



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



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.

2. Justificativa

A alta frequência de infecções por *Staphylococcus* spp. em UTI Neonatal leva a maiores taxas de mortalidade de neonatos e disseminação de cepas que podem permanecer por longos períodos no ambiente hospitalar. Os mecanismos invasão, permanência, resistência e disseminação dos *Staphylococcus*, aumentam mais a preocupação em relação ao controle desses micro-organismos dentro das áreas de cuidados intensivos. É fundamental a análise destes micro-organismos através de um processo ativo, contínuo e sistemático para o controle da propagação de clones de espécies de *Staphylococcus* resistentes e virulentas em decorrência de seu impacto negativo na sobrevivência de neonatos.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Caracterizar o perfil das infecções de corrente sanguínea por *Staphylococcus* spp. em RNs internados na UTI Neonatal, avaliar os fatores associados aos casos de infecção, perfil de virulência e resistência antimicrobiana dos estafilococos isolados, bem como a presença de clones prevalentes na unidade de internação.

3.2. Objetivos Específicos

- Determinar a incidência de infecções da corrente sanguínea por espécies de *Staphylococcus* spp e fatores associados.
- Comparar RNs com infecção confirmada e não confirmada por *Staphylococcus* spp. em relação aos fatores de risco para infecção e aos desfechos, tempo de internação e óbito.
- Identificar genotipicamente espécies de *Staphylococcus*.

- Determinar a resistência à oxacilina pela detecção do gene *mecA*.
- Detectar os genes *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD* específicos para produção de biofilme.
- Detectar os genes *hla*, *hly* e *hld* para produção de hemolisinas e o gene *lukPV* da Leucocidina Pantón-Valentine.
- Detectar o gene *tst* da Síndrome do Choque Tóxico e os genes *sea*, *seb*, *sec* e *sed* que codificam enterotoxinas.
- Determinar a presença de clones de *S. aureus* e *S. epidermidis* prevalentes na unidade neonatal.

4- Materiais e métodos

4.1. Delineamento do estudo

Estudo translacional e prospectivo realizado na UTIN do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB). A UTIN possui nível de atendimento terciário com 17 leitos de alta complexidade atendendo, em sua maioria, prematuros com menos de 1500g. A maternidade é referência para gestações de alto risco e recebe pacientes nascidos no próprio hospital e também de serviços secundários da região.

Foram incluídos no estudo todos os neonatos admitidos na UTIN do Hospital das Clínicas da FMB no período de Março de 2014 a Agosto de 2015 que possuíam hemocultura positiva somente para *Staphylococcus* spp.

4.2. Obtenção das amostras

As amostras foram coletadas diretamente de frascos de hemocultura cedidos pelo Laboratório de Microbiologia da Seção de Laboratórios Clínicos com acompanhamento do recém-nascido até o desfecho final (alta da UTI ou óbito).

A obtenção das amostras foi realizada de acordo com a aprovação do comitê de ética em pesquisa da FMB (CAAE 24768113.9.0000.5411).

4.3 Coleta de dados clínicos

A coleta de dados clínicos e o diagnóstico de ICS foram feitos com acompanhamento médico através da análise dos registros médicos dos pacientes, incluindo: idade gestacional, peso ao nascimento, gênero, uso de cateter central, nutrição parenteral e/ou ventilação mecânica, dias de hospitalização e desfecho óbito ou alta da UTI.

Os casos de ICS foram confirmados em pacientes que possuíam pelo menos uma hemocultura positiva para *Staphylococcus* spp. sem relação com infecção por outro micro-organismo e pelo menos um dos sinais e sintomas clínicos compatíveis com sepse: instabilidade térmica, bradicardia, apnéia, intolerância alimentar, piora do desconforto respiratório, intolerância à glicose, instabilidade hemodinâmica/choque, hipoatividade/letargia, piora RX, piora dos exames hemograma/PCR, aumento da necessidade de parâmetros ventilatórios/concentração de O₂, de acordo com os critérios adotados na Unidade Neonatal, até sete dias antes ou depois da coleta da hemocultura.

4.4 Identificação de *S. aureus*

Depois de constatado crescimento em placa de ágar sangue, os micro-organismos foram submetidos à coloração de Gram para análise da pureza da amostra, sua morfologia e coloração específica. Para diferenciação entre ECN e *S. aureus*, os micro-organismos foram identificados conforme preconizado por Koneman et al. (1997) pelas provas de catalase e coagulase [75].

4.5 Extração do DNA das amostras isoladas de hemoculturas

A extração do DNA foi realizada diretamente das amostras de sangue presente no frasco de hemocultura através do uso do Kit Ilustra (GE Healthcare) segundo protocolo do fabricante, acrescido de modificações na primeira centrifugação [76] e na adição de 800µL de álcool benzílico [77].

Foi feita assepsia da tampa do frasco de hemocultivo com algodão embebido em álcool 70%. Em seguida, com o auxílio de agulha e seringa estéreis, foi aspirada uma alíquota de 1,5mL de sangue colocadas em microtubos estéreis. Os microtubos foram centrifugados a 850 x g por 2 minutos e o sobrenadante foi removido por aspiração com auxílio de micropipeta e ponteiros estéreis.

O processo de extração iniciou-se com centrifugação a 10.000 x g por um minuto e o novo sobrenadante foi descartado, foram adicionados 500µL de tampão de lisozima ao sedimento. Essa mistura foi agitada em vortex e em seguida foram adicionados 800µL de álcool benzílico, novamente foi agitada em vortex e em seguida centrifugada a 7.000 x g por cinco minutos.

Dessa mistura centrifugada, retirou-se, cuidadosamente, 300µL do sobrenadante que foram colocados em novo microtubo estéril. A esse material adicionou-se 10µL de lisozima em uma concentração de 10mg/mL, deixado em temperatura ambiente por 15 minutos, com agitações, a cada cinco minutos, em vortex. Após esse tempo, adicionou-se 10µL de Proteinase K em uma concentração de 20mg/mL, agitou-se em vortex e o microtubo foi incubado à 56°C por 15 minutos, com agitações, a cada cinco minutos. Em seguida, a mistura foi transferida para a microcoluna de extração e centrifugada a 11.000 x g por um minuto. O filtrado foi descartado e 500µL de solução de lavagem foram colocados na microcoluna, e essa foi novamente centrifugada a 11.000 x g por

três minutos. O sobrenadante foi desprezado e a microcoluna foi colocada em um novo microtubo estéril, na microcoluna foram adicionados 200µL de água MilliQ, previamente aquecida à 70°C. Essa microcoluna foi mantida em temperatura ambiente por um minuto, e em seguida centrifugada por 11.000 x g durante um minuto. O material foi congelado em freezer com temperatura de -20°C para serem submetidas à técnica de PCR.

As padronizações da técnica de PCR em tempo real foram realizadas com cepas padrão (ATCC) de acordo com o Quadro 1.

Quadro 1- Cepas padrão utilizadas na padronização da técnica de PCR em tempo real

Identificação das espécies de <i>Staphylococcus</i> isoladas	<i>S. epidermidis</i>	ATCC 12228
	<i>S. capitis</i>	ATCC 49325
	<i>S. haemolyticus</i>	ATCC 29970
	<i>S. hominis</i>	ATCC 27844
	<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i>	ATCC 700237
	<i>S. lugdunensis</i>	ATCC 700328
	<i>S. saprophyticus</i>	ATCC 15305
	<i>S. warneri</i>	ATCC 10209
Deteção do gene <i>mecA</i>	<i>S. aureus</i>	ATCC 33591 (controle +)
		ATCC 25923 (controle -)

Quadro 1 (continuação) - Cepas padrão utilizadas na padronização da técnica de PCR em tempo real

Deteção dos genes para produção de biofilme	<i>icaA,icaB,icaC e icaD</i>	ATCC 35984 (controle +)
		ATCC 12228 (controle -)
Deteção dos genes de enterotoxinas estafilocócicas	<i>sea</i>	ATCC 13565
	<i>seb</i>	ATCC 14458
	<i>sec</i>	ATCC 19095
	<i>sed</i>	ATCC 23235
Deteção do gene da Toxina da Síndrome do Choque Tóxico	<i>tst</i>	ATCC 51650
Deteção do gene da Leucocidina Pantone Valentine	<i>pvl</i>	ATCC 49775 (controle +)
		29213 (controle -)
Deteção dos genes de hemolisinas	<i>hla</i>	<i>S. aureus</i> N315
	<i>hly</i>	RN4420
	<i>hld</i>	ATCC 19095

4.6 Identificação genotípica dos *Staphylococcus* coagulase negativos pela técnica de ITS-PCR

Após extração do material genético, a identificação genotípica dos micro-organismos isolados das hemoculturas em nível de espécie foi feita usando primers de sequências conservadas adjacentes aos genes que codificam o RNAr16S e RNAr23S pela técnica de ITS-PCR descrita por Couto et al. [78].

4.7 Detecção do gene *mecA* por PCR em Tempo Real

A detecção do gene *mecA* por PCR em Tempo Real foi realizada utilizando os primers (*mecA1* e *mecA2*) e sonda descritos por Vandecastelle *et al.* [79]. A reação consiste em 2 µL de DNA, 12,5 µL do Master Mix Taqman 2X (Applied Biosystems), 900 nmol/L de cada primer, e 200 nmol/L da sonda em um volume final de 25 µL. As condições de amplificação foram: 2 min a 50°C, seguido por 10 min a 95°C, 45 repetições de 15 s a 95°C e 1 min a 60°C.

4.8 Detecção dos genes *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD* por PCR em Tempo Real

Foi realizada a pesquisa dos genes relacionados a formação do biofilme *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD* por PCR em Tempo Real. Para a detecção do gene *icaA* foram utilizados a sonda e os primers descritos por Vandecastelle *et al.* [79]. A reação consiste em 2 µL de DNA, 12,5 µL do Master Mix Taqman 2X (Applied Biosystems), 900 nmol/L de cada primer, e 200 nmol/L da sonda em um volume final de 25 µL. As condições de amplificação foram: 2 min a 50°C, seguido por 10 min a 95°C, 45 repetições de 15 s a 95°C e 1 min a 60°C.

Para a detecção do gene *icaC* foram utilizados os primers descrito por Tan *et al.* (2012) [80]. A reação consiste em 4 µL de DNA, 10 µL do Master Mix SyberGreen

(Applied Biosystems), 300 nmol/L de cada primer em um volume final de 20 µL. As condições de amplificação foram: 20s a 50°C, 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1 min; e por fim a 95°C por 10 min.

Para a detecção do gene *icaB* foram utilizados a sonda, os primers e os parâmetros descritos por Klug *et al.* (2003) [81]. Para a detecção do gene *icaD* foram utilizados os primers e os parâmetros descritos por Tan *et al.* (2012) [80].

4.9 Detecção dos genes de enterotoxinas estafilocócicas e da Toxina da Síndrome do Choque Tóxico por PCR em Tempo Real

Para a detecção dos genes das enterotoxinas estafilocócicas clássicas (*sea*, *seb*, *sec* e *sed*) foram utilizados as sondas, os primers e os parâmetros descritos por Letertre *et al.* [82]. Para a detecção do gene da Toxina da Síndrome do Choque Tóxico (*tst*) foram utilizados as sondas, os primers e os parâmetros descritos por Stephens *et al.* [83]. Foram utilizadas linhagens de *S. aureus* toxigênicas de referência internacional como controle positivo. Para controle negativo foi utilizada a amostra *S. xylosus* ATCC 29971.

4.10 Detecção do gene da Leucocidina Pantón Valentine por PCR em Tempo Real

Para a detecção do gene codificante da Leucocidina Pantón Valentine (*pvl*) por PCR em Tempo Real foram utilizados as sondas, os primers e os parâmetros descritos por Stephens *et al.* (2006) (Quadro 2) [83].

4.11 Detecção dos genes de hemolisinas por PCR em Tempo Real

Para a detecção do gene das hemolisinas alfa (*hla*), beta (*hlb*) e delta (*hld*) por PCR em Tempo Real foram utilizados os primers e os parâmetros descritos por Korem *et al.* (2005) (Quadro 2) [84].

Quadro 2 - Oligonucleotídeos para a detecção dos genes utilizados na técnica de PCR em Tempo Real

Primer	Sonda	Sequência 5' - 3'	Referência
<i>mecA1</i>	AATGACGCTATG	GTAACATTGATCGCAACGTTCAAT	Vandecastelle <i>et al.</i> (2003)
<i>mecA2</i>	ATCCCAATCTAA CTTCCACAT	GCTTTGGTCTTTCTGCATTCT	
<i>icaA1</i>	TTGCTGTTTCATG	AAAGATGTAGGTTATTGGGATACTGACA	Vandecastelle <i>et al.</i> (2003)
<i>icaA2</i>	GAAACTCCATCT TTTTGATTA	CATAGAGCACGTGGTTCGTACTTAA	
<i>icaB1</i>	TAGCGTTTCAAA	CGAATCCGTCCCATTCTTT	Klug <i>et al.</i> (2003)
<i>icaB2</i>	TGCATCAT	ATGCCGATAACTATAGAATTCCACGTA	
<i>icaC1</i>		CTTGGGTATTTGCACGCATT	Smith <i>et al.</i> (2010)
<i>icaC1</i>	-	GCAATATCATGCCGACACCT	
<i>icaD1</i>		ATCGTTGTGATGATTGTTTA	Tan <i>et al.</i> (2012)
<i>icaD2</i>	-	GATATGTACGACCTTTCTT	
<i>sea1</i>		TCACACAGAATTC ATTAAAGAGGAGAAATTAAGCATG	Letertre <i>et al.</i> (2003)
<i>sea2</i>	-	AGCGAGAAAAGCGAAGAAATA CTACCAAGATCT	
<i>seb1</i>		ACTTGTATATAAATATATATC TCACACAGAATTC	Letertre <i>et al.</i> (2003)
<i>seb2</i>	-	ATTAAAGAGGAGAAATTAAGCATG GAGAGTCAACCAGATCCTAAA	
<i>sec1</i>		AAAATATAAGATCT CTTTTTCTTTGTCGTAAGATA	Letertre <i>et al.</i> (2003)
<i>sec2</i>	-	TCACACAGAATTC ATTAAAGAGGAGAAATTAAGCATG	
<i>sed1</i>		GAGAGCCAACCAGACCCTACG TCGGATTAAGATCT	Letertre <i>et al.</i> (2003)
<i>sed2</i>	-	TCCATTCTTTGTTGTAAGGTG TCACACAGAATTC	
<i>tst1</i>		ATTAAAGAGGAGAAATTAAGCATG AAACATTCTTATGCAGATAAA	Letertre <i>et al.</i> (2003)
<i>tst2</i>	-	TTTGAATAGATCT CTTTTCATATAAATAGATGTC	
<i>pvl1</i>		CCCTTTGTTGCTTGCGACA	Stephens <i>et al.</i> (2006)
<i>pvl2</i>	-	CCC ACT ACT ATA CCA GTC TAG CAA ATC C	
<i>hla1</i>		TCA CAA AAT GCC AGT GTT ATC CAG	Stephens <i>et al.</i> (2006)
<i>hla2</i>	-	TTT TGC AGC GTT TTG TTT TCG	
<i>hla1</i>		GCAGATTCTGATATTAATATTA	Korem <i>et al.</i> (2005)
<i>hla2</i>	-	AATTTGTCAATTTCTTTCTTTTC	
<i>hla1</i>		GGAGTGATAATGATGGTGAA	Korem <i>et al.</i> (2005)
<i>hla2</i>	-	TTAGTTAGTTGAGCACTATT	
<i>hld1</i>		ATGATCACAGAGATGGTA	Korem <i>et al.</i> (2005)
<i>hld2</i>	-	CTGAGTCCTAGGAACTAACT	

4.12 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

O PFGE das amostras de *Staphylococcus* spp. isolados de hemoculturas foi realizado segundo o protocolo modificado de McDougal et al. [85].

As amostras foram cultivadas em caldo BHI onde cresceram por 24h. Em um microtubo, 200µl da amostra de espécies de ECN ou 100µl de *S. aureus* foram centrifugadas a 12.000rpm por 1min. Depois de desprezado o sobrenadante, foram adicionados 150µl de solução TE (10mM de Tris, 1mM EDTA [pH 8,0]) com agitação em vortex até a completa dissolução do pellet formado. As amostras foram deixadas em banho-maria por 10min. a 37°C. Foram adicionados 2,5µl de Lisostafina (1mg/ml) por amostra e agitadas em vortex. e em seguida 150µl de agarose low melting foram adicionados. As amostras foram imediatamente despejadas nos moldes para plugues até que solidificassem e, então, colocadas em 2ml de solução EC (6mM Tris-HCl, 1M NaCl, 100mM EDTA, 0,5% Brij-58, 0,2% deoxicolato de sódio, 0,5% laurilsarcosil sódico) e incubadas à 37°C por pelo menos 4h. Em seguida, os plugues foram lavados com 2ml de solução TE quatro vezes à temperatura ambiente por meia hora. Para a restrição do DNA genômico foi utilizado 2µl da enzima *SmaI* (Fast Digest *SmaI*, Fermentas Life Science, Canadá) para *Staphylococcus* spp. na estufa a 37°C por 6 min. segundo especificações do fabricante. A eletroforese foi executada em aparelho CHEF-DR III System (BioRad Laboratories, EUA) em gel de agarose a 1% preparado com TBE 0,5X (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad Laboratories, EUA) sob as seguintes condições: intervalos de tempo de pulso de 5 a 40s por 21h; em rampa linear; 6V/cm; ângulo de 120°; 14°C; 2,2L de 0,5M TBE como tampão de corrida. Foi utilizado Lambda Ladder PFG Marker (New England BioLabs) como marcador molecular. Os géis foram corados com GelRed por 1h, e fotografados sob

transiluminação UV. Para análise de similaridade foi utilizado o software BioNumerics (versão 7.6; Applied Maths, Bélgica), cálculo dos coeficientes de correlação Dice e criação do dendrograma pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages*). A tolerância da posição das bandas e a otimização foram ajustadas para 1.25 e 1% respectivamente. Um coeficiente de similaridade de 80% foi escolhido para determinação dos clusters.

4.13 MLST – *Multilocus Sequence Typing*

O MLST para *S. aureus* foi realizado segundo as normas descritas por Enright et al (2000) [66]. Cada par de primer amplifica um fragmento interno do gene *housekeeping* (cerca de 500 pb), estes são demonstrados no Quadro 3: carbamatoquinase (*arcc*) desidrogenase, do chiquimato (*aroE*), glicerol quinase (*glp*), guanilatoquinase (*gmk*), acetiltransferase fosfato (*pta*), triosefosfatoisomerase (*tpi*), e acetil coenzima A acetiltransferase (*yqiL*). Para *S. epidermidis*, foram utilizados os primers para os genes carbamatoquinase (*arcc*), desidrogenase, do chiquimato (*aroE*), transportador ABC (*gtr*), proteína reparadora de incompatibilidades do DNA (*mutS*), proteína regulatória do operon pirimidina (*pyrR*), triosefosfatoisomerase (*tpi*), e acetil coenzima A acetiltransferase (*yqiL*) com os primers descritos por Thomas et al. [68] conforme Quadro 4.

A purificação foi realizada pelo Kit *HiYield™ Gel/PCR Fragments Extraction* e a reação de sequenciamento é descrita abaixo. A análise e comparação das sequências foram realizadas por banco de dados via internet (<http://www.mlst.net>) (2016). A análise das sequências foi realizada pelo software BioNumerics (versão 7.6; Applied Maths, Bélgica).

Quadro 3 - Sequências de primers utilizados na PCR de *S. aureus*

Gene	Iniciador	Sequencia (5'-3')	Tamanho do produto Amplificado (pb)
Carbamato quinase	<i>arcC</i> -Up	TTGATTACACCAGCGCGTATTGTC	456
	<i>arcC</i> -Dn	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	
Desidrogenase do chiquimato	<i>aroE</i> -Up	ATCGGAAATCCTATTTACATTC	456
	<i>aroE</i> -Dn	GGTGTTGTATTAATAACGATATC	
Glicerol quinase	<i>glpF</i> -Up	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC	465
	<i>glpF</i> -Dn	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	
Guanilato quinase	<i>gmk</i> -Up	ATCGTTTTATCGGGACCATC	429
	<i>gmk</i> -Dn	TCATTAACCTACAACGTAATCGTA	
Fosfato acetiltransferase	<i>pta</i> -Up	GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG	474
	<i>pta</i> -Dn	GACCCTTTTGTGAAAAGCTTAA	
Triose-fosfato isomerase	<i>tpi</i> -Up	TCGTTCATTCTGAACGTCGTGAA	402
	<i>tpi</i> -Dn	TTTGACCTTCTAACAATTGTAC	
Acetil coenzima A	<i>yqiL</i> -Up	CAGCATACAGGACACCTATTGGC	516
acetil transferase	<i>yqiL</i> -Dn	CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	

Fonte: Enright et al (66)

Quadro 4 - Sequências de primers utilizados na PCR de *S. epidermidis*

Gene	Iniciador	Sequencia (5'-3')	Tamanho do produto Amplificado (pb)
Carbamato quinase	<i>arcC</i> -Up	TGTGATGAGCACGCTACCGTTAG	465
	<i>arcC</i> -Dn	TCCAAGTAAACCCATCGGTCTG	
Desidrogenase do chiquimato	<i>aroE</i> -Up	CATTGGATTACCTCTTTGTTTCAGC	420
	<i>aroE</i> -Dn	CAAGCGAAATCTGTTGGGG	
transportador ABC	<i>gtr</i> -Up	CAGCCAATTCTTTTATGACTTTT	438
	<i>gtr</i> -Dn	GTGATTAAAGGTATTGATTTGAAT	
proteína reparadora de incompatibilidades do DNA	<i>mutS</i> -Up	GATATAAGAATAAGGGTTGTGAA	429
	<i>mutS</i> -Dn	GTAATCGTCTCAGTTATCATGTT	
proteína regulatória do operon pirimidina	<i>pyrR</i> -Up	GTTACTAATACTTTTGCTGTGTTT	428
	<i>pyrR</i> -Dn	TAGAATGTAAAGAGACTAAAATGA	
Triose-fosfato isomerase	<i>tpi</i> -Up	ATCCAATTAGACGCTTTAGTAAC	424
	<i>tpi</i> -Dn	TTAATGATGCGCCACCTACA	
Acetil coenzima A acetil transferase	<i>yqiL</i> -Up	CACGCATAGTATTAGCTGAAG	516
	<i>yqiL</i> -Dn	CTAATGCCTTCATCTTGAGAAATAA	

Fonte: Thomas et al. (68)

4.14 Reação de sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas com mix contendo: 3,25µL de água, 1,75µL de buffer Big Dye 5x (*Applied Biosystems*), 1µL de cada iniciador a 5pmoles/µL, 2µL do produto do PCR e 2µL de Big Dye (*Applied Biosystems*). A ciclagem foi iniciada por 96°C por 1 minuto, 40 ciclos de 96°C por 30 segundos, anelamento por 30 segundos e 60°C por 4 minutos. O produto da reação do sequenciamento foi precipitado utilizando-se 1µL de EDTA a 125mM, 1µL de acetato de sódio 3M, 25µL de etanol 100%. Após homogeneização a solução foi deixada em

descanso por 15 minutos e em seguida centrifugada a 3000xg por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado por inversão e adicionado de 35µL de etanol a 70%, centrifugado a 1650xg por 15 minutos a 4°C, e após a remoção do sobrenadante por inversão foram adicionados 10µL de formamida HiDi (*Applied Biosystems*) e deixado a 95°C por 5 minutos e no gelo por 2 minutos. O resultante foi para a eletroforese em sequenciador ABI3500 de 8 capilares (de 50cm) usando como polímero o POP7 (*Applied Biosystems*). A visualização das sequências (eletroforograma) foi realizada pelo programa *Bionumerics* (versão 7.6; Applied Maths, Bélgica).

4.15 *spa* typing

O *spa* typing foi realizado segundo as normas descritas por Shopsisin et al [86], utilizando um controle negativo (água destilada estéril) e um controle positivo (ATCC 33591). A purificação do produto amplificado e o sequenciamento seguiram o mesmo protocolo da técnica de MLST, citado anteriormente, modificando somente os primers específicos (Quadro 5).

A análise das sequências foi realizada pelo software BioNumerics (versão 7.6; Applied Maths, Bélgica) que sincroniza os dados com SeqNet/Ridom Spa Server (*Ridom Staphtype*, *Ridom GmbH*, *Wurzburg*, Alemanha), e para o agrupamento dos tipos de *spa* (CC-*spa*) foi utilizado o algoritmo BURP.

Quadro 5. Oligonucleotídeos utilizados na detecção do gene *spa*

Primer	Sequência
spa 1	AGACGATCCTTCGGTGAGC
spa 2	GCTTTTGCAATGTCATTACTG

Shopsisin et al. (86)

4.16 Análise estatística

Os dados clínicos e pessoais dos RNs foram submetidos à análise univariada qui-quadrado a fim de se verificar a associação entre os casos de ICS e as demais variáveis: idade gestacional, peso ao nascimento, uso de cateter central, nutrição parenteral, ventilação mecânica, dias de hospitalização, óbito e sexo.

Posteriormente, foi utilizado modelo de Regressão logística “stepwise” considerando ICS como variável resposta e as demais como variáveis explanatórias.

Foi feita regressão logística do modelo final com as variáveis significativas na análise univariada.

5- Resultados

5.1 Incidência de ICS por *Staphylococcus* spp.

Durante o período de estudo, houve 444 internações na UTIN e 37 casos confirmados de infecção por *Staphylococcus* spp. Sendo assim, a incidência cumulativa de casos de infecção por *Staphylococcus* spp. foi de 8,3% ou 83 casos em 1000 pacientes admitidos.

$$\text{Incidência} = \frac{37}{444} * 1000 = 83$$

5.2 Dados clínicos

O peso dos pacientes internados na UTIN incluídos no estudo variou de 650 a 3800g, a maioria dos RNs nasceu com extremo baixo peso (<1000g, 54,1%), e com menos de 31 semanas de gestação (72,2%) tendo o total de dias de hospitalização na UTIN variado de 3 a 83 dias com a maioria dos RNs internados entre 41 e 60 dias, a

mediana de dias de hospitalização foi de 36,5. A maioria dos pacientes fazia uso de cateter e ventilação mecânica, 85,2% e 63%, respectivamente. A letalidade nesse estudo foi de 16,2% entre os RNs com ICS confirmada e de 17,6% entre os RNs que não tiveram infecção confirmada. Na Tabela 1, podem-se comparar os dados clínicos coletados de RNs dos casos confirmados com casos não confirmados de ICS.

A análise univariada mostrou associação entre os episódios de ICS e a presença dos genes *icaB* ($p=0,0214$) e *icaD* ($p=0,0006$) nos *Staphylococcus* spp. isolados, uso de cateter central ($p=0,0407$) nos RNs e o total de dias de hospitalização ($p=0,0038$) (Tabela 1).

Tabela 1 - Comparação dos dados clínicos de recém-nascidos com casos confirmados e não confirmados de ICS.

		ICS (37 RN)		ICS não confirmada (17 RN)		p
	Total 54 RN	N	%	N	%	
Idade Gestacional	<29 semanas (29)	23	62,2	6	35,3	0,1862
	29-31 semanas (11)	8	21,6	3	17,6	
	32-33 semanas (4)	2	5,4	2	11,8	
	34-36 semanas (2)	1	2,7	1	5,9	
	>36 semanas (8)	3	8,1	5	29,4	
	<1000g (24)	20	54,1	4	23,6	
Peso ao nascimento	1000g-1499g (16)	11	29,7	5	29,4	0,0181
	1500g-2499g (8)	5	13,5	3	17,6	
	≥2500g (6)	1	2,7	5	29,4	
	Masculino (28)	17	46,0	11	64,7	
Gênero	Feminino (26)	20	54	6	35,3	0,2000
Cateter central	Sim (46)	33	89,2	13	76,4	0,0407
Nutrição Parenteral	Sim (26)	21	56,8	5	29,4	0,2000
Ventilação Mecânica	Sim (34)	26	70,3	8	47,1	0,1009
	≤20 (16)	6	16,2	10	58,8	
Dias de hospitalização	21-40 (12)	9	24,3	3	17,6	0,0038
	41-60 (20)	16	43,3	4	23,6	
	60> (6)	6	16,2	0	0	
Óbito	Sim (9)	6	16,2	3	17,6	0,8957

ICS: Infecção da corrente sanguínea

5.3 Amostras

Foram incluídos no estudo 54 recém-nascidos internados na UTI neonatal do HC de Botucatu no período de Março de 2014 a Agosto de 2015, tendo sido isolados um total de 72 *Staphylococcus* spp. das hemoculturas desses pacientes. Dos 54 recém-nascidos, em 37 foi confirmada ICS por possuírem pelo menos uma hemocultura positiva e sinais clínicos indicativos de infecção citados. Sendo 27 casos de infecção por *S. epidermidis*, 5 por *S. aureus*, 3 por *S. haemolyticus* e 2 por *S. capitis*. Dos 54 pacientes, 39 possuíam somente uma hemocultura positiva, sendo 26 (70,3%) dos 37 casos de ICS confirmados; 12 possuíam duas hemoculturas positivas, sendo 9 (24,3%) casos de ICS confirmados e três possuíam três hemoculturas positivas, sendo dois casos (5,4%) de ICS confirmados, conforme mostra a Tabela 2.

Tabela 2 – Número de hemoculturas coletadas em relação aos casos de ICS confirmados e não confirmados dos 54 pacientes incluídos no estudo.

	ICS confirmada	ICS não confirmada
1 hemocultura	26	13
2 hemoculturas	9	3
3 hemoculturas	2	1
Total	37	17

ICS: Infecção da Corrente Sanguínea

5.4 Identificação

Do total de 72 *Staphylococcus* spp. isolados, foram identificados pela técnica de ITS-PCR 60 (83,3%) *S. epidermidis*, 3 (4,2%) eram da espécie *S. haemolyticus*, 4 (5,6%) eram da espécie *S. capitis* e 5 (6,9%) da espécie *S. aureus*. A Tabela 3 compara o total de espécies isoladas com o total de espécies nos casos confirmados de ICS.

Tabela 3 – Comparação dos micro-organismos isolados das hemoculturas nos episódios confirmados e não confirmados de ICS

Micro-organismos	ICS não confirmada		ICS	
	N	%	N	%
<i>S. epidermidis</i>	33	94,3	27	73,0
<i>S. haemolyticus</i>	-	-	3	8,1
<i>S. capitis</i>	2	5,7	2	5,4
<i>S. aureus</i>	-	-	5	13,5
Total	35	100	37	100

ICS: Infecção da corrente sanguínea

5.5 Virulência e resistência

Das 72 amostras de *Staphylococcus* spp. analisadas, 55 (76,4%) possuíam o gene *mecA* de resistência à meticilina. Sendo 53 *S. epidermidis* (73,6%) e 2 *S. capitis* (2,8%). Nenhum dos *S. aureus* ou *S. haemolyticus* possuíam o gene como pode ser visto na Tabela 4.

Em relação aos genes codificadores de enterotoxina, foram encontradas 19 (26,4%) amostras que possuíam o gene *sea*, 13 (18,1%) o gene *seb*, 13 (18,1%) o gene *sec*, 8 (11,1%) o gene *sed* e nenhuma amostra possuía o gene *see*. Entre os *S. epidermidis*, 19 (31,6%) possuíam o gene *sea*, 13 (21,7%) o gene *seb*, 11 (18,3%) o gene *sec*, 5 (8,3%) o gene *sed* e nenhuma amostra possuía o gene *see*. Foi encontrada somente uma amostra de *S. capitis* com o gene *sed*, duas amostras de *S. aureus* com o gene *sec* e duas amostras de *S. haemolyticus* com o gene *sed*.

O gene *tst* da Toxina da Síndrome do Choque Tóxico foi encontrado em três amostras de *S. epidermidis*, todas de hemoculturas de pacientes diferentes. As três amostras que possuíam o gene foram encontradas em casos confirmados de infecção sendo que um dos pacientes foi a óbito.

O gene codificante da Leucocidina Pantón Valentine (*pvl*) não foi encontrado em nenhum dos 72 *Staphylococcus* spp. isolados.

Os genes para produção de hemolisinas *hla*, *hly* e *hly* foram encontrados em 43 (59,7%), 40 (55,5%) e 34 (47,2%) do total de isolados, respectivamente. Dentre os *S. epidermidis*, 39 possuíam o gene *sea*, 39 possuíam o gene *seb* e 30 possuíam o gene *sed*. Os genes *hla* e *hly* foram encontrados em 4 dos 5 *S. aureus* isolados. Nenhuma amostra de *S. capitis* ou *S. haemolyticus* possuía genes para produção de hemolisinas com os primers utilizados no estudo. Os genes *hla*, *hly* e *hly*, em 70,4%, 70,4% e 59,3% das amostras de casos confirmados por *S. epidermidis*, respectivamente. Nos casos não confirmados, os mesmos genes foram encontrados em 58,8%, 58,8% e 41,2% das amostras de *S. epidermidis*.

Dos genes para produção de biofilme, 33 amostras possuíam o gene *icaA*, 43 possuíam o gene *icaB*, 36 possuíam o gene *icaC* e 30 o gene *icaD*. Em 13 das amostras foram encontrados os genes do operon *icaADBC* completo. Entre os *S. epidermidis*, 25 possuíam o gene *icaA*, 34 possuíam o gene *icaB*, 28 possuíam o gene *icaC* e 26 possuíam o gene *icaD*. As três amostras isoladas de *S. haemolyticus* possuíam o operon *icaADBC* completo. Nas quatro amostras de *S. capitis* foi encontrado uma amostra com os genes *icaB* e *icaD*. Nas cinco amostras de *S. aureus* foram encontrados os genes *icaA*, *icaB* e *icaC*.

Em relação aos casos confirmados de ICS, 66,7% das amostras de *S. epidermidis* possuíam o gene *icaD* para produção de biofilme enquanto que, nos casos não confirmados, o gene *icaD* foi encontrado em 12,5% das amostras. Nas 5 amostras de *S. aureus* isoladas, foram encontrados os genes *icaA*, *icaB* e *icaC*. Todas as amostras de *S. aureus* e *S. haemolyticus* foram isoladas de casos confirmados de infecção. A Tabela 5 compara os fatores de virulência e resistência encontrados nos casos confirmados de ICS e nos casos não confirmados.

Tabela 4 - Detecção do gene *mecA* de resistência e de genes de virulência do total de *Staphylococcus* spp. isolados de hemoculturas

Espécie	<i>mecA</i>	<i>icaA</i>	<i>icaB</i>	<i>icaC</i>	<i>icaD</i>	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>hla</i>	<i>hlb</i>	<i>hld</i>
<i>S. epidermidis</i> (60)	53	25	34	28	26	19	13	11	5	39	39	30
<i>S. haemolyticus</i> (3)	0	3	3	3	3	0	0	0	2	0	0	0
<i>S. capitis</i> (4)	2	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
<i>S. aureus</i> (5)	0	5	5	5	0	0	0	2	0	4	1	4
Total (72)	55	33	43	36	30	19	13	13	8	43	40	34

Tabela 5 - Comparação entre os fatores de virulência e resistência de *Staphylococcus* spp. isolados de hemoculturas dos casos confirmados e não confirmados de ICS

Espécie	<i>mecA</i>	<i>icaA</i>	<i>icaB</i>	<i>icaC</i>	<i>icaD</i>	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>tst</i>	<i>hla</i>	<i>hlb</i>	<i>hld</i>
<i>S. epidermidis</i>	ICS confirmada (27)												
	25	12	19	14	18	11	5	6	2	3	19	19	16
<i>S. epidermidis</i>	ICS não confirmada (16)												
	14	6	8	7	2	3	4	1	2	0	10	10	7
<i>S. haemolyticus</i>	ICS confirmada (3)												
	0	3	3	3	3	0	0	0	2	0	0	0	0
<i>S. haemolyticus</i>	ICS não confirmada (0)												
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. capitis</i>	ICS confirmada (2)												
	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>S. capitis</i>	ICS não confirmada (1)												
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	ICS confirmada (5)												
	0	5	5	5	1	0	0	1	1	0	4	1	4
<i>S. aureus</i>	ICS não confirmada (0)												
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total (54)	40	26	36	29	25	14	9	8	8	3	33	30	27

ICS: Infecção da corrente sanguínea

Após análise univariada da espécie de *Staphylococcus* associada a ICS, fatores de virulência do isolado, resistência e clusters majoritários de *Staphylococcus* spp. associados ao episódio, verificou-se significância estatística ($p < 0,05$) em relação à presença dos genes *icaB* ou *icaD* de produção de biofilme nos isolados (Tabela 6).

As variáveis significativas na análise univariada dos fatores associados aos casos de ICS foram submetidos à regressão logística multivariada onde também se verificou significância estatística do peso ao nascimento como fator protetor, quanto maior o peso, menor o risco de ICS por *Staphylococcus* spp. e também da presença do gene *icaD* de produção do biofilme no isolado associado ao episódio (Tabela 7).

5.6 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

Foi realizado o PFGE das 72 amostras isoladas de hemoculturas, a análise foi feita no software Bionumerics 7.6. Em relação aos 60 *S. epidermidis* isolados, foram observados dois *clusters* majoritários (similaridade ≥ 80 %), um envolvendo 26 amostras (43,3%) em que 20 (76,9%) eram de casos de ICS confirmados e outro *cluster* com 16 amostras (26,7%) com 12 (75,0%) amostras de casos confirmados (grupos A e B respectivamente, Figura 1). A maior parte das amostras do grupo B foram coletadas de hemoculturas no ano de 2015 (12/16) enquanto que, no grupo A, mais de 2/3 das amostras foram coletadas em 2014 (18/26).

Tabela 6- Teste qui-quadrado para diferença de proporções de fatores associados aos casos confirmados de ICS

Fatores associados	ICS (37)	ICS não confirmada (17)	p-valor
Espécies			
<i>S. epidermidis</i>	27	16	0,1533
<i>S. haemolyticus</i>	3	0	0,5597
<i>S. capitis</i>	2	1	1
<i>S. aureus</i>	5	0	0,2776
Genes			
<i>mecA</i>	25	14	0,4240
<i>icaA</i>	21	6	0,2412
<i>icaB</i>	29	8	0,0470
<i>icaC</i>	23	7	0,2516
<i>icaD</i>	23	2	0,0016
<i>icaA+icaB</i>	2	1	1
<i>icaB+icaC</i>	0	1	0,6873
<i>icaB+icaD</i>	5	0	0,2776
<i>icaC+icaD</i>	1	0	1
<i>icaA+icaB+icaC</i>	8	3	1
<i>icaB+icaC+icaD</i>	3	0	0,5697
<i>icaADBC</i>	11	2	0,2751
<i>sea</i>	11	3	0,5441
<i>seb</i>	5	4	0,6002
<i>sec</i>	7	1	0,4009
<i>sed</i>	7	2	0,7933
<i>sea+seb</i>	2	0	0,8406
<i>sea+sec</i>	2	1	1
<i>seb+sec</i>	1	0	1
<i>sea+seb+sed</i>	1	0	1
<i>tst</i>	3	0	0,5697
<i>hla</i>	23	10	1
<i>hlb</i>	20	10	0,9739
<i>hld</i>	20	7	0,5579
<i>hla+hlb</i>	3	3	0,5688
<i>hla+hld</i>	3	0	0,5697
<i>hla+hlb+hld</i>	17	7	0,9739
<i>Cluster A</i>	14	6	1
<i>Cluster B</i>	10	3	0,6847
Biofilme e toxina	8	1	0,2945
Biofilme e hemolisina	9	3	0,8448
Hemolisina e toxina	0	2	0,1769
Biofilme, toxina e hemolisina	14	4	0,4684

ICS: Infecção da corrente sanguínea

Tabela 7 - Modelo de regressão logística multivariada para análise dos fatores associados aos casos de ICS

Fatores associados	Análise multivariada			
	ICS (37)	ICS não confirmada (17)	OR (IC 95%)	p-valor
Dados pessoais e clínicos				
Peso nascimento (g)	650 a 3800		0,999 (0,998-1,000)	0,0382
Cateter central	33	13	2,089 (0,268-16,270)	0,4816
Virulência (genes)				
<i>icaB</i>	29	8	3,514 (0,705-17,519)	0,1251
<i>icaD</i>	23	2	7,828 (1,353-45,299)	0,0216

ICS: Infecção da corrente sanguínea

A Tabela 8 compara os fatores de virulência e resistência entre os dois *clusters* majoritários observados no dendrograma de *S. epidermidis* em relação ao total de *S. epidermidis* isolados. Nota-se uma maior porcentagem de amostras com os genes *mecA*, *icaD*, *sea*, *sec*, *hla* e *hly* no *cluster* A, em relação ao *cluster* B e o total isolado. Já as amostras do *cluster* B possuem uma maior porcentagem dos genes *icaA*, *icaB* e *icaC*.

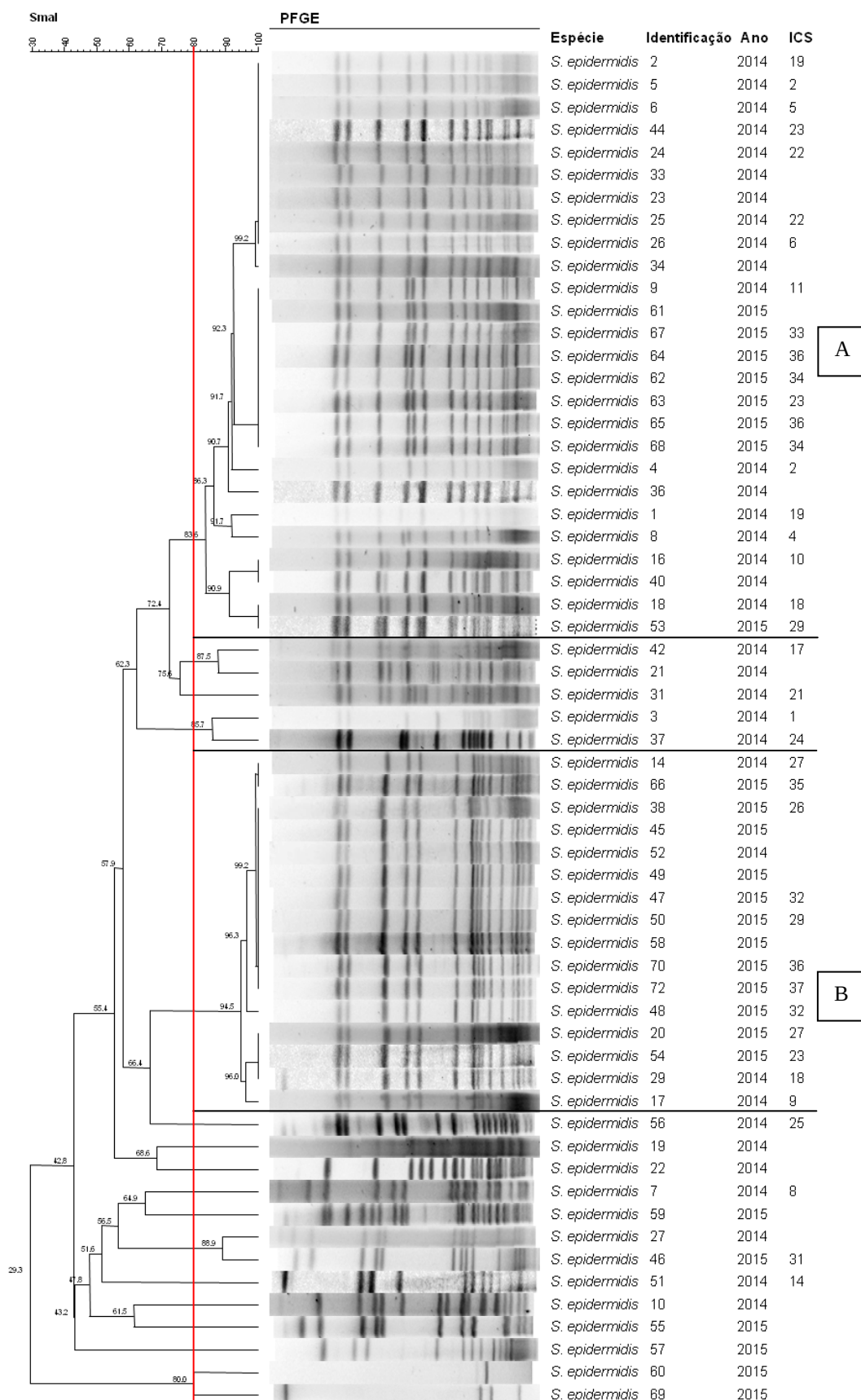


Figura 1 - Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics 7.6, Applied Maths) dos perfis PFGE – *SmaI* de *S. epidermidis* isolados de hemoculturas dos recém-nascidos incluídos no estudo (similaridade $\geq 80\%$).

Tabela 8 - Comparação dos fatores de virulência e resistência entre os *clusters* majoritários A e B observados na técnica de PFGE e o total de *S. epidermidis*

Espécie	<i>mecA</i>	<i>icaA</i>	<i>icaB</i>	<i>icaC</i>	<i>icaD</i>	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>hla</i>	<i>hlb</i>	<i>hld</i>	<i>tst</i>
<i>Cluster A</i>	25	10	13	10	16	12	7	7	1	20	20	14	0
(26, 43,3%)	96,2%	38,5%	50,0%	38,5%	61,5%	46,2%	26,9%	26,9%	3,8%	76,9%	76,9%	53,8%	-
<i>Cluster B</i>	14	7	10	8	6	4	4	2	1	9	9	8	2
(16, 26,7%)	87,5%	43,8%	62,5%	50,0%	37,5%	25,0%	25,0%	12,5%	6,3%	56,3%	56,3%	50,0%	12,5%
Total	53	25	34	28	26	19	13	11	5	39	39	30	3
<i>S. epidermidis</i>													
(60, 100%)	88,3%	41,7%	56,7%	46,7%	43,3%	31,7%	21,7%	18,3%	8,3%	65,0%	65,0%	50,0%	5,0%

Dentre os *S. haemolyticus* isolados, após análise do padrão de bandas por PFGE, constatou-se que as três amostras possuíam 100% de similaridade sendo todas de pacientes diferentes internados na UTIN num período de quatro meses (Figura 2).

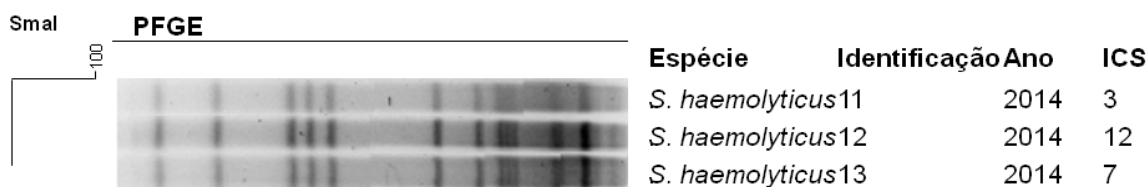


Figura 2 - Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics 7.6, Applied Maths) dos perfis PFGE – *SmaI* de *S. haemolyticus* isolados de hemoculturas dos recém-nascidos incluídos no estudo (similaridade $\geq 80\%$).

Das quatro amostras de *S. capitis* isoladas, duas amostras do mesmo paciente com ICS, coletadas em períodos diferentes, tiveram 100% de similaridade (32 e 35). O paciente ficou 15 dias internado e foi a óbito.

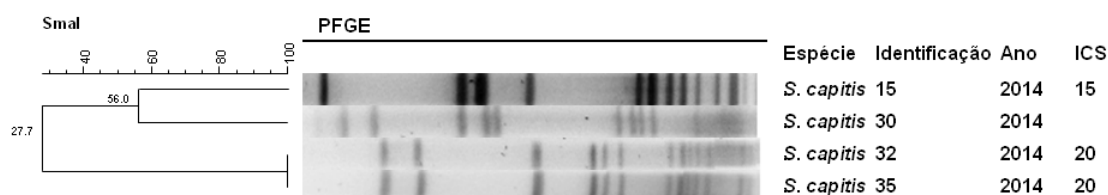


Figura 3 - Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics 7.6, Applied Maths) dos perfis PFGE – *SmaI* de *S. capitis* isolados de hemoculturas dos recém-nascidos incluídos no estudo (similaridade $\geq 80\%$).

Dos cinco *S. aureus* isolados, dois possuíam similaridade $\geq 80\%$ sendo de pacientes diferentes. Os outros três isolados não formaram *cluster*.

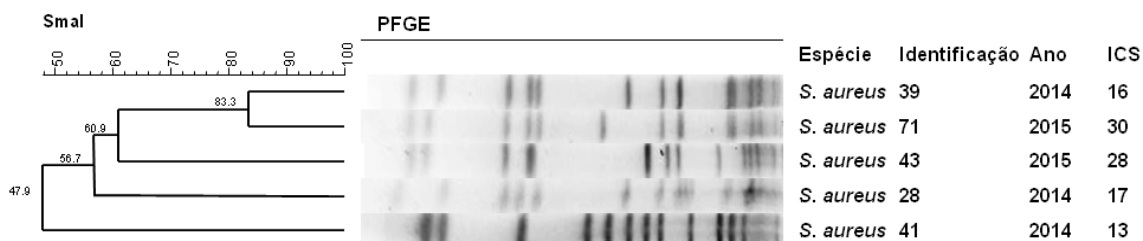


Figura 4 - Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics 7.6, Applied Maths) dos perfis PFGE – *SmaI* de *S. aureus* isolados de hemoculturas dos recém-nascidos incluídos no estudo (similaridade $\geq 80\%$).

5.7 Multilocus Sequence Typing

Foi feito o MLST de uma amostra escolhidas aleatoriamente de cada *cluster* de *S. epidermidis* (A e B) e uma amostra de *S. aureus* dentro dos grupos formados. No *cluster* A de *S. epidermidis*, foi encontrado o ST59 (amostra 25) e no *cluster* B o ST2 (amostra 72). A amostra 25 possui os genes *icaD*, *mecA* e os genes para produção de hemolisinas *hla*, *hly* e *hld* e a amostra 72 possui o operon *icaADBC*, além do gene *mecA*. A amostra de *S. aureus* estudada, não possuía nenhum ST já descrito para comparação.

5.8 spa typing

Foi feito o *spa typing* de duas amostras de *S. aureus* escolhidas aleatoriamente entre as isoladas. Foram encontrados os tipos t084 (amostra 43) e t002 (amostra 39). Ambas as amostras possuíam os genes *icaA*, *icaB*, *icaC* para produção de biofilme, além dos genes *hla* e *hld* para produção de hemolisinas.

6. Discussão

Infecções da corrente sanguínea (ICS) são as mais frequentes infecções em UTI neonatal (45-55%), seguidas por infecções do trato respiratório (16-30%) e infecções do trato urinário (8-18%) [87]. Como os ECN são comensais ubíquos na pele, autores assumem que colonizações da pele e de cateteres são importantes nos casos de sepse [88]. Em nosso estudo, foi observada a importância desses micro-organismos nas infecções em RNs onde a maioria dos pacientes (37/54) teve a infecção confirmada ao se analisar os sinais clínicos indicativos de infecção e o isolamento do micro-organismo em hemocultura, tendo sido isolados 72 *Staphylococcus* spp. no total e sua maioria foi

representada pelos ECN sendo 60 (83,3%) da espécie *S. epidermidis*, 3 (4,2%) da espécie *S. haemolyticus*, 4 (5,6%) *S. capitis* e 5 (6,9%) *S. aureus*.

A incidência de ICS por *Staphylococcus* spp. foi de 83 casos em 1000 pacientes admitidos na UTIN. *S. epidermidis* foram responsáveis por 27 casos de ICS, *S. haemolyticus* por 3 casos, *S. capitis* por 2 casos e *S. aureus* por 5 casos. Uma alta porcentagem de ECN, principalmente de *S. epidermidis*, já é esperada visto que é a espécie predominante na microbiota do recém-nascido. Esta predominância na colonização dos indivíduos e a maior patogenicidade de algumas cepas podem explicar o fato de *S. epidermidis* ser a espécie mais comumente associada aos processos infecciosos em recém-nascidos, conforme relatado em estudo realizado por Cunha et al (2002, 2007) [89, 90]. Já *S. haemolyticus* foram responsáveis por três casos de ICS (8,1%) sendo também a segunda espécie mais encontrada em outros estudos em UTIN [91, 92]. *S. haemolyticus* também são encontrados entre os ECN que colonizam e causam bacteremias em UTIN em diversos países [93, 94].

O número de infecções causadas por ECN tem aumentado drasticamente visto que pacientes em UTIN são mais sujeitos a procedimentos e dispositivos invasivos [95]. Em estudo prévio na mesma unidade, a possibilidade de infecção cruzada entre pacientes que faziam uso de cateteres foi observada pela identificação de *clusters* de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* [89]. Em nosso estudo, o uso de cateter central também se mostrou um fator associado aos casos de ICS na análise univariada ($p=0,0407$).

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 [96, 97] sendo os ECN 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]. O total de dias de hospitalização nesse estudo variou entre 3 e 83 dias sendo que a maioria (43,3%) dos pacientes com ICS confirmada ficou entre 41 e 60 dias e, nos casos em que a infecção não foi confirmada, 58,8% ficaram internados por até 20 dias na UTIN.

Em nosso estudo, a taxa de letalidade foi de 16,2% nos casos de ICS confirmada. Em um estudo de 4 anos no Brasil, as ICS foram responsáveis por 69,3% de todas as infecções em recém-nascidos internados em UTI. A taxa de letalidade entre pacientes infectados foi de 11,9% e de 8,5% no total de recém-nascidos, indicando que pacientes infectados podem ter uma maior probabilidade de morrer que pacientes não infectados [98]. Em outro estudo realizado por pesquisadores integrantes da Rede Brasileira de Pesquisa Neonatal [99], um banco de dados de RNs com extremo baixo peso ao nascimento de oito centros brasileiros com 1507 RNs estudados, 357 tiveram sepse comprovada e foi observado que esses pacientes tiveram maior mortalidade (26,6%, em média) quando comparados com RNs sem sepse (9,4%, em média), sendo os ECN os patógenos mais comumente isolados (60% das hemoculturas). A maior taxa de mortalidade foi encontrada em crianças com sepse fúngica (52%), seguida por aquelas com infecção causada por gram-negativos (35%), enquanto que em crianças com sepse por ECN, a taxa de mortalidade foi de 18% [99].

S. epidermidis são uma causa conhecida de infecções em recém-nascidos hospitalizados em UTIs [100, 101]. Assim, surtos de *S. epidermidis* têm sido bem descritos em UTIs [102, 103], sendo a maioria dos episódios de infecções sabidamente endêmicos, causados pela microbiota que coloniza os recém-nascidos [104]. Por isso, 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 [105]. Nos dois principais *clusters*

encontrados na técnica de PFGE foram isoladas amostras tanto de 2014 quanto de 2015, o que demonstra a capacidade de permanência e disseminação dessas cepas no ambiente hospitalar. Interessantemente, Hira et al. [106] encontraram que cepas de ECN de profissionais da saúde foram trocadas após um período de ausência do hospital com reposição de cepas hospitalares pelas comunitárias.

O gene *mecA* foi encontrado em 55 (76,4%) das amostras isoladas, em estudo realizado na mesma UTI, Pereira e Cunha encontraram um valor de 69% de ECN com *mecA* sendo que 73,2 dos *S. epidermidis* possuíam esse gene [107]. Entre os *S. epidermidis* isolados em nosso estudo de casos confirmados de ICS, o gene foi encontrado em 92,6% das amostras. Como a incidência de ECN resistentes a antibióticos é mais baixa na população em geral, assume-se que os neonatos são colonizados com os ECN sensíveis a antibióticos após o nascimento. Já os isolados sanguíneos são frequentemente resistentes, assim como ECNs isolados do ambiente e profissionais da saúde em UTIN [107]. Kozitskaya et al. [108] encontraram o gene *mecA* em 80% dos *S. epidermidis* estudados de infecções relacionadas a dispositivos médicos, sendo também multirresistentes, cepas obtidas da comunidade eram mais suscetíveis aos antibióticos.

Autores propõem que ECNs podem ser um reservatório significativo de genes para resistência que podem ser transferidos horizontalmente para outros patógenos comumente relacionados aos neonatos [109]. Isso pode ajudar a entender o alto número de isolados com o gene no ambiente hospitalar e também seu aumento em relação ao estudo prévio [107].

Um aumento na gravidade de doenças ou em sua frequência são frequentemente ligados a clones emergentes de bactérias de alta virulência. Elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons e ilhas de patogenicidade podem contribuir para

a maior virulência das bactérias, sendo encontrados mais frequentemente em *S. aureus* e um controle ativo de sua disseminação, principalmente entre cepas hospitalares, deve ser considerado [110].

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. Essas bactérias podem servir como reservatório desses genes para outras bactérias, o que pode aumentar a gravidade das infecções. Essas hemolisinas podem levar à lise de células de defesa do hospedeiro, como eritrócitos, diminuir a proliferação de linfócitos, por sua alta toxicidade e até possuírem atividade de ligase no biofilme o que implica numa estimulação de sua produção como reportado por Huseby et al. [111].

Nesse estudo, os genes *hla* e *hld* foram encontrados em 4 dos 5 *S. aureus* isolados. Também encontramos em 70,4% das amostras de *S. epidermidis* de casos confirmados de ICS os genes *hla* e *hly*, e, o gene *hld*, em 59,3%. Já nas amostras em que não foi confirmada a ICS, os genes *hla* e *hly* foram encontrados em 62,5% e o gene *hld* em 43,8% das amostras. A expressão de determinantes virulentos pode ditar o potencial patogênico desses micro-organismos. A presença e expressão de toxinas citolíticas pode ter um alto impacto na evasão do sistema imune por essas bactérias [110].

Nenhuma amostra de *S. capitis* ou *S. haemolyticus* possuía genes para produção de hemolisinas com os *primers* utilizados no estudo. Isso pode ter ocorrido devido às diferenças espécie-específicas desses genes entre os ECN, podendo ter sequência e estruturas diferentes entre si devido a mutações. Assim, os *primers* designados para *S. aureus* e *S. epidermidis* podem não detectar os genes em *S. haemolyticus* e *S. capitis* sendo necessário um *primer* específico para cada espécie, como foi observado por Pinheiro et al. [112].

Foram encontradas 19 (26,4%) amostras que possuíam o gene *sea*, 13 (18,1%) o gene *seb*, 13 (18,1%) o gene *sec*, 8 (11,1%) o gene *sed* e nenhuma amostra possuía o gene *see* para produção de enterotoxinas estafilocócicas. Metade das amostras possuía um ou mais genes para produção de enterotoxinas. As enterotoxinas podem funcionar como surperantígenos interagindo com o complexo principal de histocompatibilidade tipo II estimulando células T inespecificamente. Há evidências que indicam uma mediação por parte da ativação de citocinas em eventos fisiológicos da sepse neonatal em resposta a componentes bacterianos [113]. O gene *tst* da Toxina da Síndrome do Choque Tóxico foi encontrado em três amostras de *S. epidermidis*, todas de hemoculturas de pacientes diferentes. Nos três RNs foi confirmada ICS e um foi a óbito.

Em um estudo realizado na mesma UTI com 107 recém-nascidos, Cunha et al. [114] concluíram que o fato das toxinas funcionarem como superantígenos, a ativação exacerbada de mediadores imunológicos aumenta a resposta inflamatória durante a sepse e pode evoluir com choque, sugerindo que as enterotoxinas podem ter um papel importante no agravamento das infecções causadas por cepas toxigênicas de ECN.

Em relação aos genes para produção de biofilme, nas 5 amostras de *S. aureus* isoladas, foram encontrados os genes *icaA*, *icaB* e *icaC*. As três amostras isoladas de *S. haemolyticus* possuíam o operon *icaADBC* completo. Nos casos confirmados de ICS, 66,7% das amostras de *S. epidermidis* possuíam o gene *icaD* enquanto que, nos casos não confirmados, o gene *icaD* foi encontrado em 12,5% das amostras. A formação de biofilme é o fator de virulência mais importante dos ECN [114], em nosso estudo foi verificada significância estatística na análise univariada para a presença dos genes *icaB* e *icaD* nos isolados de *Staphylococcus* spp. associados a ICS, além disso, a presença do gene *icaD* também foi estatisticamente significativa na análise multivariada [OR =7,828 (1,353-45,299)]. A importância dessa produção inclui o aumento da resistência aos

antibióticos e de ataques do sistema imune do hospedeiro. A formação do biofilme é uma grande contribuição para uma colonização bem sucedida tanto em tecidos do hospedeiro quanto em dispositivos médicos [115]. Clones de *S. epidermidis* produtores de biofilme podem se tornar endêmicos por décadas e a transmissão dentro do ambiente hospitalar tem um papel importante nas infecções por esses micro-organismos [117].

A população neonatal de um hospital tem várias características que favorecem o desenvolvimento de infecções; primeiramente, isso inclui o sistema imune imaturo, o uso de procedimentos invasivos, e uma antibioticoterapia agressiva [118, 119]. Nesse estudo, 72,2% dos RNs nasceram com menos de 31 semanas, além disso, 85,2% dos pacientes faziam uso de algum tipo de cateter e 63,0% de ventilação mecânica. O peso ao nascimento dos RNs se mostrou como um fator negativamente associado a ICS na análise univariada e no modelo de regressão multivariado, sendo que quanto maior o peso ao nascer do RN, menor o risco de desenvolver ICS por *Staphylococcus* spp. A prematuridade, utilização de nutrição parenteral e ventilação mecânica não foram associados aos casos de infecção na análise estatística, talvez pelo pequeno número de RNs analisados, visto que esses dados são fatores frequentemente associados ao maior risco de ICS causadas por esses micro-organismos [99].

Apesar do RN ser tipicamente admitido no hospital com uma cepa particular de *S. epidermidis*, há uma alta probabilidade de a colonização nasal ser repostada por espécies de *Staphylococcus* com alta resistência às drogas provavelmente adquiridas do ambiente hospitalar ou da equipe profissional [120].

Cepas de *S. epidermidis* podem se tornar endêmicas em UTIN por mais de uma década, mas, pela susceptibilidade aos antimicrobianos de cepas adquiridas nos hospitais serem bastante similares, clones em surtos são difíceis de detectar sem o uso de técnicas de tipagem moleculares [121]. Em estudo realizado nos EUA, Milisavljevic

et al. [122] constataram que mais de 1/3 (37%) dos isolados analisados num período de 11 meses eram de um mesmo clone de *S. epidermidis* na tipagem por PFGE. Esse clone infectando RNs era carregado pelas mãos de enfermeiras de duas unidades estudadas e foram capazes de persistir ou substituir outros clones. Em nosso estudo, foram encontrados *clusters* de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, sendo que um dos *clusters* de *S. epidermidis* representava 43,3% do total de amostras isoladas pela tipagem por PFGE. A presença de complexos clonais de *S. epidermidis* e de *S. haemolyticus* com cepas isoladas de diferentes recém-nascidos de vários casos confirmados de infecção indica a presença de clones prevalentes dessas espécies de ECN na UTI Neonatal.

Muldrew et al. [123] demonstraram a presença de um clone predominante e persistente entre isolados de cateteres de uma enfermaria específica. Eles mostraram que esse clone não era encontrado entre isolados de *S. epidermidis* de um grupo controle da comunidade. Em nosso estudo, encontramos mais fatores de virulência e resistência nas amostras isoladas de casos de ICS confirmados quando comparados com os casos em que a infecção não foi confirmada. Esses dados sugerem que linhagens específicas são transmitidas dentro do hospital que, combinadas com a resistência e virulência, podem causar quadros mais graves de infecção.

A transmissão cruzada desses patógenos pode ocorrer diretamente entre pacientes em contato, indiretamente por contaminação pelo ambiente ou pela equipe de profissionais do hospital. A microbiota dos profissionais pode servir como reservatório e ser transmitida ao ambiente, outros profissionais ou ao paciente. Estudos tem demonstrado que profissionais da saúde podem carrear *S. epidermidis* que pertencem a um mesmo clone que causa infecções em suas respectivas enfermarias [124, 125].

Em um estudo comparando amostras de *S. epidermidis* responsáveis por infecções da corrente sanguínea relacionadas a cateter e amostras comensais de estudantes

saudáveis, observou-se que, apesar de quase 1/4 dos casos de infecção serem causadas por isolados que também colonizavam os estudantes, todos os casos severos de infecção foram causados por grupos específicos identificados por PFGE de cepas que não foram encontradas na comunidade [126]. Em nosso estudo, grande parte dos casos confirmados de ICS foram de amostras pertencentes a um dos dois principais *clusters* encontrados na técnica de PFGE, indicando que a presença de uma amostra desse grupo de bactérias, por si só, já pode indicar um possível risco para o paciente vir a desenvolver uma infecção.

A presença de clones de *S. haemolyticus* indica a importância de medidas de controle de ICS, já que essa espécie é descrita como a espécie mais resistente a diversos antimicrobianos, sendo importantes carreadores de genes de resistência que podem ser disseminados para outras espécies de ECN prevalentes nas ICS [127, 128]. Além disso, as três amostras de *S. haemolyticus* isoladas, de casos confirmados de ICS, possuíam o operon *icaADBC* completo para produção de biofilme o que indica que a associação da pesquisa dos fatores de virulência ao PFGE, permite uma maior vigilância dessa cepa e o risco de um possível diagnóstico de infecção pode ser maior nos pacientes em que esses micro-organismos forem encontrados.

No presente estudo, foi realizado o MLST de duas amostras sendo identificados os STs 59 e 2 como representativos dos dois maiores clusters de *S. epidermidis*. Ambas possuíam o gene *icaD*, considerado um dos principais genes na produção de biofilme, o fator patogênico mais importante dos *S. epidermidis* [129]. Diversos estudos citam os STs 2 e 59 entre os mais frequentemente isolados, inclusive no Brasil [129, 130, 131]. Em um estudo com um total de 863 *S. epidermidis* de isolados nosocomiais coletados em 17 centros nacionais de 17 países diferentes, Miragaia, et al [130] encontraram o ST2 como o mais representativo dentre os 217 analisados, que abrangeu 31% de todos

os isolados (67/217) seguido pelo ST59, encontrado em 6% das amostras. Segundo os autores, o ST2 foi o mais disseminado, sendo identificado em cepas isoladas de 13 países diferentes nos quatro continentes. Uma disseminação semelhante foi observada em cepas de *S. epidermidis* com ST59 que foi identificada em oito países.

O ST2 ainda foi o mais frequentemente encontrado nos casos de infecção (41%) do que em pacientes saudáveis (21%), seguido pelo ST23 (8% nos casos de infecção e menos de 5% em indivíduos saudáveis) e ST59 (7% em ambos os casos). Os STs 2 e 59 também foram os mais predominantes entre os *S. epidermidis* resistentes à meticilina, com 34% e 6% respectivamente. Entre os 20 *S. epidermidis* sensíveis à meticilina isolados, foram encontrados 19 STs diferentes, enquanto que os 197 *S. epidermidis* resistentes se dividiram em 63 STs diferentes o que demonstra que isolados sensíveis resultam em uma maior diversidade genotípica, em termos de MLST, que isolados resistentes [130]. Em nosso estudo, ambas as cepas analisadas possuíam o gene *mecA* de resistência à meticilina o que pode, juntamente com a produção de biofilme, explicar sua presença entre os dois maiores clusters de PFGE.

Desse modo, a habilidade dessas cepas de adquirir genes de virulência e resistência pode fazer com que elas sejam altamente adaptadas ao ambiente hospitalar. Ao mesmo tempo, a produção de biofilme tem sido associada à persistência dessas cepas em aparatos médicos [131].

O *spa typing* das amostras de *S. aureus* analisadas revelou os tipos 2 e 84. Segundo a base de dados encontrada no servidor Ridom para o *spa typing*, o tipo 2 é o terceiro mais encontrado no mundo com uma frequência de 6,8% do total, já tendo sido encontrado em 48 países, demonstrando a alta capacidade de disseminação desses micro-organismos [132]. Assim como em nosso estudo, é mais comumente encontrado em amostras hospitalares, sendo particularmente importante por seu potencial

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 metilina. 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 *hly*).
- O gene *tst* foi encontrado em três amostras de *S. epidermidis*, todas de casos confirmados de ICS.
- O gene codificante da Leucocidina Pantone 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 MaldonadoYA. 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-Maciolek 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. Konemman 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

Anexo I – Parecer do comitê de ética em pesquisa

FACULDADE DE MEDICINA DE
BOTUCATU -UNESP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Danilo Flávio Moraes Riboli

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 24768113.9.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Microbiologia e Imunologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 476.977

Data da Relatoria: 02/12/2013

Apresentação do Projeto:

Os estafilococos coagulase negativos (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 neonatal (UTIN) representar, muitas vezes, uma contaminação ao invés de bacteremia. A contaminação de amostras pode ocorrer no momento da coleta ou durante seu processamento devido à presença ubíqua de *S. epidermidis* na pele de profissionais da saúde. O estudo busca aprofundar o controle das infecções em áreas de cuidados intensivos, sendo fundamental a análise destes micro-organismos através de um processo ativo, contínuo e sistemático para o controle da propagação de clones de espécies de *Staphylococcus* resistentes e virulentas em decorrência de seu impacto negativo na sobrevivência de neonatos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral

Determinar a incidência de infecções em UTI Neonatal por *Staphylococcus* e caracterizar os fatores de virulência de *Staphylococcus* spp. e a prevalência de clones nesta Unidade.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a incidência de infecções por espécies de *Staphylococcus* spp.
- Identificação genotípica de *Staphylococcus* spp. para determinação da espécie pela técnica de

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

CEP: 18.618-970

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU -UNESP



Continuação do Parecer: 476.977

ITS-PCR

- Determinação da resistência à oxacilina pela presença do gene mecA por PCR em tempo real
- Determinação do tipo de SCCmec por PCR multiplex
- Detecção dos genes icaA, icaB, icaC e icaD específicos para produção de biofilme pela técnica de PCR em tempo real
- Detecção dos genes hla, hlb e hld para produção de hemolisinas pela técnica de PCR
- Detecção do gene lukPV da Leucocidina Pantón-Valentine pela técnica de PCR
- Detecção do gene tst da Síndrome do Choque Tóxico pela técnica de PCR
- Detecção dos genes sea, seb, sec e sed que codificam enterotoxinas pela técnica de PCR
- Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em células planctônicas e da concentração bactericida em biofilme (CBB) por microdiluição
- Pesquisa de clones de *S. aureus* e *S. epidermidis* pelas técnicas de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), Multilocus sequence Typing (MLST) e spa typing somente para *S. aureus*.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Adequados à realização da pesquisa. A coleta de sangue é parte da rotina já adotada no hospital e não necessitará de coletas posteriores. Os participantes serão todos os neonatos admitidos na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) no período de Janeiro de 2014 a Dezembro de 2014 que possuírem hemocultura positiva para *Staphylococcus* spp.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa que visa uma tese de doutorado em Biologia Geral e Aplicada, com orçamento no valor de R\$ 10.000,00 (dez mil reais) e contará com financiamento próprio. O estudo é de interesse científico e atende às normas éticas em vigor em nosso país. O TCLE foi escrito em linguagem clara e acessível na forma de convite.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador anexou no rol dos documentos obrigatórios: (a) TCLE em linguagem simples e na forma de convite aos responsáveis pela criança; (b) termo de compromisso da Resolução 466/12; (c) Termo de entrega do relatório final; (d) Declaração do Chefe do Departamento de Microbiologia e Imunologia; (e) Declaração do Vice-diretor do Instituto de Biociências; (f) Declaração para consulta a prontuários e material humano;

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

FACULDADE DE MEDICINA DE
BOTUCATU -UNESP



Continuação do Parecer: 476.977

Recomendações:

Aprovar sem a necessidade de envio ao CONEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião do CEP de 02 de Dezembro de 2.013, sem necessidade de envio à CONEP.

Ao Final deste projeto os pesquisadores devem encaminhar ao CEP o respectivo Relatório Final de Atividades.

BOTUCATU, 03 de Dezembro de 2013

Assinador por:
Trajano Sardenberg
(Coordenador)

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

CEP: 18.618-970

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

Anexo II – Protocolo ICS e dados clínicos

PROTOCOLO DE INFECÇÃO DA CORRENTE SANGUÍNEA

Nome: _____ RG: _____ Data do nascimento: ____/____/____

Sexo: ☐ M ☐ F Idade gestacional: _____ Peso ao nascer: _____

Procedência da criança: _____

Duração da hospitalização (dias): _____

Internação na UTI: _____ Duração (dias): _____

Cateterização: _____

Data da cateterização: _____ Data da remoção do cateter: _____ Duração (dias): _____

Causas da remoção do cateter: _____

Ventilação mecânica: _____ Nutrição parenteral: _____

Idade na ocasião da coleta da hemocultura: _____

Quadro clínico ao coletar a hemocultura ou uma semana após coleta:

- | | | |
|---|---|---|
| ☐ Instabilidade térmica (<36°C, >37,5°C) | ☐ Bradicardia (<100bpm) | ☐ Apnéia |
| ☐ Intolerância alimentar | ☐ Piora desconforto respiratório | ☐ Intolerância à glicose |
| ☐ Instabilidade hemodinâmica/Choque | ☐ Hipoatividade/Letargia | ☐ Piora RX |
| ☐ Piora exames Hemograma/PCR | ☐ Aumento da necessidade de parâmetros ventilatórios/ concentração de O ₂ | |

Exame/Hemocultura: _____ Data: _____ Resultado: _____

Sepse: ☐ Sim ☐ Não Etiologia: _____

Antibióticos: Sim ☐ Qual: _____ Período: _____
Não ☐