon* contém os genes *icaADBC*, mais o *icaR*, que tem a função regulatória e é transcrito no sentido

oposto. Assim que ocorre a ativação deste operon, são codificadas quatro proteínas necessárias para a síntese do PIA que são IcaA, IcaD, IcaB e IcaC [56].

A resistência aos antimicrobianos e a formação de biofilme são fatores seletivos na persistência de cepas nosocomiais endêmicas e provavelmente contribuem para a predominância de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* isolados em pacientes em UTI neonatal. Nesses casos, pode ser indispensável a remoção do cateter venoso central (CVC) [57].

Genótipos endêmicos em hospitais de *S. epidermidis* têm maiores taxas de produção de biofilme do que isolados não endêmicos [58]. Pacientes colonizados são provavelmente o principal reservatório de cepas resistentes, e a transmissão entre pacientes pode ocorrer pela colonização ou contaminação de profissionais da saúde [17, 25].

A genotipagem de isolados ao nível de cepas tem sido cada vez mais importante, a fim de verificar se os organismos envolvidos em surtos hospitalares ou em eventos de transmissão cruzada possuem possível relação clonal [59]. Diferentes métodos de tipagem epidemiológica têm sido usados em estudos com ECN. O uso simultâneo de tecnologias baseadas no ácido nucléico com culturas sanguíneas pode facilitar um rápido diagnóstico e uma identificação da susceptibilidade aos antimicrobianos mais facilmente. Técnicas moleculares, como eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e *Multilocus Sequence Typing* (MLST), também são úteis na diferenciação de cepas [60]. Métodos diagnósticos baseados em PCR podem ser os mais úteis clinicamente a curto prazo fornecendo aos clínicos a detecção de marcadores genéticos de resistência [61]. Métodos genotípicos, que utilizam várias técnicas para comparar o material genético de cepas, têm maior resolução e se tornaram o método de escolha na tipagem de bactérias. O método mais discriminatório de tipagem de *S. epidermidis* é o PFGE,

que, atualmente, em contraste com o MLST, também pode ser utilizado para caracterizar espécies de ECN [62].

Genotipagem por macrorestrição usando PFGE tem sido considerado o padrão ouro de tipagem com alta resolução e reprodutibilidade, para muitas bactérias [63] com restrição enzimática do genoma cromossomal seguida pela separação dos fragmentos por eletroforese em campo pulsado. Apesar do fato do método utilizar apenas o sítio de restrição específico da enzima, o PFGE tem uma alta capacidade de detectar grandes alterações genômicas como inserções, deleções e rearranjos. PFGE é tido como altamente discriminatório e frequentemente usado para a investigação de surtos [64].

O PFGE, não é, porém, utilizado para estudos genéticos a longo prazo [61]. Entretanto, combinando-se o PFGE e a tipagem do *SCCmec*, são gerados dados confiáveis equivalentes ao MLST [62].

Métodos de tipagem baseadas no sequenciamento de genes *housekeeping* têm sido propostos para estudos a longo prazo e para a avaliação da relação entre cepas de *S. aureus* [65]. O MLST caracteriza os isolados bacterianos com base no polimorfismo em fragmentos de sete genes *housekeeping*, representando o genoma estafilocócico. Cada fragmento é traduzido em um alelo distinto, e cada isolado é classificado com um tipo de sequência (ST) pela combinação dos alelos dos sete genes [66].

Fragmentos internos com 500 pares de base são sequenciados para criar dados confiáveis, sem ambiguidade. Esses genes conservados codificam proteínas essenciais e provavelmente não são relacionados à expressão de virulência ou resistência. Esse grupo de genes escolhidos para análise no MLST é particularmente conservado pois tem uma frequência de mutação intermediária comparados a baixa frequência dos genes ribossomais. Consequentemente, o MLST se tornou o método de escolha no estudo epidemiológico a longo prazo entre populações bacterianas, por medir as mudanças

genéticas nesses genes *housekeeping* [66]. Isolados com MLST idênticos são considerados como sendo descendentes de um ancestral comum [67]. Para estudos em *S. aureus* e *S. epidermidis* os sete genes são parcialmente sequenciados e comparados com sequências conhecidas e traduzidos em números alélicos pela base de dados do MLST (<http://www.mlst.net>) [68]. O perfil gerado facilita a padronização internacional e comparação dos dados genéticos [69]. Uma vantagem da técnica é que ela também fornece informações filogenéticas e evolucionárias das linhagens de bactérias estudadas. O MLST não fornece dados de elementos genéticos móveis e é menos discriminatório e, portanto, menos aplicável que o PFGE na investigação de surtos hospitalares [70].

Como o padrão de PFGE de uma cepa específica de *S. epidermidis* pode mudar rapidamente devido a rearranjos genéticos e ao alto poder discriminatório do PFGE, a análise por PFGE de populações de cepas de vários períodos ou países pode superestimar a diversidade genética e falhar na determinação da similaridade dos isolados [64].

Usando-se o MLST, cujo alvo são áreas conservadas no cromossomo bacteriano, estudos têm aumentado o entendimento da estrutura da população de *S. epidermidis* [62]. A sequência nosocomial internacional mais prevalente entre os *S. epidermidis* até o momento é o ST2 [64].

Frenay et al. (1996) desenvolveram um método de sequenciamento de um único locus para *S. aureus* usando sequências da região polimórfica X do gene da proteína A de *S. aureus*. Essa região consiste de um número de 24 repetições de pares de base, com sua diversidade sendo atribuída principalmente por deleções e duplicações das repetições e, mais raramente, por mutações pontuais [71]. A principal vantagem do *spa typing* sobre o MLST é a sua simplicidade, já que envolve sequências de um único locus. O poder discriminatório do *spa typing* está entre o PFGE e o MLST. Em

contraste com o MLST, a evolução molecular e surtos hospitalares podem ser investigadas com *spa typing*. Dados de tipagem individuais de laboratórios são sincronizados pela internet com o servidor central *spa* ([http:// www.spaserver.ridom.de](http://www.spaserver.ridom.de)), que é auxiliado pela iniciativa SeqNet.org europeia ([http:// www.seqnet.org](http://www.seqnet.org)) para garantir uma nomenclatura universal e o acesso público aos dados [72].

Os dados atuais do servidor *spa* incluem mais de 1.200 *spa types*, consistindo de uma combinação de 100 repetições *spa* de mais de 13.000 isolados em 36 países na Europa. Assim, este é o maior banco de dados de tipagem de *S. aureus*. Além disso, uma vantagem é a possibilidade de coleta de dados contínuos para propósitos de controle de infecções e para desenvolvimento de algoritmos para detecção automática de surtos em regiões ou hospitais endêmicos para *S. aureus* resistentes à Meticilina (MRSA), mas com *spa types* circulantes heterogêneos. Por seu alto poder discriminatório, vários *spa types* podem ser encontrados com um mesmo ST, determinado por MLST, mas eles permanecem como um cluster [73].

Considerando-se a escassez de estudos prospectivos (onde é possível o acompanhamento do paciente até o desfecho final) e a importância de elucidar a significância clínica de ECN quando isolados de hemoculturas, esse estudo teve como objetivos avaliar amostras de ECN isoladas de hemoculturas de neonatos da UTIN pertencente ao Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) visando determinar a incidência de infecção por espécies de *Staphylococcus* spp., fatores de risco para infecção, perfil de virulência e resistência antimicrobiana dos estafilococos isolados, bem como a pesquisa de clones prevalentes na unidade.

epidêmico. [133, 134]. Já o tipo 84 é o oitavo mais encontrado no mundo, com 1,72% do total das amostras, segundo o banco de dados Ridom, tendo sido encontrado em 33 países até o momento [132]. Além disso, ambas as amostras possuíam os genes *icaA*, *icaB* e *icaC* para produção de biofilme, podendo colaborar para sua persistência nos ambientes hospitalares.

Sendo assim, vale destacar a importância dos *Staphylococcus* spp. como micro-organismos capazes de causar graves infecções, principalmente entre indivíduos imunossuprimidos e com o sistema imune imaturo, como os RNs prematuros, além de atuarem como reservatórios de diversos genes de virulência podendo piorar quadros clínicos, dificultando a resposta imune do hospedeiro e assim prolongando a hospitalização. A capacidade de formar biofilme, de resistência a antibióticos e de produção de fatores de virulência, tendo em vista sua alta capacidade de transferência de genes, podem fazer com que cepas endêmicas permaneçam por décadas no ambiente hospitalar, disseminadas, inclusive, entre diversos países. A detecção de cepas específicas pode ajudar no diagnóstico prévio de infecções mais graves sendo um diagnóstico preciso, combinando a detecção do micro-organismo no hospedeiro com o quadro clínico sugestivo, fundamental no tratamento dessas infecções por esses micro-organismos.

7. Conclusão

- A incidência de ICS causadas por *Staphylococcus* spp. foi de 83 casos em cada 1000 internações.
- Na análise multivariada, o peso ao nascimento dos RNs foi negativamente associado a ICS, enquanto a presença do gene *icaD* nos isolados de *Staphylococcus* spp. foi fator associado ao maior risco de ICS causada por esses micro-organismos.

- A espécie mais frequentemente isolada foi *S. epidermidis* seguida de *S. aureus*, *S. capitis* e *S. haemolyticus*. Todas as amostras de *S. aureus* e *S. haemolyticus* foram isoladas de casos confirmados de ICS.
- A maioria das amostras de *Staphylococcus epidermidis* possuía o gene *mecA* de resistência à meticilina. Nenhum *S. aureus* ou *S. haemolyticus* possuía o gene *mecA*.
- Dos fatores de virulência estudados somente a presença dos genes *icaB* e *icaD* nos isolados de *Staphylococcus* spp. foram associados a ICS.
- O cluster majoritário de *S. epidermidis* agrupou isolados com maior frequência dos genes de resistência (gene *mecA*) e de virulência (*icaD*, *sea*, *sec*, *hla* e *hlb*).
- O gene *tst* foi encontrado em três amostras de *S. epidermidis*, todas de casos confirmados de ICS.
- O gene codificante da Leucocidina Pantón Valentine (*pvl*) não foi encontrado em nenhum dos 72 *Staphylococcus* spp. isolados.
- A presença de complexos clonais de *S. epidermidis* e de *S. haemolyticus* indica a presença de clones prevalentes dessas espécies de ECN na UTIN com cepas isoladas de diferentes recém-nascidos de diversos casos confirmados de infecção. A persistência desses micro-organismos foi demonstrada pela técnica de PFGE em que dois grandes clusters de *S. epidermidis* foram encontrados durante todo o período do estudo, além dos ST2 e ST59, encontrados em diversos países, presentes nesses clusters.

7. Referências bibliográficas

1. WHO, World Health Statistics: 2010, 2010.
2. Liu L, Johnson HL, Cousens S. et al. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *The Lancet*, 2012;379(9832): 2151–2161.
3. UNICEF. The State of the World's Health 2009: Maternal and Newborn Health, 2009.
4. Bizzarro MJ, Raskind C, Baltimore RS and Gallagher PG. Seventy-five years of neonatal sepsis at Yale: 1928–2003, *Pediatrics*, 2005;116(3): 595–602.
5. Graham PL, Begg MD, Larson E, Della-Latta P, Allen A and Saiman L. Risk factors for late onset gram-negative sepsis in lowbirthweight infants hospitalized in the neonatal intensive care unit. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 2006;25(2): 113–117.
6. Gray JE, Richardson DK, McCormick MC and Goldmann DA. Coagulase-negative staphylococcal bacteremia among very low birth weight infants: relation to admission illness severity, resource use, and outcome, *Pediatrics*, 1995;95(2): 225–230.
7. Payne NR, Carpenter JH, Badger GJ, Horbar JD and Rogowski J. Marginal increase in cost and excess length of stay associated with nosocomial bloodstream infections in surviving very low birth weight infants. *Pediatrics*, 2004;114(2): 348–355.
8. Brady MT. Health care-associated infections in the neonatal intensive care unit. *American Journal of Infection Control*, 2005;33(5): 268–275.
9. Hall SL, Riddell SW, Barnes WG, Meng L and Hall RT. Evaluation of coagulase-negative staphylococcal isolates from serial nasopharyngeal cultures of premature infants. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 1990;13(1): 17–23.
10. Healy CM, Baker CJ, Palazzi DL, Campbell JR and Edwards MS. Distinguishing true coagulase-negative *Staphylococcus* infections from contaminants in the neonatal intensive care unit. *Journal of Perinatology*, 2013;33(1): 52–58.
11. Hornik CP, Fort P, Clark RH et al. Early and late onset sepsis in very-low-birth-weight infants from a large group of neonatal intensive care units. *Early Human Development*, 2012;88(2): S69–S74.
12. Bolat F, Uslu S, Bolat G et al. Healthcare-associated infections in a Neonatal Intensive Care Unit in Turkey. *Indian Pediatrics*, 2012;49(12): 951–957.

13. Távora CV, Castro AB, Militão MAM, et al. Risk factors for nosocomial infection in a Brazilian neonatal intensive care unit. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2008;12(1): 75–79.
14. Sohn H, Garrett DO, Sinkowitz-Cochran RL et al. Prevalence of nosocomial infections in neonatal intensive care unit patients: results from the first national point-prevalence survey. *Journal of Pediatrics*, 2001; 139(6): 821–827.
15. Remington JS, Klein JO, Wilson CB, Nizet V and Maldonado YA. Staphylococcal infections. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn*, 2011;489–505.
16. Bjorkqvist M, Liljedahl M, Zimmermann J, Schollin J and Soderquist B. Colonization pattern of coagulase-negative staphylococci in preterm neonates and the relation to bacteremia. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2010;29(9): 1085–1093.
17. Milisavljevic V, Wu F, Cimmotti J et al. Genetic relatedness of *Staphylococcus epidermidis* from infected infants and staff in the neonatal intensive care unit. *American Journal of Infection Control*, 2005;33(6): 341–347.
18. Costa SF, Miceli MH and Anaissie EJ. Mucosa or skin as source of coagulase-negative staphylococcal bacteraemia?. *Lancet Infectious Diseases*, 2004;4(5): 278–286.
19. Hira V, Kornelisse RF, Sluijter M et al. Colonization dynamics of antibiotic-resistant coagulase-negative Staphylococci in neonates. *Journal of Clinical Microbiology*, 2013;51(2): 595–597.
20. Marchant EA, Boyce GK, Sadarangani M, Lavoie PM. Neonatal Sepsis due to Coagulase-Negative Staphylococci. *Clin. Dev. Immunol.*, 2013;2013:586076.
21. Huang YC, Wang YH, Su LH, Chou YH, Lien RI, Lin TY. Determining the significance of coagulase-negative staphylococci identified in cultures of paired blood specimens from neonates by species identification and strain clonality. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, 2006;27(1): 70–73.
22. Verboon-Macielek MA, Thijsen SF, Hemels MA, Menses M, van Loon AM, Krediet TG et al. Inflammatory mediators for the diagnosis and treatment of sepsis in early infancy. *Pediatr. Res.*, 2006;59(3): 457–461.
23. Klingenberg C, Ronnestad A, Anderson AS, et al. Persistent strains of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: virulence factors and invasiveness. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2007;13:1100–1111.

24. Parvez FM and JarvisWR. Nosocomial infections in the nursery. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 1999;10(2): 119–129.
25. Tokars JI. Predictive value of blood cultures positive for coagulase-negative staphylococci: implications for patient care and health care quality assurance. *Clin. Infect. Dis.*, 2004;39(3): 333–341.
26. Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, et al. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*, 2002;(110):285–291.
27. Khashu M, Osiovič H, Henry D, Al Khotani A, Solimano A and Speert DP. Persistent bacteremia and severe thrombocytopenia caused by coagulase-negative *Staphylococcus* in a neonatal intensive care unit. *Pediatrics*, 2006;117(2): 340–348.
28. Paolucci M, Landini MP and Sambri V. How can the microbiologist help in diagnosing neonatal sepsis?. *International Journal of Pediatrics*, 2012(ID 120139).
29. Connell TG, Rele M, Cowley D, Buttery JP and Curtis N. How reliable is a negative blood culture result? Volume of blood submitted for culture in routine practice in a children's hospital. *Pediatrics*, 2007;119(5): 891–896.
30. Hall KK and Lyman J. Updated review of blood culture contamination. *Clinical Microbiology Reviews*, 2006;19(4): 788–802.
31. Beekmann SE, Diekema DJ and Doern GV. Determining the clinical significance of coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 2005;26(6): 559–566.
32. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med.*, 1998;339: 520–32.
33. Vandenesch F., Lina G., Henry T. *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? *Front. Cell. Inf. Microbio.*, 2012;16(2):12.
34. DeLeo FR, Diep BA, Otto M. Host defense and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* infections. *Infectious Disease Clinics of North America*, 2009;23(1): 17–34.
35. Bubeck-Wardenburg J, Patel RJ, Schneewind O. Surface proteins and exotoxins are required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Infection and Immunity*, 2007;75:1040–1044.

36. Callegan MC, Engel LS, Hill JM, O'Callaghan RJ. Corneal virulence of *Staphylococcus aureus*: roles of alpha-toxin and protein A in pathogenesis. *Infection and Immunity*, 1994;62:2478–2482.
37. Iwatsuki K, Yamasaki O, Morizane S, Oono T. Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression. *J Dermatol Sci.*, 2006;42: 203–14.
38. Novick RP, Schlievert P, Ruzin A.. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. *Microbes Infect*, 2001;3:585–94.
39. Lindsay JA, Holden MT. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? *Trends Microbiol*, 2004;12: 378–85.
40. Archer GL, Johnston JL. Self-transmissible plasmids in staphylococci that encode resistance to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.*, 1983;24:70–7.
41. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2000; 44:1549–55.
42. Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2001;45: 1323–36.
43. Chambers HF, Hartman BJ, Tomasz A. Increased amounts of a novel penicillin-binding protein in a strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* exposed to nafcillin. *J Clin Invest.*, 1985;76: 325–31.
44. Archer, G., Niemeyer, D.M. Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci. *Trends in Microbiol.*, 1994;2:343-347.
45. Chambers HF, Hartman BJ, Tomasz A. Increased amounts of a novel penicillin-binding protein in a strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* exposed to nafcillin. *J. Clin. Invest.*, 1985;76: 325–331
46. Lopes HV. CA-MRSA: um novo problema para o infectologista. *Ver. Panam. Infectol.*, 2005; 7(3): 34-36.
47. Cheung GYC, Rigby K, Wang R et al. *Staphylococcus epidermidis* strategies to avoid killing by human neutrophils. *PLoS Pathogens*, 2010;6(10),1001133.
48. Otto M. Staphylococcal biofilms. Recent review on the molecular biology of staphylococcal biofilm formation. *Curr Top Microbiol Immunol.*, 2008;322:207–228.

49. Gilbert P, Das J, Foley I. Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res.*, 1997; 11:160–167.
50. Foster TJ. Immune evasion by staphylococci. *Nature Reviews Microbiology*, 2005;3(12):948–958.
51. Mack D, Davies AP, Harris LG, Rohde H, Horstkotte MA and Knobloch JKM. Microbial interactions in *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007;387(2):399–408.
52. Rohde H, Frankenberger S, Zahringer U and MackM. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. *European Journal of Cell Biology*, 2010;89(1):103–111.
53. Donlan RM. Role of biofilms in antimicrobial resistance. *ASAIO J.*, 2000;S47-S52.
54. Stewart PS, Consterton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, 2001;359:135-138.
55. Mack D, Riedewald J, Rohde H, Magnus T, Feucht HH, Elsner HÁ, Laufs R, Rupp ME. Essential functional role of the polysaccharide intercellular adhesin of *Staphylococcus epidermidis* in hemagglutination. *Infect. and Immun.*, 1999;67: 1004-08.
56. Morales M, Mendez-Alvarez S, Martin-Lopes JV, Marreiro C, Freytes CO. Biofilm: the microbial “bunker” for intravascular catheter-related infection. *Support Care Cancer.*, 2004;12:701-07.
57. Hira V, Kornelisse RF, Sluijter M et al. Colonization dynamics of antibiotic-resistant coagulase-negative Staphylococci in neonates. *Journal of Clinical Microbiology*, 2013;51(2):595–597.
58. Li M, Wang X, Gao Q, Lu Y. Molecular characterization of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from a teaching hospital in Shanghai, China. *J Med Microbiol.*, 2009;58(4):456–461.
59. Sloos JH, Dijkshoom L, Vogel L, van Boven CPA. Performance of phenotypic and genotypic methods to determine the clinical relevance of serial blood isolates of *Staphylococcus epidermidis* in patients with septicemia. *J Clin Microbiol*, 2000;38:2488-2493.
60. Raimundo O, Heussler H, Bruhn JB et al. Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococcal bacteraemia in a newborn intensive care unit. *Journal of Hospital Infection.*, 2002;51:33–42, 2002.

61. Mancini N, Carletti S, Ghidoli N, Cichero P, Burioni R and Clementi M. The era of molecular and other non-culturebased methods in diagnosis of sepsis. *Clinical Microbiology Reviews*, 2010;23(1):235–251.
62. Miragaia M, Carriço JA, Thomas JC, Couto I, Enright MC, de Lencastre H. Comparison of molecular typing methods for characterization of *Staphylococcus epidermidis*: proposal for clone definition. *J Clin Microbiol.*, 2008;46(1):118–129.
63. Gerner-Smidt P, Hise K, Kincaid J, Hunter S, Rolando S, Hyytiä-Trees E, Ribot EM, Swaminathan B. PulseNet USA: a five-year update. *Foodborne Pathog Dis.*, 2006;3(1):9–19.
64. Springer-Verlag I, Widerström A, Wiström MA, Sjöstedt JA, Monsen AA. Coagulase-negative staphylococci: update on the molecular epidemiology and clinical presentation, with a focus on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus*. *J European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2012;31:1.
65. Cooper JE, Feil EJ. Multilocus sequence typing—what is resolved? *Trends Microbiol.*, 2004;12: 373–377.
66. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, 2000;38:1008–1015.
67. Turner KM, Feil EJ. The secret life of the multilocus sequence type. *Int J Antimicrob Agents.*, 2007;29(2):129–135
68. Thomas JC, Vargas MR, Miragaia M, Peacock SJ, Archer GL, Enright MC. Improved multilocus sequence typing scheme for *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Microbiol.* 2007;45(2):616–619.
69. Miragaia M, Thomas JC, Couto I, Enright MC, de Lencastre H. Inferring a population structure for *Staphylococcus epidermidis* from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol.*, 2007;189(6):2540–2552.
70. Li W, Raoult D, Fournier PE. Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiol Rev.*, 2009;33(5):892–916.
71. Frenay HM, Bunschoten AE, Schouls LM, van Leeuwen WJ, Vandenbroucke- Grauls CM, Verhoef J, Mooi FR. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1996. 15:60-64.

72. Harmsen D, et al. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management. *J. Clin. Microbiol.* 2003 41: 5442–5448.
73. Mellmann A, Friedrich AW, Rosenkötter N et al. Automated DNA sequence-based early warning system for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreaks. *PLoS Med* 2006; 3: e33.
74. Menezes AMB, Costa JD, Gonçalves H et al. Incidência e fatores de risco para tuberculose em Pelotas, uma cidade do Sul do Brasil. *Revista Brasileira de Epidemiologia.*, 1998;1(1):50–60.
75. Koneman EV, Allen SD, Sowell VR, Sommer HM. Introdução à microbiologia médica. In: Diagnóstico microbiológico: texto e Atlas colorido. 5º ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.
76. Hogg GM, McKenna JP, Ong G. Rapid detection of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from positive BacT/Alert blood culture bottles using real-time polymerase chain reaction: evaluation and comparison of 4 DNA extraction methods. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, 2008; 61(4):446-52.
77. Fredricks DN, Relman DA. Improved amplification of microbial DNA from blood cultures by removal of the PCR inhibitor sodium polyanethanesulfonate. *J Clin Microbiol.*, 1998;36(10):2810–6.
78. Couto I, Pereira S, Miragaia M, Sanches IS, Lencastre H. Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by Internal Transcribed Spacer PCR. I. *Clin. Microbiol.*, 2001;39(9):3099-103.
79. Vandecasteele SJ, Peetermans WE, Merckx R, Van Eldere J. Expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus epidermidis* during in vitro and in vivo foreign body infections. *J Infect Dis.*, 2003;188(5):730-7.
80. Tan H, Peng Z, Li Q, Xu X, Guo S, Tang T. The use of quaternised chitosan-loaded PMMA to inhibit biofilm formation and downregulate the virulence-associated gene expression of antibiotic-resistant staphylococcus. *Biomaterials.*, 2012;33(2):365-77.
81. Klug D, Wallet F, Kacet S, Courcol RJ. Involvement of adherence and adhesion *Staphylococcus epidermidis* genes in pacemaker lead-associated infections. *J Clin Microbiol*, 2003;41:3348–3350.
82. Letertre C, Perelle S, Dilasser F, Fach P. Detection and genotyping by real-time PCR of the staphylococcal enterotoxin genes *sea* to *sej*. *Molecular and Cellular Probes.*, 2003;17:139–147.

83. Stephens AJ, Huygens F, Inman-Bamber J, Price EP, Nimmo GR, Schooneveldt J, Munckhof W, Philip M, Giffard. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* genotyping using a small set of polymorphisms. *Journal of Medical Microbiology*., 2006;55:43–51.
84. Korem M, Gov Y, Kiran MD, Balaban N. Transcriptional profiling of target of RNAIII-activating protein, a master regulator of staphylococcal virulence. *Infect Immun.*, 2005;73:6220-6228.
85. McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC: Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the United States: Establishing a National Database. *Journal of Clinical Microbiology*., 2003;41:5113-5120.
86. Shopsin B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE, et al. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol.* 1999;37(11):3556-63.
87. Borguesi A, Stronati M. Strategies for the prevention of hospital acquired infections in the neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect*, 2008;68:293-300.
88. Costa SF, Miceli MH and Anaissie EJ. Mucosa or skin as source of coagulase-negative staphylococcal bacteraemia?. *Lancet Infectious Diseases*, 2004;4(5):278–286.
89. Cunha MLRS, Lopes CAM, Rugolo LMSS, Chalita LVAS. Significância clínica de estafilococos coagulase-negativa isolados de recém-nascidos. *J Pediatr*, 2002;78:279-288.
90. Martins A, Cunha MLRS: Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects. *Microbiology and Immunology*, 2007;51:787-795.
91. von Eiff C, Jansen B, Kohnen W, et al. Infections associated with medical devices: pathogenesis, management and prophylaxis. *Drugs*, 2005;65:179–214.
92. Piette A, Verschraegen G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease *Veterinary Microbiology*, 2009;134:45–54.
93. Bradford R, Abdul MR, Daley AJ. Coagulase-negative staphylococci in very-low-birthweight infants: inability of genetic markers to distinguish invasive strains from blood culture contaminants. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2006;25:283–90.

94. Voronina OL, Kunda MS, Dmitrenko OA, Lunin VG, Gintsburg AL. Development of *Staphylococcus haemolyticus* multilocus sequencing scheme and its use for molecular-epidemiologic analysis of strains isolated in hospitals in Russian federation in 2009-2010. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, 2011;5:62–7.
95. Brodie SB, Sands KE, Gray JE, Parker RA, Goldmann DA, Davis RB. Occurrence of nosocomial bloodstream infections in six neonatal intensive care units. *Pediatr Infect Dis J*, 2000;19:56–65.
96. Bizzarro MJ, Raskind C, Baltimore RS and Gallagher PG. Seventy-five years of neonatal sepsis at Yale: 1928–2003, *Pediatrics*, 2005;116(3):595–602.
97. Graham PL, Begg MD, Larson E, Della-Latta P, Allen A and Saiman L. Risk factors for late onset gram-negative sepsis in lowbirthweight infants hospitalized in the neonatal intensive care unit. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 2006;25(2):113–117.
98. Brito DD, Brito CS, Resende DS, do Ó JM, Abdallah VOS, Filho PPG. Nosocomial infections in a Brazilian neonatal intensive care unit: a 4-year surveillance study. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2010;43(6):633-637.
99. Rugolo LMSS, Bentlin MR, Mussi-Pinhata M, Almeida MFB, Lopes JMA, Marba STM, et al. Late-Onset Sepsis in very Low Birth Weight Infants: A Brazilian Neonatal Research Network Study. *Journal of Tropical Pediatrics*, 2014;60: 415–421.
100. Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, et al. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*, 2002;110:285-91.
101. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report: data summary from January 1992 to June 2002, issued August 2002. *Am J Infect Control*, 2002;30:458-75.
102. Raimundo O, Heussler H, Bruhn JB, Suntrarachun S, Kelly N, Deighton MA, et al. Molecular epidemiology of coagulase-negative Staphylococcal bacteraemia in a newborn intensive care unit. *J Hosp Infect*, 2002;51:33-42.
103. Villari P, Sarnataro C, Iacuzio L. Molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* in a neonatal intensive care unit over a three-year period. *J Clin Microbiol*, 2000;38:1740-6.
104. von Eiff C, Peters G, Heilmann C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect Dis*, 2002;2:677-85.

105. Sloos JH, Dijkshoorn L, Vogel L, van Boven CPA. Performance of phenotypic and genotypic methods to determine the clinical relevance of serial blood isolates of *Staphylococcus epidermidis* in patients with septicemia. *J Clin Microbiol*, 2000;38:2488-2493.
106. Hira V, Sluiter M, Goessens WH, Ott A, de Groot R, Hermans PW, Kornelisse RF. Coagulase-negative staphylococcal skin carriage among neonatal intensive care unit personnel: from population to infection. *J. Clin. Microbiol.*, 2010;48:3876–3881.
107. Pereira, VC & Cunha, MLRS. Coagulase-negative staphylococci strains resistant to oxacillin isolated from neonatal blood cultures. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2013;108(7):939-942.
108. Kozitskaya S, Cho SH, Dietrich K, Marre R, Naber K, Ziebuhr W. The bacterial insertion sequence element IS256 occurs preferentially in nosocomial *Staphylococcus epidermidis* isolates: association with biofilm formation and resistance to aminoglycosides *Infect Immun*, 2004;72:1210–1215.
109. Ziebuhr W, Hennig S, Eckart M, Kränzler H, Batzilla C, Kozitskaya S, Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2006;28(1):S14–S20.
110. Li M, Diep BA, Villaruz AE, et al. Evolution of virulence in epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 2009;106(14):5883-5888.
111. Huseby MJ, Kruse AC, Digre J, Kohler PL, Vocke JA, Mann EE, Bayles KW, Bohach GA, Schlievert PM, Ohlendorf DH, Earhart CA. Beta toxin catalyzes formation of nucleoprotein matrix in staphylococcal biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010;107:14407–14412.
112. Pinheiro L, Brito CI, de Oliveira A, Martins PY, Pereira VC, da Cunha MLRS. *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*: molecular detection of cytotoxin and enterotoxin genes. *Toxins*. 2015;7:3688–3699.
113. Kilpatrick L, Harris MC. Cytokines and the inflammatory response in RA Polin, WW Fox (eds), *Fetal and Neonatal Neonatal Physiology*, 1998;1967-1989.
114. Cunha MLRS, Rugolo LMSS, Lopes CAM. Study of virulence factors in coagulase-negative staphylococci isolated from newborns. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2006;101(6):661-668.

115. de Silva GD, Kantzanou M, Justice A, Massey RC, Wilkinson AR, et al. The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative Staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.*, 2002;40(2):382-388.
116. Otto M, Virulence factors of the coagulase-negative staphylococci. *Frontiers in Bioscience*, 2004;9:841-863.
117. Huebner J, Pier GB, Maslow JN, Muller E, Shiro H, Parent M, et al. Endemic nosocomial transmission of *S. epidermidis* bacteremia isolates in a neonatal intensive care unit over 10 years. *J Infect Dis*, 1994;169(3):526 -31.
118. Srivastava S, Shetty N: Healthcare-associated infections in neonatal units: lessons from contrasting worlds. *J Hosp Infect*, 2007;65(4):292–306.
119. Walz JM, Memtsoudis SG, Heard SO: Prevention of central venous catheter bloodstream infections. *J Intensive Care Med*, 2010;25(3):131–138.
120. Jamaluddin TZ, Kuwahara-Arai K, Hisata K, Terasawa M, Cui L, Baba T, Sotozono C, Kinoshita S, Ito T, Hiramatsu K: Extreme genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strains disseminated among healthy Japanese children. *J Clin Microbiol*, 2008;46(11):3778–3783.
121. Worthington T, Lambert PA, Elliott TS. Is hospital-acquired intravascular catheter-related sepsis associated with outbreak strains of coagulase-negative staphylococci? *J Hosp Infect*, 2000;46:130-4.
122. Milisavljevic V, Wu F, Cimmotti J, Haas J, Della-Latta P, Larson E, Saiman L, MD, MPH,a,d Genetic relatedness of *Staphylococcus epidermidis* from infected infants and staff in the neonatal intensive care unit. *AJIC*, 2005;33(6):341-347.
123. Muldrew KL, Tang Y-W, Li H, Stratton CW. Clonal dissemination of *Staphylococcus epidermidis* in an oncology ward. *J Clin Microb*, 2008;46:3391-3396.
124. Liakopoulos V, Petriniki E, Efthimiadi G: Clonal relatedness of methicillin resistant coagulase-negative staphylococci in the haemodialysis unit of a single university center in Greece. *Nephrol Dial Transpl*, 2008;23:2599–2603.
125. Milisavljevic V, Wu F, Cimmoti J, Haas J, Della-Latta P, Larson E, Saiman L: Genetic relatedness of *Staphylococcus epidermidis* from infected infants and staff in the neonatal intensive care unit. *Am J Infect Control*, 2005;33:341–347.

126. Cherifi S, By B, Deplano A, Nagant C, Nonhoff C, Denis O, Hallin M. Genetic characteristics and antimicrobial resistance of *Staphylococcus epidermidis* isolates from patients with catheter-related bloodstream infections and from colonized healthcare workers in a Belgian hospital. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2014;13(20):1-8.
127. Bouchami O, Hassen AB, Lencastre H, Miragaia M: High prevalence of mec complex C and *ccrC* is independent of SCCmec type V in *Staphylococcus haemolyticus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2012;31:605–614.
128. Barrosa EM, Ceottob H, Bastosb MCF, Santos KRN, Giambiagi-deMarval M: *Staphylococcus haemolyticus* as an Important Hospital Pathogen and Carrier of Methicillin Resistance Genes. *J. Clin. Microbiol*, 2012;50:166-168.
129. Khodaparast L, Khodaparast L, Shahrooei M, Stijlemans B, Merckx R, Baatsen P, et al. The Possible Role of *Staphylococcus epidermidis* LPxTG Surface Protein SesC in Biofilm Formation. *PLoS One*, 2016;11: e0146704.
130. Miragaia M, Thomas JC, Couto L, Enright MC, de Lencastre H. Inferring a population structure for *Staphylococcus epidermidis* from multilocus sequence typing data. *J. Bacteriol.*, 2007;189:2540-2552.
131. Oliveira CF, Cavanagh JP, Fredheim EGA, Reiter KC, Rieger A, Klingenberg C, et al. Coagulase-negative staphylococci in Southern Brazil: looking toward its high diversity. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2016;49(3): 292-299.
132. Ridom GmbH.2017. *SpaServer:frequencies*. <http://spa.ridom.de/frequencies.shtml> Acessado 28 de outubro 2017.
133. Adler A, Chmelnitsky I, Shitrit P, Sprecher H, Navon-Venezia S, Embon A, et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Israel: dissemination of global clones and unique features. *J Clin Microbiol* 2012;50:134–137.
134. Nakaminami H, Noguchi N, Ito A, Ikeda M, Utsumi K, Maruyama H, Sakamoto H, Senoo M, Takasato Y, Nishinarita S. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from tertiary care hospitals in Tokyo, Japan. *J Infect Chemother* 2014;20:512–515