



unesp

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

Instituto de
Biotecnologia



Comparação de Métodos de Detecção de Biofilme em Estafilococos
Coagulase-Negativa Provenientes de Infecções em Recém-Nascidos

ADILSON DE OLIVEIRA

ORIENTADORA: PROF^a. DRA. MARIA DE LOURDES RIBEIRO DE SOUZA DA CUNHA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biotecnologia, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia de Parasitas e Microrganismos (BPM)

**BOTUCATU – SP
2009**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Comparação de Métodos de Detecção de Biofilme em Estafilococos
Coagulase-Negativa Provenientes de Infecções em Recém-Nascidos

ADILSON DE OLIVEIRA

MARIA DE LOURDES RIBEIRO DE SOUZA DA CUNHA
ORIENTADOR

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia de Parasitas e Microrganismos (BPM)

BOTUCATU – SP
2009

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha esposa **Silvia Helena**, filhas **Flávia e Lisandra** que sempre me incentivaram na busca do crescimento pessoal e profissional, agradeço também pela paciência e colaboração durante todo esse período.

Aos meus pais **Sebastião** (em memória) e **Luzia**, que dentro de suas possibilidades, sempre procuraram fazer o melhor por mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado força e determinação, e pelas minhas viagens sempre seguras,

À minha orientadora Prof^a. Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha, pela paciência comigo durante o curso, pelos ensinamentos e colaboração,

Às amigas Valéria Catanelli Pereira, Eliane Pessoa da Silva, Eliane (enfermagem), Nathalíe Gaebler, Mariana, Letícia T. Pazzini, Deise Ustulin, e Cristiane Melissa Tomazini, e aos amigos André Martins, Jackson Batalha, Marcos Vinícius Pimenta e Carlos Henrique Camargo pela solidariedade que tiveram comigo na execução do trabalho e pelos bons momentos que vivenciamos juntos,

Aos professores Ary Fernandes Jr., Eduardo Bagagli, Josias Rodrigues, Vera Lúcia M. Rall, Terue Sadatsune e Maria de Fátima Sugizaki, pelo incentivo e trocas de experiências,

Aos funcionários Izaltino Onório de Oliveira, Pedro Miguel Oyan Filho, Luiz Alquati, Ademival Antonio de Almeida e Luiz Severino dos Santos, pela amizade e ajuda que sempre dispensaram a mim,

As secretárias Sonia Maria Faraldo e Leonice Aparecida Garcia pela presteza no atendimento,

Aos funcionários da seção de pós-graduação Maria Helena de Godoy, Sérgio Primo Vicentini, Luciene de Cássia Jaron e Herivaldo Mota dos Santos pelo bom atendimento durante o curso,

Ao Prof. Dr. José Eduardo Corrente e Giovana Fumes pela realização dos testes estatísticos,

Aos meus colegas de trabalho Sr. Ivan Regis Montanholi, Sra Hilda Paschoalinotto, Sra. Angela Cristina Rossi de Oliveira e Sra.Cláudia Paes de Oliveira pelo incentivo, compreensão e colaboração,

As professoras Tatiana Maria Nege, Silvia Elena Piovezana de Camargo e Lupércia Ranzani Galli, pela ajuda no esclarecimento de dúvidas no inglês e português,

As supervisoras Sra. Maria Manoela Maschieto, Sra. Maria José dos Santos e a Sra. Lígia Aparecida Dorigo Roder (Seção Finanças), pelo bom atendimento prestado,

Ao apoio financeiro da Fapesp e da Secretaria de Estado da Educação de São Paulo, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho,

A todos que de uma forma ou de outra, não menos importante que ninguém, estiveram comigo durante esse período.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO GERAL	11
OBJETIVOS	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
ARTIGO I	27
<i>Resumo</i>	28
<i>Abstract</i>	29
INTRODUÇÃO	30
MATERIAIS E MÉTODOS	32
<i>Amostras</i>	32
<i>Identificação de estafilococos coagulase-negativa</i>	32
<i>Estudo da produção de biofilme</i>	33
<i>Pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em tubo de borossilicato</i>	33
<i>Pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em placa de Poliestireno</i>	34
<i>Pesquisa da produção de biofilme pelo método do Ágar Vermelho Congo (CRA)</i>	37
<i>Deteção de genes icaA, icaC e icaD específicos para produção de biofilme</i>	38
<i>Extração do ácido nucléico</i>	38
<i>Amplificação do ácido nucléico (PCR)</i>	38
<i>Visualização dos produtos amplificados</i>	39
<i>Análise Estatística</i>	39
RESULTADOS	40
<i>Amostras</i>	40
<i>Identificação de Staphylococcus coagulase-negativa</i>	41
<i>Estudo da produção de biofilme</i>	43
<i>Deteção dos genes icaA, icaC e icaD específicos para a produção de biofilme</i>	43
<i>Estudo da produção de biofilme pelo método de aderência em tubo de borossilicato</i>	45
<i>Estudo da produção de biofilme pelo método de aderência em placa de poliestireno</i>	46
<i>Estudo da produção de biofilme pelo método do Ágar Vermelho Congo (CRA)</i>	49
<i>Comparação entre os métodos para deteção de biofilme em ECN</i>	51
DISCUSSÃO	52
CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

ARTIGO II	66
<i>Resumo</i>	<i>67</i>
<i>Abstract</i>	<i>69</i>
INTRODUÇÃO	71
<i>Material e Métodos</i>	<i>73</i>
<i>Amostras.....</i>	<i>73</i>
<i>Critérios de inclusão.....</i>	<i>73</i>
<i>Critérios de exclusão.....</i>	<i>74</i>
<i>Identificação de estafilococos coagulase-negativa.....</i>	<i>74</i>
<i>Deteção dos genes icaA, icaC e icaD específicos para produção de biofilme através da técnica de PCR</i>	<i>75</i>
<i>Extração do ácido nucléico.....</i>	<i>75</i>
<i>Amplificação do ácido nucléico (PCR).....</i>	<i>75</i>
<i>Visualização dos produtos amplificados.....</i>	<i>76</i>
<i>Relevância Clínica</i>	<i>76</i>
<i>Análise Estatística.....</i>	<i>78</i>
RESULTADOS.....	79
<i>Amostras.....</i>	<i>79</i>
<i>Identificação dos estafilococos coagulase-negativa</i>	<i>79</i>
<i>Relevância Clínica</i>	<i>81</i>
DISCUSSÃO.....	86
CONCLUSÃO	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

RESUMO

Os estafilococos coagulase-negativa (ECN) estão entre os microrganismos mais envolvidos em infecções nosocomiais, principalmente em recém-nascidos (RN) prematuros e de baixo peso. Entre os fatores de risco para infecções por esses agentes, a produção de um polissacarídeo extracelular e a conseqüente formação do biofilme, permitindo aderência às superfícies plásticas e lisas de cateteres e outros dispositivos médicos desempenham um papel importante. Uma coleção de 100 amostras de ECN, sendo 50 isoladas de pontas de cateteres e 30 de hemoculturas obtidas de RN da Unidade Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP e 20 obtidas de fossas nasais de portadores saudáveis foi analisada quanto à produção de biofilme pelos métodos do tubo (TM), ágar vermelho congo (CRA) e através do método quantitativo de aderência a placa de poliestireno (TCP). Esses métodos foram comparados com a pesquisa dos genes *icaA*, *icaD* e *icaC* envolvidos na produção de biofilme em ECN. Das 100 amostras de ECN estudadas, 82% foram positivas pela técnica de PCR, 82% pelo método do tubo, 81% pelo método da placa de poliestireno e 76% pelo CRA. O método de aderência ao tubo (TM) foi o teste que mostrou resultados mais confiáveis, com uma sensibilidade e especificidade de 100% e boa concordância quando comparado a técnica de PCR. Com o objetivo de determinar o papel do biofilme como fator de risco na ocorrência de infecções em RN, 130 amostras de estafilococos coagulase-negativa (ECN) isoladas de recém-nascidos (RN) internados na Unidade Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu foram identificadas e classificadas em significativas e contaminantes, baseado em dados clínicos e laboratoriais obtidos dos prontuários dos RN. Foram pesquisados fatores perinatais de risco para infecção, evolução clínica dos RN e antibioticoterapia, além da detecção de genes responsáveis pela produção de biofilme em ECN. Das 130 amostras de ECN estudadas, 66 (50,8%) foram classificadas como clinicamente significativas, e 64 (49,2%) como contaminantes. Os resultados não mostraram diferença na detecção de genes para produção de biofilme nas amostras de ECN isoladas dos RN do grupo com infecção (81,8%) e sem infecção (84,3%), embora 11 (91,7%) de 12 crianças que foram a óbito associado à ECN, estavam infectadas com amostras positivas para a presença desses genes. Dos 54 RN com infecção por ECN, 45 (83,3%) eram prematuros, e 33 (61,1%) com peso ao nascimento ≤ 1.500 g. A

maioria dos RN com infecção por ECN estava submetida a procedimentos invasivos como uso de cateter (85,2%), nutrição parenteral (61,1%) e ventilação mecânica (57,4%). *S. epidermidis* foi a espécie mais isolada (81,5%), e mais associada com infecção (86,3%) do que com contaminação (76,5%). A maioria dos recém-nascidos com infecção por ECN apresentou fatores que contribuem para a instalação desses microrganismos e desenvolvimento da infecção, incluindo o peso de nascimento \leq 1.500g, complicação de cateter, uso de dreno e a antibioticoterapia prévia. A identificação de espécies de ECN é um importante marcador de infecção, visto que o *S. epidermidis* foi o agente etiológico mais frequentemente isolado e associado aos processos infecciosos, o que se faz necessário a detecção precisa desses microrganismos quando do seu isolamento a partir de sangue e corpos estranhos de recém-nascidos, realizando um exame criterioso dos dados clínicos e laboratoriais desses pacientes, com a finalidade de determinar a relevância clínica das amostras.

Palavras-chave: Biofilme; Estafilococos Coagulase-negativa; Fatores de risco, Infecção; Métodos fenotípicos; PCR.

ABSTRACT

Coagulase-negative staphylococci (CNS) are most often associated with nosocomial infections, especially in premature and under weight newborns. The most important pathogenic factor of these microorganisms is the production of extracellular polysaccharide and the consequent formation of biofilm which facilitates their adherence to the surfaces of catheters and other medical devices. A total of 100 clinical isolates of coagulase-negative staphylococci (CNS) isolated from infected medical devices received from the Neonatal Unit, University Hospital, Botucatu Medical School, including 50 isolated from catheter tips, 30 from blood cultures, and 20 collected from the nasal cavity of healthy subjects were investigated in order to evaluate the efficiency of three phenotypic methods of detection of biofilm formation, and also analyze the *icaA*, *icaD* and *icaC* genes, using the PCR method. The clinical isolates were screened by tissue culture plate (TCP), Tube method (TM), and Congo Red Agar (CRA) method. Of the 100 tested isolates, 82% were positive in the PCR method; in the TM, 82%; in the TCP assay, 81%; and 76% in CRA method. The method of adherence to the test tube was shown that more reliable results, with a sensitivity and specificity of 100% and good agreement when compared with the PCR technique. In order to determine the role of biofilm as a risk factor in the occurrence of infections in newborns 130 clinical isolates of CNS were identified and classified as *significant* and *contaminant*, based on clinical data obtained from the patients' reports. Perinatal risk factors for infection, clinical evolution and antibiotic therapy for the newborns were studied, as well as the detection of the genes responsible for the production of biofilm in CNS. Of the 130 clinical isolates of CNS, 66 (50.8%) were classified as clinically significant and 64 (49.2%) as contaminant. There was no difference between the CNS isolates of the

infected group of newborns (81.8%) and the non-infected group (84.3%) in relation to the detection of biofilm producers, although 11 (91.7%) of 12 who died during the study were infected with positive samples for the presence of these genes. Of the 54 newborns infected by CNS, 45 (83.3%) were premature and 33 (61.1%) weighted ≤ 1500 g at birth. Invasive procedures were performed on the majority infected babies, such as the use of catheters (85.2%), parenteral nutrition (61.1%) and mechanical ventilation (57.4%). The clinical isolates of *S. epidermidis* (81.5% of the total isolates) showed a closer association with infection (86.3%) than with contamination (76.5%). The majority of the babies with infection caused by CNS showed factors that contribute for the installation of the CNS, causing infection. These factors include weight at birth ≤ 1500 g, catheter complications, use of surgical drain and previous antibiotic therapy. The identification of CNS species is an important infection marker, considering fact that *S. epidermidis* was the more frequent etiologic agent isolated and associate with infectious process, is necessary a accurate detection this microorganism when isolated from blood cultures and medical devices of the newborns, doing a discerning research of the clinical information and laboratory this patients, to determine the clinical relevance.

Key-words: Biofilm, Coagulase-negative Staphylococci, Risk Factors, Infection, Phenotypic methods, PCR.

INTRODUÇÃO GERAL

Os estafilococos estão entre os mais freqüentes microrganismos isolados em microbiologia médica (1). Atualmente o gênero *Staphylococcus* é composto por 41 espécies e 24 subespécies, que se distribuem amplamente na natureza, fazendo parte da microbiota normal da pele do homem e de outros animais (2). Pertencem à família Staphylococcaceae, são cocos Gram-positivos formando agrupamentos semelhantes a cachos de uvas, catalase positivos, e divididos em dois grupos com base na produção da enzima coagulase (3).

Entre os coagulase-positivos, a espécie *Staphylococcus aureus* é a mais conhecida e estudada por produzir muitas toxinas que contribuem para a virulência dessa bactéria, aumentando sua habilidade de invadir o corpo e danificar os tecidos, provocando infecções superficiais como foliculite e abscessos, até infecções sistêmicas. Esses microrganismos também são importantes patógenos envolvidos em infecções nosocomiais, principalmente as relacionadas ao uso de corpos estranhos e pacientes imunocomprometidos (4,5).

Nas duas últimas décadas os estafilococos coagulase-negativa (ECN) foram reconhecidos como agentes de doenças humanas. Embora tenham sido descritas várias espécies de ECN, entre as mais comuns envolvidas em infecções humanas estão o *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. xylosus*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. simulans* e *S. caprae* (6).

Bacteremias causadas por ECN são comuns em neonatos, pacientes com câncer e pacientes internados em UTI e que normalmente estão com o sistema imunológico comprometido. Estas infecções geralmente estão associadas ao uso ou implantes de dispositivos médicos. Os cateteres vasculares são as principais portas de entrada por serem facilmente colonizados por microrganismos que fazem parte da microbiota normal da pele e mucosas. Em relação aos recém-nascidos muitos outros fatores perinatais de risco contribuem para a infecção desses agentes como o baixo peso ao nascimento, idade gestacional; ruptura prolongada de membrana (maior que 24 horas); ventilação mecânica; procedimentos cirúrgicos; diálise; nutrição parenteral; antibioticoterapia prévia e também a não remoção do corpo estranho durante o episódio de infecção (7).

O *S. epidermidis* é a espécie de ECN isolada com maior freqüência (50% a 80%). Durante anos esses microrganismos foram considerados como saprófitas,

entretanto, atualmente tem se destacado como principal causador de infecções nosocomiais, principalmente em recém-nascidos com baixo peso, pacientes imunocomprometidos e internados em UTI e que geralmente fazem uso de dispositivos médicos (8). As infecções produzidas por esses microrganismos incluem endocardite de válvulas cardíacas naturais e protéticas, infecções relacionadas com cateteres endovenosos, peritonite associada a cateteres para diálise peritoneal, bacteremia, osteomielite, infecções de feridas e infecções de próteses articulares e outros implantes ortopédicos (9,1).

Um passo importante no desenvolvimento de infecções associadas a dispositivos médicos é a aderência e a fixação dessas bactérias em superfícies de biomateriais (9,7,10). Entre os vários mecanismos envolvidos na adesão bacteriana, a produção de substância extracelular de natureza polissacarídica chamada limo, parece desempenhar um papel relevante (9,11). O limo forma um biofilme sobre as superfícies plásticas que contém várias camadas de bactérias. Esse mecanismo é considerado o principal fator de virulência dos ECN, pois protege esses microrganismos da ação de antibióticos administrados para tratar essas infecções, sendo muitas vezes necessário a remoção do corpo estranho para obter a cura. (12,8). Assim, ao que tudo indica as infecções pelos ECN estão relacionadas com as condições do paciente e a produção desse polissacarídeo extracelular (13,9).

De modo geral, vários fatores influenciam nos mecanismos de aderência bacteriana, como o efeito do substrato, as características do meio e as propriedades da superfície celular. De acordo com Von Eiff *et al.* (14), fenômenos físico-químicos atuam na adesão bacteriana aos materiais de implantes. Por exemplo, as forças relacionadas à superfície do material como a de van de Waals, eletrostáticas, tensão superficial e de hidrofobicidade superficial.

Quando um determinado material é implantado num indivíduo os fluídos corpóreos como as proteínas do soro e plaquetas passam a recobri-lo, o que modifica as propriedades das superfícies facilitando a aderência bacteriana (14,15).

A formação do biofilme ocorre em estágios, sendo o primeiro, a fixação da bactéria ao material, o segundo a formação de vários grupos de células de multicamadas com aderência célula-célula, e o terceiro estágio, também chamado de fase de “acúmulo”, é quando depois de fixadas, as bactérias começam a se multiplicar e formam inúmeras camadas, onde, após o biofilme formado, ocorre a liberação das células bacterianas para o meio (9,14).

A fixação dos ECN direto ao material plástico não revestido é dependente das propriedades físico-químicas da superfície bacteriana e plástica. Sendo a superfície plástica hidrofóbica, o principal parâmetro que determina a adesão bacteriana é também o nível hidrofóbico da superfície bacteriana. Já no caso da superfície do polímero estar recoberta pela camada protéica, ocorre uma interação do *S. epidermidis* com ela através de diferentes moléculas de superfície. A proteína FBE (“*Fibrinogen-binding*”) encontrada na superfície de *S. epidermidis*, está envolvida na ligação dessas bactérias com o fibrinogênio. No segundo estágio da formação do biofilme, ocorre a multiplicação dos ECN na monocamada de células fixadas ao plástico ou no hospedeiro. Para formar as camadas bacterianas, as células vão se ligando umas as outras através do PIA (polissacarídeo de adesão intercelular) uma molécula polissacarídica que favorece a adesão entre as células (9,14,16). O PIA está localizado na superfície celular, é um homopolímero linear de até 130 resíduos de β -1-6-N-acetilglicosamina, composto por duas frações polissacarídicas: polissacarídeo I (>80%) com 15 a 20% dos resíduos diacetilados e, portanto carregados positivamente e polissacarídeo II (< 20%) estruturalmente relacionado ao polissacarídeo I, mas com baixa quantidade de resíduos D-glicosamina não N-acetilados e contém fosfato e éster ligado a succinato, sendo aniônica (17,9).

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 (Figura1). Assim que ocorre a ativação deste *operon*, são codificadas quatro proteínas necessárias para a síntese do PIA que são IcaA, IcaD, IcaB e IcaC (18,19,16, 20).



Figura 1 – Organização genética do *operon ica*

O PIA é sintetizado a partir de UDP-N-acetilglicosamina por uma enzima N-acetilglicosaminatransferase, a qual é codificada pelo locus de adesão intercelular (*ica*), em particular pelo *icaA*. A expressão única deste gene induz uma baixa atividade enzimática produzindo baixa quantidade do polissacarídeo, entretanto a expressão simultânea do *icaA* e do *icaD* promovem um aumento significativo da N-acetilglicosaminatransferase, que atua formando oligômeros com 10-20 resíduos aproximadamente de β -1,6-N-acetilglicosamina (21,18). O gene *icaC* quando expresso concomitantemente com o *icaA* e *icaD*, induz a síntese de oligômeros mais longos com 130 resíduos. O gene *icaB* não tem ainda função estabelecida (Figura 2) (22,14).

Estudos sobre a estrutura dos biofilmes mostraram que estes são formados por células microbianas e substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que corresponde de 50% a 90% do carbono orgânico total destes, porém, o biofilme pode apresentar certas particularidades de acordo com os microrganismos que o compõe (23). Hussain *et al.* (24), demonstraram que o limo que forma o biofilme de *Estafilococcus coagulase-negativa* apresenta um ácido teicóico misturado a pequenas quantidades de proteínas. Devido o hidrogênio presente na estrutura do EPS apresentar uma alta afinidade pela água estes se tornam altamente hidratados.

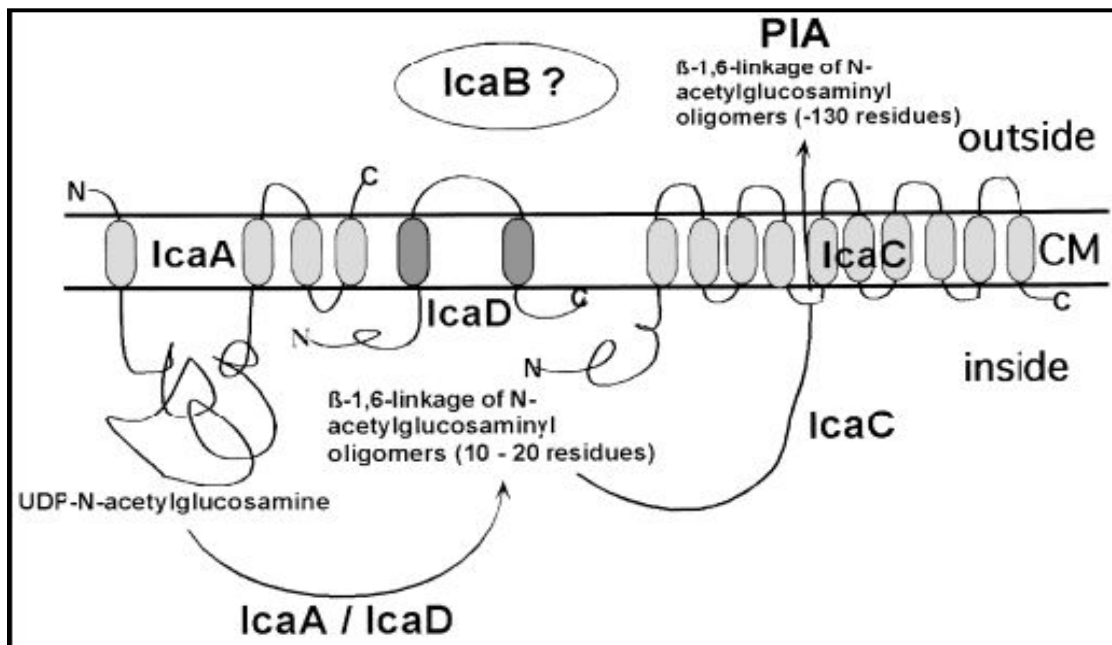


FIGURA 2 – Modelo de biossíntese de PIA.

IcaA e *IcaD* sintetizam oligômeros derivados de UDP-N-acetilglicosamina formando oligômeros com 10-20 resíduos. Na presença de *IcaC*, oligômeros mais longos são formados com 130 resíduos que reagem com dois anti-soros específicos para PIA. Devido à similaridade da sequência com diacetilases, *IcaB* pode catalisar a reação de diacetilação. CM, membrana citoplasmática.

Adaptado de Heieman *et al.* (1996), Gerke *et al.* (1998)

Segundo Sutherland (26), a composição e estrutura dos polissacarídeos podem determinar sua configuração primária. Muitos EPS bacterianos possuem estruturas de sustentação contendo resíduos de hexose β -1,3 ou β -1,4 com tendências mais rígidas, e em certos casos solúveis ou até insolúveis em água.

Os genes que codificam os fatores de virulência do *S. epidermidis*, bem como o operon *ica*, aparentam estar sob regulação dos sistemas regulatórios globais *agr* e *sar*, semelhante a formas que ocorrem em *S. aureus* (27). Um dos mecanismos que vem se mostrando extremamente importante na formação e desenvolvimento de biofilmes é a comunicação interbacteriana, este mecanismo é chamado de “*quorum sensing*”, através do qual as bactérias são capazes de controlar todo o processo, desde

a formação do biofilme até sua liberação para o meio (28). Esses microrganismos podem mudar o seu comportamento de acordo com as condições do ambiente, como alta osmolaridade, pH e níveis de oxigênio, sendo capazes de se comportarem de forma coordenada permitindo que uma população inteira realize uma função em resposta a uma necessidade da colônia. A comunicação bactéria-bactéria, denominada de *quorum-sensing* é baseada em moléculas sinalizadoras, chamadas auto-indutores, dessa forma regulam seu comportamento de acordo com a densidade populacional. Se estiverem em pequeno número a concentração de moléculas auto-indutores não é detectada, porém, em uma alta densidade populacional, a concentração dessas moléculas alcança um nível suficiente para fazer com que as células respondam ao estímulo, ativando ou reprimindo genes-alvo, expressando seus fatores de virulência no momento certo e garantindo a eficiência do ataque conjunto (16,29).

Após muitos estudos para entender a estrutura dos biofilmes e das vantagens que ele proporciona para as bactérias e também do comportamento e envolvimento dos ECN na formação destes, fizeram com que os ECN fossem reconhecidos como patógenos, especificamente relacionados à sepse hospitalar pelo uso de cateter, sendo a aderência a superfícies de polímeros e a conseqüente formação do biofilme um pré-requisito para o desenvolvimento de infecções (18). O biofilme é considerado um importante fator de virulência, e a capacidade de produção deste, por esses agentes está entre as causas que explicam a colonização de aparelhos médicos e possíveis infecções por *Staphylococcus* (15,12).

Davenport (30) num estudo com ECN produtores e não produtores de biofilmes, verificaram que, utilizando-se de antibioticoterapia, somente 32% das infecções causadas por linhagens produtoras de biofilme foram resolvidas, enquanto que nas linhagens não produtoras a cura foi obtida em 100% dos casos .

Uma outra vantagem que o biofilme traz para a bactéria, é que o polissacarídeo que o compõe, também desempenha funções biológicas importantes, como a inibição da proliferação de linfócitos T e monócitos periféricos por indução da produção de prostaglandina E₂, interferência sobre a blastogênese das células B e na produção de imunoglobulinas e coagulação (31). Essa substância inibe a quimiotaxia dos leucócitos polimorfonucleares, por induzir a degranulação destas, inibindo as atividades metabólicas dependentes do oxigênio que normalmente ocorrem durante a fagocitose e subseqüente morte intracelular, interferindo nas

interações das opsoninas de superfície das células bacterianas que constituem um pré-requisito para processamento pelas células fagocitárias, dessa forma, acaba por influenciar a opsonização e a fagocitose de modo adverso (32,33).

As amostras de ECN produtoras de biofilme têm sido isoladas mais frequentemente de pacientes com sepse do que de pacientes sem doença invasiva, indicando o risco de doença invasiva em pacientes portadores de ECN produtores de biofilme (34). Dados similares aos obtidos por esses autores foram observados por Cunha *et al.* (7), onde se encontrou uma frequência significativamente maior de linhagens de *S. epidermidis* produtoras de biofilme isoladas de hemoculturas (20,4%) e de corpos estranhos (21,9%) do que de secreções. Esses autores também mostraram uma maior proporção de *S. epidermidis* positivos para a produção de biofilme e clinicamente significativas isoladas a partir de corpos estranhos (29,4%), do que de secreções (0,0%).

Em outro estudo realizado por Cunha *et al.* (10), esses autores verificaram que a produção do biofilme foi um fator independente associado com a não resolução de casos de peritonites causados por ECN em pacientes submetidos a diálise peritoneal ambulatorial contínua (CAPD), sendo que as peritonites causadas por ECN não produtores de biofilme apresentaram chance de cura 27 vezes maior do que nos episódios causados pelas amostras de ECN biofilme positivas. Entretanto, Cunha *et al.* (2006), observaram que uma pequena proporção de linhagens produtoras desse exopolissacarídeo (22,2%), esteve associada a processos infecciosos em recém-nascidos. Outros autores relataram a falta de evidência do biofilme como fator de risco na ocorrência de infecções (35,36). Kotilainem (36), num estudo para avaliar a importância da produção do biofilme como um fator de virulência das linhagens envolvidas na sepse, relata que a produção do biofilme é um importante fator de virulência, porém deve haver outros fatores que contribuam para a patogenia desses microrganismos.

A produção de biofilme pode também variar nas diferentes espécies sendo esta característica mais freqüente entre linhagens *S. epidermidis*, *S. lugdunensis* e *S. hominis* (28,10).

Em relação à detecção da produção de biofilmes, atualmente são utilizados diversos métodos na área médica, dentre eles os visuais através da microscopia eletrônica utilizando diversos tipos de microscópio eletrônico (ME). A microscopia eletrônica é utilizada até hoje para o exame e caracterização de biofilmes em

aparelhos médicos e em infecções humanas e por apresentar excelente propriedade de resolução, constitui-se numa importante ferramenta para a pesquisa de biofilme (23).

Porém, na rotina são utilizados os métodos qualitativos como o do tubo (TM) Christensen *et al.* (37), o método do Ágar Vermelho Congo (CRA) descrito por Freemam *et al.* (38) e o método quantitativo da placa de cultura de tecido (TCP) descrito por Christensen *et al.* (39). Ainda em complemento a esses métodos são utilizados os moleculares como a reação da polimerase em cadeia (PCR), que amplificam genes envolvidos na produção do biofilme.

Em relação aos métodos qualitativos, o mais comumente usado é o método do tubo (TM) descrito por Christensen *et al.* (37). Vários autores utilizaram esse método obtendo resultados confiáveis, e mostrando ser eficiente com excelente sensibilidade e adequada especificidade, fornecendo diagnóstico confiável e adequado para uso em rotina (11,40,16).

Em estudo para a avaliação da confiabilidade de três métodos para detecção de biofilmes em *S. aureus*, o método TCP, TM e o CRA, Knobloch *et al.* (4), relataram que o TM, teve uma boa correlação com o TCP para linhagens que eram fortes produtoras de biofilme. Já o exame no CRA teve uma baixa correlação com o TM e o TCP.

Resultados similares foram obtidos por Mathur *et al.* (41), num estudo para detecção da formação do biofilme entre os isolados clínicos dos *Staphylococcus*, fazendo uma avaliação de três métodos de seleção diferentes, incluindo o TM, CRA e o PCT. Os autores relataram que o TCP foi muito satisfatório em relação aos fenótipos positivos do biofilme, sendo fácil distinguir entre os fortes, moderados, fracos ou quando nenhum biofilme foi detectado. O TM correlacionou bem com o TCP. Já o CRA não se correlacionou bem com nenhum dos métodos anteriores. Com esse trabalho os autores concluíram que o TCP foi o método mais sensível, o mais exato e com boa reprodutibilidade para a detecção da formação do biofilme por *Staphylococcus* e com a vantagem de ser quantitativo para o estudo da aderência dos *Staphylococcus* em dispositivos médicos. Também em estudo realizado por Gelosia *et al.* (42) para detecção de fatores de virulência em *S. epidermidis* o TCP apresentou uma ótima correlação com a PCR.

Arciola *et al.* (27,43) relataram que a comparação da classificação de cor no CRA com a detecção dos genes pelo PCR mostrou uma boa correlação entre os dois métodos. Altoparlak *et al.* (44) utilizaram o teste CRA para detecção de biofilmes e os resultados apresentaram dois tipos de coloração bem definidas, preta para as amostras produtoras de biofilme e vermelha para as não produtoras. Entretanto, em outro estudo realizado por Arciola *et al.* (43) para a detecção dos cinco genes do locus *ica* em *S. epidermidis* em comparação com o CRA, foram observados 5 amostras negativas para o CRA que apresentavam todos os genes *ica*. Em adição, em estudo realizado por Chaieb *et al.* (45) o CRA não apresentou uma boa correlação com a PCR. Das 32 amostras estudadas, 6 de coloração bordô e 1 de coloração vermelha que seriam negativas para o CRA, apresentaram o gene *icaA e D* e uma de coloração quase preta, que deveria ser positiva para o CRA, não apresentou o gene *icaA e D*.

Considerando que linhagens de ECN produtoras de biofilme apresentam potencial para aderência a dispositivos médicos, esse trabalho tem como objetivos a detecção da produção de biofilme em amostras de ECN isoladas de materiais clínicos de recém-nascidos da Unidade Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu utilizando métodos fenotípicos e a pesquisa dos genes *icaA*, *icaC* e *icaD* pela técnica de PCR, bem como o estudo dos fatores de risco para a ocorrência de infecções associadas a esses microrganismos.

OBJETIVOS

- Identificar amostras de Estafilococos Coagulase-negativa (ECN) isoladas de materiais clínicos de recém-nascidos da Unidade Neonatal do HC da Faculdade de Medicina de Botucatu,
- Detectar a produção de biofilme em amostras de ECN através dos métodos fenotípicos de aderência ao tubo de borossilicato (TM), Ágar Vermelho Congo (CRA) e de aderência a placa de poliestireno (TCP),
- Detectar através da técnica de PCR os genes *icaA*, *icaC* e *icaD*, responsáveis pela produção de biofilme em ECN,
- Verificar o papel do biofilme na ocorrência de infecções causadas por ECN em recém-nascidos,
- Verificar o papel dos fatores de risco do hospedeiro na ocorrência de infecções causadas por ECN,

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Becker K., Bierbaum G., Von-Eiff C., Engelmann S., Götz F., Hacker J., Hecker M., Peters G., Rosenstein R., Ziebuhr W. (2007) Understanding the physiology and adaptation of staphylococci: A post-genomic approach. *Int J Med Microbiol* doi: 10.1016/j.ijmm.2007.04.004.

- 2 Euzéby J.P. (2008) List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature, skooao pann.

- 3 Whitener C. Caputo G.M., Weitekamp M.R., Karchmer A.W. (1993) Endocarditis due to coagulase-negative staphylococci: microbiologic, epidemiologic, and clinical considerations. *Infect Dis Clinics North America* **7**:81-96.

- 4 Knobloch J. K.M., Horstkotta M.A. Rodhe H., Mack D. (2002) Avaliação de diferentes métodos de detecção de formação de Biofilme no *S. aureus*. *Med Microbiol Imunol* 191:101-6.

- 5 Cramton S.E., Ulrich M., Götz F., Döring G. (2001) Anaerobic Conditions Induce Expression of Polysaccharide Intercellular Adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **69**:4079-85.

- 6 Kloos W.E., Bannerman T.L. (1995). *Staphylococcus* and *Micrococcus*, p. 282-98. In: Murray, P. R., Baron, E.J., Tenover, F.C., and Tenover, F.C., and Tenover, F.C., and Tenover, F.C., and Tenover, F.C., and Tenover, F.C., and Tenover, F.C., and Tenover, F.C., and Tenover, F.C., and Tenover, F.C. (eds), *Manual of clinical microbiology*, ASM Press Washington, D.C.

- 7 Cunha M.L.R.S., Lopes C.A.M., Rugolo L.M.S.S., Chalita L.V.A.S. (2002) Clinical significance of coagulase-negativa Staphylococci from neonates. *J Pediatr (RJ)*, **78**:279-88.

- 8 Klingenberg C., Aarag E., Ronnestad A., Sollid J.E., Abrahamsen M.D Kjeldsen G., Flaegstad T. (2005) Coagulase-Negative Staphylococcal Sepsis em Neonates – Association Between Antibiotic Resistance, Biofilm Formation and the Host Inflammatoty Response. *The Ped Infec Dis* **24**:817-22.

- 9 Vuong C., Otto M. (2002) *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microb Infect* **4**:481-89.
- 10 Cunha M.L.R.S., Caramori J.C.T., Fioravante A.M., Batalha J.E.N., Montelli A.C., Barretti P. (2004) Significance of slime as virulence factor in coagulase-negative staphylococcus peritonitis in CAPD. *Perit Dial Int* **24**:191-93.
- 11 Arciola CR., Campoccia D., Gamberini S., Cervel-Lati M, Dontati, E Montanaro L. Detection of slime Production by means of na optimized Congo red agar plate based on a Colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus. *Biomaterials* 2002 **23**:4233-39.
- 12 Costa F.S., Miceli M.H, Anaissie E.J. (2004) Mucosa or Skin as source of coagulase-negative staphylococcal bacteremia. *Clin Infect Dis* **4**:278-86.
- 13 Goldmann D.A., Pier G.B. (1993) Pathogenesis of infections related to intravascular catheterization. *Clin Microbiol* **6**:176-92.
- 14 Von Eiff C., Peters G., Heilmann C. (2002) Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect Dis* **2**:677-85.
- 15 Alcaraz L.E., Satorres S.E., Lucero R.M., Centrorbi O.N.P (2003) Species identification, slime production and oxacilin susceptibility in coagulase-negative staphylococci isolate from nosocomial specimens. *Braz J Microbiol* **34**:45-51.
- 16 Morales M., Mendez-Alvarez S., Martin-Lopes J.V, Marreiro C., Freytes C.O. (2004) Biofilm: the microbial “bunker” for intravascular catheter-related infection. *Support Care Cancer* **12**:701-07.
- 17 Murga R., Forster T.S., Brown E., Pruckler J.M., Fields B.S., Donlan R.M. (2001) The role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable water system. *Microbiology* **147**:3121-26.
- 18 Gotz F. *Staphylococcus* and biofilms. (2002) *Mol. Microbiol.* **43**:1367-78.

- 19 Cafiso V., Bertuccio T., Santagati M., Campanile F., Amicosante G., Perilli M.G., Selan L., Artini M., Nicoletti G., Stefani S. (2004) Presence of the *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. *Clin Microbiol Infect* **10**:1081-88.
- 20 Nilsson-Augustiinsson A., Claesson C., Lindgren P.E., Lundqvist-Gustafsson H., Ohman L. (2005) Adherence of *Staphylococcus epidermidis* to extracellular matrix proteins and effects of fibrinogen-bound bacteria on oxidase activity and apoptosis in neutrophils. *APMS* **113**: 361-73.
- 21 Dobinski S., Bartscht K., Mack D. (2002) Influence of Tn917 insertion of transcription of the *icaADBC* operon in six biofilm-negative transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis*. *Plasmid* **47**:10-17.
- 22 Gerke C., Kraft A., Sussmuth R., Schweitzer O., Gotz F. Kraft A., Sussmuth R., Schweitzer O., Gotz F. (1998) Characterization of the *N-acetylglucosaminyltransferase* activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesion. *J Biol Chem* **273**:18856-93.
- 23 Donlan M.R. (2002) Biofilm: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* **8**:881-90.
- 24 Hussain M., Hastings J.G.M., White P.J. (1991) Isolation and Composition of the Extracellular Slime Made By Coagulase-negative Staphylococci in a Chemically defined Medium. *Infect Dis* **163**:534-41.
- 25 Heilmann C., Gerke., Perdreau-Remington F., Gotz F. (1996) Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation *Infect Immun* **64**:277-82.
- 26 Sutherland I.W. (2001) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* **147**:3-9.

27 Arciola CR., Campoccia D., Gamberini S., Cervel-Lati M, Dontati E, Montanaro L. (2002) Detection of slime Production by means of an optimized Congo red agar plate based on a Colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus. *Biomaterials* **23**:4233-39.

28 Davey, M.E., O' Toole G.A. (2000) Biofilms: From ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**:867.

29 Trabulsi L.R., Alterthum F., Martinez M.B., Campos L.C., Gompertz V., Fischman O., Rácz M.L. (2005) *Microbiologia* 4^a ed.- São Paulo: Editora Atheneu p.163-68.

30 Davenport D.S, Masanari, R.M, Pfaller, M.A, Bale M.J, Hierholzer W.J. (1986) Usefulness of a test for slime production as a marker for clinically significant infections with coagulase-negative staphylococci. *J Infect Dis* **153**:332-39.

31 Bykowska K., Ludwicka A., Wegrzynowicz Z., Lopaciuk S., Kopeć M. (1985) Anticoagulant properties of extracellular slime substance produced by *Staphylococcus epidermidis*. *Thromb Haemost.* **54**:853-56.

32 Jansen B., Schumacher-Perdreau F., Peters G. (1989) New aspects in the pathogenesis and prevention of polymer-associated, foreign-body infection caused by coagulase-negative staphylococci. *J Invest Sur* **2**:361-80.

33 Ferguson D.A. JR., Veringa E.M., Mayberry, W.R., Overbeek B.P. Lambe DW Jr. Verhoef J. (1992) *Bacteroides* and *Staphylococcus* glycoalyx: chemical analysis and the effects on chemiluminescence and chemotaxis of human polymorphonuclear leucocytes. *Microbios* **69**:53-65.

34 Stoll B.J., Hansen N., Fanaroff A.A., Wright L.L. (2002) Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatric* **110**:285-91.

- 35 Christensen D., Baddour M., Simpson W.A. (1987) Phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* slime production in vitro and in vivo. *Infect Immun* **55**:2870-77.
- 36 Kotilainen P. (1990) Association of coagulase-negative staphylococcal slime production and adherence with the development and outcome of adult septicemias. *J Clin Microbiol* **6**:2779-85.
- 37 Christensen G.D., Simpson W.A., Bisno A.L., Beachey E.H. (1982) Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun* **37**:318-26.
- 38 Freeman D.J., Falkner, F.R., Keane C.T. (1989) New methodo for detecting slime production by coagulase-negative Staphylococci. *J Clin Pathol* **42**:872-74.
- 39 Christensen G.D., Simpson W.A., Yonger J.J., Baddor L.M., Barrett F.F., Melton D.M., Beachey E.H. (1985) Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices. *Journ Clin Microbiol* **22**: 996-06.
- 40 Cunha M. L. R. S., Caramori J.C.T., Lopes C.A.M. (2006) Study of virulence factors in coagulase-negative staphylococci isolated from newborns. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **101**:661-68.
- 41 MATHUR T., Singhal S., Klan S., Upadhyay D.J., Fatma T., Rattan A. (2006) Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci*: An evaluation of three different screening method. *Indian J Med Microbiol* **24**:25-29.
- 42 Gelosia A. Baldassari L., Deighton M., Van Nguyen T. (2001) Phenotypic and genotypic markers of *Staphylococcus epidermidis* virulence. *Clin. Microbiol. Infect.* **7**:193-99.
- 43 Arciola C.R., Campoccia D., Baldassari L., Donati M.E., Pirini V., Gamberini Simonetta G., Montanaro L. (2005) Detection of biofilm formation in

Staphylococcus epidermidis from implant infections. Comparison of a PCR-method that recognizes the presence of *ica* genes with two classic phenotypic methods. Wiley InterScience DOI: 10.1002/jbm.a.30552

44 Altoparlak U., Kadanali A., Celebi S. (2004) Slime factor positivity in coagulase negative staphylococci isolate from nasal samples of haemodialysis patients. J Clin Pract **58**:1112-14.

45 Chaieb K., Mahdouani K., Bakhrouf A. (2005) Detection of *icaA* and *icaD* loci by polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needles in a dialysis unit. Journ Hosp Infect **61**:225-30.

ARTIGO I

O artigo foi descrito de acordo com as normas de publicação da Revista Científica Microbiology and Immunology.

Título: Comparação de métodos para detecção de Biofilme em Estafilococos Coagulase-Negativa

Adilson de Oliveira, Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP.

E-mail: Adilson de Oliveira – adilsonoliveiralp@ig.com.br; Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha – cunhamlr@ibb.unesp.br.

Autor correspondente: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, Caixa Postal 510, CEP 18618-000.

RESUMO

Uma coleção de 80 amostras de estafilococos coagulase-negativa (ECN) isoladas de materiais clínicos, provenientes de recém-nascidos (RN) da Unidade Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu e 20 de fossas nasais obtidas de indivíduos saudáveis, foram estudadas quanto à produção de biofilme, objetivando avaliar três métodos fenotípicos de detecção de biofilmes em ECN e a pesquisa dos genes *icaA*, *icaD* e *icaC* utilizando a técnica de PCR. Foram utilizados os métodos de aderência em placa de poliestireno (TCP), aderência em tubo de borossilicato (TM) e o método do Ágar Vermelho Congo (CRA). Das 100 amostras de ECN estudadas, 82% foram positivas pela técnica de PCR, 82% pelo método do tubo, 81% pelo método da placa de poliestireno e 76% pelo CRA. Feita a comparação dos métodos utilizados, tendo por referência o PCR, observamos que o método que melhor se correlacionou com a pesquisa dos genes *ica*, foi o método de aderência em tubo de borossilicato, apresentando melhor sensibilidade e especificidade. O método do tubo pode ser indicado para o uso de rotina para a pesquisa de biofilme por ECN por ser fácil, rápido, apresentar um baixo custo e principalmente por garantir resultados confiáveis com ótima sensibilidade e especificidade.

Palavras-chave: Biofilme; Estafilococos Coagulase-negativa; Fatores de risco, Infecção; Métodos fenotípicos; PCR

ABSTRACT

A total of 80 clinical isolates of coagulase-negative staphylococci (CNS) isolated from infected medical devices received from the Neonatal Unit of Hospital das Clínicas (Faculdade de Medicina de Botucatu) and 20 clinical isolates collected from the nasal cavity of healthy subjects were investigated in order to evaluate the efficiency of three phenotypic methods of detection of biofilm formation, and also analyze the *icaA*, *icaD* and *icaC* genes, using the PCR method. The clinical isolates were screened by tissue culture plate (TCP), Tube method (TM), and Congo Red Agar (CRA) method. Of the 100 tested isolates, 82% displayed a biofilm-positive phenotype in the PCR method; in the TM, 82%; in the TCP assay, 81%; and 76% in CRA method. Once the three methods were compared, it was observed that the TM was the most sensitive and specific in terms of analyzing the *ica* genes. Our data indicates that the Tube method is an accurate and reproducible method for screening and this technique can serve as a reliable tool for determining biofilm formation by clinical isolates of staphylococci, once it is also a fast, easy and low-cost method.

Key-words: Biofilm, Coagulase-negative Staphylococci, Risk Factors, Infection, Phenotypic methods, PCR.

INTRODUÇÃO

Os Estafilococos coagulase-negativa (ECN), são os mais frequentes microrganismos envolvidos em infecções nosocomiais em neonatos. Essas infecções, geralmente estão associadas ao uso de cateteres e outros dispositivos médicos (1). O aumento no uso de dispositivos médicos teve impacto considerável dos estafilococos na medicina moderna. A capacidade de aderir à superfícies poliméricas e a consequente formação do biofilme, é considerado o principal fator de virulência dos ECN, principalmente do *S. epidermidis*, a espécie mais frequentemente isolada.

O biofilme protege os ECN da ação de antibióticos, administrados para tratar essas infecções e também do sistema imune do paciente, sendo muitas vezes necessário a remoção do corpo estranho para obter a cura (2,3). Assim, ao que tudo indica as infecções pelos ECN estão relacionadas com as condições do paciente e a produção desse polissacarídeo extracelular (4,5).

O biofilme consiste de camadas de células agrupadas e embutidas numa matrix de um polissacarídeo extracelular, denominado *polysaccharide intercellular adhesin* (PIA), composto por β -1,6 N-acetilglicosamina, e sintetizado pela enzima N-acetilglicosaminiltransferase (6). É funcional na adesão célula-célula, sendo essencial para a acumulação do biofilme pelos ECN, principalmente na maioria das linhagens clínicas de *S. epidermidis* (7).

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 (8,9,10). O PIA é sintetizado a partir de UDP-N-acetilglicosamina por uma enzima N-acetilglicosaminatransferase, a qual é codificada pelo locus de adesão intercelular (*ica*), em particular pelo *icaA*. A expressão única deste gene induz uma baixa atividade enzimática produzindo baixa quantidade do polissacarídeo, entretanto a expressão simultânea do *icaA* e do *icaD* promovem um aumento significativo da N-acetilglicosaminatransferase, em consequência o aumento da quantidade do polissacarídeo, formando oligômeros com 10-20 resíduos aproximadamente de β 1,6-N-acetilglicosamina (11,12). O gene *icaC*, quando expresso concomitantemente com o *icaA* e *icaD*, induz a síntese de oligômeros mais longos com 130 resíduos. A proteína transcrita por *icaB* provavelmente é uma proteína secretora que aparenta não estar envolvida na biossíntese do PIA (13,14).

Em relação à detecção da produção de biofilmes, atualmente são utilizados diversos métodos nas áreas médicas, dentre eles, os visuais através da microscopia eletrônica (ME) utilizando diversos tipos de microscópios. Para a caracterização de biofilmes em aparelhos médicos e em infecções humanas e por apresentar excelente propriedade de resolução, a ME constitui-se numa importante ferramenta para a pesquisa de biofilme (15). Porém, na rotina dos laboratórios são utilizados os métodos qualitativos como o do tubo (TM) descrito por Christensen *et al.* (16), o método do Ágar Vermelho Congo (CRA) descrito por Freeman *et al.* (17) e o método quantitativo da placa de cultura de tecido (TCP) descrito por Christensen *et al.* (18). Complementando esses métodos, são utilizados os moleculares, como a reação da polimerase em cadeia (PCR), que amplificam genes envolvidos na produção do biofilme.

Esse estudo objetivou estudar amostras de estafilococos coagulase-negativa (ECN) isoladas de materiais clínicos provenientes de recém-nascidos (RN) da Unidade Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu e de fossas nasais, obtidas de indivíduos saudáveis, quanto à produção de biofilme, por três métodos fenotípicos e a pesquisa dos genes *icaA*, *icaD* e *icaC* utilizando a técnica de PCR.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

Foram estudadas 100 amostras de estafilococos coagulase-negativa (ECN), sendo, que 80 foram isoladas de materiais clínicos provenientes de recém-nascidos internados na Unidade Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu e 20 provenientes das fossas nasais de portadores saudáveis. Linhagens de referência internacional foram utilizadas como controle, incluindo *S. epidermidis* ATCC 12228 e *S. warneri* ATCC 10209, não produtoras de biofilme (controle negativo) e *S. epidermidis* ATCC 35984, *S. simulans* ATCC 27851 e *S. xylosus* ATCC 29979 produtoras de biofilme (controle positivo).

Identificação de estafilococos coagulase-negativa

Os isolados, obtidos a partir de espécimes clínicos foram semeados em ágar sangue e corados pelo método de Gram, objetivando-se sua pureza e a observação de sua morfologia e coloração específica. Após a confirmação dessas características, as linhagens foram submetidas às provas de catalase e coagulase. O gênero *Staphylococcus* foi diferenciado de *Micrococcus*, com base na prova de oxidação e

fermentação da glicose e pela resistência à bacitracina (0,04 U), indicada pela ausência de halo de inibição ou formação de halo de até 9 mm e pela sensibilidade à furazolidona (100 µg) caracterizada por halos de inibição de 15 a 35 mm de diâmetro (19).

Para a identificação dos ECN, foi utilizado o esquema simplificado proposto por Cunha *et al.* (20), o qual estabelece a realização de testes de utilização de açúcares: xilose, sacarose, trealose, manitol, maltose, e frutose, caracterização de hemolisinas, urease, ornitina decarboxilase e resistência à novobiocina. Posteriormente à confirmação da espécie as linhagens foram conservadas em Caldo nutriente com glicerol a - 20°C e a - 70°C.

Estudo da produção de biofilme

Pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em tubo de borossilicato (Christensen *et al.* 1982).

Na pesquisa da produção de biofilme efetuada pelo método de Christensen *et al.* (16), as colônias isoladas de estafilococos coagulase-negativa em ágar sangue, foram inoculadas em tubos de 12,0 x 75,0 mm contendo 2,0 ml de caldo Trypticase Soja (TSB - Difco) e incubadas a 37°C por 48h, sem agitação. Posteriormente, o conteúdo foi desprezado e alíquotas de 1,0 ml de solução aquosa a 0,4% de azul de tripan (Sigma) foram adicionadas em cada tubo. Após suave agitação, para garantir a coloração do material aderido à superfície interna dos tubos, o corante foi desprezado. O resultado positivo foi indicado pela presença de uma camada de material corado, aderido à parede interna dos tubos. A presença de um anel corado

somente na superfície de contato líquido-ar, não foi considerada como resultado positivo.

Pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em placa de Poliestireno (Christensen *et al.* 1985) modificado

O método da pesquisa da produção de biofilme em placas de cultura proposto por Christensen *et al.* (18), foi utilizado com algumas modificações. Este método apresenta bases espectrofotométricas, baseando-se na leitura da densidade óptica (DO) do material aderente produzido pela bactéria.

Foram utilizadas culturas em TSB, incubadas por 24 horas e posteriormente diluídas a 1:1 com TSB, preparado com 2% de glicose. Foram utilizadas placas previamente esterilizadas de 96 cavidades com fundo plano (Costar, modelo 3599 fabricado pela *Corning Incorporated*). Os poços foram preenchidos em quaduplicata com 200µl da cultura diluída, utilizando pipeta multicanal. Em todos os testes foram utilizados uma amostra como controle positivo, uma como controle negativo e uma com TSB estéril. As placas foram incubadas por 24 horas à 37°C e posteriormente o conteúdo de cada poço foi aspirado cuidadosamente utilizando-se pipeta multicanal, e então, lavados quatro vezes com 200µl de tampão fosfato salina (PBS), pH 7,2. A secagem da placa foi realizada em temperatura ambiente por 1 hora. A seguir, os poços foram corados com cristal violeta a 2% por um minuto, em seguida, o volume foi aspirado e o excesso de corante retirado através de uma lavagem das placas com água destilada utilizando-se de pipeta multicanal. A seguir, foi feita a secagem das placas em temperatura ambiente por 60 minutos e realizada a leitura da densidade óptica no leitor de Elisa, da marca Labssystem modelo Multiskan EX. Uma vez, que

não dispúnhamos do filtro de 570 nm, utilizado no estudo de Christensen (18), adaptamos a técnica a dois novos filtros, de comprimento de onda, 492nm e 540nm, próximos ao recomendado. Após esta primeira leitura, as placas foram preenchidas com etanol 95% e após 5 minutos o conteúdo foi transferido para novas placas e estas submetidas à leitura.

Para determinação do ponto de corte foi utilizado o mesmo procedimento descrito acima com uma placa inteira contendo TSB estéril. Após a leitura foi determinado a média (M) e o desvio padrão (DP) da placa seca e com etanol nos dois comprimentos de onda (Tabela 1).

Tabela 1 Valores de média e desvio padrão para o cálculo do ponto de corte.

Leitor de Elisa (nm)	Placa Seca - Diluição		Placa com Etanol	
	1:1		95%	
Filtro	492	540	492	540
Média	0,077	0,084	0,075	0,288
Desvio Padrão	0,012	0,009	0,012	0,087

Para calcular o ponto de corte, foi utilizado o procedimento recomendado por Christensen *et al.* (18), multiplicou-se o desvio padrão por três e adicionou o valor da média da densidade óptica da amostra de TSB estéril no mesmo comprimento de onda segundo fórmula descrita abaixo:

$$(\text{Ponto de corte} = \text{DP} \times 3 + \text{M da DO do TSB estéril})$$

As amostras foram classificadas em três categorias:

- **Não aderente (NA)**, DO igual ou menor que o ponto de corte,

- **Fraco aderente (FRA)**, DO maior que o ponto de corte ou igual ou menor que o dobro desse valor,
- **Forte aderente (FOA)**, DO maior que o dobro do ponto de corte.

Tabela 2 Valores do ponto de corte

Resultado*	Filtro 492nm Placa Seca	Filtro 540nm Placa Seca	Filtro 492nm Placa etanol 95%	Filtro 540nm Placa etanol 95%
NA	$\leq 0,116$	$\leq 0,111$	$\leq 0,111$	$\leq 0,549$
FRA	$>0,116$ ou $\leq 0,232$	$>0,111$ ou $\leq 0,222$	$>0,111$ ou $\leq 0,222$	$>0,549$ e $\leq 1,098$
FOA	$> 0,232$	$>0,222$	$> 0,222$	$> 1,098$

* NA- Não aderente; FRA- Fraco aderente; FOA- Forte aderente

Para verificar qual foi o melhor procedimento para essa metodologia (Placas secas ou com etanol e o melhor filtro para a leitura), foram calculadas a sensibilidade e especificidade para cada experimento. As amostras foram classificadas como negativas, quando o valor do ponto de corte correspondia à classificação de não aderente e em positivas, quando o valor do ponto de corte correspondia à classificação de fraco aderente ou forte aderente. A sensibilidade e especificidade para cada situação foi calculada utilizando a técnica de PCR como parâmetro, em relação a presença dos genes *icaA* e *icaD* ou *icaADC* concomitantes.

Pesquisa da produção de biofilme pelo método do Ágar Vermelho Congo (CRA) de Freeman *et al.* (1989)

A caracterização fenotípica da produção de biofilme foi estudada pela cultura de amostras de ECN em placas de Ágar Vermelho Congo (CRA) proposto por Freeman *et al.* (17). Todas as amostras foram semeadas nas placas contendo o CRA e incubadas aerobicamente por 24 horas à 37°C e subseqüentemente “overnight” a temperatura ambiente. De acordo com o proposto por Freeman *et al.* (17) espécies produtoras de biofilme, formam colônias negras no CRA, enquanto que as não produtoras formam colônias vermelhas.

Para uma afirmação acurada de todas as variações cromáticas exibidas pelas colônias cultivadas, foi utilizada uma escala de referência de cinco cores. As amostras que apresentaram colônias negras em duas tonalidades, preto com aspecto brilhante (PB) e preto com aspecto seco e opaco (PS), foram consideradas como produtoras de biofilme. Por outro lado, as colônias vermelhas (V), rosa (R) e bordô (B), foram classificadas como negativas.

Em alguns casos, surgiram subcolônias de coloração vermelha e bordô no centro das colônias pretas (PB), 48 horas após o cultivo, essas colônias foram removidas e subcultivadas novamente por 24 horas no CRA para a obtenção de isolados puros de variantes produtoras e não produtoras de biofilme. Esses isolados, também foram submetidos aos testes fenotípicos de aderência ao tubo, de aderência a placa de poliestireno e pesquisa dos genes *ica* pela técnica de PCR.

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

Extração do ácido nucléico

O ácido nucléico total foi extraído a partir de linhagens de *Staphylococcus*, cultivadas em ágar sangue e inoculadas individualmente em caldo Infusão de Cérebro e Coração e incubadas a 37°C por 24 h.

A extração foi realizada com o Kit GFX (GE Healthcare), que consistiu na digestão inicial das células de estafilococos com lisozima (10 mg/ml) e proteinase K (20 mg/ml). A seguir, 500 µl da solução de extração foi adicionada à mistura e esta foi centrifugada a 10.000 x g por 4 min. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para a coluna GFX e centrifugado a 5.000 x g por 1 min. O líquido coletado foi descartado e 500 µl de solução de extração, foi adicionado novamente à coluna. Após a centrifugação e descarte do líquido coletado, 500 µl da solução de lavagem foi adicionada à coluna e esta submetida à centrifugação a 20.000 x g por 3 min. A seguir, a coluna foi transferida para um tubo de 1,5 ml e 200 µl de água Milli Q aquecida a 70°C sendo utilizada para a eluição.

Amplificação do ácido nucléico (PCR)

As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 ml em volumes totais de 25 µl contendo 10 pmol de cada oligonucleotídeo (Tabela 3), 2,0 U de Taq DNA polimerase, 100 µM de desoxiribonucleotídeos trifosfatados, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 0,75 mM de MgCl₂ e 3µL de ácido nucléico. A incubação foi realizada em termociclador tipo MJ Research, empregando os parâmetros descritos por Arciola *et al.* (21) que consistiram de: 94°C por cinco minutos para o primeiro ciclo, seguido por 50 ciclos de desnaturação a 94°C por

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

Tabela 3 Oligonucleotídeos utilizados para a detecção dos genes *icaA*, *icaC* e *icaD*.

Oligonucleotídeo	Sequência de nucleotídeos 5'a 3'	Produto amplificado (pb)
<i>icaA1</i>	ACA GTC GCT ACG AAA AGA AA	103
<i>icaA2</i>	GGA AAT GCC ATA ATG AGA AC	
<i>icaC1</i>	TAA CTT TAG GCG CAT ATG TTT	400
<i>icaC2</i>	TTC CAG TTA GGC TGG TAT TG	
<i>icaD1</i>	ATG GTC AAG CCC AGA CAG AG	198
<i>icaD2</i>	CGT GTT TTC AAC ATT TAA TGC AA	

Fonte: Arciola *et al.*, 2005

Visualização dos produtos amplificados

A resolução das amplificações foi observada por eletroforese em gel de agarose 2%, preparado em tampão 0,5 X TBE e corado com brometo de etídeo e fotografados sob transiluminação UV).

Análise Estatística

Os testes de avaliação de sensibilidade e especificidade (22,23), foram embasados na comparação entre os métodos fenotípicos testados na detecção da produção de biofilme e a técnica de PCR, para a detecção dos genes envolvidos na síntese de biofilme; sendo que foram consideradas amostras biofilme positivas, todas aquelas que apresentaram pelo menos dois dos genes pesquisados. Os testes aplicados para a avaliação de sensibilidade e especificidade foram assim descritos:

- Sensibilidade (S): proporção de amostras positivas pela técnica de PCR (detecção dos genes *icaA* e *icaD* ou *icaADC* concomitantes) e que foram positivas nos outros métodos fenotípicos.

- Especificidade (E): proporção de amostras negativas pela técnica de PCR (não detecção dos gene *ica*) e que foram negativas pelos métodos fenotípicos.

Para avaliar a concordância dos testes em relação a presença dos genes *ica*, foi utilizado o teste de análise de concordância – Kappa (24, 25), conforme tabela 4.

Tabela 4 Valores para o teste de concordância Kappa

Valores de Kappa	Interpretação
<0	Não concordância
0-0.19	Pouca concordância
0.20-0.39	Satisfatória concordância
0.40-0.59	Moderada concordância
0.60-0.79	Boa concordância
0.80-1.00	Concordância quase perfeita

Fonte: Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; 33: 159-174)

RESULTADOS

Amostras

Foram estudadas 100 amostras de estafilococos coagulase-negativa (ECN), incluindo 80 amostras isoladas de materiais clínicos provenientes de recém-nascidos internados na Unidade Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu e 20 provenientes

das fossas nasais de portadores sadios. Das 80 amostras isoladas de materiais clínicos, 50 foram isoladas de ponta de cateteres e 30 de hemoculturas.

Identificação de *Staphylococcus* coagulase-negativa

A Figura 1 apresenta os resultados da identificação das 100 amostras de ECN incluídas no estudo. *S. epidermidis* (Figura 2) foi a espécie mais encontrada (81%), seguido por *S. cohnii* (4%), *S. saprophyticus* (4%), *S. warneri* (4%), *S. haemolyticus* (2%), *S. xylosus* (2%), *S. capitis* (2%) e *S. lugdunensis* (1%).

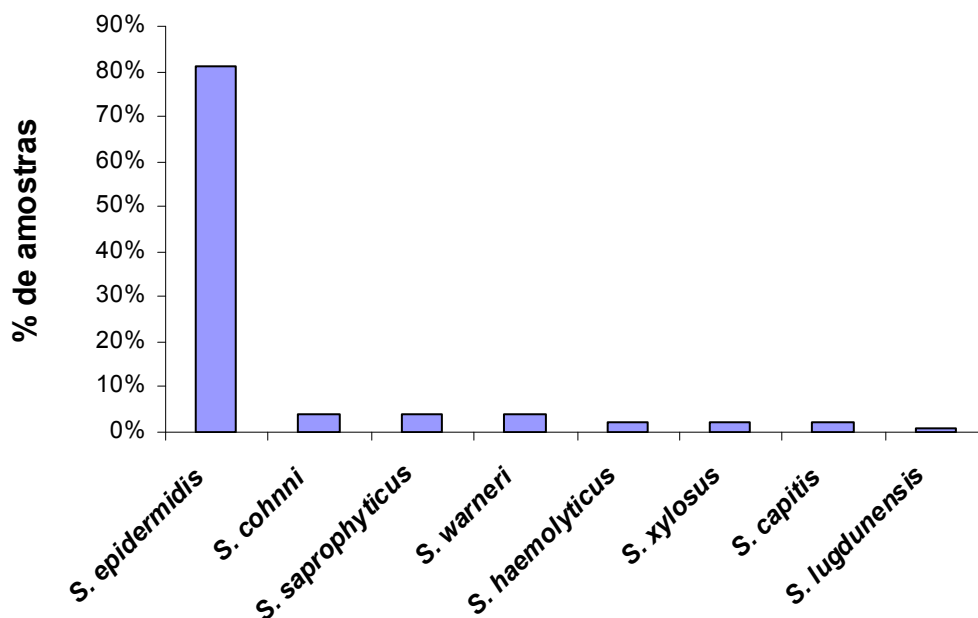


Figura 1 Distribuição das espécies isoladas.

A Tabela 5 mostra a frequência das espécies de ECN de acordo com o material clínico. *S. epidermidis* foi a espécie de ECN isolada com maior frequência dos materiais clínicos (cateter e hemocultura) e das fossas nasais de indivíduos sadios. *S. haemolyticus*, *S. xylosus*, *S. lugdunensis* e *S. capitis*, também foram isoladas dos materiais clínicos, enquanto *S. cohnii*, *S. saprophyticus* foram isolados

das fossas nasais de portadores saudáveis. A espécie *S. warneri*, foi encontrada tanto em hemocultura como nas fossas nasais.

Tabela 5 Frequência de espécies de ECN isolados de acordo com o material clínico

Espécies	Ponta de Cateteres	Hemocultura	Fossas Nasais	Total Geral	Porcentagem (%)
<i>S. epidermidis</i>	45	27	09	81	81
<i>S. cohnii</i>	00	00	04	04	04
<i>S. haemolyticus</i>	01	01	00	02	02
<i>S. saprophyticus</i>	00	00	04	04	04
<i>S. warneri</i>	00	01	03	04	04
<i>S. xyloso</i>	02	00	00	02	02
<i>S. lugdunensis</i>	00	01	00	01	01
<i>S. capitis</i>	02	00	00	02	02
Total	50	30	20	100	100

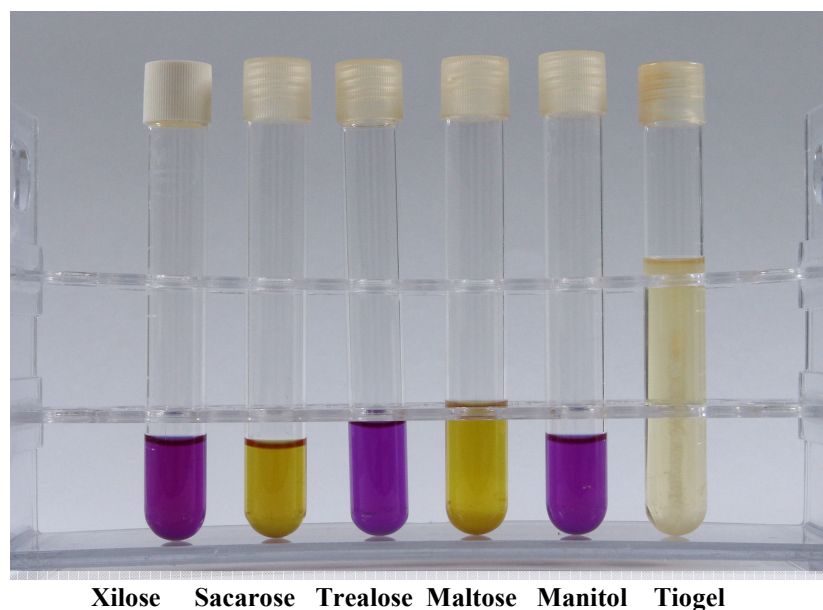


Figura 2. Amostra de *S. epidermidis* identificada pelo Método Simplificado (Cunha *et al.*, 2004).

Estudo da produção de biofilme

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

A presença dos genes *icaA* (103 pb), *icaC* (400 pb) e *icaD* (198 pb) nas amostras de ECN, foi demonstrada pela amplificação dos fragmentos correspondentes (Figuras 3, 4 e 5). Das 100 amostras de ECN estudadas, 40 (40%) apresentaram os genes *icaA* e *icaD* concomitantes e 42 (42%) os genes *icaA*, *C* e *D* concomitantes e 18 (18%) das amostras não apresentaram nenhum dos genes estudados. Com exceção de *S. haemolyticus* e de *S. capitis*, todas as outras espécies de ECN foram positivas para a presença dos genes estudados.

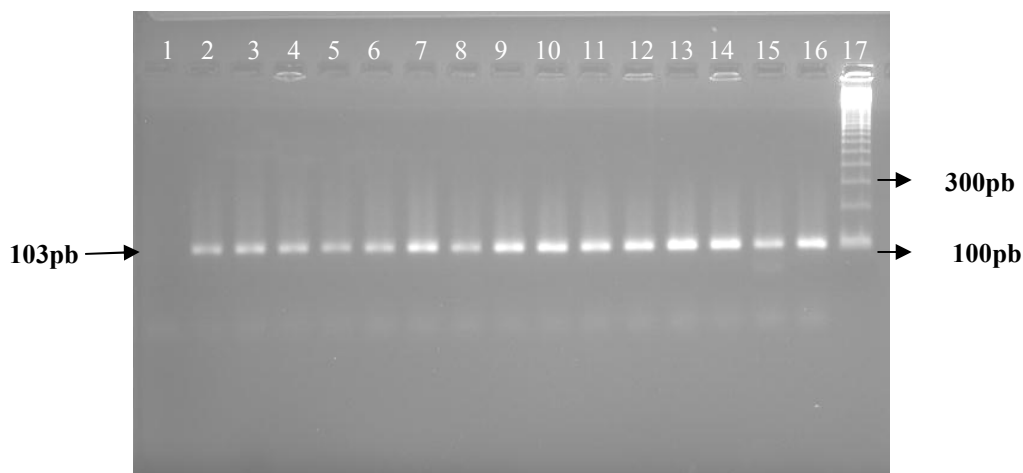


Figura 3 - Eletroforese de gel de agarose 2% corado com Brometo de Etídeo para detecção do gene *icaA* (103 bp). 1: Controle negativo; 2 ao 15 amostras positivas; 16: Controle positivo; 17: Marcador de peso molecular (100 bp).

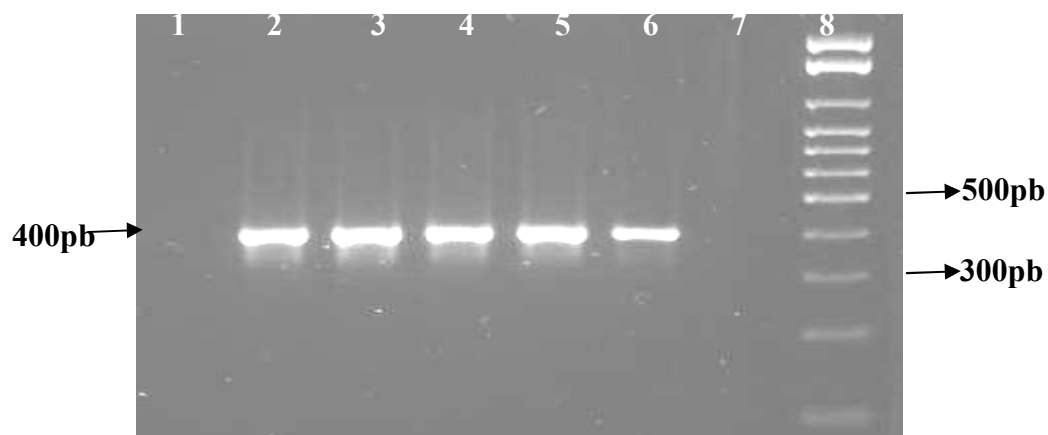


Figura 4: Gel de agarose 2% corado com Brometo de Etídeo, representando a amplificação do gene *icaC* (400 pb). Linha 1: amostra negativa; Linhas 2 a 5: amostras positivas; Linha 6: controle positivo; Linha 7: controle negativo; Linha 8: Marcador de peso molecular (100 pb).

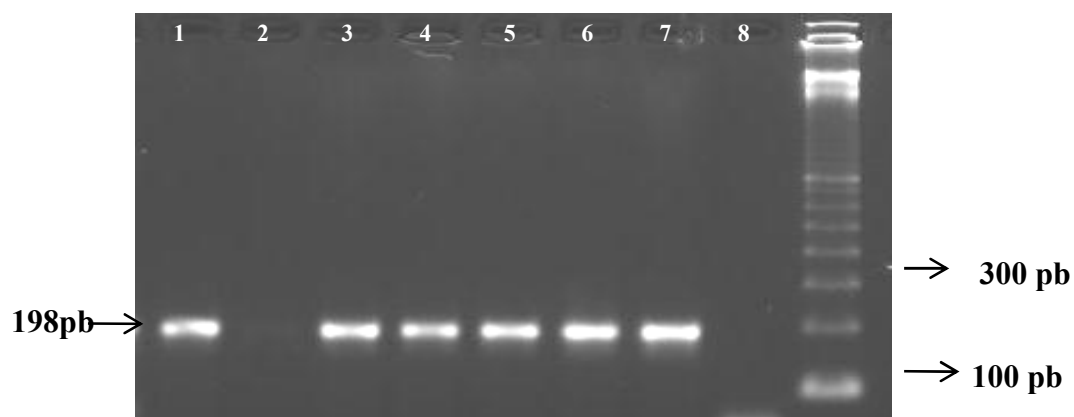


Figura 5: Gel de agarose 2% corado com Brometo de Etídeo, representando a amplificação do gene *icaD* (198 pb). Linhas 1, 3 a 6: amostras positivas; Linha 2: amostra negativa; Linha 7: controle positivo; Linha 8: controle negativo; Linha 9: Marcador de peso molecular (100 pb).

Estudo da produção de biofilme pelo método de aderência em tubo de borossilicato (Christensen *et al.* 1982)

Na pesquisa da produção de biofilme pela técnica de aderência em tubo de borossilicato (Figura 6), foi verificado que das 100 amostras estudadas, 82 foram produtoras de biofilme, sendo 44 amostras isoladas de ponta de cateteres, 23 de hemocultura e 15 de fossas nasais. Com relação à análise de cada espécie, observou-se que 70 (85,4%) amostras de *S. epidermidis* foram positivas. A produção de biofilme também foi verificada em *S. warneri* (4), *S. cohnii* (3), *S. xylosum* (2), *S. saprophyticus* (2) e *S. lugdunensis* (1).

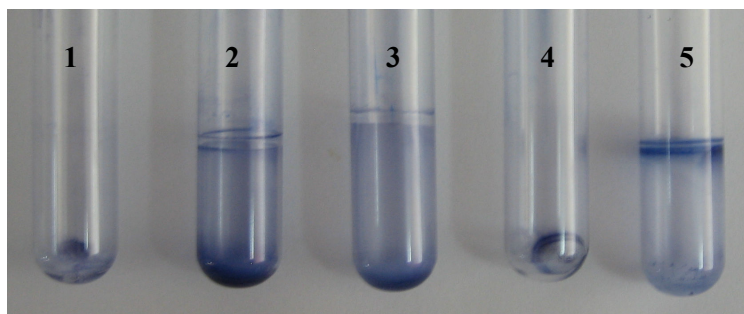


Figura 6 Produção de biofilme pelo método de aderência em tubo em amostras de *Staphylococcus* coagulase-negativa. 1: amostra não produtora de biofilme, 2 e 3: amostras produtoras de biofilme, 4: *S. epidermidis* ATCC 12228 - (controle negativo), 5: *S. xylosum* ATCC - 29979 (controle positivo).

Foi calculada a sensibilidade e especificidade do método de aderência em tubo utilizando a presença do genes *ica* como parâmetro. Os resultados mostraram, que o teste de aderência ao tubo de borossilicato (16) apresentou 100% de

sensibilidade e 100% de especificidade, quando comparado com a técnica de PCR (presença concomitante dos genes *icaA* e *D* ou *icaACD*).

Também foi realizada a análise de concordância dos resultados do teste de aderência ao tubo em relação à presença dos genes *icaA* e *D* ou *icaACD*, e os resultados revelaram uma boa concordância (0,64).

Estudo da produção de biofilme pelo método de aderência em placa de poliestireno (Christensen *et al.* 1985).

O resultado do cálculo da sensibilidade e especificidade para o método de aderência em placa de Poliestireno utilizando as leituras em placas secas e contendo etanol nos filtros de 492nm e 540nm, utilizando a técnica de PCR como parâmetro, mostrou que a leitura realizada em placa seca com o filtro de 540nm, apresentou melhor sensibilidade (96%) e melhor especificidade (94%), portanto foi a escolhida para análise dos resultados (Tabela 6).

Tabela 6 Valores de sensibilidade e especificidade do Método de aderência em placa de poliestireno

Placa/Filtro(nm)	Sensibilidade(%)	Especificidade(%)
Seca – 492	94	94
Seca – 540	96	94
Etanol 95% - 492	90	50
Etanol 95% - 540	90	47

A partir da leitura das placas secas com filtro de 540nm (Figura 7 e 8), foi verificado que das 100 amostras estudadas, 35 (35%) foram classificadas como

fracos aderente e 46 (46%), como fortes aderente, totalizando 81 (81%) de amostras positivas e 19 (19%), como não aderentes. Das 81 amostras positivas, 44 (54,3%) foram obtidas de ponta de cateter, 21 (25,9%) de hemocultura e 16 (19,8%) de fossas nasais. Das 19 amostras negativas, 6 (31,6%) foram de ponta de cateter, 9 (47,4%) de hemocultura e 4 (21,0%) de fossas nasais.

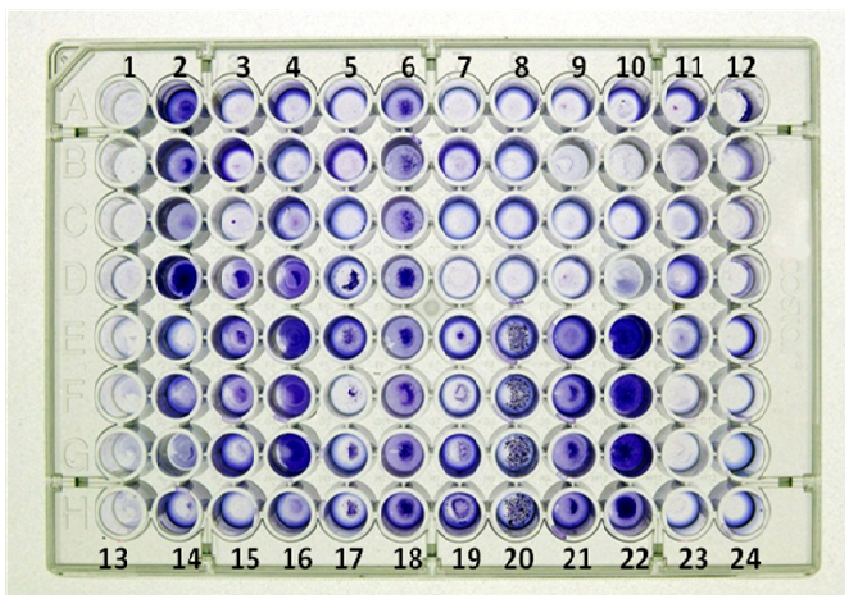


Figura 7 Coluna 1, Linhas A, B, C, D (TSB estéril); Coluna 13, Linhas E, F, G, H *S. epidermidis* ATCC 12228 (Controle Negativo) – Coluna 2, Linhas A, B, C, D *S. xylosus* ATCC 35984 (Controle positivo); Colunas – 3, 7, 8, 10, 11, 17 amostras classificadas como fraco aderente – 4, 6, 14, 15,16, 18, 19, 20, 21, 22 amostras classificadas como fortes aderentes – 5, 9, 12, 23 e 24 amostras não aderentes.

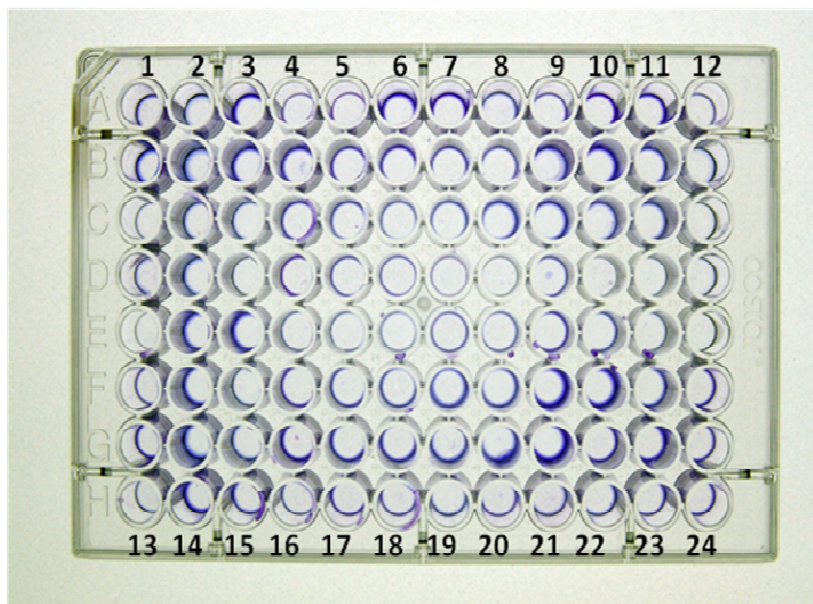


Figura 8 Amostras: 1 a 24 negativas (TSB estéril).

O teste de aderência a placa de poliestireno com leitura no filtro de 540nm, apresentou 96% de sensibilidade e 94% de especificidade para a presença dos genes *icaA* e *D* ou *icaACD* concomitantes, quando comparados com o PCR. Os resultados mostraram uma amostra de fossa nasal falso positiva, sendo classificada como forte aderente, porém, não apresentou nenhum dos genes *ica*, e três amostras de hemoculturas falso negativas, classificadas como não aderentes, porém uma amostra foi positiva para os genes *icaA* e *D* e duas apresentaram os genes *icaACD*.

Também foi realizada a análise de concordância dos resultados do teste de aderência a placa de poliestireno em relação a presença dos genes *icaA* e *D* ou *icaACD*, mostrando uma moderada concordância, com valor de 0,44.

Para confirmar a relação da quantidade de biofilme em relação à presença dos genes *icaACD* concomitantes, foi realizada a comparação dos resultados positivos, classificados como fortes aderente obtidos pela leitura da placa seca no filtro de 540nm, com os resultados obtidos pela técnica de PCR. Os resultados

mostraram que das 46 amostras fortes aderente, 26 (56,5%) apresentaram os genes *icaACD*.

A análise através do teste de concordância, mostrou uma moderada concordância (0,44) entre os resultados das amostras fortes aderente em relação a presença concomitantes dos genes *icaACD*.

Estudo da produção de biofilme pelo método do Ágar Vermelho Congo (CRA) de Arcíola *et al.* (2001)

As linhagens de referência internacional *S. simulans* ATCC 27851 e *S. xylosus* ATCC 29979, utilizadas como controle positivo, exibiram coloração preto brilhante, enquanto *S. epidermidis* ATCC 12228 (controle negativo), apresentou coloração bordô e o *S. warneri* ATCC 10209 (controle negativo) apresentou uma coloração bordô metálica.

Das 100 amostras de *Staphylococcus* coagulase-negativa estudadas, 76 formaram colônias negras no Ágar Vermelho Congo, com 44 amostras revelando coloração preta brilhante e 32 amostras com coloração preta e seca. Os resultados mostraram 24 amostras não produtoras de biofilme (Figuras 9 e 10) variando as colorações entre rosa (2%), vermelha (5%) e bordô (17%). Surgiram duas variantes em colônias pretas (PB), sendo uma com ponto bordô ao centro e outra com ponto vermelho. O centro dessas colônias foi removido e subcultivado novamente por 24 horas no CRA para a obtenção de isolados puros. As subcolônias após isolamento apresentaram-se negativas, com coloração vermelha e bordô, respectivamente. Essas amostras após reisolamento a partir do centro, também foram negativas no teste do tubo, no TCP e não apresentaram os genes *icaADC* pela técnica de PCR.



Figura 9 *S. simulans* ATCC 27851, controle positivo, com coloração preto brilhante no Ágar Vermelho Congo.

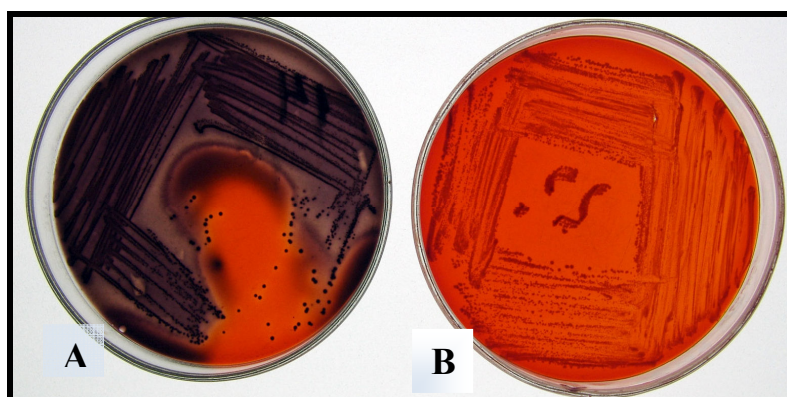


Figura 10 Amostras negativas para produção de biofilme no Ágar Vermelho Congo, A: *S. epidermidis* (Coloração Bordô) e B: *S. cohnii* (Coloração vermelha)

Os resultados revelaram 9 amostras com colônias bordô, consideradas negativas, mas que foram positivas para a presença concomitante dos genes *icaA* e *icaD* ou *icaACD*, consideradas portanto, falso negativas em comparação com a

técnica de PCR. Dessas amostras, duas foram obtidas de hemoculturas e sete de fossas nasais.

O método do Ágar Vermelho Congo apresentou sensibilidade de 89% e especificidade de 100% em comparação com a presença concomitante dos genes *icaA* e *icaD* ou *icaACD*.

A análise estatística através do teste de concordância, mostrou uma moderada concordância (0,44) do CRA com a técnica de PCR.

Comparação entre os Métodos para Detecção de Biofilme em ECN

A Tabela 7 apresenta a comparação entre os métodos fenotípicos, para detecção da produção de biofilme com a presença dos genes *icaA* e *icaD* e/ou *icaACD*.

Tabela 7 Sensibilidade e Especificidade dos Métodos Fenotípicos.

Método		Biofilme positivo	Biofilme negativo	Sensibilidade	Especificidade
Teste do tubo	Aderente	82	0	100%	100%
	Não aderente	0	18		
Teste da placa	Aderente	80	3	96%	94%
	Não aderente	1	16		
Teste CRA	Aderente	73	9	89%	100%
	Não aderente	0	18		

O método fenotípico que revelou melhor sensibilidade (100%) e especificidade (100%) na detecção de biofilme, quando comparado com a técnica de PCR foi o método de aderência em tubo de borossilicato. Esse método também mostrou uma boa concordância com a PCR (0,64). Os demais testes revelaram uma moderada concordância, quando comparados com a técnica de PCR (0,44).

DISCUSSÃO

Atualmente, devido ao grande número de infecções relacionadas a microrganismos produtores de biofilme, faz-se necessário a utilização de uma metodologia confiável para seu diagnóstico.

Neste estudo foram pesquisadas 100 amostras de ECN isoladas de materiais clínicos obtidos de recém-nascidos e de fossas nasais de portadores saudáveis. Os resultados de nossas observações revelaram o *S. epidermidis*, como a espécie mais freqüentemente isolada, tanto de materiais clínicos como de fossas nasais, correspondendo a (81%) do total das amostras. Outras espécies de ECN também foram encontradas, como o *S. cohnii*, *S. saprophyticus*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. xylosum*, *S. capitis* e *S. lugdunensis*. Estudo realizado por outros pesquisadores também revelaram resultados semelhantes (27,28).

O fato do *S. epidermidis* ser a espécie mais freqüentemente isolada na maioria dos estudos, pode ser devido a esses microrganismos possuírem determinados mecanismos, que de alguma forma favoreça a sua adaptação em alguns locais em relação a outros, sendo os mais prevalentes da pele e mucosas dos seres humanos (29).

Os dados obtidos nesse estudo não revelaram diferença em relação à freqüência da produção de biofilme entre os isolados de amostras clínicas e de fossas nasais de portadores saudáveis, em todos os testes utilizados para a pesquisa de biofilme. A produção de biofilme similar em amostras de ECN isoladas de diferentes origens, incluindo espécimes clínicos, ambiente e da microbiota de pessoas saudáveis, também foi relatada por outros pesquisadores (30,28).

No presente estudo, a presença dos genes pesquisados para a produção de biofilme foi demonstrada pela amplificação dos fragmentos correspondentes, *icaA* (103 pb), *icaD* (198 pb) e *icaC* (400 pb). Das 100 amostras de ECN estudadas, 40% apresentaram os genes *icaA* e *icaD* concomitantemente e 42% os genes *icaACD*. Esses resultados, diferiram dos encontrados por Cafiso *et al.* (8) que também pesquisaram a presença dos genes envolvidos na produção de biofilme. Os autores encontraram 35% das amostras isoladas positivas para os genes *icaA* e *icaD* concomitantemente e apenas 4 apresentaram os genes *icaACD*, em algumas amostras foi encontrado apenas o gene *icaD*.

Os resultados obtidos nesse estudo, mostraram que a técnica de PCR foi um método eficiente para a determinação da presença dos genes do *operon ica*. Outros autores também descreveram a PCR, como importante ferramenta na identificação dos genes *ica*, por ser uma técnica simples, rápida e confiável, além de requerer quantidades mínimas de DNA (31,8).

Em referência aos testes fenotípicos, o teste de aderência em tubo de borossilicato (TM), proposto por Christensen *et al.* (16), é o método qualitativo mais comumente usado nos laboratórios na pesquisa de biofilme. Este teste apresenta uma metodologia simples, sendo fácil e rápida a sua execução. Nesse estudo o teste apresentou 100% de sensibilidade e 100% de especificidade, quando comparado com a presença concomitante dos genes *icaA* e *icaD* ou *icaACD* pela técnica de PCR, apresentando uma boa concordância (0,64). Ruzicka *et al.* (32), também relataram boa concordância entre o teste do tubo e a PCR em amostras obtidas de infecções, 62,6% das amostras foram positivas para o *operon ica* e 53,7 das amostras foram produtoras de biofilme pelo teste do tubo.

Em adição, Kotilainem (33) em 1990 utilizando o método do tubo para associar a produção de biofilme por ECN com o desenvolvimento de sepse, relatou que o teste apresentou excelentes resultados. Segundo Morales *et al.* (9) e Cunha *et al.* (34) o teste fornece diagnóstico confiável na detecção de biofilme em ECN e é adequado para uso em rotina.

No presente estudo também foi utilizado o método quantitativo de aderência em placa de poliestireno (TCP) proposto por Christensen *et al.* (18), com modificações. Entre as modificações padronizadas nesse estudo, está o aumento na concentração de glicose no TSB de 0,25% para 2%, o período de incubação de 18h para 24h e as leituras com filtro de 492nm e 540nm em placas secas e lavadas com etanol a 95%. Quando comparadas com a técnica de PCR, as placas secas com leituras no filtro de 540nm apresentaram maior sensibilidade (96%) e maior especificidade (94%). Como foi observado em nosso estudo e também encontrado na literatura (35), a expressão dos genes do *operon ica* é altamente variável, podendo ser induzida por diferentes condições do meio de cultura, como aumento na taxa de açúcar ou outras substâncias que produzem estresse. Em estudo realizado por Mathur *et al.* (36), também foram obtidos resultados melhores com o aumento de glicose no TSB para 1% e o período de incubação para 24h. Quando se adiciona uma grande quantidade de açúcar em um meio colonizado por ECN, ocorre a indução do estresse que estimula a fermentação, aumentando a produção do PIA e em consequência um aumento na produção de biofilme (5).

Os resultados obtidos nesse estudo, revelaram que 81% das amostras foram positivas no teste TCP, com moderada concordância (0,44) quando comparado com o PCR para a presença concomitante dos genes *icaA* e *D* ou *icaACD*. Resultados semelhantes foram obtidos por Arciola *et al.* (37), utilizando o TCP para detecção de

amostras produtoras de biofilme, onde 81,2% de suas amostras foram positivas para o teste.

De acordo com Gerke *et al.* (13) na síntese do PIA, a manifestação do gene *icaD* sozinho não induz atividade enzimática de transferase, enquanto que *icaA* isolado induz pouca atividade. Entretanto, quando *icaA* e *icaD* são expressos conjuntamente, a atividade enzimática da transferase é aumentada, formando oligômeros de UDP-N-acetilglucosamina com 10-20 resíduos, em consequência a produção de uma moderada quantidade de PIA. Entretanto, o gene *icaC* quando expresso conjuntamente com *icaA* e *icaD*, faz acontecer a síntese de oligômeros com 130 resíduos de UDP-N-acetilglucosamina, em consequência uma grande produção de PIA. Para confirmar os dados relatados por esses autores e testar a confiabilidade do método TCP em relação à quantificação da produção de biofilme, foram comparadas as amostras fortes aderentes com a presença concomitante dos três genes *ica* (*ACD*) através da técnica de PCR. Os resultados mostraram, que 56,5% das amostras fortes aderente apresentaram os três genes. A análise através do teste de concordância, mostrou uma moderada concordância (0,44) entre os resultados positivos das amostras fortes aderente com a presença concomitante dos genes *icaACD*.

Em relação à utilização do teste CRA, de acordo com o proposto por Freeman *et al.* (17), espécies produtoras de biofilme formam colônias negras secas no CRA, enquanto que as não produtoras formam colônias vermelhas. Os resultados do presente estudo revelaram diversas cores de colônias nas placas de CRA, mostrando colônias negras com aspecto brilhante ou seco e colônias vermelha, rosa e bordô. Assim, foi necessário adotar uma escala de cinco cores comparando os resultados das placas do CRA com a técnica de PCR com a finalidade de analisar a

variação da coloração das colônias com a presença dos genes *ica*. Dessa forma, foram classificadas as amostras positivas em preto brilhante (PB) e preto seca (PS) e as negativas em vermelha (V), rosa (R) e bordô (B). Em estudos realizados por outros pesquisadores utilizando o CRA, também foram adotados escalas de cores para se obter um melhor diagnóstico, porém com algumas variações nas tonalidades em relação à escala proposta nesse estudo. As amostras positivas foram classificadas como muito negro (vb), negro (b) e quase negro (ab) e as negativas como bordô (brd), vermelho (r) e muito vermelho (vr) (38,39,21).

Também os resultados revelaram em nosso estudo duas variantes de coloração negra, uma com ponto bordô ao centro e outra com ponto vermelho. Essas colônias foram removidas e subcultivadas novamente por 24 horas no CRA para a obtenção de isolados puros. Todas as subcolônias depois de isoladas e novamente semeadas nas placas de CRA apresentaram-se negativas, com coloração bordô e vermelha, respectivamente, e na PCR não apresentaram os genes *icaADC*, semelhante ao achado por Arciola *et al.* (39).

Das 100 amostras testadas nesse estudo utilizando o método CRA, 73% foram positivas, resultados próximos aos encontrados por Cafiso *et al.* (8), onde, 83% de amostras de ECN isoladas de cateteres associadas a infecções foram positivas no CRA. Porém, outros estudos revelaram uma menor taxa de amostras positivas com este teste. Em estudos para detecção de *S. epidermidis* produtores de biofilme em amostras de cateteres (39) e de próteses (21), foram encontrados 49% e 57%, respectivamente de amostras positivas no CRA. Silva *et al.* (27) encontraram apenas 25% de amostras de ECN isoladas de materiais clínicos de RN internados em UTI neonatal produtoras de biofilmes no CRA.

A comparação do teste CRA com os resultados obtidos na PCR revelou 6 amostras de ECN com colônias de cor bordô que foram positivas para a presença concomitante dos genes *icaA* e *icaD* e três para a presença dos genes *icaACD*, sendo portanto falso negativas em comparação com a técnica de PCR. Arciola *et al.* (21) encontraram 8 amostras com variação na coloração de vermelha a bordô, consideradas negativas, porém, todas apresentaram os genes do *operon ica*. Cafiso *et al.* (8) obtiveram 3 amostras de ECN negativas para produção de biofilme no CRA, porém contendo o *operon ica* inteiro. Em outro estudo realizado por Chaieb *et al.* (39), 6 amostras que apresentaram os genes *icaA* e *icaD* pela técnica de PCR também foram negativas no teste CRA. Embora a reação de PCR detecte a presença dos genes contidos nas amostras independentes de sua expressão, as amostras positivas na técnica de PCR, devem ser consideradas com potencial para produção de biofilme.

O teste CRA quando comparado com a presença concomitante dos genes *icaA* e *icaD* ou *icaACD* na PCR, apresentou sensibilidade de 89% e especificidade de 100%. A análise estatística revelou uma moderada concordância (0,44) entre os resultados do CRA com a técnica de PCR. Em pesquisas realizadas por outros autores (40,21,38) o teste CRA mostrou desempenho semelhante ao encontrado nesse estudo. O teste CRA é de fácil e rápida execução em relação aos demais testes fenotípicos, porém, quando comparado com a análise molecular dos genes envolvidos, mostrou-se um pouco impreciso para a determinação de amostras positivas, fato também observado por Fitzpatrick *et al.* (41).

Os dados encontrados nesse estudo demonstram que a presença dos genes de adesão intercelular (*icaACD*) e a conseqüente formação de biofilme é encontrada na maioria das amostras de ECN, podendo facilitar o desenvolvimento de infecções

por se constituir em importante fator por comprometer a atividade do sistema imunológico do paciente e para a falha da antibioticoterapia, contribuindo para a ocorrência de infecções recidivantes e o surgimento de patógenos multi-resistentes.

CONCLUSÃO

S. epidermidis foi a espécie de ECN mais frequentemente isolada de materiais clínicos e de fossas nasais de portadores saudáveis.

Os resultados obtidos não revelaram diferença na produção de biofilme e na presença de genes *ica* entre as amostras de ECN isoladas de espécimes clínicos e de fossas nasais de portadores saudáveis.

A técnica de PCR mostrou ser uma técnica rápida e de fácil execução na detecção dos genes responsáveis pela produção de biofilme.

O teste CRA é um teste de baixo custo, rápido e de fácil execução, porém, apresentou baixa sensibilidade e dificuldade na interpretação dos resultados em função da variação da coloração das colônias das diferentes espécies de ECN.

O teste de aderência à placa de poliestireno (TCP) apresentou uma boa sensibilidade e especificidade. Porém, apresenta dificuldade na reprodutibilidade, é mais demorado e caro, o que dificulta seu uso em rotina.

O método de aderência ao tubo (TM) foi o teste que mostrou resultados mais confiáveis, com uma sensibilidade e especificidade de 100% quando comparado a técnica de PCR e também com uma boa concordância. É um teste fácil e rápido de executar, além de possuir um baixo custo em relação ao demais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 Stoll B.J., Hansen N., Fanaroff A.A., Wright L.L. (2002) Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatric* **110**:285-91.

2 Costa F.S., Miceli M.H. (2004) Anaissie E.J. Mucosa or Skin as source of coagulase-negative staphylococcal bacteremia. *Clin Infect Dis* **4**:278-86.

3 Klingenberg C., Aarag E., Ronnestad A., Sollid J.E., Abrahamsen M.D., Kjeldsen G., Flaegstad T. (2005) Coagulase-Negative Staphylococcal Sepsis em Neonates – Association Between Antibiotic Resistance, Biofilm Formation and the Host Inflammatory Response. *The Ped Infect Dis* **24**:817-22.

4 Goldman D.A., Pier G.B. (1993) Pathogenesis of infections related to intravascular catheterization. *Clin Microbiol* **6**:176-92.

5 Vuong C., Otto M. (2002) *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microb Infect* **4**:481-89.

6 Mack D., Riedewald J., Rohde H., Magnus T., Feucht H.H., Elsner H.Á., Laufs R., Rupp M.E. (1999) Essential functional role of the polysaccharide intercellular adhesin of *Staphylococcus epidermidis* in hemagglutination. *Infect and Immun* **67**: 1004-08.

7 Mack D., Sabottke A., Dobinsky S., Rohde H., Horstkotte M.A., Knobloch J.K.M. (2002) Differential expression of methicillin resistance by different biofilm-negative

Staphylococcus epidermidis transposon mutant classes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46:178-83.

8 Cafiso V., Bertuccio T., Santagati M., Campanile F., Amicosante G., Perilli M.G., Selan L., Artini M., Nicoletti G., Stefani S. (2004) Presence of the *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. *Clin Microbiol Infect* **10**:1081-88.

9 Morales M., Mendez-Alvarez S., Martin-Lopes J.V, Marreiro C., Freytes C.O. (2004) Biofilm: the microbial “bunker” for intravascular catheter-related infection. *Support Care Cancer* **12**:701-07.

10 Nilsson-Augustiinnsson A., Claesson C., Lindgren P.E., Lundqvist-Gustafsson H., Ohman L. (2005) Adherence of *Staphylococcus epidermidis* to extracellular matrix proteins and effects of fibrinogen-bound bacteria on oxidase activity and apoptosis in neutrophils. *APMS* **113**: 361-73.

11 Dobinski, S.; Bartscht, K.; Mack, D. (2002) Influence of Tn917 insertion on transcription of the *icaADBC* operon in six biofilm-negative transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis*. *Plasmid* 47:10-17.

12 Gotz F. *Staphylococcus* and biofilms. (2002) *Mol. Microbiol.* 43:1367-78.

13 Gerke C., Kraft A., Sussmuth R., Schweitzer O., Gotz F. Kraft A., Sussmuth R., Schweitzer O., Gotz F. (1998) Characterization of the *N-*

acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesion. J Biol Chem **273**:18856-93.

14 Von Eiff C., Peters G., Heilmann C. (2002) Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. Lancet Infect Dis **2**:677-85.

15 Donlan M.R. (2002) Biofilm: microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis **8**:881-90.

16 Christensen G.D., Simpson W.A., Bisno A.L., Beachey E.H. (1982) Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. Infect Immun **37**:318-26.

17 Freeman D.J., Falkner, F.R., Keane C.T. (1989) New methodo for detecting slime production by coagulase-negative Staphylococci. J Clin Pathol **42**:872-74.

18 Christensen G.D., SimpsonvW.A., Yonger J.J, Baddor L.M., Barrett F.F., Melton D.M., Beachey E.H. (1985) Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices. Journ Clin Microbiol **22**: 996-06.

19 Baker B.J., Tyson G.W., Goosherst L., Banfield J.F. (1984) Extremely Acidophilic Protists from Acid Mine Drainage Host *Rickettsiales*-Lineage Endosymbionts That Have Intervening Sequences in Their 16S rRNA Genes. Appl. Environ Microbiol doi: 10.1128/AEM. 02500.

20 Cunha M.L.R.S., Caramori J.C.T., Fioravante A.M., Batalha J.E.N., Montelli A.C., Barretti P. (2004) Significance of slime as virulence factor in coagulase-negative staphylococcus peritonitis in CAPD. *Perit Dial Int* **24**:191-93.

21 Arciola CR., Gamberini S., Campoccia D., Visai L., Speziale P., Baldassari L., Montanaro L. (2005) A multiplex PCR method for the detection of all five individual genes of *ica* locus in *Staphylococcus epidermidis*. A survey on 400 clinical isolates from prosthesis-associated infections., doi: 10.1002/jbm.a.30445.

22 Fletcher R.H., Fletcher S.W., Wagner E.H. (1991) Diagnóstico. In: Fletcher, R.H., Fletcher, S.W., Wagner, E.H., eds., *Epidemiologia Clínica*, Porto Alegre: Artes Médicas **3**:68-107.

23 Sox H.C. (1986) Probability theory in the use of diagnostic tests, An Introduction to Critical Study of Literature. *Ann Inter Med* **104**: 60-6.

24 Fleiss J.L (1981) *Statistical methods for rates and proportions*. New York: Wiley J. 212-36.

25 Siegel S., Castellan N.N. (1988) *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*. 2. ed. New York: McGraw-Hill 284-85.

26 Landis J.R., Koch G.G. (1977) The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* **33**:159-74.

- 27 Silva G.D.I., Kantzanou M., Justice A., Massey R.C., Wilkinson A.R., Day N.P.J., Peacock S.J. (2002) The *ica* Operon and Biofilm Production in Coagulase-Negative Staphylococci Associate with Carriage and Disease in a Neonatal Intensive Care Unit. *Journ Clin Microbiol* **40**:382-88.
- 28 Alcaraz L.E., Satorres S.E., Lucero R.M., Centrorbi O.N.P (2003) Species identification, slime production and oxacilin susceptibility in coagulase-negative staphylococci isolate from nosocomial specimens. *Braz J Microbiol* **34**:45-51.
- 29 Gemmell C.G. (1986) Virulence characteristics of *Staphylococcus epidermidis*. *J Med Microbiol* **22**:287-89.
- 30 Vogel L., Sloos J.H., Spaargaren J., Suiker I., Dijkshoorn L. (2000) Biofilm production by *Staphylococcus epidermidis* isolates associated with catheter related bacteremia. *Diagnostic Microbiol Infect Dis* **36**:139-41.
- 31 Arciola C.R., Baldassarri L., Montanaro L.(2001) Pré Sence of *icaA* and *icaD* Genes and Slime Production in a Collec tion of Staphylococcal Strains from Catheter-Associated Infection. *J Clin Microbiol* **39**:2151-56.
- 32 Ruzicka F., Holá V., Votava M., Tejkalová M., Horvát R., Heroldová M., Woznicová V. (2004) Biofilm Detection and the Clinical Significance of *Staphylococcus epidermidis* Isolates. *Folia Microbiol* **49**:596-00.

33 Kotilainen P. (1990) Association of coagulase-negative staphylococcal slime production and adherence with the development and outcome of adult septicemias. *J Clin Microbiol* **6**:2779-85.

34 Cunha M. L. R. S., Caramori J.C.T., Lopes C.A.M. (2006) Study of virulence factors in coagulase-negative staphylococci isolated from newborns. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **101**:661-68.

35 Cho S.H., Naber K., Hacker J., Ziebuhr W. (2002) Detection of the *icaADBC* gene cluster and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from catheter-related. *Intern Journ Antim Agent* **19**:570-75.

36 MATHUR T., Singhal S., Klan S., Upadhyay D.J., Fatma T., Rattan A. (2006) Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci*: An evaluation of three different screening method. *Indian J Med Microbiol* **24**:25-29.

37 Arciola C.R., Campoccia D., Baldassari L., Donati M.E., Pirini V., Gamberini Simonetta G., Montanaro L. (2005) Detection of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* from implant infections. Comparison of a PCR-method that recognizes the presence of *ica* genes with two classic phenotypic methods. Wiley InterScience DOI: 10.1002/jbm.a.30552

38 Chaieb K., Mahdouani K., Bakhrouf A. (2005) Detection of *icaA* and *icaD* loci by polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needles in a dialysis unit. *Journ Hosp Infect* **61**:225-30.

39 Arciola C.R., Campoccia D., Gamberini S., Cervel-Lati M., Dontati E., Montanaro L. (2002) Detection of slime Production by means of a optimized Congo red agar plate based on a Colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates geno Typed for *ica* locus. *Biomaterials* **23**:4233-39.

40 Arciola CR., Campoccia D., Gamberini S., Cervel E., Dontati L.M., Montanaro L. (2003) Occurrence of *ica* genes for slime synthesis in a collection of *Staphylococcus epidermidis* strains from orthopedic prosthesis infection. *Acta Orthop Scand* **5**:617-21.

41 Fitzpatrick F., Humphreys H., O'Gara P. (2005) Evidence for *icaADBC*-Independent Biofilm Development Mechanism in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates. *Journ Clin Microbiol* **43**:1973-76.

ARTIGO II

O Artigo foi descrito de acordo com as normas de publicação da Revista Científica BMC Pediatrics.

Fatores de Risco para infecção por estafilococos coagulase-negativa em recém-nascidos internados na Unidade Neonatal de um Hospital Universitário Brasileiro.

Adilson de Oliveira, Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP.

E-mail: Adilson de Oliveira – adilsonoliveiralp@ig.com.br; Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha – cunhamlr@ibb.unesp.br.

Autor correspondente: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, Caixa Postal 510, CEP 18618-000.

Resumo

Introdução: Os estafilococos coagulase-negativa (ECN) estão entre os microrganismos mais envolvidos em infecções nosocomiais, principalmente em recém-nascidos (RN) prematuros e de baixo peso. Entre os fatores de risco de infecções por esses agentes, a produção de um polissacarídeo extracelular e a conseqüente formação do biofilme, permitindo aderência às superfícies plásticas e lisas de cateteres e outros dispositivos médicos desempenham um papel importante. Este estudo objetivou identificar amostras de ECN isoladas de 105 recém-nascidos internados na Unidade Neonatal, e verificar a associação do biofilme e de fatores de risco do hospedeiro na ocorrência de infecções.

Métodos: As amostras de ECN isoladas foram identificadas e classificadas em significativas e contaminantes, baseado em dados clínicos e laboratoriais obtidos dos prontuários dos RN. Foram pesquisados fatores perinatais de risco para infecção, evolução clínica dos RN e antibioticoterapia, além da detecção de genes responsáveis pela produção de biofilme em ECN.

Resultados: Das 130 amostras de ECN estudadas, 66 (50,8%) foram classificadas como clinicamente significativas, e 64 (49,2%) como contaminantes. Os resultados não mostraram diferença na detecção de genes para produção de biofilme nas amostras de ECN isoladas dos RN do grupo com infecção (81,8%) e sem infecção (84,3%), embora 11 (91,7%) de 12 crianças que foram a óbito associado a ECN, estavam infectadas com amostras positivas para a presença desses genes. Dos 54 RN com infecção por ECN, 45 (83,3%) eram prematuros, e 33 (61,1%) com peso ao nascimento ≤ 1.500 g. A maioria dos RN com infecção por ECN estava submetida a procedimentos invasivos como uso de cateter (85,2%), nutrição parenteral (61,1%) e

ventilação mecânica (57,4%). *S. epidermidis* foi a espécie mais isolada (81,5%), e mais associada com infecção (86,3%) do que com contaminação (76,5%).

Conclusão: A maioria dos recém-nascidos com infecção por ECN apresentou fatores que contribuem para a instalação dos ECN e desenvolvimento da infecção, incluindo o peso de nascimento $\leq 1.500\text{g}$, complicação de cateter, uso de dreno e a antibioticoterapia prévia. A identificação de espécies de ECN é um importante marcador de infecção, visto que o *S. epidermidis* foi o agente etiológico mais frequentemente isolado e associado aos processos infecciosos.

Palavras-chave: Biofilme; Estafilococos Coagulase-negativa; Fatores de risco, Infecção; Métodos Fenotípicos; PCR.

Abstract

Background: Coagulase-negative staphylococci (CNS) are most often associated with nosocomial infections, especially in premature and under weight newborns. The most important pathogenic factor of these microorganisms is their ability to form an extracellular polysaccharide and the *biofilm*, which facilitates their adherence to the surfaces of catheters and other medical devices. The aim of this study is to identify clinical isolates of coagulase-negative staphylococcus isolated from 105 newborns from the Neonatal Unit and verify the association of biofilm formation with the pathogenic factors in the occurrence of infection.

Method: The clinical isolates were identified and classified as *significant* and *contaminant*, based on clinical data obtained from the patients reports. Perinatal risk factors for infection, clinical evolution and antibiotic therapy for the newborns were studied, as well as the detection of the genes responsible for the production of biofilm in CNS.

Results: Of the 130 clinical isolates of CNS, 66 (50.8%) were classified as clinically significant and 64 (49.2%) as contaminant. There was no difference between the CNS isolates of the infected group of newborns (81.8%) and the non-infected group (84.3%) in relation to the detection of biofilm producers, although 11 (91.7%) of 12 babies who died during the study were infected with positive samples for the presence of these genes. Of the 54 newborns infected by CNS, 45 (83.3%) were premature and 33 (61.1%) weighted ≤ 1500 g at birth. Invasive procedures were performed on the majority infected babies, such as the use of catheters (85.2%), parenteral nutrition (61.1%) and mechanical ventilation (57.4%). The clinical

isolates of *S. epidermidis* (81.5% of the total isolates) showed a closer association with infection (86.3%) than with contamination (76.5%).

Conclusion: The majority of the babies with infection caused by CNS showed factors that contribute for the installation of the CNS, causing infection. These factors include weight at birth \leq 1500 g, catheter complications, use of surgical drain and previous antibiotic therapy. The identification of CNS species is an important infection marker, considering the fact that *S. epidermidis* is associated with infection in most of the cases.

Key-words: Biofilm, Coagulase-negative Staphylococci, Risk Factors, Infection, Phenotypic methods, PCR.

Introdução

Os estafilococos coagulase-negativa (ECN) estão entre os mais frequentes microrganismos causadores de infecções hospitalares em recém-nascidos (1). Essas infecções ocorrem principalmente em recém-nascidos prematuros de baixo peso ou com outros tipos de doenças, mas principalmente os internados em UTI e que fazem uso de procedimentos invasivos como uso de cateter intravascular, nutrição parenteral, uso de ventilação mecânica e antibioticoterapia prévia (2,3,4).

Esses microrganismos fazem parte da flora normal da pele e mucosas, sendo um dos mais importantes contaminantes de culturas, o que dificulta a interpretação de hemoculturas positivas para esses agentes (5,6). Por isso, os pesquisadores têm se utilizado de uma variedade de critérios clínicos e laboratoriais para distinguir contaminação de bacteremia, sendo feito o diagnóstico com base nos dados clínicos dos pacientes e no isolamento de microrganismos idênticos em duas ou mais hemoculturas. As culturas em que ocorre o crescimento de múltiplas linhagens ou de espécies de ECN, em associação às outras espécies de microrganismos, são classificadas como contaminantes (5,7).

Os ECN também são caracterizados pela sua grande capacidade de aderência e crescimento em superfícies lisas de cateteres e de outros dispositivos médicos. Entre os vários mecanismos envolvidos nesta adesão, a produção de uma substância extracelular de natureza polissacarídica chamada limo parece desempenhar um papel relevante (8,9,10). O limo forma o biofilme em superfícies lisas, protegendo as bactérias contra os mecanismos de defesa do hospedeiro e contra a terapia antimicrobiana, sendo considerado um importante fator de virulência (11,7). Assim, ao que tudo indica, o que favorece as infecções pelos ECN, além das condições do

paciente é a produção desse polissacarídeo extracelular, o PIA (polissacarídeo de adesão intercelular) que permite a aderência desses microrganismos e a consequente formação do biofilme em superfícies de biomateriais (8,12). Recentemente, o controle genético da produção do limo que forma o biofilme foi determinado (13). A síntese desse polissacarídeo capsular é mediada por produtos do gene cromossomal *ica* (*intercelular adhesion*), organizados em uma estrutura *operon*. Com a ativação deste *operon*, ocorre a síntese do polissacarídeo de adesão intercelular (PIA), que faz a ligação das células bacterianas até a formação do biofilme (13).

Em consequência de muitos estudos indicarem que infecções por ECN são causadas principalmente por linhagens capazes de produzirem biofilme e essa capacidade se correlacionar bem com as consequências da infecção, foi sugerido que a positividade no teste de produção de biofilme poderia ser usada como marcador de patogenia em uma determinada linhagem (14,15,16).

Entretanto, outros estudos não mostraram associação da produção de biofilme com infecções (4,7). A divergência dos resultados em diversos estudos pode sugerir que, mesmo que a produção do biofilme seja considerada um importante fator de virulência, a relação entre a produção de biofilme e as infecções clinicamente significativas pode ser um fato que não ocorra de forma universal (17). Associado a produção do biofilme pelos ECN, pode haver outros fatores relacionados ao tratamento do paciente que contribuem na patogenia desses microrganismos, podendo esses fatores variar de um ambiente hospitalar para outro (17,18,19).

Esse estudo foi realizado com o objetivo de identificar amostras de ECN isoladas de recém-nascidos internados na Unidade Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, e verificar a associação do biofilme e de

fatores de risco do hospedeiro na ocorrência de infecções causadas por esses microrganismos.

Material e Métodos

Amostras

Foram estudadas 130 amostras de estafilococos coagulase-negativa (ECN), isoladas de materiais clínicos provenientes de recém-nascidos internados na Unidade Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) e quatro linhagens de referência internacional: *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. simulans* ATCC 27851, *S. warneri* ATCC 10209, *S. xylosus* ATCC 29979. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Critérios de Inclusão

Foram incluídas no estudo, amostras de ECN isoladas de fluídos internos, incluindo sangue e secreções, bem como de corpos estranhos, tais como cânulas, drenos e cateteres.

Nos casos de material biológico em que se encontrou uma microbiota normal, e os ECN estiveram em cultura associativa com outras bactérias, exigiu-se sempre sua nítida prevalência numérica.

Crêterios de exclusão

Foram excluídas do estudo amostras isoladas de recém-nascidos, cujo registro de dados clínicos e laboratoriais referentes a um período de uma semana anterior e posterior ao isolamento não foi localizado.

Identifica o de estafilococos coagulase-negativa

Os isolados, obtidos a partir de espécimes clínicos foram semeados em ágar sangue e corados pelo método de Gram, objetivando-se sua pureza e a observa o de sua morfologia e colora o específica. Após a confirma o dessas características, as linhagens foram submetidas às provas de catalase e coagulase. O g nero *Staphylococcus* foi diferenciado de *Micrococcus*, com base na prova de oxida o e fermenta o da glicose e pela resistência   bacitracina (0,04 U), indicada pela ausência de halo de inibi o ou forma o de halo de até 9 mm e pela sensibilidade   furazolidona (100 µg) caracterizada por halos de inibi o de 15 a 35 mm de diâmetro (20).

Para a identifica o dos ECN foi utilizado o esquema simplificado proposto por Cunha *et al.* (4), o qual estabelece a realiza o de testes de utiliza o de a c ares: xilose, sacarose, trealose, manitol, maltose, e frutose, caracteriza o de hemolisinas, urease, ornitina decarboxilase e resistência   novobiocina. Para controle dos resultados dos testes, foram utilizadas as seguintes linhagens de ECN de referência internacional: *S. epidermidis* (ATCC 12228), *S. simulans* (ATCC 27851), *S. warneri* (ATCC 10209) e *S. xylosus* (ATCC 29979). Posteriormente   confirma o da espécie as linhagens foram conservadas em Caldo nutriente com glicerol a - 20 C e a - 70 C.

Detecção dos genes icaA, icaC e icaD específicos para produção de biofilme através da técnica de PCR

Extração do ácido nucléico

O ácido nucléico total foi extraído a partir de linhagens de *Staphylococcus* cultivadas em ágar sangue e inoculadas individualmente em caldo Infusão de Cérebro e Coração e incubadas a 37°C por 24 h.

A extração foi realizada com o Kit illustra (GE Healthcare), que consistiu na digestão inicial das células de estafilococos com lisozima (10 mg/ml) e proteinase K (20 mg/ml). A seguir, 500 µl da solução de extração foi adicionada à mistura e esta foi centrifugada a 10.000 x g por 4 min. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para a coluna e centrifugado a 5.000 xg por 1 min. O líquido coletado foi descartado e 500 µl de solução de extração foi adicionado novamente à coluna. Após a centrifugação e descarte do líquido coletado, 500 µl da solução de lavagem foi adicionada à coluna e esta submetida à centrifugação a 20.000 x g por 3 min. A seguir, a coluna foi transferida para um tubo de 1,5 ml e 200 µl de água Milli Q aquecida a 70 °C foi utilizada para a eluição.

Amplificação do ácido nucléico (PCR)

As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 ml em volumes totais de 25 µl contendo 10 pmol de cada oligonucleotídeo (Tabela 1), 2,0 U de Taq DNA polimerase, 100 µM de desoxiribonucleotídeos trifosfatados, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 0,75 mM de MgCl₂ e 3µL de ácido nucléico. A incubação foi realizada em termociclador tipo MJ Research, empregando-se os parâmetros descritos por Arciola *et al.* (21), que consistiram de: 94°C por cinco minutos para o primeiro

ciclo seguido por 50 ciclos de desnaturação a 94°C por trinta segundos, anelamento dos oligonucleotídeos a 55,5°C por trinta segundos e extensão a 72°C por trinta segundos. Após completar os 50 ciclos, os tubos serão incubados a 72°C por um minuto antes de resfriar à 4°C. Em todas as reações realizadas foram utilizadas linhagens de referência internacional com controle positivo e negativo, *S. epidermidis* ATCC 35984 (produtora de biofilme) e um controle negativo *S. epidermidis* ATCC 12228.

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados para a detecção dos genes *icaA*, *icaC* e *icaD*.

Oligonucleotídeo	Sequência de nucleotídeos 5'a 3'	Produto amplificado (pb)
<i>icaA1</i>	ACA GTC GCT ACG AAA AGA AA	103
<i>icaA2</i>	GGA AAT GCC ATA ATG AGA AC	
<i>icaC1</i>	TAA CTT TAG GCG CAT ATG TTT	400
<i>icaC2</i>	TTC CAG TTA GGC TGG TAT TG	
<i>icaD1</i>	ATG GTC AAG CCC AGA CAG AG	198
<i>icaD2</i>	CGT GTT TTC AAC ATT TAA TGC AA	

Fonte: Arciola *et al.*, 2005.

Visualização dos produtos amplificados

A resolução das amplificações foi observada por eletroforese em gel de agarose 2% preparado em tampão 0,5 X TBE e corado com brometo de etídeo e fotografados sob transiluminação UV.

Relevância Clínica

Os dados clínicos que auxiliaram na verificação da ocorrência de infecções associadas ao uso de cateteres e de hemoculturas, foram obtidos a partir da análise de prontuários dos pacientes. Foram analisados os dados referentes a fatores

perinatais de risco para a infecção, como: ruptura prolongada de membrana (RM) > 24 horas, idade gestacional (IG), peso ao nascimento, procedimentos invasivos como a cateterização, ventilação mecânica (VM), nutrição parenteral (NP) e drenagem de tórax, foi considerado também se houve ou não a remoção do corpo estranho durante o episódio de infecção por ECN.

Foi analisada a evolução clínica dos recém-nascidos na semana que antecedeu e na semana que sucedeu o isolamento do ECN, valorizando-se os diagnósticos e o quadro clínico sugestivo de infecção por ECN, que se caracteriza por sinais e sintomas insidiosos e inespecíficos, incluindo, mais frequentemente, o comprometimento do estado geral, a instabilidade térmica e a ocorrência de apnéias.

Quanto aos óbitos, estes foram atribuídos à infecção por ECN quando ocorreram nas primeiras 72 horas do isolamento deste agente, e a possível associação a ECN se ocorreu entre quatro e sete dias após o isolamento de ECN.

Outro aspecto investigado, que auxiliou na consideração da relevância clínica, foi o uso de antibioticoterapia prévia e antibióticos adequados para o ECN após o resultado do diagnóstico bacteriológico. A determinação de antibioticoterapia adequada foi sempre baseada nos resultados do antibiograma arquivados no prontuário ou realizado por ocasião do estudo.

As linhagens de ECN incluídas no estudo foram classificadas em significativas e contaminantes conforme os critérios propostos pelo CDC (23) e Cunha *et al.* (18).

Significativas: amostras isoladas de recém-nascidos que apresentaram três ou mais dos seguintes critérios: fatores de risco para infecção, quadro clínico, alteração hematológica e antibioticoterapia adequada. Também foram consideradas

significativas as linhagens isoladas de pacientes que apresentaram apenas dois dos critérios e não receberam antibioticoterapia adequada, mas foram a óbito;

Contaminantes: amostras isoladas de recém-nascidos que apresentaram somente fatores de risco para infecção e/ou apenas um dos demais critérios (quadro clínico ou alteração hematológica ou antibioticoterapia adequada). As linhagens isoladas de recém-nascidos que apresentaram três critérios, mas que tiveram evolução satisfatória do quadro infeccioso sem a administração de antibióticos adequados, também foram consideradas contaminantes. O isolamento de outro agente etiológico de fluídos internos e corpos estranhos, na mesma época do isolamento de ECN, também foi usado como critério para a classificação de contaminação.

Análise Estatística

Os dados relativos à relevância clínica de linhagens de ECN foram analisados pelo teste do qui-quadrado, no qual o nível de significância para todos os testes foi fixado em $p < 0,05$ (24).

Para a análise de peso e idade entre os grupos, foi utilizado o teste de Wilcoxon (25).

Os dados que na análise univariada apresentaram um valor de $< 0,25$ foram posteriormente submetidos à análise multivariada, utilizando o modelo de regressão logística (26), com a finalidade de avaliar simultaneamente a influência das diversas variáveis incluindo dados clínicos dos recém-nascidos e produção de biofilme na incidência de infecção por ECN.

Resultados

Amostras

Foram estudadas 130 amostras de ECN isoladas de diversos materiais clínicos provenientes de 105 recém-nascidos internados na Unidade Neonatal do HC da Faculdade de Medicina de Botucatu no período de 1993 a 2004. Foram incluídas no estudo 69 amostras de corpos estranhos (54 de ponta de cateter, cinco de ponta de cânula e dez de ponta de dreno torácico), 57 de hemocultura e quatro de secreção.

Identificação dos estafilococos coagulase-negativa

A distribuição das amostras de ECN, segundo a espécie está ilustrada na Figura 1. O *S. epidermidis* foi a espécie mais frequentemente isolada, representando 106 (81,5%) da população de ECN estudada, seguido por seis (4,6%) *S. haemolyticus*, cinco (3,8%) *S. warneri*, três (2,4%) *S. xylosus*, três (2,4%) *S. lugdunensis*, dois (1,5%) *S. capitis*, dois (1,5%) *S. hominis*, dois (1,5%) *S. simulans* e um (0,8%) *S. saprophyticus*.

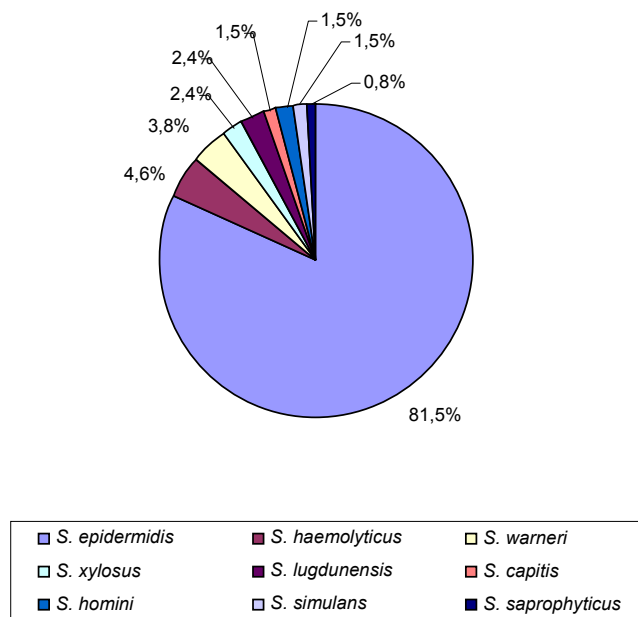


Figura I Distribuição das espécies de ECN isoladas de recém-nascidos.

A Tabela 2 apresenta a distribuição das espécies de ECN classificadas como clinicamente significativas e contaminantes de acordo com o tipo de material clínico isolado. Das 130 amostras estudadas, 66 (50,8%) foram classificadas como clinicamente significativas, e 64 (49,2%) foram classificadas como contaminantes.

Os resultados mostraram uma frequência maior de *S. epidermidis* associado com infecção (86,3%) do que com contaminação (76,5%), embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa ($p > 0,05$). A análise estatística da distribuição das outras espécies também não mostrou diferença significativa.

Dos 54 recém-nascidos com infecção por ECN, o *S. epidermidis* foi o agente etiológico isolado de 44 crianças (81,5%). Dentre as outras espécies o *S. haemolyticus* foi responsável pelo quadro infeccioso apresentado por três crianças (5,5%), o *S. warneri* por dois (3,7%), o *S. xylosum* por dois (3,7%), *S. capitis* por dois (3,7%) e o *S. lugdunensis* por um (1,9%).

Tabela 2: Distribuição das espécies classificadas como significativas e contaminantes de acordo com o material clínico.

Espécies	Significativas			Contaminantes		
	Material Clínico			Material Clínico		
	Corpo estranho	Sangue	Secreção	Corpo estranho	Sangue	Secreção
<i>S. epidermidis</i>	33	22	2	26	23	0
<i>S. haemolyticus</i>	1	2	0	0	2	1
<i>S. warneri</i>	1	1	0	2	1	0
<i>S. xylosus</i>	2	0	0	1	0	0
<i>S. lugdunensis</i>	0	1	0	0	2	0
<i>S. capitis</i>	1	0	0	1	0	0
<i>S. hominis</i>	0	0	0	0	2	0
<i>S. simulans</i>	0	0	0	0	1	1
<i>S. saprophyticus</i>	0	0	0	1	0	0
Total	38	26	2	31	31	2

Relevância Clínica

Dos 105 recém-nascidos estudados, 54 foram considerados com infecção por ECN e 51 sem infecção (Tabela 3). Das 130 amostras estudadas e analisadas quanto à significância clínica, 66 (50,8%) foram interpretadas como significativas e 64 (49,2%) como contaminantes (Tabela 2). Deste total, 69 foram isoladas de corpos estranhos, das quais 38 (55%) foram interpretadas como significativas, sendo 27 (71%) isoladas de ponta de cateteres, 8 de dreno torácico (21,1%) e três (7,9%) de cânula. De hemocultura foram isoladas 57 amostras, sendo que 26 (45,6%) foram interpretadas como significativas e 31 (54,4%) como contaminantes e quatro amostras isoladas de secreções, das quais duas foram consideradas significativas e duas contaminantes.

Não houve diferença significativa das amostras interpretadas como clinicamente significativas em relação ao tipo de espécime clínica.

A distribuição percentual das crianças classificadas com infecção e sem infecção por ECN conforme a idade gestacional, peso ao nascimento e dados pessoais encontra-se na Tabela 3. Entre as 54 crianças com infecção por ECN, 45 (83,3%) eram prematuras, das quais, 26 (48,1%) consideradas prematuras extremas (idade gestacional <31 semanas) comparado com 15 (29,4%) no grupo de crianças sem infecção, diferença estatisticamente significativa ($p = 0,027$).

Em relação ao peso, observa-se que dos 54 recém-nascidos com infecção por ECN, 61,1% apresentavam peso ao nascimento inferior a 1.500g, com diferença significativa ($p < 0,001$) do grupo sem infecção (19,6%). A mediana do peso ao nascimento também apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre o grupo de infectados por ECN (1.238g) e sem infecção (2.140g). A mediana da idade das crianças, por ocasião do isolamento de ECN, não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre o grupo dos recém-nascidos com infecção (8,5 dias de vida) e crianças sem infecção (6 dias). Quanto ao sexo houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,022$), sendo 34 (63,0%) RN do sexo masculino no grupo com infecção e 21 (41,2%) no grupo sem infecção. Em relação à procedência das crianças, se nascidas no HC ou transferidas de outra Unidade, não foi verificada diferença.

Tabela 3: Dados pessoais dos recém-nascidos com e sem infecção por ECN.

Dados Pessoais	Com infecção		Sem infecção		Total		Valor de p
	N	%	N	%	N	%	
IG < 31	26	48,1	15	29,4	41	39,0	0,027
IG 31-36	19	35,2	18	35,3	37	35,2	ns
IG ≥ 37	6	11,1	18	35,3	24	22,9	0,001
PN ≤ 1.500g	33	61,1	10	19,6	43	40,1	< 0,001
Mediana PN (g)	1,238		2,140		1,600		< 0,001
Mediana idade (dias)	8,5		6		7		ns
Sexo M	34	63,0	21	41,2	55	52,4	0,022
Nascidos no HC/FMB	36	66,6	31	60,8	69	65,7	ns
Total	54	51,4	51	48,6	105	100	

IG: idade gestacional (semanas); RN: recém-nascido; PN: peso ao nascimento; M: masculino; HC/FMB: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. Obs.: 3 RNs com IG desconhecidas, 3 RNs com PN desconhecidos, 2 RNs com idade desconhecida, 2 RNs com sexo desconhecido, 3 RNs com procedência desconhecida.

A análise univariada dos dados clínicos dos recém-nascidos, com relação aos fatores perinatais de risco (Tabela 4), mostrou diferença significativa entre o grupo de crianças com e sem infecção, em relação à ruptura de membrana > 24 horas ($p = 0,036$), complicação de cateter ($p < 0,001$) e utilização de dreno ($p = 0,025$).

Em relação aos ECN positivos para a presença de genes específicos para produção de biofilme, 54 (81,8%) foram classificados no grupo com infecção e 54 (84,3%) no grupo sem infecção. A Tabela 5 mostra que não houve diferença significativa em relação à produção de biofilme nos dois grupos e nem em relação ao tipo de material clínico ($p > 0,05$).

Tabela 4: Fatores perinatais de risco para infecção por ECN.

Fatores de Risco	Com infecção		Sem infecção		Total		Valor de p
	N	%	N	%	N	%	
Ruptura de membrana > 24horas	19	35,2	10	19,6	29	27,6	0,036
Internação UTI	52	96,2	39	76,5	91	86,6	ns
Cateter	27	50,0	27	52,9	54	51,4	ns
Complicação cateter	11	20,4	1	1,9	12	11,4	< 0,001
Dreno	8	14,8	2	2,9	10	9,5	0,025
Ventilação mecânica	31	57,4	23	45,0	54	51,4	ns
Nutrição parenteral	33	61,1	28	55,0	61	58,1	ns
Não remoção dos corpos estranhos	24	44,4	19	37,2	43	41,0	ns
Cirurgia e/ou Diálise	7	13,0	10	19,6	17	16,2	ns
Total RN	54	51,4	51	48,6	105	100	

RN: recém-nascido. Obs.: 2 RNs com uso de cateter desconhecido; 2 RNs com complicação de cateter desconhecido; 2 RNs com uso de dreno desconhecido; 2 RNs com ventilação mecânica desconhecida; 2 RNs com nutrição parenteral desconhecida; 12 RNs com remoção de corpo estranho desconhecida; 6 RNs com cirurgia e/ou diálise desconhecida.

Tabela 5 : Frequência de amostras de ECN positivas para a presença de genes específicos para produção de biofilme de acordo com a relevância clínica das amostras e material clínico.

Biofilme	Com infecção			Sem infecção		
	Material Clínico			Material Clínico		
	Corpo estranho	Hemocultura	Secreção	Corpo estranho	Hemocultura	Secreção
Positivas	28	25	1	29	26	1
Negativas	3	8	1	5	2	1
Total	31	33	2	34	28	2

Na Tabela 6 estão representados os resultados da análise multivariada utilizando o modelo de regressão logística, apresentando como fatores de risco significativos na ocorrência de infecção por ECN, o peso muito baixo ao nascimento, a complicação de cateter, o uso de dreno torácico e o uso de antibioticoterapia prévia. O cálculo do risco de ocorrência de infecção por ECN, sob a forma de razão de chances ou *Odds Ratio*, demonstrou que recém-nascidos com peso $\leq 1.500\text{g}$ ao nascimento apresentaram um risco de 12,34 vezes maior de infecção por ECN em relação ao recém-nascido com peso superior, os recém-nascidos que apresentaram complicação de cateter tiveram um risco de infecção de 12,33 vezes maior, os que fizeram uso de dreno torácico 6,43 vezes mais e no caso das crianças que fizeram uso de antibioticoterapia prévia a chance de infecção foi aumentada em 3,57 vezes.

Tabela 6 : Ajuste do modelo de regressão logística.

Dados dos recém-nascidos	Valor de p	<i>Odds Ratio</i>	Intervalo de confiança (95%)	
			LI	LS
Peso $\leq 1.500\text{g}$	0,0078	12,345	2,366	64,413
Complicação de cateter	0,022	12,328	1,430	106,278
Dreno	0,041	6,428	1,075	38,432
Antibioticoterapia prévia	0,014	3,571	1,291	9,881

Durante a hospitalização, no grupo de crianças com infecção, foi observado o óbito de 18 (33,3%) recém-nascidos, sendo que destes, 12 (66,7%) foram óbitos relacionados com a infecção por ECN. Das 12 crianças que tiveram o óbito relacionado com infecção por ECN, quatro estavam submetidos a corpos estranhos infectados com ECN e que foram removidos somente na data do óbito, cinco eram

RN prematuros extremos, quatro apresentavam o peso < 1.000g, e em 11 crianças os ECN isolados foram positivos para a presença de genes específicos para produção de biofilme.

Discussão

Os Estafilococos coagulase-negativa são importantes patógenos envolvidos em infecções nosocomiais de recém-nascidos. A detecção e a identificação das espécies de ECN e dos fatores de risco dos RN para ocorrência dessas infecções são importantes mecanismos para o diagnóstico e prevenção das infecções.

Alguns autores reforçam a idéia de se utilizar rotineiramente a identificação das espécies de ECN, uma vez que os resultados de seus estudos revelam que as amostras de *S. epidermidis* isoladas, estão mais associadas a infecção do que a contaminação (18,27). Nesse estudo realizado com 130 amostras de ECN isoladas de RN, o *S. epidermidis* foi a espécie mais freqüentemente isolada, representando (81,5%) da população de ECN estudada, dados similares aos encontrados por outros autores (18,27). Nossos resultados também mostraram uma freqüência maior de *S. epidermidis* associado a infecção (86,3%) do que a contaminação (76,5%). Estudo realizado por Pessoa-Silva *et al.* (28), mostraram que do total de óbitos relacionadas a infecções da corrente sanguínea em recém-nascidos, 26,7% foram atribuídos à espécie *S. epidermidis*, reforçando a idéia da importância da identificação.

Apesar do *S. epidermidis* ser a espécie isolada com maior freqüência e envolvida etiologicamente, também outras espécies de ECN têm sido isoladas de várias fontes clínicas (29,30,27). Em nosso estudo, outras espécies de ECN foram associadas a infecção, incluindo-se 3 *S. haemolyticus*, 2 *S. warneri*, 2 *S. xylosus*,

1 *S. lugdunensis* e 1 *S. capitis*, semelhante ao resultado obtido por Sung *et al.* (29), que isolaram *S. warneri*, *S. capitis*, *S. haemolyticus* e *S. hominis* de bacteremias em neonatos internados em UTI. Em estudo realizado por Aguirre *et al.* (27), além do *S. epidermidis*, esses autores encontraram *S. hominis* e *S. haemolyticus* relacionados a sepse.

Recém-nascidos prematuros são mais susceptíveis a infecção, principalmente os de baixo peso. Em nosso estudo, dos 54 recém-nascidos com infecção por ECN, a maioria (83,3%) era de prematuros, com 48,1% deles apresentando prematuridade extrema (IG < 31 semanas), mediana do peso igual a 1.238g e 61,1% com peso ao nascimento \leq 1.500g. Resultados similares aos nossos, têm sido obtidos por outros pesquisadores (31). Em outro estudo, realizado por Aguirre *et al.* (27) foi verificado que dos RN que desenvolveram infecções por ECN, 62,8% apresentaram prematuridade extrema com (IG < 31 semanas) e 87,1% com peso abaixo de 1.500g. A análise de regressão logística realizada em nosso estudo, mostrou como fator predisponente para a infecção por ECN, o peso ao nascimento \leq 1.500g, aumentando o risco de infecção em 12,34 vezes. Vários fatores contribuem para essa susceptibilidade e pela maior gravidade dos quadros infecciosos nesses RN, como a imaturidade do sistema imunológico, principalmente no que diz respeito à deficiência da fagocitose, opsonização por anticorpos e funções do complemento (32).

A mediana da idade no grupo de RN com e sem infecção por ECN em nosso estudo não foi estatisticamente significativa, sendo de 8,5 e 6 dias, respectivamente. Apenas 9,3% dos recém-nascidos apresentaram infecção por ECN nas primeiras 24 horas de vida, dados semelhantes aos encontrados por Cunha *et al.* (18) que observaram a ocorrência de somente 12% das infecções por ECN nas primeiras 48 horas de vida, enquanto que infecções por outras espécies de bactérias ocorrem

principalmente nesse período. Também em estudo realizado por Hoang *et al.* (33), os quadros de infecções surgiram em RN a partir de 6 dias de vida, e Campeotto *et al.* (34) mostraram que a colonização e infecção variou entre 6 e 7 dias. Os dados obtidos em nosso estudo e por esses autores, demonstram que o envolvimento, na maioria das vezes na etiologia de quadros clínicos tardios de infecção hospitalar é uma característica peculiar desses microrganismos.

Em relação ao sexo dos recém-nascidos, esse estudo mostrou que das 54 crianças do grupo com infecção, 34 (63%) eram do sexo masculino, número estatisticamente significativo. Resultados semelhantes foram encontrados por Nimri *et al.* (35), sendo que das crianças com infecção, 60,6% eram do sexo masculino e 39,4% do sexo feminino. Em outro estudo, realizado por Babazono *et al.* (36), foi verificado que crianças do sexo masculino apresentaram uma razão de chances de 1,86 para infecção, comparado com 1,00 nas crianças do sexo feminino.

Em nosso estudo, 19 (35,2%) dos RN do grupo com infecção apresentaram a ruptura prolongada de membrana > que 24 horas ($p < 0,05$). Em estudo realizado por Martius *et al.* (37), esses autores verificaram que RN com ruptura prolongada de membrana > 24 h tiveram uma razão de chance de 2,9 vezes para infecção. Ronestad *et al.* (38) também demonstraram a ruptura prolongada de membrana > que 24 horas como sendo um importante fator de risco.

Os pacientes mais sujeitos a infecção por ECN são aqueles internados em unidades de terapia intensiva, pela necessidade de serem submetidos a procedimentos invasivos, além da imunossupressão e a utilização de antimicrobianos de amplo espectro (39,40). Em nosso estudo, 96,2% dos recém-nascidos do grupo com infecção e 76% do grupo sem infecção tiveram internação em UTI. Esses números não foram estatisticamente significativos em nosso estudo,

porém, sabemos que as crianças que fizeram parte do estudo e tiveram internação em UTI, fizeram uso de procedimentos invasivos e antibióticos, fatores que indiretamente fazem da internação em UTI um importante fator de risco para essas infecções.

O uso de ventilação mecânica, nutrição parenteral e cateter no grupo de RN com infecção não foi estatisticamente significativo, semelhante aos resultados encontrados por Sung *et al.* (29), que também não encontraram diferenças em relação ao uso de cateter, nutrição parenteral e ventilação mecânica nas crianças com ou sem infecção por ECN. Esses resultados podem ser explicados pelo fato de que a maioria dos recém-nascidos incluídos no estudo estavam submetidos a esses procedimentos. A ventilação mecânica e, principalmente os cateteres venosos são as principais portas de entrada para microrganismos da própria pele do paciente ou das mãos dos profissionais que manipulam esses dispositivos.

Em nosso estudo, dos 54 RN com infecção, 33 (61,1%) fizeram uso de nutrição parenteral. Nimri *et al.* (35) e Campeotto *et al.* (34), também relatam a nutrição parenteral como importante fator de risco para infecções nosocomiais, não só pelo fato do longo período no uso de cateteres e da manipulação dos mesmos, mas também pelo fato de alguns nutrientes que são inseridos através deles, servirem como meio de cultura favorecendo a proliferação bacteriana.

Embora o uso de cateter não tenha mostrado diferença entre os RN com infecção e sem infecção por ECN, a complicação de cateter foi significativamente mais freqüente nos recém-nascidos com infecção (20,4%) do que no grupo sem infecção (1,9%). A análise multivariada mostrou que os RN que tiveram complicações em cateteres tiveram uma razão de chance de 12,32 para infecções por ECN. Esse achado é concordante com os dados encontrados por outros

pesquisadores (41,33), que alertam para o cuidado no uso de cateteres, pois os resultados de seus estudos mostraram que os ECN foram os microrganismos mais envolvidos em complicações de cateter, principalmente em RN que fizeram uso por um longo período de tempo.

Ainda em relação ao uso de procedimentos invasivos o uso de dreno torácico foi significativamente mais freqüente no grupo com infecção (14,8%) do que no grupo sem infecção (2,9%). O resultado da análise multivariada mostrou que os RN submetidos ao uso de dreno torácico tiveram o risco para infecções por ECN aumentado em 6,42 vezes. Os resultados obtidos por outros autores (28,42,43) não mostraram associação no uso de dreno com infecções por ECN, entretanto outros procedimento invasivos foram significativos, como a nutrição parenteral, ventilação mecânica e uso de cateteres. Isso mostra que apesar de não se ter encontrado estudos associando o uso de dreno diretamente com infecções por ECN, o fato desse procedimento invasivo ser utilizado também com freqüência em RN internados em UTI, acaba sendo um fator de risco importante na ocorrência de infecções.

Um outro fator de risco encontrado em nosso estudo foi o uso de antibioticoterapia prévia nos recém-nascidos com infecção por ECN, os resultados da análise multivariada mostraram que o risco de infecção por ECN aumenta em 3,57 vezes para os RN que fizeram uso prévio de terapia antimicrobiana. Resultados semelhantes tem sido verificados por vários autores (18,38). Ainda, Tennant *et al.* (44) relataram que o uso prévio de antibióticos aumenta em 75% o risco de infecções em RN. Lopes *et al.* (45), associaram o uso de antibioticoterapia prévia ao maior índice de mortalidade em RN prematuros e de baixo peso. O uso prévio de antibióticos pode suprimir a flora normal e selecionar microrganismos resistentes,

aumentando não apenas o risco de infecção, mas também sua gravidade e a dificuldade no seu tratamento.

Em relação à presença de genes responsáveis pela produção de biofilme, os resultados do nosso estudo não mostraram diferença estatisticamente significativa entre as amostras de ECN do grupo com infecção (81,8%) e sem infecção (84,3%). Alguns autores relataram a falta de evidência do biofilme como fator de risco nas infecções (46,19). Também em estudo realizado por Klingenberg *et al.* (7), não foi encontrado diferença em relação à produção do biofilme. Os autores verificaram que 57% das amostras isoladas do grupo de crianças com infecção eram positivas para produção de biofilme, bem como 47% no grupo sem infecção. Isso pode ocorrer pelo fato da maioria dos ECN serem capazes de produzir biofilme. Num estudo realizado por Alcaraz *et al.* (30), os autores pesquisaram a produção de biofilme por ECN em amostras clínicas e ambientais, e a produção foi similar nos dois grupos. O biofilme permite a esses microrganismos a habilidade de aderir e colonizar superfícies lisas de cateteres e de outros dispositivos médicos, o que garante a sua presença nestes locais, favorecendo a ocorrência de infecções associadas a esses dispositivos.

Durante a hospitalização, no grupo de crianças com infecção, foi observado o óbito de 18 (33,3%) recém-nascidos, sendo que destes, 12 (66,7%) foram óbitos relacionados com a infecção por ECN. Das 12 crianças que tiveram o óbito relacionado com infecção por ECN, quatro estavam submetidos a corpos estranhos infectados com ECN, que foram removidos somente na data do óbito, cinco eram prematuras extremas, quatro apresentavam o peso < 1.000g, e 11 crianças estavam infectadas com amostras de ECN positivas para a presença dos genes específicos para produção de biofilme. Desses 11 RN, 8 (72,7%) estavam utilizando terapia

antimicrobiana adequada mas não obtiveram cura, mostrando a importância do biofilme na dificuldade de tratamento, uma vez que os microrganismos são protegidos da ação de drogas e contra os mecanismos de defesa do hospedeiro. Confirmando esses dados, Klingeberg *et al.* (7), em seu estudo encontraram associação entre a produção genotípica e fenotípica de biofilme e resistência a antibióticos. Segundo os autores o contato próximo das bactérias dentro do biofilme, facilita a troca de informações genéticas, incluindo genes para a resistência a antibióticos e outros fatores de virulência. Recentes investigações tem mostrado que o PIA (*polysaccharide intercelular adhesin*) de *S. epidermidis*, tem um papel crucial dificultando a atuação do sistema de imunidade inata humana (47,48).

5- Conclusão

A maioria dos recém-nascidos com infecção por ECN apresentou fatores que contribuem para a instalação dos ECN e desenvolvimento da infecção, incluindo o peso de nascimento $\leq 1.500\text{g}$, complicação de cateter, uso de dreno e a antibioticoterapia prévia. A identificação de espécies de ECN é um importante marcador de infecção, visto que o *S. epidermidis* foi o agente etiológico mais frequentemente isolado e associado aos processos infecciosos, o que se faz necessário a detecção precisa desses microrganismos quando do seu isolamento a partir de sangue e corpos estranhos de recém-nascidos, realizando um exame criterioso dos dados clínicos e laboratoriais desses pacientes, com a finalidade de determinar a relevância clínica das amostras isoladas.

6- Referência Bibliográficas

1. Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA: Wright LL. **Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network.** *Pediatric* 2002, **110**:285-291.
2. Chapman RL, Faix RG: **Persistente bacteremia and outcome in late onset infection among infants in a neonatal intensive care unit.** *Pediatric Infect Dis* 2003, **22**:17-21.
3. Urrea M., Iriundo M, Thio M, Krauel X, Serra M, LaTorre C, Jimenez RA: **Prospective incidence study of nosocomial infections in a neonatal care unit.** *Am J Infect Control* 2003, **31**:505-507.
4. Cunha MLRS, Caramori JCT, Fioravante AM, Batalha JEN, Montelli AC, Barretti P: **Significance of Slime as Virulence Factor in Coagulase-Negative Staphylococcus Peritonitis in CAPD.** *Perit Dial Int* 2004, **24**:191-193.
5. Archer GL *Staphylococcus epidermidis*: the organism, its diseases, and treatment, 1984:25-48. In J. S. Remington and M. N. Swartz (ed.), Current clinical topics in infectious diseases 5. McGraw-Hill, New York.
6. Ziebhuhr W, Heilmann C, Gotz F, Meyer P, Wilms K, Straube, E, Hacher J: **Detection of the Intercellular Adhesion Gene Cluster (ica) and Phase Variation**

in *Staphylococcus epidermidis* Blood Culture Strains and Mucosal Isolates.
Infect and Immun 1997, **65**:890-896.

7. Klingenberg C, Aarag E, Ronnestad A, Sollid JE, Abrahamsen MD, Kjeldsen G, Flaegstad T: **Coagulase-Negative Staphylococcal Sepsis em Neonates – Association Between Antibiotic Resistance, Biofilm Formation and the Host Inflammatory Response.** *The Ped Infec Dis* 2005, **24**:817-822.

8. Vuong C, Otto M: ***Staphylococcus epidermidis* infections.** *Microb. Infect* 2002, **4**:481-489.

9. Arciola CR, Campoccia D, Gamberini S, Cervel-Lati M, Dontati E, Montanaro L: **Detection of slime Production by means of na optimized Congo red agar plate based on a Colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates geno Typed for *ica* locus.** *Biomaterials* 2002, **23**:4233-4239.

10. Arciola CR, Campoccia D, Gamberini S, Cervel, E, Dontati, L.M, Montanaro, L. **Occurrence of *ica* genes for slime synthesis in a collection of *Staphylococcus epidermidis* strains from orthopedic prosthesis infection.** *Acta Orthop Scand* 2003, **5**:617-621,

11. Costa FS, Miceli MH, Anaissie EJ: **Mucosa or Skin as source of coagulase-negative staphylococcal bacteremia.** *Clin Infect Dis* 2004, **4**:278-286.

12. 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, 12:701-707.
13. Gerke C, Kraft A, Sussmuth, R Schweitzer, O, Gotz F: **Characterization of the *N*-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesion.** *J Biol Chem* 1998, **273**:18856-18593.
14. Christensen GD, Arisi T, Bisno AL, Simpsom WA, Beachey EH: **Characterization of clinically significant strains of coagulase-negative *Staphylococci*.** *J Clin Microbiol* 1983, **18**:258-259.
15. 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.** *Infection and Immunity* 1999, **67**: 1004-1008.
16. Altoparlak U, Kadanali A, Celebi S: **Slime factor positivity in coagulase negative staphylococci isolate from nasal samples of haemodialysis patients.** *J Clin Pract* 2004, **58**:1112-1114.
17. Pfaller MA, Herwaldt LA: **Laboratory, clinical, and epidemiological aspects of coagulase-negative staphylococci.** *Clin Microbiol* 1988, **1**:281-299.

18. Cunha MLRS, Lopes CAM, Rugolo LMSS, Chalita LVAS: **Clinical significance of coagulase-negative Staphylococci from neonates.** *J Pediatr* (RJ) 2002, **78**:279-288.
19. Cunha MLRS, Caramori JCT, Lopes CAM. **Study of virulence factors in coagulase-negative staphylococci isolated from newborns:** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006, **101**: 661-668.
20. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn JR, WC: (eds). **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**, J.B. Lippincott, Philadelphia, 1997.
21. Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L. **Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production of Staphylococcal strains from cathater-associated infections.** *J Clin Microbiol* 2001, **39**:2151-2156.
22. Arciola CR, Gamberini S, Campoccia D, Visai L, Speziale P, Baldassari L, Montanaro L: **A multiplex PCR method for the detection of all five individual genes of *ica* locus in *Staphylococcus epidermidis*. A survey on 400 clinical isolates from prosthesis-associated infections.** 2005, doi: 10.1002/jbm.a.30445.
23. Centers for Disease Control and Prevention 1600 Clifton Rd. Atlanta, GA 30333, USA 800-CDC-INFO.

24. Curi PR: **Metodologia e análise de pesquisa em Ciências Biológicas**. 1ª ed. Botucatu: Tipomic; 1997.
25. Mccullagh P, Nelder JA: **Generalized linear Models**. London: Champman and Hall, 1992.
26. Collet D: **Modelling binary data**. London: Champman and Hall; 1991.
27. Aguirre JB, Rueda MAR, Pérez JC, Palomo VES, Torres MPR: **Importancia del peso al nacerem La generacion de infecciones nosocomiales en una Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales**. *Bol Med Hosp Inf Mex* 2007, **64**:288-294.
28. Pessoa -Silva CL, Myasaki CH, Almeida MF, Kopelman BI, Raggio RL, Wey SB: **Neonatal late-onset bloodstream infection: Attributable mortality, excess of length of stay and risk factor**. *European Journal Epdemiology* 2001, **17**:715-720.
29. Sung L, Ramotar K, Samson LM, Teye B: **Bacteremia Due to Persistente Strains of Coagulase-Negative Staphylococci in a Neonatal Intensive-Care Unit**. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999, **20**:349-351.
30. Alcaraz LE, Satorres, SE, Lucero RM, Centorbi ONP: **Species identification, slime production and oxacilin susceptibility in coagulase-negative staphylococci isolate from nosocomial specimens**. *Braz J Microbiol* 2003, **34**:45-51.

31. Healy CM, Palazzi LD, Morven SE, Campbell RJ, Baker JC: **Features of Invasive Staphylococcal Disease in Neonates.** *Pediatrics* 2004, **114**:953-961.
32. Eshali H, Ringertz S, Nystrom S, Faxelius G. **Septicaemia with coagulase negative staphylococci in a neonatal intensive care unit.** *Acta Paediatr Scand Suppl* 1989, **360**:127-134.
33. Hoang V, Sills J, Chandler M, Busalani E, Clifton-Koeppel R, Mondanlou HD: **Percutaneously Inserted Central Catheter for Total Parenteral Nutrition in Neonates: Complications Rates Related to Upper Versus Lower Extremity Insertion.** *Pediatrics* 2008, **121**:1152-1159.
34. Campeotto F, Garnier F, Kalach N, Soulaines P, Dupont C, Raymond J: **Acquisition nosocomiale de bactéries multirésistantes dans un service de néonatalogie: etude prospective et analyse des facteurs de risque.** *Archives de pédiatrie* 2004, **11**:1314-1318.
35. Nimri LF, Rawashdesh M, Meqdan MM: **Bacteremia in Children: Etiologic Agents, Focal Sites, and Risk Factors.** *Jornal of Tropical Pediatric* 2001, **47**: 356-360.
36. Babazono A, Kitajima H, Nishimaki S, Nakamura T, Shiga S, Hayakawa, Tanaka T, Sato K, Nakayama H, Ibara S, Une H, Doi H: **Risk Factors for Nosocomial Infection in the Neonatal Intensive Care Unit by Japanese Nosocomial Infection Surveillance.** *Acta Med Okayama* 2008, **62**:261-268.

37. Martius JA, Roos T, Gora B, Oehler MK, Schrod L, Papadopoulos T, Grob W: **Risk factors associated with early-onset sepsis in premature infants.** *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 1999, **85**:151-158.
38. Ronnestad A, Abrahamsen TG, Medbo S, Reigstad H, Lossius K, Kaaresen PI, Irgens LM, Markestad T: **Septicemia in the First Week of Life in a Norwegian National Cohort of Extremely Premature Infants.** *Pediatrics* 2005, **115**: 262-268.
39. Isaacs D: **A ten year, multicentre study, of coagulase negative Staphylococcal infections in Australian neonatal units.** *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 2003 **88**:89-93.
40. Agvald-Öhman C, Lund B, Edlund C: **Multiresistant coagulase-negative staphylococci disseminate frequently between intubated patients in a multidisciplinary intensive care unit.** *Critical Care* 2004, **8**:42-47.
41. Cabrera RH, Sebastian JD, Larios AB, Nadal D, Pena P, Caballero JG: **Septicemias asociadas a la cateterización venosa central em um hospital infantil. Estudo multivariante.** *Méd Clin* 1998, **111**:687-691.
42. Pessoa-Silva CL, Richtmann R, Calil R, Santos RMR, Costa MLM, Frota ACC, Wey BW: **Healthcare-Associated Infections Among Neonates in Brazil.** *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004, **25**:772-777.

43. Rosenthal VD, Maki DG, Salomao R, Álvarez-Moreno C, Mehta Y, Higuera F, Cuellar LE, Arikan OA, Abouqal R, Leblebicioglu H: **Device-Associated Nosocomial Infections in 55 Intensive Care Units of 8 Developing Countries.** *Ann Intern Med* 2006, **145**:582-592.
44. Tennant I, Harding H, Nelson M, Roye-Green K: **Microbial Isolates from Patients in an Intensive Care Unit, and Associated Risk Factors.** *West Indian Med J* 2005, **54**:225-231.
45. Lopes JMM, Goulart EMA, Starling CEF: **Pediatric Mortality Due to Nosocomial Infection: A Critical Approach.** *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2007, **11**:515-519.
46. Kotilainen P: **Association of coagulase-negative staphylococcal slime production and adherence with the development and outcome of adult septicemias.** *J Clin Microbiol* 1990, **6**:2779-2785.
47. Vuong C, Voyich JM, Fischer ER: **Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system.** *Cell Microbiol* 2004, **6**:269-275.
48. Vuong C, Kocianova S, Voyich JM: **A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion and virulence.** *J Biol Chem* 2004, **279**:54881-54886.