

Milena Borgo Azevedo

Staphylococcus COAGULASE-NEGATIVOS ISOLADOS DE NEONATOS:
ESPÉCIES PREVALENTES, CARACTERIZAÇÃO DO SCC_{mec} E GENÓTIPOS



Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia)

Orientador: Kátia Regina Netto dos Santos



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF PAULO DE GÓES
RIO DE JANEIRO
FEVEREIRO DE 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Azevedo, Milena Borgo

Staphylococcus coagulase-negativos isolados de neonatos prematuros: espécies prevalentes, caracterização do SCCmec e genótipos / Milena Borgo Azevedo– Rio de Janeiro, 2009

X, 77

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)

Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, 2009.

Orientador: Kátia Regina Netto dos Santos

Referências bibliográficas: f 64

1.neonato 2.*Staphylococcus* coagulase-negativo 3.identificação bacteriana 4. resistência à oxacilina; 5. SCCmec; 6. diversidade clonal

I. dos Santos Kátia Regina Netto. II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Mestrado em Ciências Biológicas. III. *Staphylococcus* coagulase-negativos isolados de neonatos prematuros: espécies prevalentes, caracterização do SCCmec e genótipos

Milena Borgo Azevedo

Staphylococcus COAGULASE-NEGATIVOS ISOLADOS DE NEONATOS:
ESPÉCIES PREVALENTES, CARACTERIZAÇÃO DO SCC_{mec} E GENÓTIPOS

Rio de Janeiro, ___ de fevereiro de 2009

Aprovada por:

Presidente: Regina Maria C. Pilotto Domingues

Ana Paula Vieira Colombo

Ana Luiza de Mattos Guaraldi

Leila de Souza Fonseca

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2009

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Infecção Hospitalar, Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob orientação da Prof^a Kátia Regina Netto dos Santos

AGRADECIMENTOS

À Deus.

À Dra. Kátia, pela grande oportunidade, ensinamentos, paciência e sobretudo pela confiança depositada.

A minha família, meus pais, Francisco e Rosângela (*in memória*), meus irmãos, Marina e Athayde, e ao meu primo Cassiano pela ajuda, compreensão e paciência.

Ao meu namorado, Thiago pelo amor e carinho.

Aos grandes amigos do Laboratório de Infecção Hospitalar, Ariane, Fernanda, André, Ricardo, Carol, Milena, Gustavo, Gal, Cristiane, Roberta, Natália e Felipe pelo convívio, amizade e imensa ajuda.

Ao Laboratório de Micobactérias e Microbiologia Molecular, pela ajuda e momentos de descontração, em especial ao Marlei e Orlando.

A Natália, por todas as noites em que fez companhia e pela ajuda enquanto escrevia a tese.

Ao Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, nas pessoas da Diretora Profa. Agnes Sá Figureiredo, e da Coordenadora de Pós-Graduação Prof^a. Thais Souto-Padrón.

A FAPERJ, CNPq, CAPES, PRONEX e FUJB, pelo suporte financeiro.

O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.

Fernando Pessoa

RESUMO

Milena Borgo Azevedo

Staphylococcus COAGULASE-NEGATIVOS ISOLADOS DE NEONATOS:
ESPÉCIES PREVALENTES, CARACTERIZAÇÃO DO SCCmec E GENÓTIPOS

Orientadora: Kátia Regina Netto dos Santos

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Staphylococcus coagulase-negativos (SCN) são responsáveis por 30% das bacteriemias hospitalares. Em neonatos, são agentes frequentes de sepse devido ao uso de procedimentos invasivos e à supressão de seu estado imunológico. O objetivo desse estudo foi avaliar a prevalência de espécies, susceptibilidade antimicrobiana e diversidade clonal em amostras de SCN isoladas de neonatos. As 84 amostras isoladas em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) de dois hospitais brasileiros, HC-UFU (30 amostras; MG) e IMMFM (54; RJ), foram identificadas fenotipicamente e por PCR para genes espécie-específicos de *S. haemolyticus* e *S. epidermidis*. A avaliação da resistência antimicrobiana foi realizada pelos métodos fenotípicos de disco-difusão e de determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e ágar triagem (4µg/mL) para oxacilina, e pela tipagem molecular do SCCmec. A análise de genótipos foi obtida por PFGE. Oito espécies diferentes de SCN foram identificadas, sendo *S. epidermidis* (61%) e *S. haemolyticus* (21%), as prevalentes. Resistência à oxacilina foi observada para 82% das amostras, sendo 84% da espécie *S. epidermidis* e 100% da espécie *S. haemolyticus*. Grande parte (40%) das amostras isoladas no HC-UFU foi teste D-positiva, em contraste com aquelas isoladas no IMMFM (7,4%). Cerca de 40% das amostras resistentes apresentaram os cassetes SCCmec de origem comunitária, tipos VI e V, detectados nas espécies *S. epidermidis* (100%) e *S. haemolyticus* (73,3%), respectivamente. Contudo, muitas (40,6%) foram não tipáveis. Todas as amostras tipo III foram multirresistentes e da espécie *S. epidermidis*. Amostras com SCCmec tipo II só foram encontradas no IMMFM. Quanto à diversidade clonal avaliada entre amostras resistentes à oxacilina, 91% dos *S. epidermidis* isolados no HC-UFU foram distribuídos em apenas três genótipos, enquanto as sete amostras de *S. haemolyticus* foram incluídas em dois genótipos. No IMMFM, as 32 amostras de *S. epidermidis* foram distribuídas em 18 genótipos, embora mais de 50% das amostras tenham sido incluídos em apenas cinco genótipos, enquanto entre as 11 amostras de *S. haemolyticus*, 7 (63%) pertenciam somente a dois genótipos. A maioria das amostras do mesmo genótipo, em ambas as UTINs, apresentaram o mesmo SCCmec e valores similares de CMI, confirmando a caracterização das amostras e sua transmissão cruzada nestas unidades hospitalares. Adicionalmente, 65% dos neonatos apresentaram baixo peso (<2500g), fator de risco importante para aquisição de infecção.

Palavras-chave: neonato; *Staphylococcus* coagulase-negativo; identificação bacteriana; resistência à oxacilina; SCCmec; diversidade clonal

Rio de Janeiro
Fevereiro 2009

ABSTRACT

Milena Borgo Azevedo

**COAGULASE-NEGATIVE *Staphylococcus* ISOLATED FROM NEONATES:
PREVALENCE OF SPECIES, SCCmec CHARACTERIZATION AND GENOTYPES**

Orientador: Kátia Regina Netto dos Santos

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS) are bacterial agents responsible for 30% of nosocomial bacteremia. In neonates, they are major causes of sepsis due to invasive procedures use and low immune response to infections. The aim of this study was to evaluate the prevalence of species, antimicrobial susceptibility and clonal diversity in samples of SCN isolated from neonates. The samples (84), isolated from Neonatal Intensive Care Units (NICU) of two Brazilian hospitals, HC-UFU (30 samples; MG) and IMMFM (54; RJ) were identified phenotypically and by PCR for species-specific genes of *S. epidermidis* and *S. haemolyticus*. Antimicrobial resistance analysis was performed by the phenotypic methods of disk-diffusion and the determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC), and agar screening for oxacillin, and by the molecular typing of SCCmec. Genotypes were obtained by PFGE. Eight different species of SCN have been identified, and the species *S. epidermidis* (61%) and *S. haemolyticus* (21%) were the most prevalent. Oxacillin resistance was observed for 82% of samples, including 84% of *S. epidermidis* and 100% of *S. haemolyticus* Isolates. About 40% of isolates in the HC-UFU was D test-positive, in contrast to those isolated from IMMFM (7.4%). SCCmec types of community origin, as types V and VI, were found in 40% of the isolates, including the species *S. epidermidis* (100%) and *S. haemolyticus* (73.3%), respectively. However, some isolates (40.6%) were not typable. All isolates from SCCmec type III were multiresistant and belonged to the species *S. epidermidis*. Isolates with SCCmec type II were found only in IMMFM. Analysis of the clonality performed among oxacillin-resistant isolates included 91% of *S. epidermidis* isolated from HC-UFU in only three genotypes, whereas seven isolates of *S. haemolyticus* were included in two genotypes. Among CNS isolated from IMMFM, 32 *S. epidermidis* isolates were distributed in 18 genotypes, although more than 50% of them have been included in only five genotypes. Of the 11 isolates of *S. haemolyticus*, 7 (63%) belonged to only two genotypes. Most isolates of the same genotype in both the NICU, showed the same SCCmec and similar values of MIC, confirming the characterization of strains and their cross-transmission into NICU. Additionally, 65% of the neonates had low birthweight (<2500g), an important risk factor for acquisition of infection.

Keyword: neonates; Coagulase-negative *Staphylococcus*; bacterial identification, oxacillin resistance, SCCmec, clonal diversity

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2009

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 OBJETIVOS | 19 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 20 |
| 3.1 Desenho do Estudo | 20 |
| 3.1.1 Aspectos Clínicos e Éticos | 20 |
| 3.1.2 Amostras Bacterianas | 20 |
| 3.1.3 Análise estatística | 21 |
| 3.2 Identificação bacteriana convencional | 21 |
| 3.2.1 Identificação do Gênero <i>Staphylococcus</i> | 21 |
| 3.2.2 Aspecto morfo-tintorial | 22 |
| 3.2.3 Expressão da enzima catalase | 22 |
| 3.2.4 Susceptibilidade à bacitracina | 22 |
| 3.3 Identificação das espécies de <i>Staphylococcus</i> | 22 |
| 3.3.1 Expressão da enzima coagulase | 23 |
| 3.3.2 Expressão de fator “clumping” | 23 |
| 3.3.3 Susceptibilidade à novobiocina e desferrioxamina | 23 |
| 3.3.4 Expressão da enzima pirrolidonil arilamidase (PYRase) | 24 |
| 3.3.5 Expressão da enzima fosfatase | 24 |
| 3.3.6 Expressão da enzima urease | 24 |
| 3.3.7 Fermentação da manose e trealose | 24 |
| 3.4. Determinação da susceptibilidade antimicrobiana | 26 |
| 3.4.1. Teste de difusão a partir do disco | 26 |
| 3.4.2 Teste de diluição em ágar com oxacilina | 27 |
| 3.4.3 Teste de triagem em ágar contendo oxacilina..... | 27 |
| 3.5. Técnica da PCR para detecção de seqüências gênicas específicas | 28 |
| 3.5.1 Extração do DNA bacteriano através da utilização de isotiocianato de guanidina.... | 28 |
| 3.5.2. PCR para detecção de seqüências gênicas espécie-específicas de <i>S. epidermidis</i> e <i>S. haemolyticus</i> | 28 |
| 3.5.3. PCR multiplex para tipagem do SCCmec | 29 |
| 3.6. Análise do perfil de fragmentação do DNA cromossômico após tratamento com enzima de restrição e separação por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) | 31 |
| 4 RESULTADOS | 33 |
| 5 DISCUSSÃO | 53 |
| 6 CONCLUSÕES | 62 |
| 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 64 |
| ANEXOS | 76 |

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
 ATCC - American Type Culture Collection
 BAC - Bacitracina
 CA-ORSA- Community acquired – Oxacillin Resistant *S. aureus*
 CAT - Catalase
 CDC- Centers for Disease Control and Prevention
 CG - Coagulase livre
 CLSI- Clinical Laboratory Standard Institute
 CMI Concentração Mínima Inibitória
 CVC - Cateter Vascular Central
 DEF - Desferrioxamina
 DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
 FC - Fator “clumping”
 FOS - Fosfatase
 HA -ORSA- Hospital acquired – Oxacillin Resistant *S. aureus*
 HC-UFU - Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
 HEM - Hemólise
 IMMFM - Instituto Municipal da Mulher Fernando Magalhães
 IRASs -Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
 MAN - Manose
 MLST- Multilocus Sequence Type
 MRSA- Methicillin-Resistant *S. aureus*
 NHSN- National Healthcare Safety Network
 NICHD- National Institute of Child Health and Human Development
 NNIS - National Nosocomial Infection Surveillance System
 NOV - Novobiocina
 ORSA- Oxacillin-Resistant *S. aureus*
 ORSE - Oxacillin-Resistant *S. epidermidis*
 ORSH - Oxacillin-Resistant *S. haemolyticus*
 PCR- Polymerase Chain Reaction
 PFGE- Pulsed Field Gel Electrophoresis
 PYR - Pirrolidônio arilamidase
 R - Resistente
 RN - Recém-Nascidos
 S - Sensível
 SCN - *Staphylococcus* Coagulase-Negativos
 TRE - Trealose
 TSA- Trypticase Soy Agar
 URE - Urease
 UTINs - UTIs neonatais
 VON- Vermont Oxford Network
 WHO- World Health Organization
 XYL - Xylose

1 INTRODUÇÃO

1. Infecção relacionada à assistência à saúde – Aspectos Gerais

Ultimamente, o termo infecção hospitalar tem sido substituído por Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRASs), sendo aquela adquirida no curso de um tratamento específico para outra enfermidade, dentro de um cenário de cuidados médicos (CDC, 2008). As IRASs constituem uma importante causa de morbidade e mortalidade em instituições de saúde de todo o mundo, constituindo um grave problema de saúde pública, tanto em países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento. Milhares de pacientes são acometidos anualmente, resultando em tempo de hospitalização prolongado e altos custos para estas instituições (WHO, 2006).

Nas últimas décadas esse quadro tem se agravado devido às infecções causadas por microrganismos multirresistentes (GRAF & MARTIN, 2000). Dados do “National Nosocomial Infection Surveillance System” (NNISS), um sistema americano de vigilância de infecção hospitalar, publicados em 2004, mostraram que as taxas de resistência em bactérias causadoras de infecções hospitalares têm aumentado para a maioria das espécies, entre elas *Staphylococcus* resistente à oxacilina e *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos e quinolonas. O uso aumentado de antimicrobianos está fortemente associado à emergência desses patógenos multirresistentes no ambiente hospitalar (KOLLEF, 2000).

Os estafilococos estão entre os principais agentes etiológicos de infecções bacterianas no ambiente hospitalar e na comunidade (WILKINSON, 1997). Este foi o principal gênero bacteriano isolado a partir de bacteriemias comunitárias e hospitalares em dois estados norte-americanos, entre 1999 e 2000 (DIEKEMA *et al.*, 2003). Um estudo envolvendo seis países da América Latina, incluindo o Brasil, entre os anos de 1997 e 2001, mostrou que a espécie *Staphylococcus aureus* foi aquela com maior prevalência em IRASs, especialmente em bacteriemias, sendo responsável por 21% destes quadros. Os *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN) ocuparam o terceiro lugar, sendo responsáveis por 13% dessas infecções (SADER *et al.*, 2004). Em outro estudo, realizado a partir de dados obtidos em 19 centros médicos canadenses nos períodos de 2005 e 2006 os *Staphylococcus* spp. foram o grupo de microrganismo mais isolado de UTIs, sendo o mais prevalente em hemoculturas (ZHANEL *et al.*, 2008). Wisplinghoff e colaboradores (2004) mostraram que os SCN

foram os agentes mais prevalentes em bacteriemias, tanto como em UTIs outras unidades hospitalares de 49 estados norte-americanos, entre 1995 e 2002.

1.1 Pacientes Recém Nascidos- Aspectos associados à infecções relacionadas a assistência à saúde

O avanço na tecnologia de cuidados médicos contribuiu para uma maior sobrevivência de recém-nascidos (RN) prematuros, mas também representou a inclusão de fatores de risco, como o emprego de procedimentos invasivos, facilitando a aquisição de IRAS por estes pacientes. Em particular, o baixo peso, assim como o imunocomprometimento e os baixos níveis de anticorpos transplacentários no RN contribuem, sobremaneira, para o agravamento do quadro (PESSOA-SILVA *et al.*, 2001; KILBRIDE *et al.*, 2003; ZINGG, POSFAY-BARBE & PITTET, 2008). De acordo com o National Healthcare Safety Network (NHSN), o peso do RN é dividido em cinco categorias: < 750g, 751 - 1000 g, 1001-1500 g, 1501- 2500 g, >2500 g (EDWARDS *et al.*, 2008)

As IRAS são responsáveis por taxas significativas de morbidade e mortalidade em Unidades de Tratamento Intensivo Neonatal (UTINs), resultando em hospitalização prolongada dos RN (WEI *et al.*, 2005). A Organização Mundial de Saúde estima que a taxa de IRAS em UTINs varia de 5,9 a 32% (BANG *et al.*, 2005). No Brasil, as taxas de IRAS em UTINs têm variado de 34% (COUTO *et al.*, 2007;TÁVORA *et al.*, 2008) a 50,7% (NAGATA, BRITO & MATSUO, 2002) em UTINs. Em comparação à população pediátrica de maior idade, os índices de IRAS em neonatos podem ser até cinco vezes maiores (SRIVASTAVAA & SHETTY, 2007).

A contribuição da assistência aos RNs para o decréscimo da mortalidade infantil é uma das características fundamentais no cenário epidemiológico. Várias iniciativas vêm sendo desenvolvidas para a formação de redes neonatais multicêntricas, tendo como objetivo melhorar a qualidade da atenção neonatal. No Brasil, foi fundada a Rede de Pesquisa Neonatal, envolvendo serviços de neonatologia do Sul-Sudeste, regiões com menores taxas de mortalidade do país (HORBAR, 1999). Nos EUA, há a Rede Vermont Oxford (“Vermont Oxford Network”, VON) e a Rede Neonatal do Instituto Nacional de Saúde (“National Institute of Child Health and Human Development” NICHD) (CASTRO & LEITE, 2007).

Entre as principais IRASs adquiridas por neonatos, destaca-se a sepse. Em países em desenvolvimento, essa infecção representa 3,6 a 21% de todas as demais IRASs (KARTHIKEYAN & PREMKUMAR, 2001). Um estudo de cohort, desenvolvido por Couto e colaboradores (2007), envolvendo seis UTINs de Brasília, mostrou que as IRASs mais freqüentes são: sepse (45,9%), conjuntivite (12,1%), infecção cutânea (9,6%) e pneumonia (6,8%), sendo os microrganismos Gram- negativos responsáveis por 51,6% dos episódios de sepse e os Gram-positivos, principalmente os SCN, responsáveis por 37,4%. Em um estudo envolvendo necrópsia de RN com baixo peso ao nascer, realizado por cientistas de uma universidade em Los Angeles, durante 1990 e 1993, foi observado que a principal causa de óbitos é sepse (50%), seguida por síndrome respiratória (22%) (BARTON, HODGMAN & PAVLOVA, 1999).

Os fatores de risco para sepse neonatal de origem hospitalar podem ser divididos em fatores intrínsecos e extrínsecos. Os fatores intrínsecos incluem: idade gestacional, peso ao nascer, severidade da doença e imunocomprometimento do RN (GAYNES *et al.*, 1996), enquanto os fatores extrínsecos incluem: emprego de procedimentos invasivos, como cateteres, sonda gástrica, cânula traqueal e administração de nutrição parenteral, uso inadequado de antimicrobianos e de técnicas de higiene (KAUFMAN & FAIRCHILD, 2004; PAYNE *et al.*, 2004; STRUNK *et al.*, 2007; HOLMES *et al.*, 2008).

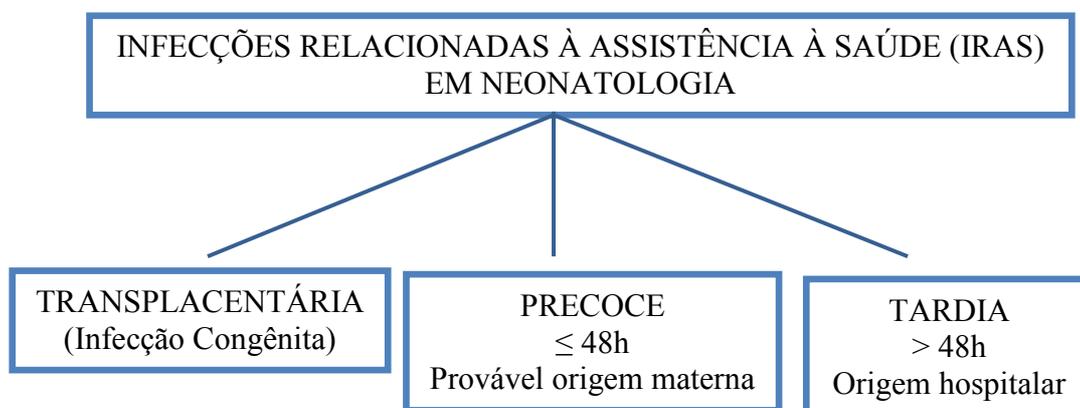
O diagnóstico e controle das IRASs, especialmente em UTIN, são de difícil realização, já que os sintomas destes pacientes não são específicos, sendo necessária delicada avaliação clínica e um adequado sistema de vigilância (ZWET *et al.*, 2005). Todos os pacientes em estado crítico, com uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica ou síndrome de disfunção de múltiplos órgãos, parecem sépticos. Apesar disso, apenas metade está infectada (MARSHALL & SWEENEY, 1990). O uso empírico de antimicrobianos pode ser um risco, pois estes alteram a microbiota anfibiótica do neonato, e selecionam microrganismos resistentes (MUSSI-PINHATA, 2001; LACROIX, 2007).

Para o diagnóstico de sepse, é necessária a presença de pelo menos um dos seguintes critérios: (1) uma ou mais hemoculturas positivas para microrganismos não contaminantes da pele; (2) pelo menos um sinal clínico de infecção; (3) em caso de microrganismos considerados contaminantes de pele (como SCN), pelo menos duas hemoculturas positivas colhidas em dois locais diferentes, com intervalo máximo de 48 horas entre as coletas; (4) e presença de SCN em pelo menos uma hemocultura de sangue periférico, em paciente

com cateter vascular central (CVC) (VENKATESH *et al.*, 2006; CDC, 2008). Dentre os sinais típicos, mas não específicos de sepse, os mais comuns são apnéias, letargia, irritabilidade, intolerância alimentar, incluindo à glicose, palidez cutânea, hipotensão, instabilidade térmica, desordem gastrintestinal, aumento da necessidade de oxigênio e/ou cianose, hiperglicemia e hipoglicemia (PANERO, 1997; BIZARRO *et al.*, 2005; STRUNK *et al.*, 2007; Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2008).

No caso de sepse, apesar do isolamento de microrganismos do sangue ser o método de escolha para o diagnóstico da infecção (SARKAR *et al.*, 2006), existe a dificuldade em se obter um volume sanguíneo necessário para hemocultura. Se apenas 0,5 mL de sangue do RN fossem utilizados para análise, cerca de 60% das hemoculturas seriam falso-negativas para patógenos neonatais comuns (KELLOGG *et al.*, 1997). O amplo uso de antimicrobianos intraparto também pode tornar a incidência de sepse clínica associada à hemocultura negativa significativamente mais alta do que aquela comprovada por cultura (KAUFMAN & FAIRCHILD, 2004). Apesar disso, o método padrão para diagnosticar sepse neonatal continua sendo a hemocultura, embora, em muitos casos, estas sejam negativas diante de fortes indicadores clínicos de septicemia, ou até mesmo em infecções disseminadas por bactéria ou fungo comprovadas por necrópsia.

Segundo a ANVISA (2008) em neonatologia as IRAS podem ser classificadas em: transplacentária, quando as infecções são adquiridas por via transplacentária, com acometimento intra-úterino; precoce, de provável origem materna, quando a evidência diagnóstica da infecção ocorreu nas primeiras 48 horas de vida, com fator de risco materno para infecção; tardia, de origem hospitalar, cuja evidência diagnóstica ocorre após as primeiras 48 horas de vida (Figura 1)



Antes de 1980, a maioria das infecções tardias em RNs e crianças em geral era causada por *S. aureus* e bacilos Gram-negativos. Nos últimos 30 anos, os SCN se tornaram os principais patógenos, sendo responsáveis por até 75% de sepse neonatal tardia, destacando-se a espécie *S. epidermidis* (MUSSI-PINHATA & NASCIMENTO, 2001; WEISMAN, 2004).

Um estudo retrospectivo realizado nos EUA, que avaliou 755 hemoculturas positivas obtidos de neonatos entre 1989 a 2003, identificou os SCN como os agentes etiológicos mais comuns (29%), seguido de *Escherichia coli* (12%), *Streptococcus* grupo B (10%) e *S. aureus* (10%) (BIZARRO *et al.*, 2005). Após classificação das IRAS, foi observado que nas IRAS precoces, os *Streptococcus* grupo B foram os microrganismos mais isolados (47%), seguidos de *E. coli* (27%). A maioria dos neonatos caracterizava-se por ter uma idade gestacional > 30 semanas e peso acima de 1500g, e somente 10% usavam cateter vascular central. Nas infecções tardias, os microrganismos mais frequentes foram SCN (39%), seguidos por *E. coli* (9%) e *C. albicans* (8%). Neste caso, os neonatos tinham uma idade gestacional < 30 semanas e peso inferior a 1500g, enquanto 78% deles usavam cateter vascular central (BIZARRO *et al.*, 2005).

Um estudo desenvolvido pelo grupo SENTRY, entre 1997 e 2000, avaliou a frequência de patógenos isolados em 25745 hemoculturas, coletadas de centros médicos da América do Norte. Os autores observaram que *S. aureus*, *E. coli* e SCN foram os patógenos mais comuns, sendo responsáveis por 55% da bacteriemias. Os SCN foram os patógenos mais isolados em crianças com menos de um ano de idade (DIEKEMA, PFALLER & JONES, 2002).

1.2. Pacientes Recém-Nascidos – Aspectos Relacionados à Imunidade

Nos seres humanos, as primeiras linhas de defesa contra a infecção são a epiderme e as membranas mucosas intactas, barreiras estas que estão comprometidas em neonatos prematuros. O estrato córneo do prematuro tem a espessura de apenas três camadas de células na 26ª semana de gestação, enquanto os não prematuros apresentam 16 camadas. Eles também apresentam uma fina camada de queratina na epiderme, que é facilmente danificada pela manipulação, uso de adesivos e aplicação de álcool (EVANS & RUTTER, 1986).

A colonização da superfície cutâneo-mucosa, com posterior invasão microbiana estimula uma resposta inflamatória no hospedeiro, levando à migração de neutrófilos e

macrófagos para o local da infecção. Essas células após fagocitarem os microrganismos promovem sua eliminação, com a ajuda de anticorpos e do sistema complemento disponíveis no soro do hospedeiro (FOSTER, 2005). Nesse sentido, a transmissão placentária de IgG tem um papel importante no mecanismo de defesa. Em crianças prematuras, um baixo nível de IgG está associado a sepse tardia. A transferência materno-fetal de IgG ocorre, principalmente, no terceiro trimestre gestacional. Assim, crianças nascidas antes de 32 semanas de gestação possuem baixos níveis de anticorpos adquiridos passivamente, além de apresentar produção limitada de anticorpos em resposta aos novos antígenos apresentados (HEALY & BAKER, 2007).

A taxa de incidência de sepse em RNs é inversamente proporcional ao peso do neonato e à idade gestacional (STOLL *et al.*, 2002). Esses aspectos estão relacionados com a falta de anticorpos efetivos e com a diminuição da atividade do complemento em RNs prematuros, contribuindo para uma fagocitose ineficiente das células polimorfonucleares e, conseqüentemente para a não eliminação do patógeno (STRUNK *et al.*, 2007).

1.3 Gênero *Staphylococcus*

Os *Staphylococcus* são classificados como cocos Gram-positivos, com baixo conteúdo G+C, pertencentes à família *Staphylococcaceae*, com diâmetro variando de 0,5 a 1,5 µm. Não formam esporos, são resistentes a bacitracina e imóveis, e, normalmente, são catalase-positivos. Suas células podem ser visualizadas através de microscopia óptica isoladamente, aos pares, em tétrades, pequenas cadeias (3 ou 4 células), ou em arranjos irregulares, em forma de cachos. As colônias são geralmente opacas ou podem ter tonalidade branca, creme e, algumas vezes, podem variar de amarelo à laranja. Geralmente, crescem em até 10% de NaCl e a temperatura ótima de crescimento está entre 30°C e 37°C (BANNERMAN & PEACOCK 2007). O gênero atualmente é composto por 41 espécies e 24 subespécies (EUZÉBY, 2008).

As espécies de *Staphylococcus* estão distribuídas em dois grandes grupos: coagulase negativo e coagulase-positivos. Essa divisão é fundamentada na produção de uma enzima extracelular denominada coagulase, capaz de converter o fibrinogênio sanguíneo em fibrina, conferindo à bactéria a capacidade de coagular o plasma humano (ARCHER, 2000).

S. aureus é a espécie coagulase-positiva de maior relevância clínica, sendo o principal agente etiológico de IRAS e infecções comunitárias, podendo causar desde

infecções cutâneas e de tecidos moles, como celulite, impetigo e abscesso, até infecções graves decorrentes da invasão direta dos tecidos, como pneumonia, meningite, endocardite e bacteriemia (CASEY *et al.*, 2007; KUBICA *et al.*, 2008).

O sucesso do *S. aureus* como patógeno é, primariamente, devido à produção de um vasto número de fatores de virulência, que inclui um conjunto de adesinas superficiais capazes de se ligar aos componentes da matriz extracelular do hospedeiro, conhecidas como “microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules” (MSCRAMMS). Além disso, praticamente todas as amostras produzem enzimas como proteases, nucleases, hialuronidase, lipases e colagenases (FOSTER, 2005; KUBICA *et al.*, 2008). Essa espécie também pode produzir toxinas com propriedades de superantígeno, causando infecções mesmo em pacientes hígidos (FOSTER, 2005).

O ser humano é considerado o reservatório natural de *S. aureus* e as narinas anteriores constituem o principal nicho deste microrganismo, sendo, aproximadamente, 20% dos indivíduos carreadores persistentes, e 30% carreadores intermitentes (WERTHEIM *et al.*, 2008). Esse tipo de colonização se constitui em grande risco para aquisição de infecções estafilocócicas, já que grande parte das bacteriemias nosocomiais tem origem endógena (HOLTFRETER *et al.*, 2007). Em RNs, o maior reservatório de *S. aureus* é o cordão umbilical, mas outros sítios também são relatados, como pele, nasofaringe e trato gastrintestinal. Após 10 dias de vida, aproximadamente 80% dos RNs estão colonizados por *S. aureus* (CIMOLAI, 2003; ZINGG, POSFAY-BARBE & PITTET, 2008).

Em relação aos SCN, a maioria das espécies distribui-se em todo o corpo humano, como *S. epidermidis* e *S. cohnii*, mas algumas delas apresentam nichos preferenciais no hospedeiro. *S. capitis* é prevalente no couro cabeludo e face após a puberdade, enquanto *S. auriculares* apresenta tropismo pelo ouvido médio. *S. saprophyticus* possui propriedades que permitem sua aderência em células do trato geniturinário, enquanto as espécies *S. hominis* e *S. haemolyticus* são encontradas com frequência em áreas do tecido cutâneo onde são numerosas as glândulas apócrinas, como axilas e região púbica (BANNERMAN & PEACOCK, 2007).

Os SCN geralmente estão em equilíbrio na microbiota do hospedeiro. No entanto, podem causar infecções quando há rompimento da barreira cutâneo-mucosa (SALYERS & WHITT, 2003), por isso são responsáveis por grande parte das IRAS (BEARMAN & WENZEL, 2005). Em uma análise de bacteriemias realizada pelo grupo SENTRY, no

Canadá, durante o período de 1997 e 1998, foi observada uma alta prevalência dos SCN como agentes etiológicos responsáveis por este tipo de infecção (DIEKEMA *et al.*, 2000). Dados desse mesmo programa, coletados entre 1997 e 2001, em instituições de saúde da América Latina, mostraram os SCN como a terceira causa de bacteriemias (SADER *et al.*, 2004). *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* são as espécies de SCN mais relacionadas com tais tipos de infecções (PFALLER *et al.*, 1999).

A espécie prevalente na microbiota humana é o *S. epidermidis*, sendo também a mais isolada de bacteriemias relacionadas ao uso de cateter vascular central, bem como em infecções em geral, por SCN (GARCIA *et al.*, 2004; WEISMAN, 2004; CASEY *et al.*, 2007). O aumento do uso de biomateriais na medicina, como cateteres, próteses, válvulas cardíacas e marcapasso, predispõe à colonização e infecção por *S. epidermidis* devido à sua habilidade de aderência à esses biomateriais, através da expressão de proteínas de ligação como, a Fbe (“fibrinogen binding *S. epidermidis*”) e a autolisina AtlE, (VON EIFF, PETERS & HEILMANN, 2002) assim, possui habilidade em formar um biofilme estável (MACK *et al.*, 2007). O biofilme é composto por múltiplas camadas de células do microrganismo, depositadas sobre a superfície de um polímero e protegidas por um material amorfo, o “slime” (GÖTZ, 2002). Em associação ao “slime” foi verificada a presença de uma adesina polissacarídica intercelular, denominada PIA (“Polysaccharide Intercellular Adhesin”), um polissacarídeo composto de β -1-6-N-acetilglicosamina (GÖTZ, 2002) presente também em *S. aureus* e em algumas cepas de *E. coli* (VUONG *et al.*, 2004).

Outra espécie de SCN freqüente em bacteriemias é *S. haemolyticus*, a segunda mais relacionada com infecções humanas, tais como endocardites, septicemias, peritonites, infecções geniturinárias, ósseas e articulares (Spanu *et al.*, 2003; OTTO, 2004). Essa espécie também é conhecida por sua maior resistência à oxacilina, entre os SCN e, freqüentemente, têm apresentado concentrações mínimas inibitórias (CMIs) para glicopeptídeos mais elevadas do que outras espécies (ING, BADDOUR & BAYER, 1997).

Amostras da espécie *S. hominis* têm sido isoladas de artrites, endocardites e de septicemias (BANNERMAN & PEACOCK, 2007). Dentre os SCN, essa é a terceira espécie mais isolada em IRASs (CHAVES *et al.*, 2005).

S. saprophyticus é considerado o segundo patógeno mais comum em infecções urinárias comunitárias, em mulheres jovens, sendo responsável por 10-15% dos casos (VON EIFF, PETERS & HEILMANN, 2002). Outras complicações severas incluem

pielonefrite, septicemia, endocardite, além de infecções do trato urinário em homens pelo uso de sonda vesical (RAZ *et al.*, 2005). Essa espécie tem uma grande capacidade em aderir às células do uroepitélio (VON EIFF, PETERS & HEILMANN, 2002). Algumas proteínas de superfície no patógeno têm sido relacionadas a essa capacidade de adesão, como a proteína “adhesin of *S. saprophyticus*” (Aas), que permite aderência a fibronectina e promove hemaglutinação, e a proteína Ssp (“*Staphylococcus saprophyticus* surface-associated protein”) (VON EIFF, PETERS & HEILMANN, 2002; OTTO, 2004). A urease é outro fator de virulência importante no *S. saprophyticus*, pois contribui para a invasão do patógeno através do dano ocasionado pela alteração no pH local devido à produção de amônia pelo patógeno. A presença de lipase, elastase e enzima modificadora de ácidos graxos (FAME) também têm sido relatadas nessa espécie (VON EIFF, PETERS & HEILMANN, 2002; OTTO, 2004).

A espécie *S. capitis* apresenta duas subespécies: *S. capitis* subsp *capitis* e *S. capitis* subsp *urealyticus*, facilmente distinguíveis pela produção da urease. *S. capitis* tem sido responsável por infecções do trato urinário, bacteriemias relacionadas à cateter, endocardite, enterocolite necrotizante em RN e outras infecções (CONE *et al.*, 2005).

Em 1988, foram descritas duas novas espécies de *Staphylococcus* como patógenos nosocomiais, *S. lugdunensis* e *S. schleiferi* (FRENEY *et al.*, 1988). Elas estão associadas a endocardites, infecções relacionadas à presença de polímeros, osteomielites, artrites, infecções do trato urinário e infecções em feridas. Tem se destacado o tipo agressivo de endocardite causado por *S. lugdunensis*, demonstrando ser esta espécie uma das mais patogênicas entre os SCN (LEUNG *et al.*, 1998; FRANK *et al.*, 2008). Aproximadamente 25% das amostras clínicas de *S. lugdunensis* produzem “slime” ou glicocalice, que tem importante papel na colonização bacteriana, além de interferir na fagocitose. Em adição, enzimas importantes na invasão são detectadas em *S. lugdunensis*, incluindo estearases, FAME, proteases e lípases. Essa espécie também pode expressar fator “clumping”, produzir DNase (VON EIFF, PETERS & HEILMANN, 2002; OTTO, 2004) e SLUSH (“*Staphylococcus lugdunensis* synergistic haemolysin”), uma exoproteína com atividade hemolítica sinérgica de *S. aureus* em ágar sangue (FRANK *et al.*, 2008).

Szeeczyk, Piotrowski & Rózska (2000) isolaram 147 amostras de *Staphylococcus* spp. de superfícies do ambiente e 72 amostras de RN internados na UTI pediátrica de um hospital de ensino na Polônia. Os autores observaram que a espécie *S. cohnii* representava 44% das amostras isoladas no ambiente, seguido de *S. epidermidis* (23%). Em neonatos, *S.*

epidermidis predominava sendo 59% das amostras clínicas, seguido de *S. haemolyticus*, (15%). Apenas duas dessas amostras de neonatos eram da espécie *S. cohnii*.

Microrganismos Gram-negativos são os principais agentes etiológicos de sepse neonatal em países em desenvolvimento (ZAIDI *et al.*, 2005). Entretanto, em UTINs de cuidados terciários, que possuem espaço físico e práticas de controle de infecção adequadas, os SCN se destacam como os principais agentes de sepse hospitalar neonatal (KREDIET *et al.*, 2004). Um estudo realizado por Sohn e colaboradores (2001) em 29 UTINs dos EUA mostrou que os SCN eram os patógenos mais frequentes em bacteriemias, sendo responsáveis por 48% das mesmas. Em 2005, um estudo realizado em oito UTINs na Colômbia apontou os microrganismos Gram-negativos (55%) como os agentes etiológicos mais frequentes de bacteriemias (EFIRD *et al.*, 2005). Já em um estudo desenvolvido por Center e colaboradores (2003), os autores isolaram 321 amostras de SCN de RNs prematuros, as espécies mais frequentes foram *S. epidermidis* (60%), *S. warneri* (12%), *S. haemolyticus* (9,7%) e *S. hominis* (5,6%).

1.4 Caracterização de espécies

A identificação do microrganismo envolvido em uma infecção é fundamental para a análise epidemiológica de sua distribuição nas IRASs e para o monitoramento da terapêutica utilizada contra o patógeno (KLOOS & BANNERMAN, 1994). A identificação precisa da espécie estafilocócica é importante para o tratamento efetivo do paciente e para confirmar as falhas na terapêutica (SPANU *et al.*, 2003), sobretudo quando realizada a partir de amostras isoladas de sepse associada a procedimentos invasivos, que responde por mais da metade dos casos (GOLDMANN, 1990), sendo a espécie *S. epidermidis* responsável por cerca de 60% desse tipo de infecção (HUDOME & FISHER, 2001).

A identificação convencional dos estafilococos é realizada a partir da combinação de um grupo de testes fenotípicos, que inclui, entre outros, a verificação da morfologia colonial, do metabolismo fermentativo e da susceptibilidade a certos antimicrobianos (BANNERMAN & PEACOCK 2007). Iorio e colaboradores (2007) desenvolveram um método simplificado de identificação, composto de nove testes, que mostrou uma acurácia de 98.5% quando foram analisadas 198 amostras de *Staphylococcus* spp.

O diagnóstico de infecções estafilocócicas também tem sido realizado através de técnicas moleculares, principalmente através da reação em cadeia da polimerase (PCR) (MASON *et al.*, 2001; SAKAI *et al.*, 2004; SKOW *et al.*, 2005). Zhang e colaboradores

(2004) descreveram uma técnica de PCR-Quadriplex para identificação de amostras clínicas de *S. aureus* e de sua resistência a meticilina e mupirocina. Esta técnica foi capaz de diferenciar a espécie *S. aureus* dos demais SCN, bem como determinar sua resistência a oxacilina e mupirocina, com 100% de concordância com os testes fenotípicos, porém não identificou os SCN em espécies. Martineau e colaboradores (2001) desenvolveram um PCR que permite a identificação dos estafilococos à nível de gênero e espécie. Recentemente, Schuenck e colaboradores (2008), utilizando oligonucleotídeos específicos para a espécie *S. haemolyticus*, identificaram 41 amostras desta espécie, entre 147 amostras clínicas de SCN, mostrando uma sensibilidade e especificidade de 100%.

1.5 Resistência aos Antimicrobianos

A era antibiótica foi iniciada em 1941, com a utilização da penicilina. Desde então, vem sendo marcada por ciclos característicos pela introdução de novos antimicrobianos, seguidos rapidamente do aparecimento de amostras resistentes (SWARTZ, 2000; ITO *et al.*, 2003). Cinco anos após a sua introdução, aproximadamente 50% das amostras de *S. aureus* já se apresentavam resistentes à penicilina, atingindo taxas de até 95% de resistência (LIVERMORE, 2000; STREIT *et al.*, 2004). Em 1959, começaram a ser utilizadas, na Europa, penicilinas semi-sintéticas resistentes a β -lactamases, como meticilina, oxacilina e nafcilina, para o tratamento de infecções ocasionadas por cepas de *S. aureus* resistentes à penicilina. No entanto, em 1961 foi relatado o primeiro caso de amostra “Methicillin-resistant *S. aureus*” (MRSA) ou “Oxacillin-resistant *S. aureus*” (ORSA) na Inglaterra (JEVONS, 1961 *apud* RICE *et al.*, 2006).

Uma vez que a resistência à oxacilina está relacionada à resistência a todos os agentes β -lactâmicos e a outras classes de antimicrobianos, a terapêutica utilizada em infecções causadas por *Staphylococcus* multirresistentes tem se baseado no uso da vancomicina, um glicopeptídeo que tem sido prescrito como alternativo no tratamento dessas infecções (ENDTZ *et al.*, 1999). Entretanto, esse antibiótico apresenta algumas desvantagens, como custo elevado e alta toxicidade (HIRAMATSU *et al.*, 1997). Além disso, o uso de antimicrobianos está fortemente associado à emergência desses patógenos multirresistentes no ambiente hospitalar (KOLLEF, 2000).

Acredita-se que os SCN constituem um reservatório para os genes de resistência, permitindo que ocorra uma transferência horizontal para os *S. aureus* (HANSSEN & SOLLID, 2006). Berglund e Söderquist (2008) sugeriram que um clone prevalente de *S.*

haemolyticus resistente à oxacilina (ORSH), isolado na UTIN de um hospital na Suécia tenha transmitido horizontalmente o gene de resistência a oxacilina (*mecA*) para cepas de *S. aureus* sensíveis à oxacilina.

1.5.1 Resistência à oxacilina

Dados do programa SENTRY, realizado em 2001 no Brasil e América Latina, mostraram que a resistência à oxacilina entre amostras de *S. aureus* é de cerca de 43%, enquanto para os SCN as taxas alcança 79,3%, no Brasil e 82,3% na América Latina (SADER *et al.*, 2004). Resultados desse mesmo grupo mostraram taxas de resistência à oxacilina de 89,1% e 51,1% para SCN e *S. aureus*, respectivamente, entre amostras isoladas em UTIs durante o ano de 2002 (NNISS, 2004).

Infecções por amostras ORSA em UTINs, têm sido relatadas pelo mundo (RICE, 2006; BIZARRO *et al.*, 2007), contudo a frequência de resistência à oxacilina em amostras de SCN isoladas de RNs é ainda mais expressiva do que aquela observada entre amostras de *S. aureus* isoladas deste tipo de paciente (KREDIET *et al.*, 2001).

Um estudo realizado com amostras de SCN isoladas de swab de pele e de sangue, em RNs com sepse tardia, mostrou uma taxa de resistência a penicilina e oxacilina de 94% e 66%, respectivamente (JAIN, AGARWAL & BANSAL, 2004). Outro estudo desenvolvido com 836 amostras isoladas de pacientes pediátricos, entre 1997 e 2004, em um hospital na Turquia mostrou que os microrganismos mais isolados foram SCN, representando 170 amostras, seguido de *S. aureus* (130), com taxas de resistência à oxacilina de 85% e 25,2% respectivamente (CELEBI *et al.*, 2007).

A resistência a oxacilina é expressa pelo gene *mecA*, que se encontra inserido em um elemento genético móvel, o cassete estafilocócico cromossômico *mec* (SCC*mec* “staphylococcal cassette chromosome *mec*”). O gene *mecA* codifica uma proteína alterada de ligação à penicilina, PBP2a ou PBP2', de 76 kDa, que mantém sua atividade de transpeptidase, enquanto apresenta baixa afinidade pela penicilina e outros antimicrobianos β -lactâmicos (DERESINSKI, 2005; BIZARRO *et al.*, 2007).

O cassete *mec* tem sido bem caracterizado em amostras de *S. aureus*. O SCC*mec* pode apresentar diferentes tamanhos, variando de 20 a 68 kb. O SCC*mec* carrega o complexo dos genes *ccr* e *mec*. O complexo *ccr* é caracterizado pela presença dos genes específicos *ccrA* e *ccrB*, que codificam recombinases da família invertase/resolvase, responsáveis pela motilidade. O complexo *mec* é caracterizado pela presença de terminais

invertidos reconhecidos por essas recombinases e pelo complexo do gene *mec*, que inclui o genes *mecA*, além dos genes *mecI* e *mecR1*, reguladores da transcrição deste gene. O *SCCmec* também apresenta uma região denominada região J (“junkyard”), que contém vários genes e pseudogenes, não essenciais para a célula. Também pode conter segmentos de DNA associados, como seqüências de inserção (IS431), transposons (Tn554) e cópias de plasmídeos (pUB110 e pT181), carreando genes que codificam resistência a outros antimicrobianos, como aminoglicosídeos e quinolonas (HIRAMATSU *et al.*, 2001; HANSEN *et al.*, 2004; MACHADO *et al.*, 2007).

Em *S. aureus*, foram descritas, inicialmente, três classes de complexo do gene *mec*, A, B e C, e cinco tipos de complexo *ccr*, 1, 2, 3, 5 e 8. Fundamentados na classe do complexo dos genes *mec* e *ccr*, os cassetes *SCCmec* foram classificados em 7 tipos, I, II, III, IV, V, VI e VII (ZHANG *et al.*, 2005, JANSEN *et al.*, 2006; OLIVEIRA, MILHEIRIÇO & DE LENCASTRE, 2006; DESCLOUX, ROSSANO & PERRETEN, 2008). As principais características dos sete cassetes *mec* estão descritos na Tabela 1 e na Figura 2.

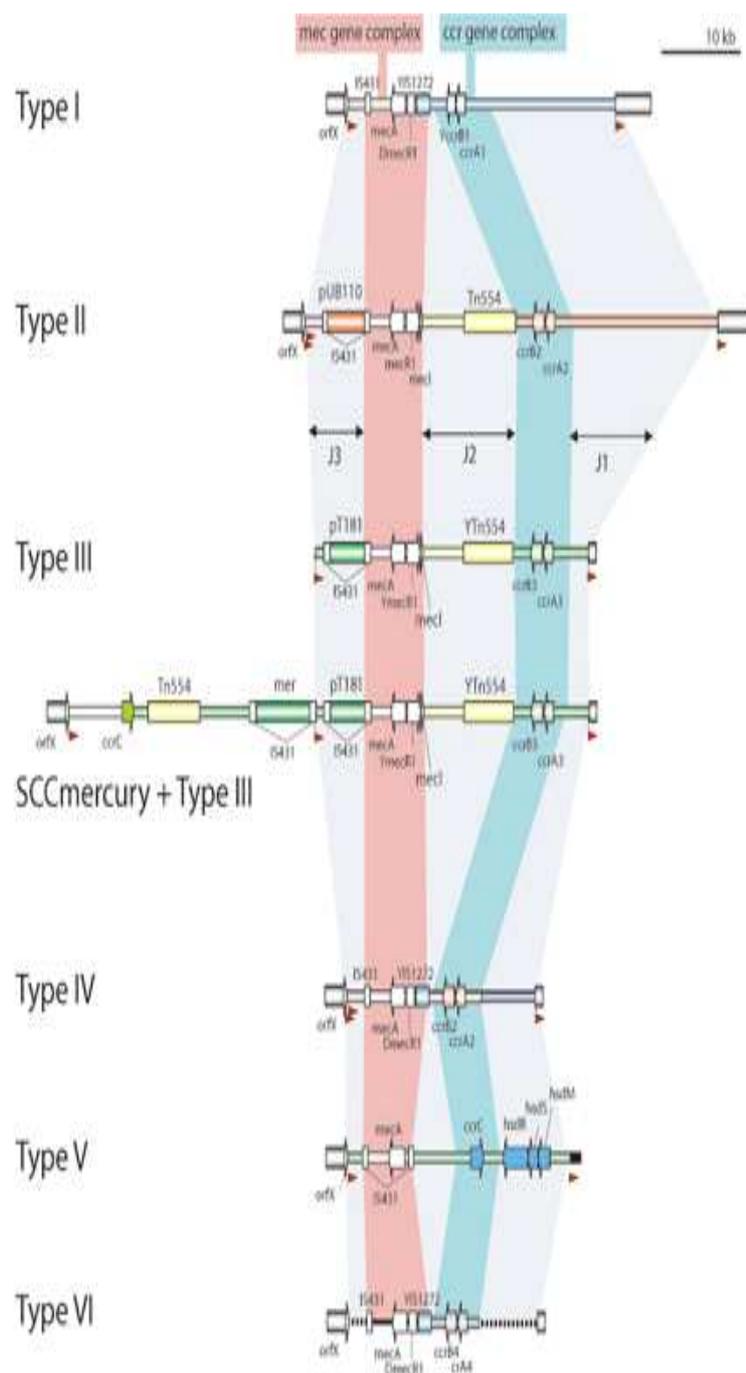


Figura 2: Desenho esquemático das estruturas dos cassetes *mec* I, II, III, IV, V e VI, descritos para amostras de *S. aureus*.

Tabela 1: Características dos diferentes tipos de cassete estafilocócico *mec* em *S. aureus*

| Tipo | Complexo <i>mec</i> | Complexo de recombinação (<i>ccr</i>) | Tamanho (Kb) | Presença de elementos genéticos adicionais | | |
|------|---------------------|---|--|--|-------|------------|
| | | | | IS431 | Tn554 | Plasmídeos |
| I | Classe B | <i>ccr1</i> | 34 | sim | não | não |
| II | Classe A | <i>ccr2</i> | 53 | sim | sim | sim |
| III | Classe A | <i>ccr3</i> | 67 | sim | sim | sim |
| IV | Classe B | <i>ccr2</i> | 21 - 24 | não | não | sim |
| V | Classe C | <i>ccr5</i> | 28 | sim | não | não |
| VI | Classe B | <i>ccr4</i> | Características semelhantes ao SCCmec tipo IV ^a | | | |
| VII | Classe B | <i>ccr 2 e ccr 8</i> | 41 | sim | sim | sim |

ITO *et al.*, 2001; MA *et al.*, 2002; ITO *et al.*, 2004; ^aOLIVEIRA, MILHEIRÃO & DE LENCASTRE, 2006; DESCLOUX, ROSSANO & PERRETEN, 2008

As amostras de ORSA hospitalares normalmente contêm o cassete estafilocócico cromossômico *mec* dos tipos I, II ou III. O SCCmec tipo I, que contém apenas o complexo do gene *mec*, era encontrado entre amostras ORSA na década de 1960, e foi substituído na década de 1980 pelos tipos II e III, os quais carregam determinantes gênicos de resistência a vários antimicrobianos e se tornaram prevalentes nos hospitais (HIRAMATSU *et al.*, 2001; ITO *et al.*, 2001).

Nos últimos anos, a prevalência de *S. aureus* resistente à oxacilina adquirido na comunidade (CA “community acquired”-ORSA) tem crescido (MALTEZOU & GIAMARELLOU, 2006). As amostras CA-ORSA diferem das “hospital acquired” (HA - ORSA) pela susceptibilidade a numerosos agentes antimicrobianos (PALAVECINO, 2004), por conterem os tipos IV e V de SCCmec, e não possuem marcadores adicionais de resistência. Essas amostras são frequentemente resistentes somente a antimicrobianos β -lactâmicos (MA *et al.*, 2002; ITO *et al.*, 2004). Vivoni e colaboradores (2006) verificaram a prevalência dos tipos de SCCmec em amostras ORSA isoladas de um hospital universitário, entre 1999 e 2000, no Rio de Janeiro e demonstraram que 88% delas continham o SCCmec tipo III e apenas 2 amostras (6%) continham o SCCmec tipo IV. No entanto, Stein e colaboradores (2006) em um estudo realizado em Israel, de julho a dezembro de 2004, relataram um surto na UTIN por uma cepa de ORSA não multirresistente a drogas que carregavam o SCCmec tipo III. Os autores mostraram que essa cepa foi transmitida pela equipe médica que estava colonizada nas narinas.

Em SCN, poucos são os estudos que analisaram os tipos de SCCmec. Em 2008, Jamaluddin e colaboradores avaliaram a prevalência e características associadas a *Staphylococcus* resistentes a meticilina, a partir de 1285 amostras nasais isoladas de crianças em cinco creches e dois jardins de infância, no Japão. Entre elas, 390 (30,35%) carregavam SCN resistentes à oxacilina e 49 (3,81%) ORSA. Os tipos de SCCmec encontrados em SCN foram: tipo II (22 amostras), tipo III (14), tipo IV (239), tipo V (13) e não tipável (100). A maioria das amostras carregava o SCCmec tipo IV, confirmando a maior frequência desse tipo de cassete em amostras comunitárias. Outro estudo, em diferentes países desenvolvidos verificou uma distribuição praticamente uniforme dos tipos II, III, e IV em 43 cepas de *S. epidermidis* resistentes à oxacilina (KOZITSKAYA *et al.*, 2005). Miragaia e colaboradores (2007) estudaram 138 amostras clínicas de *S. epidermidis* resistentes à oxacilina de 17 países, das quais 41% foram classificadas como pertence ao SCCmec tipo IV, 27% ao tipo III, 6% ao tipo V, 4% ao tipo I e 4% ao tipo II. Porém, 18% das amostras foram não tipáveis.

Em UTINs na Finlândia, Ibrahim e colaboradores (2008) avaliaram 61 amostras de SCN resistentes à oxacilina isoladas de neonatos, e identificaram 49 (80%) como *S. epidermidis*. A distribuição do SCCmec foi diversa: em 20 (33%) amostras foi detectada o SCCmec tipo IV, 11 (18%) tipo V, 4 (6%) tipo I, 3 (4%) tipo II e 23 (38%) foram novos tipos (IBRAHEM *et al.*, 2008).

No Brasil, Machado e colaboradores (2007) avaliaram a distribuição dos tipos de SCCmec em SCN isolados de pacientes atendidos no hospital de Clínicas de Porto Alegre, entre 2004 e 2005, e observaram que o SCCmec tipo I (19,4%) e o SCCmec tipo III (18,6%) foram os mais prevalentes na espécie *S. epidermidis*, enquanto 59% das amostras clínicas não tipáveis foram identificadas como *S. hominis*.

Recentemente, Kondo e colaboradores (2007), desenvolveram uma técnica de tipagem que tem sido mais apropriada para a identificação de SCN. Esta técnica consiste em seis PCRs multiplex para a identificação dos tipos de *ccr*, das classes do gene *mecA* e das estruturas específicas na região J. No entanto, no presente estudo só foi realizada duas PCRs multiplex: M-PCR1, que amplifica genes dos cinco tipos de *ccr*; e a M-PCR2 que detecta as classes do gene *mec*.

1.6 Diversidade Genômica

Algumas técnicas moleculares vêm sendo utilizadas para a caracterização epidemiológica de amostras hospitalares de *Staphylococcus*. Essas técnicas, por analisarem diretamente o material genômico dos microrganismos, apresentam melhor poder discriminatório do que as técnicas convencionais (SECHI *et al.*, 1999). A eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), após restrição do DNA genômico, é uma técnica molecular desenvolvida por Schwartz e colaboradores (1983), a partir de uma variação da eletroforese em gel de agarose convencional. Consiste na mudança de pulsos elétricos, periodicamente, permitindo a separação de grandes fragmentos de DNA. Esses fragmentos são obtidos após tratamento do DNA total com enzima de restrição, para a qual o genoma do microrganismo tenha poucos sítios de clivagem.

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

Um estudo publicado em 1999, envolvendo amostras hospitalares de *S. epidermidis*, demonstrou uma ampla variabilidade genética, sem o reconhecimento de tipos clonais predominantes relacionados com o tipo de infecção ou pacientes (Lang *et al.*, 1999). Contudo, Nunes e colaboradores, em 2005, mostraram em estudo desenvolvido com amostras isoladas de diferentes hospitais do Brasil a presença de dois clones prevalentes de *S. epidermidis*, entre a maioria das amostras isoladas de cinco instituições no Rio de Janeiro. Mesmo apresentando resultados diferenciados, ambos os estudos indicaram a transmissão cruzada de SCN em um mesmo setor e/ou ambiente hospitalar.

Villari e colaboradores (2000), ao avaliarem genotipicamente através de PFGE amostras de *S. epidermidis* isoladas de pacientes de uma UTIN, em um hospital universitário na Itália, observaram que a maioria dessas infecções era devido a disseminação de um clone. Os quatro principais clones encontrados foram resistentes a maioria dos antibióticos e 94,6% destes eram resistentes aos dois antibióticos usados no tratamento empírico nas UTINs, ampicilina e gentamicina. Resultados similares também foram encontrados por Saida e colaboradores (2006) ao analisarem a clonalidade de amostras de *S. epidermidis* resistentes à oxacilina (ORSE), responsáveis por infecções

epidêmicas em uma UTIN, na Tunísia, entre dezembro de 2003 e setembro de 2004. As 20 amostras de ORSE, isoladas de RNs foram caracterizadas genotipicamente através de PFGE, observando-se que o surto era causado por múltiplos clones multiresistentes, com predominância de um genótipo.

Ainda em relação a amostras isoladas de neonatos, foi realizado um estudo por Bogado e colaboradores (2002), em Rosário, na Argentina, com 40 amostras de SCN resistentes a oxacilina, isoladas de pacientes internados na UTI do hospital Centenário. Essas amostras foram analisadas por RAPD (random amplification of polymorphic DNA) e rep (repetitive extragenic palindromic)-PCR. Em ambas as metodologias, foi verificada a persistência do mesmo clone de *S. epidermidis*. No Brasil, um estudo realizado por Loureiro e colaboradores (2000) com amostras de *S. aureus* resistentes à oxacilina oriundas de narina anterior e sangue de neonatos da maternidade de um hospital público no Rio de Janeiro, mostrou que 60% das amostras de narina apresentaram um perfil de PFGE idêntico, sugerindo que a transmissão de um único clone aconteceu extensivamente dentro da unidade do hospital. No mesmo estudo, entre as amostras isoladas de sangue, 75% apresentaram similaridade de mais de 90% com aquelas isoladas de narina.

Apesar dos recentes relatos de caracterização dos tipos de SCCmec em amostras de *S. aureus* isoladas em diferentes partes do mundo (OLIVEIRA, MILHEIRIÇO & DE LENCASTRE, 2006; STEIN *et al.*, 2006; DESCLOUX, ROSSANO & PERRETEN, 2008), incluindo o Brasil (TRINDADE *et al.*, 2005; VIVONI *et al.*, 2006), poucos são os estudos avaliando cassetes de resistência à oxacilina em amostras de SCN (MACHADO *et al.*, 2007; HANSEN, JOHANNA & SOLLID, 2007; RUPPÉ *et al.*, 2008). Além disso, não existem na literatura estudos que tenham avaliado, a prevalência dos tipos de SCCmec, concomitante com a relação clonal entre amostras isoladas de neonatos. Adicionalmente, é importante lembrar que os SCN estão entre os patógenos mais isolados de infecção em neonatos. Devido ao comprometimento físico, imunológico e orgânico que esse tipo de paciente apresenta, predispondo-o a um alto risco de aquisição de infecções, torna-se fundamental a realização de estudos que esclareçam aspectos relacionados às características fenotípicas e moleculares de amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de neonatos.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral desse estudo foi avaliar amostras de *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN), isoladas de neonatos, incluindo crianças prematuras, internadas em unidades de tratamento intensivo de dois hospitais brasileiros, quanto à prevalência de espécies, susceptibilidade antimicrobiana e diversidade clonal.

Objetivos Específicos

- Identificar amostras de SCN pelo método fenotípico miniaturizado e confirmar os resultados obtidos através da PCR, detectando seqüências gênicas específicas para as espécies prevalentes *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*.
- Avaliar a susceptibilidade antimicrobiana das diferentes espécies de SCN e a concentração mínima inibitória (CMI) para oxacilina.
- Detectar o tipo de cassete cromossômico *mec* (SCC*mec*) nas diferentes espécies e correlacionar com o fenótipo de susceptibilidade e com as CMIs obtidas para oxacilina.
- Avaliar a diversidade clonal entre as amostras de diferentes espécies de SCN através de PFGE

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho do Estudo

Foi realizado um estudo de casos de infecção por cepas de SCN isoladas de neonatos, incluindo os de baixo peso, internados nas UTINs do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), Minas Gerais, no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2002, gentilmente cedidas pelo professor Paulo Gontijo Filho e do Instituto Municipal da Mulher Fernando Magalhães (IMMFM), localizado no Rio de Janeiro, no período de maio de 2007 a agosto de 2008.

3.1.1 Aspectos Clínicos e Éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Instituto Municipal da Mulher Fernando Magalhães, sob o número 239A/2007 (ANEXO 1). Nenhuma intervenção foi efetuada no acompanhamento dos casos, a não ser aquelas rotineiramente realizadas pelos profissionais de saúde das referidas instituições. O estudo envolveu apenas a utilização de amostras de SCN analisadas na rotina bacteriológica de cada hospital, não havendo nenhum contato com o paciente. Aspectos clínicos e demográficos associados aos pacientes foram registrados em uma ficha individual (ANEXO 2). As amostras de SCN isoladas dos pacientes foram utilizadas apenas para as caracterizações fenotípicas e moleculares.

3.1.2 Amostras Bacterianas

Foram analisadas 84 amostras de SCN, sendo 28 amostras oriundas do HC-UFU e 80 amostras do IMMFM. Todas as amostras do estudo foram mantidas em caldo TSB (“Trypticase Soy Broth”, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) com 20% (v/v) de glicerol, a -20°C (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989). Para os testes fenotípicos e moleculares empregados no estudo, foram utilizadas as amostras controles listadas na Tabela 2.

Tabela 2: Amostras controles utilizadas no presente estudo

| Espécie | Característica | Número | Referência |
|-------------------------------------|--|------------|-----------------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Padrão para antibiograma (CLSI) | ATCC 25923 | CLSI, 2008 |
| | Padrão para análise de CMI (CLSI) | ATCC 29213 | CLSI, 2008 |
| | Amostra positiva para o gene <i>mecA</i> | ATCC 33591 | Santos <i>et al.</i> , 1999 |
| | Amostra tipo | ATCC 12600 | - |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Amostra tipo | ATCC 14990 | - |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | Amostra tipo | ATCC 29970 | - |
| <i>Staphylococcus hominis</i> | Amostra tipo | ATCC 27844 | - |
| <i>Staphylococcus lugdunensis</i> | Amostra tipo | DSMZ 4804 | - |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | Amostra tipo | ATCC 15305 | - |
| <i>Staphylococcus warneri</i> | Amostra tipo | ATCC 10209 | - |
| <i>Escherichia coli</i> | Controle Gram-negativo | ATCC 11229 | CLSI, 2008 |
| <i>Micrococcus luteus</i> | Controle à bacitracina | ATCC 10240 | CLSI, 2008 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | Amostra tipo | ATCC 29212 | - |

ATCC – “American Type Culture Collection”; CLSI- “Clinical Laboratory Standards Institute”; CMI –Concentração Mínima Inibitória; DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen.

3.1.3 Análise estatística

Neste estudo foi utilizado o teste do Qui-quadrado para analisar se houve diferença quanto à resistência aos antimicrobianos entre as amostras isoladas de neonatos. Foi estabelecida significância em valores de 5% ($p \leq 0,05$).

3.2 Identificação bacteriana convencional

3.2.1 Identificação do Gênero *Staphylococcus*

As amostras foram cultivadas, inicialmente, em ágar sangue (“Blood Agar Base” [Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra] adicionado de 5% (v/v) de sangue desfibrinado de carneiro) e incubadas a 35°C, por até 72h, para a análise da pureza, morfologia colonial e verificação da produção de hemólise. Posteriormente, os testes para a caracterização do gênero foram realizados de acordo com as metodologias descritas por MacFaddin (1977), Bannerman & Peacock (2007). Os testes utilizados estão listados a seguir.

3.2.2 Aspecto morfo-tintorial

O aspecto morfo-tintorial foi analisado através da coloração de Gram. A leitura foi realizada observando-se coloração, morfologia e arranjo das células bacterianas. As células coradas em violeta foram consideradas Gram-positivas, enquanto aquelas coradas em rosa foram consideradas Gram-negativas. A amostra *S. aureus* ATCC 12600 foi utilizada como controle Gram-positivo, enquanto *E. coli* ATCC 11229 como Gram-negativo.

3.2.3 Expressão da enzima catalase

A expressão da enzima catalase foi verificada em lâmina de microscopia, tocando-se em uma colônia bacteriana, crescida em “Trypticase Soy Agar” (TSA, Oxoid), com o auxílio de uma agulha bacteriológica e, posteriormente, em uma gota de peróxido de hidrogênio (Proquimios, Rio de Janeiro, Brasil) a 3%. A formação de bolhas foi indicativa de reação positiva. As amostras *S. epidermidis* ATCC 14990 e *E. faecalis* ATCC 29212 foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

3.2.4 Susceptibilidade à bacitracina

Uma suspensão bacteriana de cada amostra, com uma turbidez equivalente à 0,5 da escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) foi preparada em salina 0,85% e semeada confluentemente em ágar Müeller-Hinton (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA) utilizando-se um “swab”. Posteriormente, foi depositado sobre o meio um disco impregnado com 0,04U de bacitracina (CECON, São Paulo, Brasil) e a placa foi incubada a 35°C, por 24h. Um halo menor ou igual a 10mm foi indicativo de resistência à bacitracina (BAKER, HACKETT & SIMARD, 1986). As amostras utilizadas como controles foram *S. aureus* ATCC 12600 (resistente) e *M. luteus* ATCC 10240 (sensível).

3.3 Identificação das espécies de *Staphylococcus*

A identificação dos estafilococos em espécies foi realizada através da utilização da técnica miniaturizada alternativa, associada ao fluxograma de identificação de *Staphylococcus* spp. (Figura 3) conforme preconizado por Iorio e colaboradores (2007). As metodologias utilizadas foram aquelas descritas por MacFadin (1977). Para a realização dos testes, as amostras foram, inicialmente, cultivadas em ágar sangue e incubadas por 48h, a 35°C.

3.3.3 Susceptibilidade à novobiocina e desferrioxamina

Uma suspensão bacteriana, com uma turbidez equivalente à 1,0 da escala McFarland (3×10^8 UFC/mL) foi preparada em salina 0,85% e semeada confluentemente em ágar Müeller-Hinton (Difco Laboratories). Posteriormente, foi depositado sobre o meio um disco contendo 5 µg de novobiocina (CECON, São Paulo, Brasil) e um disco de papel de filtro impregnado com 100 µg de desferrioxamina (Sigma Chemical Company). O meio foi incubado a 35°C, por 24h. Um halo menor ou igual a 16 mm foi indicativo de resistência à novobiocina (BANNERMAN & PEACOCK, 2007). As amostras que apresentaram qualquer halo de inibição no disco de desferrioxamina foram consideradas susceptíveis (MONSEN *et al.*, 1998). As amostras utilizadas como controles dos testes foram *S. saprophyticus* ATCC 15305 (resistente à novobiocina) e *S. epidermidis* ATCC 14990 (sensível à novobiocina), *S. warneri* ATCC 10209 (resistente à desferrioxamina) e *S. hominis* ATCC 27844 (sensível à desferrioxamina).

Para a realização dos testes a seguir, as amostras foram transferidas para salina para obtenção de uma suspensão bacteriana, com uma turbidez equivalente à 1,0 da escala McFarland. Posteriormente, 45 µL dessa suspensão foram inoculados em 180 µL de meios de culturas específicos para cada teste a seguir. Os testes foram realizados em placa de poliestireno de 96 poços (Imulon 2, Dynathec Laboratories) e foram avaliados nos períodos de incubação de 24 e 48 horas.

3.3.4 Expressão da enzima pirrolidonil arilamidase (PYRase)

A expressão da enzima pirrolidonil arilamidase foi verificada em caldo TSB (Oxoid), contendo 0,006% (p/v) de L-pirroglutamil-β-naftilamina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA). A leitura do teste foi realizada pela adição de 50µL da solução reveladora, contendo dimetilaminocinamaldeído a 1% (p/v) (Sigma Chemical Company), após 24h de incubação, a 35°C. O aparecimento de uma coloração rosa ou púrpura, em até 10min após a adição do reativo foi considerado resultado positivo. Como controles positivo e negativo da reação foram usadas as amostras *S. haemolyticus* ATCC 29970 e *S. aureus* ATCC 12600, respectivamente.

3.3.5 Expressão da enzima fosfatase

A expressão da enzima fosfatase foi verificada em caldo PDP, segundo MacFaddin (1977), com modificações (0,37% [p/v] de extrato de carne; pH 7,5), adicionado de 2% (v/v) de solução PDP (0,5% [p/v] de difosfato de fenoltaleína). A leitura foi realizada após a adição de 10µL da solução reveladora de NaOH a 40% (v/v), após 24h de incubação, a 35°C, observando-se o aparecimento de coloração rosa para amostras positivas. As amostras controles utilizadas foram *S. aureus* ATCC 12600 (controle positivo) e *S. haemolyticus* ATCC 29970 (controle negativo).

3.3.6 Expressão da enzima urease

A expressão da enzima urease foi verificada em caldo uréia de Rustigian & Stuart, segundo MacFaddin (1977) com modificações, conforme descrito a seguir: 1,2% (p/v) KH_2PO_4 , 2,4% (p/v) de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,14% (p/v) de extrato de levedura e 0,014% (p/v) de vermelho de fenol, pH 7,6. O caldo foi autoclavado, e a seguir, a uréia (2,5% [p/v]) foi adicionada após filtração. A leitura foi realizada em até 48h de incubação, a 35°C. A ausência de alteração na coloração do meio (amarela) foi considerada como resultado negativo. As amostras *S. epidermidis* ATCC 14990 e *S. haemolyticus* ATCC 29970 foram utilizadas respectivamente, como controles positivo e negativo desta prova bioquímica.

3.3.7 Fermentação da manose e trealose

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

3.4. Determinação da susceptibilidade antimicrobiana

3.4.1. Teste de difusão em disco (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI, 2006a)

O perfil de susceptibilidade das amostras foi determinado frente a 15 antimicrobianos. As amostras foram inicialmente semeadas em ágar sangue, por 18-24h, a 35°C. A cultura microbiana foi então diluída em solução salina 0,85% (p/v) para obtenção do padrão de turvação 0,5 da escala de McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC/mL), e inoculado em placa com ágar Mueller-Hinton (Difco Laboratories), de forma a obter crescimento confluyente. Os discos foram depositados sobre o meio, e a leitura dos halos de inibição foi feita após 18h de incubação a 35°C, exceto para oxacilina, teicoplanina e vancomicina, cujo período de incubação foi de 24 horas.

As amostras foram testadas frente aos seguintes antimicrobianos: clindamicina (2µg), ciprofloxacina (5µg), cloranfenicol (30µg), eritromicina (15µg), gentamicina (10µg), penicilina G (10UI), rifampicina (5µg), sulfametoxazol/trimetoprima (25µg), teicoplanina (30µg), vancomicina (30µg), tetraciclina (30µg), (Cecon). Os discos de cefoxitina (30µg), linezolid (30µg), mupirocina (5µg) e oxacilina (1µg) foram obtidos da Oxoid.

Os discos de clindamicina e eritromicina foram colocados a 20 mm de distância margem a margem, e a análise da indução de resistência à clindamicina pela eritromicina foi verificada pelo surgimento de um “achatamento” (Teste D) no halo de inibição da clindamicina, próximo ao disco de eritromicina (CLSI, 2008).

A interpretação dos halos de inibição foi realizada conforme o CLSI (2008), para os antimicrobianos em geral, e de acordo com Fuchs, Jones e Barry (1990), para a mupirocina. A amostra padrão *S. aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle do teste.

3.4.2 Teste de diluição em ágar com oxacilina (CLSI, 2006b)

A determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMIs) para oxacilina (Sigma Chemical Company) foi realizada pelo método de diluição em ágar, segundo o CLSI (2006b). As amostras bacterianas foram, inicialmente, semeadas em ágar sangue por 18-24h, a 35°C. O crescimento microbiano foi então diluído em salina, para obtenção do

padrão de turvação 0,5 da escala de McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida, foi realizada uma diluição 1:10 (v/v) em salina, e as amostras foram transferidas para o replicador de “Steers”, obtendo-se $\sim 1,5 \times 10^7$ UFC/mL. Posteriormente, foram inoculados, aproximadamente, 2 μ L desta diluição ($\sim 3 \times 10^4$ UFC/mL) nas placa contendo ágar Mueller-Hinton (Difco Laboratories) com 2% de NaCl (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil) e concentrações crescentes do antimicrobiano, variando de 0,25 a 256 μ g/mL. Os meios inoculados foram analisados de acordo com os valores estabelecidos pelo CLSI (2008). A amostra *S. aureus* ATCC 29213 foi utilizada como controle do teste.

3.4.3 - Teste de triagem em ágar contendo oxacilina

As amostras foram, inicialmente, cultivadas em ágar sangue, a 35°C/48 horas. O crescimento foi, então, disperso em salina até atingir turvação correspondente à escala 0,5 de McFarland e semeado com o auxílio de “swab” na superfície do meio de ágar Mueller-Hinton (Difco Laboratories), contendo 4 μ g/mL de oxacilina (Sigma Chemical Company) e 4% (p/v) de NaCl (Reagen) (FERREIRA *et al.*, 2003). A leitura foi realizada após 24 e 48 horas de incubação, a 35°C. O crescimento de mais de uma colônia na superfície do meio foi indicativo de resultado positivo, isto é, resistência à oxacilina, segundo sugerido pelo CLSI (2008) para *S. aureus*.

Placas contendo ágar Muller-Hinton sem oxacilina foram utilizadas como controle do crescimento bacteriano. Como controles do teste foram utilizadas amostras padrão de *S. aureus* ATCC 29213 sensível à oxacilina, e *S. aureus* ATCC 33591 resistente à oxacilina.

3.5. Técnica da PCR para detecção de seqüências gênicas específicas

3.5.1 Extração do DNA bacteriano através da utilização de isotiocianato de guanidina

A liberação do DNA através da guanidina foi realizada de acordo com Pitcher, Sauders & Owen (1989). Cinco colônias isoladas, obtidas a partir de crescimento bacteriano em ágar sangue, foram inoculadas em 3 mL de caldo TSB (Oxoid) e incubadas por 18h, a 35°C. A seguir, 1mL desta suspensão foi centrifugado (5 min; 8000 xg) e o sedimento ressuspenso em 1,5 mL de tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,8). A suspensão foi novamente centrifugada (5 min; 8000 xg), e ao precipitado foram adicionados 100 μ L de solução de lise (5 mg/mL de lisozima [Sigma] em tampão TE

adicionado de BRIJ 0,5% [Sigma]). A esta solução foram adicionados 5 µL de lisostafina (1mg/mL) comercial (Sigma) e após agitação, esta solução foi incubada por 1h, a 37°C, em banho-maria. Após esse período, as amostras foram lisadas, utilizando-se uma solução contendo 500 µL de isotiocianato de guanidina (Gibco BRL – Life Technologies) a 5 M. As suspensões celulares foram agitadas, manualmente, e então incubadas a temperatura ambiente, por 5 a 10 minutos. Posteriormente, os lisados foram resfriados em gelo por 10 min, e a seguir adicionados a eles 250 µL de acetato de amônio (Vetec) a 7,5 M, preparado em água, agitando-se manualmente os tubos, e, em seguida, incubando-se por 10min em gelo. Após esse período uma solução de 500 µL composta de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1 v/v – Vetec) foi adicionada, e a mistura agitada. Posteriormente, esta mistura foi centrifugada por 10 min, a 13000 x g. A fase aquosa foi então transferida para um novo tubo, onde foram adicionados 430 µL isopropranolol (Vetec). Os tubos foram então invertidos por 1 min para misturar as soluções. Após centrifugação a 7000 x g, por 20 seg, o DNA precipitado foi então, lavado cinco vezes, com etanol (Vetec) a 70%. Por fim, o DNA foi ressuspensão em 50 µL de tampão TE, incubado “overnight” em banho-maria, a 37°C, e então estocado a 4 °C.

3.5.2. PCR para detecção de seqüências gênicas espécie-específicas de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*

A detecção de seqüências gênicas espécie-específicas de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* foi realizada pela técnica de PCR, utilizando-se os oligonucleotídios SH-1 e SH-2 para a espécie *S. haemolyticus*, listados na Tabela 3. Para identificação molecular da espécie *S. epidermidis* foram desenhados oligonucleotídeos, utilizando-se as ferramentas BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), ClustalX e OligoAnalyzer.

A amplificação dos fragmentos codificados foi realizada em um termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient, Hamburgo, Alemanha), utilizando-se um volume total de 25µL para a reação, constituída de 3µL de DNA, 2,5µL de tampão da enzima (10mM Tris HCl, 25mM KCl), 2mM de MgCl₂, 100µM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Life Technologies Inc., Gathersburg, MD, EUA), 1,5U de *Taq* DNA polimerase (Biotools, Madrid, Espanha), e 20 pmoles de cada um dos oligonucleotídeos. As amostras tipo *S. haemolyticus* ATCC 29970 e *S. epidermidis* ATCC 1228 foram utilizadas como controles nas reações.

Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados, amplicon obtido e ciclo empregado na PCR para detecção do gene espécie-específico de *S. haemolyticus* e *S. epidermidis*

| Oligonucleotídeos | Gene | Amplicon | Ciclo | Referência |
|-------------------------------------|-------------|----------|---|-------------------------------|
| SH-1 5'-GGTCGCTTAGTCGGAACAAT-3' | <i>mvaA</i> | 285pb | 94°C – 2min 94°C – 1 min 55°C – 1min 72°C – 1min 72°C – 5min 94°C – 2min | SCHUENCK <i>et al.</i> , 2008 |
| SH-2 5'-CACGAGCAATCTCATCACCT-3' | | | | |
| SE -1 5'-CAGTTAATCGGTATGAGAGC-3' | <i>recN</i> | 218pb | 94°C – 1 min 55°C – 1min 72°C – 1min 72°C – 5min | Dados em publicação |
| SE-2 5' – CTGTAGAGTGACAGTTTGGT3' | | | | |

Os produtos das reações foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em TBE (0,89 M Tris, 0,89M ácido bórico, 2,5 mM EDTA, pH 8,2). Após corrida de 1:30 h a 90V, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5µg/mL) por 30 min e a imagem foi capturada sob luz ultravioleta em um fotodocumetador (Vilber Lourmat, Marne-la-Valleé, França). Como padrão de corrida foi utilizado o marcador 100 pb DNA Ladder (Life Technologies).

3.5.3. PCR multiplex para tipagem do SCCmec

A determinação do tipo de SCCmec foi realizada conforme descrito por Kondo *et al.*, 2007. A técnica consiste de duas PCR multiplex (M-PCR1 e M-PCR2) que permitem a amplificação de segmentos de regiões específicas de cada tipo de SCCmec. Na Tabela 4 estão descritas as seqüências utilizadas dos oligonucleotídeos, o tamanho dos amplicons e a especificidade para cada tipo de SCCmec.

A amplificação dos fragmentos foi realizada em um termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient), utilizando-se um volume total de 50 µl composto de: 1µL de DNA, 5µL de tampão da enzima (10mM de Tris-HCl e 25 mM de KCl), 3,2 mM de MgCl₂, 200µM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP,dCTP, dTTP) (LifeTechnologies), 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Biotools), e 20 pmoles dos oligonucleotídeos.

Tabela 4: Oligonucleotídeos utilizados e amplicons obtidos nas duas técnicas de PCR multiplex para tipagem do SCC*mec*

| Oligonucleotídeo | Seqüência (5'-3') | Amplicon (pb) | Especificidade (tipo de SCC <i>mec</i>) |
|------------------|-----------------------------|---------------|--|
| M-PCR1 | | | |
| mA1 | TGCTATCCACCCCTCAAACAGG | 286 | <i>mecA</i> |
| mA2 | AACGTTGTAACCACCCCAAGA | | |
| α 1 | AACCTATATCATCAATCAGTACGT | 695 | <i>ccrA1</i> |
| α 2 | TAAAGGCATCAATGCACAAACACT | 937 | <i>ccrA2</i> |
| α 3 | AGCTCAAAGCAAGCAATAGAAT | 1791 | <i>ccrA3</i> |
| β c | ATTGCCTTGATAATAGCCITCT | | <i>ccrB1, ccrB2, ccrB3</i> |
| α 4.2 | GTATCAATGCACCAGAACTT | 1287 | <i>ccrA4</i> |
| β 4.2 | TTGCGACTCTCTTGCGGTTT | | |
| γ R | CCTTTATAGACTGGATTATTCAAATAT | 518 | <i>ccrC</i> |
| γ F | CGTCTATTACAAGATGTTAAGGATAAT | | |
| M-PCR 2 | | | |
| mI 6 | CATAACTTCCCATTCTGCAGATG | 1963 | <i>mecI</i> (classe <i>mec</i> A) |
| mA7 | ATATACCAAACCCGACAACTACA | | <i>mecA</i> |
| IS7 | ATGCTTAATGATAGCATCCGAATG | 2827 | <i>IS1272</i> (classe <i>mec</i> B) |
| mA7 | ATATACCAAACCCGACAACTACA | | <i>mecA</i> |
| IS2 | TGAGGTTATTGATATTTTCGATGT | 804 | <i>IS431</i> (classe <i>mec</i> C) |
| mA7 | ATATACCAAACCCGACAACTACA | | <i>mecA</i> |

O ciclo da PCR consiste em desnaturação inicial a 94⁰C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de 2 minutos a 94⁰C, anelamento de 1 minuto a 57⁰C, um ciclo de extensão final de 2 minutos a 72⁰C, finalizada com a etapa de alongamento de 72⁰C, por 2 minutos.

Os produtos da reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,5%, em TBE (0,89 M Tris, 0,89M ácido bórico, 2,5 mM EDTA, pH 8,2). Após corrida de 2:30 h a 90V, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5µg/mL) por 30min e a imagem foi capturada sob luz ultravioleta em um fotodocumetador (Vilber Lourmat, Marne-la-Valleé, França). Como padrão de corrida foi utilizado o marcador 100pb DNA Ladder (Life Technologies). O tipo de SCC*mec*, foi posteriormente classificado de acordo com o tipo de *ccr* com a classe *mec* detectados (Tabela 5).

Tabela 5: Classificação do tipo de SCC*mec*

| SCC <i>mec</i> | M-PCR 1 (tipo <i>ccr</i>) | M-PCR 2 (classe <i>mec</i>) |
|----------------|-------------------------------|---------------------------------|
| Tipo I | <i>ccr</i> 1 | <i>mec</i> B |
| Tipo II | <i>ccr</i> 2 | <i>mec</i> A |
| Tipo III | <i>ccr</i> 3 | <i>mec</i> A |
| Tipo III | <i>ccr</i> 3; <i>ccr</i> 5 | <i>mec</i> A |
| Tipo IV | <i>ccr</i> 2 | <i>mec</i> B |
| Tipo V | <i>ccr</i> 5 | <i>mec</i> C |
| Tipo VI | <i>ccr</i> 4 | <i>mec</i> B |

www.staphylococcus.net

3.6. Análise do perfil de fragmentação do DNA cromossômico após tratamento com enzima de restrição e separação por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).

A análise do perfil de fragmentação do DNA cromossômico foi realizada após separação por PFGE dos fragmentos gerados pelo tratamento com a enzima de restrição *SmaI*, segundo Nunes e colaboradores (2005), com modificações. Cinco colônias isoladas, obtidas após crescimento em ágar sangue, por 24h, foram inoculadas em 5 ml de caldo TSB (Oxoid) e incubadas durante 4h, a 35°C. A turvação foi ajustada a uma turbidez equivalente à escala 2 (6×10^8 UFC/mL) de McFarland, com solução salina estéril. A seguir, 1 mL desta suspensão foi centrifugado (5 min a 700 xg), e o sedimento ressuspenso em 250µL de tampão PIV (NaCl 1M, Tris-HCl 10 mM, pH 7,6). A esta suspensão foi adicionado o mesmo volume de agarose de baixo ponto de fusão (“Low Melting Point

Agarose”, IBI Technical, New Haven, EUA) a 1,8%, dissolvida em tampão PIV e mantida a 58°C. Após homogeneização, a agarose foi distribuída em moldes, mantidos a 4°C, por cerca de 10 min. Em seguida os blocos de agarose foram colocados em 2mL de solução de lise EC (tris-HCl 6mM pH 7,6, NaCl 1M, EDTA 100mM pH 7,5, Brij 58 0,5%, laurilsarcosinato de sódio 0,5%), contendo 10mg/mL de lisozima (Sigma Chemical Company) e 1mg/mL de lisostafina (Sigma Chemical Company), e incubados a 35°C, sob leve agitação, durante 18 a 24h. Após esse período, os tubos foram resfriados a 4°C e a solução foi substituída por 2mL de solução ES (EDTA 0,4M pH 9,5, lauril sarcosinato de sódio 1%), adicionada de 0,1 mg/mL de proteinase K (Sigma Chemical Company), e incubadas a 50°C, em banho de imersão, durante 18 a 24h. Ao final dessa fase, os blocos de agarose foram mantidos em nova solução ES (sem proteinase) e mantidos a 4°C.

A digestão do DNA foi realizada a partir de um bloco de agarose, lavando cinco vezes em tampão TE (Tris-HCl 10mM e EDTA 10mM, pH 7,5), a 37°C, em banho-maria, sendo as quatro primeiras lavagens de 1h cada e a última de 18h. Após esse processo, o bloco foi transferido para uma solução contendo 150µL do tampão específico da enzima de restrição *SmaI* (Biotools Boehringer Mannheim) e incubado a 25°C, por 4 horas. Em seguida, o bloco foi transferido para um novo tampão da enzima de restrição, contendo 20U da enzima *SmaI*, e incubado a 25°C, durante 18-24h. A seguir, a solução contendo a enzima foi removida, o bloco de agarose foi fundido a 70°C e aplicado em gel de agarose (Sigma Chemical Company) a 1%, em tampão TBE 0,5x. A eletroforese em campo pulsado foi realizada em um CHEF DR III, (Bio-Rad, Laboratories, California, EUA), utilizando-se um tempo de pulso crescente de 1 a 35s, durante 21h a 6V/cm, a 14°C, com ângulo de 120°. Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídio (0,5µg/mL), por 30min e a imagem foi capturada sob luz ultravioleta em um fotodocumetador (Vilber Lourmat, Marne-la-Valleé, França). Como padrão de corrida foi utilizado o marcador 100pb DNA Ladder (Life Technologies). Os padrões de bandas das diferentes amostras foram analisados através da comparação visual e classificados de acordo com os critérios de Tenover e colaboradores (1995), e através da análise automatizada com o auxílio do sistema “Image Analisys System”, empregando-se o programa “Molecular Analyst Fingerprint Plus”, versão 1.6 (BioRad Laboratories) e o método de “Unweitghed Pair Group Method using Arithmetic Averages” (UPGMA) para o cálculo dos coeficientes de similaridade.

4 RESULTADOS

4.1 Características gerais das amostras e identificação bacteriana

Foram coletadas 84 amostras de SCN, provenientes de neonatos, incluindo crianças prematuras, internadas em unidades de terapia intensiva de dois hospitais brasileiros. Dessas, 30 foram isoladas no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2002, e 54 amostras foram isoladas no Instituto Municipal da Mulher Fernando Magalhães, (IMMFM), no período de junho de 2007 a julho de 2008. Amostras múltiplas, isoladas de um mesmo paciente, foram excluídas, exceto em um caso, onde duas amostras (572s e 586s) foram isoladas do mesmo paciente, em um intervalo de 38 dias, de infecções diferentes. Todas as amostras analisadas neste estudo apresentaram-se como cocos Gram-positivos, agrupados em cachos, catalase-positivas, resistentes à bacitracina e coagulase negativos. O sítio de isolamento mais freqüente foi o sangue, com 62 (74,4%) amostras, seguido de secreção ocular (10 amostras; 11,6%) e ponta de cateter vascular (7; 8,0%). Na Tabela 6 estão descritas a origem e fonte de isolamento das 84 amostras analisadas.

Tabela 6: Origem e fonte de isolamento das 84 amostras de SCN identificadas no presente estudo

| Hospital (Total de amostras/ ano de isolamento) | Espécie (Nº/% de amostras) | Fonte de isolamento (Nº/ %de amostras) |
|---|---|--|
| HC-UFU (30/ 2001-2002) | <i>S. epidermidis</i> (18; 60) <i>S. haemolyticus</i> (7; 23,3) <i>S. hominis</i> (2; 6,5) <i>S. capitis urealyticus</i> (1; 3,4) <i>S. caprae</i> (1; 3,4) <i>S. warneri</i> (1; 3,4) | Sangue (16/ 53,3); Secreção ocular (8/ 26,6); Ponta de cateter vascular (5/ 16,6); Secreção de ouvido (1/3,3) |
| IMMFM (54/ 2006-2008) | <i>S. epidermidis</i> (33 ; 61) <i>S. haemolyticus</i> (11 ; 20,3) <i>S. capitis capitis</i> (4 ; 7,4) <i>S. hominis</i> (2; 3,7) <i>S. capitis urealyticus</i> (1; 1,9) <i>S. warneri</i> (1; 1,9) <i>S. saprophyticus</i> (1; 1,9) <i>S. cohnii</i> (1; 1,9) | Sangue (46/ 85,6); Secreção ocular (2/ 3,8); Ponta de cateter vascular (2/ 3,8); Abscesso cutâneo (1/ 1,7); Aspirado Traqueal (1/ 1,7); Líquor (1/ 1,7); Urina (1/ 1,7) |

HC-UFU- Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia; IMMFM- Instituto Municipal da Mulher Fernando Magalhães

Os perfis bioquímicos apresentados pelas 84 amostras de SCN identificadas no estudo estão descritos na Tabela 7. Oito espécies de *Staphylococcus* foram identificadas, sendo 51(61%) amostras da espécie *S. epidermidis*, 18 (21%) de *S. haemolyticus*, seis (7%) de *S. capitis*, quatro (5%) de *S. hominis*, duas (2%) de *S. warneri*, e uma de cada das seguintes espécies: *S. caprae*, *S. cohnii* e *S. saprophyticus*. Apenas duas amostras de *S. epidermidis*, que foram isoladas no hospital IMMFM, apresentaram perfil bioquímico atípico para a espécie, isto é, o teste da fosfatase apresentou resultado negativo, não compatível com o esperado para a espécie.

Tabela 7 – Identificação fenotípica e molecular de 84 amostras de SCN isoladas de neonatos internados nos hospitais HC-UFU e IMMFM

| Espécie (Total de amostras) | H | F | C | C | P | F | U | M | T | N | D | B | PCR | |
|-----------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---------------------|---------------------|
| | E | C | G | A | Y | O | R | A | R | O | E | A | gene <i>recN</i> | gene <i>mvaA</i> |
| <i>S. epidermidis</i> (51)* | - | - | - | + | - | + | + | + | - | S | S | R | + | - |
| <i>S. haemolyticus</i> (18) | + | - | - | + | + | - | - | - | + | S | R | R | - | + |
| <i>S. capitis capitis</i> (4) | - | - | - | + | - | - | - | + | - | S | R | R | - | - |
| <i>S. capitis urealyticus</i> (2) | - | - | - | + | - | - | + | + | + | S | R | R | - | - |
| <i>S. hominis</i> (4) | - | - | - | + | - | - | + | - | - | S | S | R | - | - |
| <i>S. warneri</i> (2) | - | - | - | + | - | - | + | - | + | S | R | R | - | - |
| <i>S. cohnii</i> (1) | - | - | - | + | - | - | - | - | + | R | R | R | - | - |
| <i>S. caprae</i> (1) | - | - | - | + | - | + | + | + | + | R | R | R | - | - |
| <i>S. saprophyticus</i> (1) | - | - | - | + | - | - | - | - | + | R | S | R | - | - |

HC-UFU- Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia; IMMFM- Instituto Municipal da Mulher Fernando Magalhães; HEM - hemólise; FC - fator “clumping”; CG - coagulase livre; CAT - catalase; PYR - pirrolidônio arilamidase; FOS - fosfatase; URE - urease; Ácidos a partir de MAN - manose e TRE - trealose; susceptibilidade à: NOV - novobiocina, DEF - desferrioxamina e BAC - bacitracina; R - resistente; S - sensível (HOLT *et al.*, 1994; MONSEN *et al.*, 1998; BANNERMAN & PEACOCK, 2007); gene *recN* - codifica uma recombinase específica da espécie *S. epidermidis* (Dados não publicados) e gene *mvaA* - codifica a enzima HMG CoA redutase (SCHUENCK *et al.*, 2008) ; * - Duas amostras apresentaram perfil atípico em relação ao teste da fosfatase, isto é, foram fosfatase negativas

Os resultados obtidos a partir das PCRs espécie-específicas foram concordantes com aqueles encontrados nas provas bioquímicas, isto é, todas as amostras identificadas, bioquimicamente, como *S. epidermidis* apresentaram o gene *recN* (codifica uma recombinase específica desta espécie) (Figura 4) e todas as amostras de *S. haemolyticus* apresentaram o gene *mvaA* (codifica a enzima HMG CoA redutase, específica da espécie) (Figura 5). Nenhuma das amostras identificadas como pertencentes a outras espécies apresentaram amplificação para os genes supracitados.

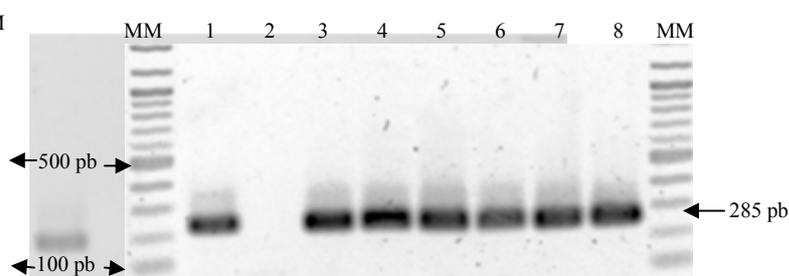


Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose do fragmento do gene *recN* (218pb), espécie-específico para *S. epidermidis*. MM: marcador molecular; linha 1: controle positivo para o gene *recN* (*S. epidermidis* ATCC 14990); linha 2: Controle negativo para o gene *recN* (*S. haemolyticus* ATCC 29970); linhas 3 a 8 – amostras clínicas identificadas bioquimicamente como *S. epidermidis*

Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose do fragmento do gene *mvaA* (285pb), espécie-específico para *S. haemolyticus*. MM: marcador molecular; linha 1: controle positivo para o gene *mvaA* (*S. haemolyticus* ATCC 29970); linha 2: Controle negativo para o gene *mvaA* (*S. epidermidis* ATCC 14990); linhas 3 a 8 – amostras clínicas identificadas bioquimicamente como *S. haemolyticus*

4.2 Determinação da susceptibilidade antimicrobiana e das concentrações mínimas inibitórias

Todas as 84 amostras foram avaliadas quanto à susceptibilidade a 15 antimicrobianos, pelo método de difusão a partir do disco (CLSI, 2006a). A Tabela 8 apresenta os resultados de resistência antimicrobiana, obtida frente a treze dos 15 antimicrobianos testados. Como todas as amostras apresentaram susceptibilidade a linezolida e vancomicina, estes antimicrobianos não foram incluídos na Tabela. As maiores taxas de resistência foram observadas para penicilina (94%), cefoxitina e oxacilina (82%), eritromicina (61%), gentamicina (54%) e sulfametoxazol/trimetoprina (52%). As taxas de resistência a teicoplanina (8%) e a mupirocina (9%) foram as mais baixas. Ao compararmos as taxas de resistência em relação aos dois hospitais avaliados observamos diferença estatisticamente significativa para ciprofloxacina, teicoplanina e tetraciclina ($p < 0,05$). No HC-UFU, as taxas de resistência a teicoplanina e tetraciclina foram mais elevadas. Em contrapartida, a taxa de resistência a ciprofloxacina foi cinco vezes maior em comparação à observada no HC-UFU.

Tabela 8: Percentual de resistência antimicrobiana de acordo com o teste de difusão a partir do disco em 84 amostras de SCN isoladas nos dois hospitais avaliados, HC-UFU e IMMFM

| Agente Antimicrobiano | Número (%) de amostras resistentes | | | Total (n=84) |
|-----------------------------|------------------------------------|-----------------|----------------|-----------------|
| | HC-UFU (n=30) | IMMFM (n=54) | Valor de p^* | |
| Cefoxitina/oxacilina | 21 (70) | 48 (89) | 0,188 | 69 (82) |
| Ciprofloxacina | 3 (10) | 26 (48) | 0,001* | 29 (34) |
| Clindamicina | 14 (47) | 23 (43) | 0,718 | 37 (44) |
| Cloranfenicol | 8 (27) | 8 (15) | 0,185 | 16 (19) |
| Eritromicina | 17 (57) | 34 (63) | 0,571 | 51 (61) |
| Gentamicina | 14 (47) | 31 (57) | 0,344 | 45 (54) |
| Mupirocina | 0 | 8 (15) | 0,067 | 8 (9) |
| Penicilina | 30 (100) | 49 (91) | 0,215 | 79 (94) |
| Rifampicina | 5 (16) | 5 (9) | 0,315 | 10 (12) |
| Sulfametoxazol/Trimetoprima | 15 (50) | 29 (54) | 0,744 | 44 (52) |
| Teicoplanina | 6 (20) | 1 (2) | 0,013* | 7 (8) |
| Tetraciclina | 12 (40) | 7 (13) | 0,010* | 19 (23) |

HC-UFU – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia; IMMFM – Instituto Municipal da Mulher Fernando Magalhães; para os resultados serem considerados estatisticamente significativos foi utilizado o valor de $p < 0,05$, segundo determinado pelo teste Qui-quadrado

Doze (40%) amostras isoladas no HC-UFU e quatro (7,4%) isoladas no IMMFM apresentaram fenótipo de resistência à clindamicina induzida pela eritromicina, detectada através do teste D (Figura 6).



Figura 6 – Resistência à clindamicina induzida pela eritromicina (Teste D) observada para uma amostra clínica da espécie *S. epidermidis*

A Tabela 9 apresenta o percentual de resistência antimicrobiana de acordo com a espécie de SCN identificada. *S. haemolyticus* foi a espécie que apresentou as maiores taxas de resistência antimicrobiana, incluindo 100% de resistência a oxacilina, seguida da espécie *S. epidermidis*, com 84% de resistência à este antimicrobiano. Resistência à mupirocina (16%) só foi observada para a espécie *S. epidermidis*. A única amostra de *S. cohnii* só apresentou resistência aos beta-lactâmicos, enquanto a amostra de *S. saprophyticus* foi sensível a todos os antimicrobianos.

Tabela 9: Resistência antimicrobiana observada através do teste de difusão a partir do disco em 84 amostras de oito espécies SCN, isoladas de neonatos

| Agente Antimicrobiano | Número e percentual de amostras resistentes | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------|---|----|--------------------------------|-----|--------------------------|----|--------------------------|-----|--------------------------|-----|-------------------------|-----|-------------------------|-----|--------------------------------|---|
| | <i>S. epidermidis</i> n=51 | | <i>S. haemolyticus</i> n=18 | | <i>S. capitis</i> n=6 | | <i>S. hominis</i> n=4 | | <i>S. warneri</i> n=2 | | <i>S. caprae</i> n=1 | | <i>S. cohnii</i> n=1 | | <i>S. saprophyticus</i> n=1 | |
| | R | % | R | % | R | % | R | % | R | % | R | % | R | % | R | % |
| Cefoxitina/oxacilina | 43 | 84 | 18 | 100 | 3 | 50 | 2 | 50 | 2 | 100 | - | - | 1 | 100 | - | - |
| Ciprofloxacina | 17 | 33 | 8 | 44 | 3 | 50 | 0 | | 1 | 50 | - | - | - | - | - | - |
| Clindamicina | 27 | 53 | 4 | 22 | 1 | 17 | 2 | 50 | 2 | 100 | 1 | 100 | - | - | - | - |
| Cloranfenicol | 14 | 27 | 2 | 11 | 0 | - | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Eritromicina | 35 | 69 | 10 | 55 | 1 | 17 | 2 | 50 | 2 | 100 | 1 | 100 | - | - | - | - |
| Gentamicina | 30 | 59 | 9 | 50 | 2 | 33 | 1 | 25 | 2 | 100 | 1 | 100 | - | - | - | - |
| Mupirocina | 8 | 16 | 0 | - | 0 | - | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Penicilina | 49 | 96 | 18 | 100 | 5 | 83 | 4 | 100 | 2 | 100 | 1 | 100 | 1 | 100 | - | - |
| Rifampicina | 8 | 16 | 0 | - | 1 | 17 | 1 | 25 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Sulfametoxazol/Trimetoprima | 30 | 60 | 9 | 50 | 1 | 17 | 1 | 25 | 2 | 100 | 1 | 100 | - | - | - | - |
| Teicoplanina | 3 | 6 | 3 | 17 | 1 | 17 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Tetraciclina | 6 | 12 | 7 | 40 | 2 | 33 | 2 | 50 | 1 | 50 | 1 | 100 | - | - | - | - |

- nenhuma amostra encontrada; R- resistente; S- sensível

Como já mencionado anteriormente, 69 (82%) amostras de SCN foram resistentes à oxacilina pelo teste de disco-difusão, sendo 21 amostras do HC-UFU e 48 do IMMFM. Esses resultados foram concordantes com aqueles obtidos no teste de triagem em ágar contendo 4 µg/mL de oxacilina (FERREIRA *et al.*, 2003). Apenas cinco amostras de *S. epidermidis* resistentes à oxacilina para disco não apresentaram crescimento confluyente nesse meio, sendo assim, caracterizadas como heterorresistentes.

A análise da correlação entre os valores de CMI, a triagem e a presença do gene *mecA* em 84 amostras de SCN isoladas de neonatos mostrou que houve concordância entre os testes (Tabela 10). As CMIs para oxacilina, nas oito espécies de SCN analisadas, variaram de $\leq 0,25$ µg/mL à >256 µg/mL. Entre amostras resistentes à oxacilina da espécie *S. epidermidis*, 76,7% apresentou CMI variando de 0,5 µg/mL a 8 µg/mL, enquanto em *S. haemolyticus*, todas as amostras foram resistentes à oxacilina, com 72,2% apresentando CMI $\geq 8,0$ µg/mL, apesar de cinco amostras terem apresentado CMI entre 1 e 4 µg/mL. Entre as amostras sensíveis, as CMIs foram $\leq 0,25$ µg/mL.

Tabela 10: Correlação entre concentração mínima inibitória para oxacilina, o resultado do teste de triagem e a presença do gene *mecA* em 84 amostras de oito espécies de SCN isoladas de neonatos

| Espécie | Nº de amostras | gene <i>mecA</i> | Triagem em 4µg/mL de oxacilina | Nº de amostras com as seguintes CMI ^b (µg/mL) | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|----------------|------------------|--------------------------------|--|-----|----|---|---|---|----|----|----|-----|------|
| | | | | ≤0,25 | 0,5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | >256 |
| <i>S. epidermidis</i> | 43 | + | R | | 5 | 12 | 5 | 8 | 3 | | 1 | 2 | 5 | 2 |
| | 8 | - | S | 8 | | | | | | | | | | |
| <i>S. haemolyticus</i> | 18 | + | R | | | 1 | | 4 | 3 | 2 | | 1 | | 7 |
| <i>S. capitis capitis</i> | 2 | + | R | | | | | | | | 1 | 1 | | |
| | 2 | - | S | 2 | | | | | | | | | | |
| <i>S. capitis urealyticus</i> | 1 | + | R | | | | | | 1 | | | | | |
| | 1 | - | S | 1 | | | | | | | | | | |
| <i>S. hominis</i> | 2 | + | R | | | 1 | | | 1 | | | | | |
| | 2 | - | S | 2 | | | | | | | | | | |
| <i>S. warneri</i> | 2 | + | R | | | | | | 1 | | | | | 1 |
| <i>S. caprae</i> | 1 | - | S | 1 | | | | | | | | | | |
| <i>S. cohnii</i> | 1 | + | R | | | | | | | | | | 1 | |
| <i>S. saprophyticus</i> | 1 | - | S | 1 | | | | | | | | | | |

CMI – concentração mínima inibitória; R- resistente; S- sensível; ^a - Determinado pela reação em cadeia da polimerase (Santos *et al.*, 1999); ^b – Determinadas pelo teste de diluição em ágar: amostras resistente CMI ≥0,5 µg/mL, amostra sensível CMI ≤ 0,25 µg/mL (CLSI, 2008)

4.3 Tipagem do cassete estafilocócico *mec* (SCC*mec*) e relação com CMI e susceptibilidade antimicrobiana

A Tabela 11 apresenta os tipos de SCC*mec* observados a partir da detecção dos genes *ccr* e da classe do gene *mecA*, obtidos através de duas PCRs multiplex, M-PCR1 e M-PCR2. A análise das 69 amostras de SCN resistentes a oxacilina demonstrou a presença de segmentos gênicos compatíveis com quatro tipos de cassete *mec*, II, III, IV e V. O SCC*mec* tipo II só foi observado em duas amostras de *S. epidermidis* do IMMFM. O SCC*mec* III foi observado em nove amostras, o tipo IV e V em 15 amostras. Em 28 (40%) amostras não foi possível determinar o tipo de SCC*mec* porque estas apresentavam mais de um tipo de gene *ccr* ou ausência de classe do gene *mecA*. Todas as amostras SCC*mec* tipo IV foram identificadas como *S. epidermidis* e, três das amostras isoladas no HC-UFU também apresentaram o gene *ccrC*. Dentre as amostras tipo V, 11 (73%) delas foram identificadas como *S. haemolyticus*. O SCC*mec* tipo III foi encontrado em 9 (13%) amostras todas da espécie *S. epidermidis*, enquanto o tipo II foi detectado em 2 (3%).

A Figura 7 mostra a eletroforese em gel de agarose das seqüências gênicas que codificam para tipos de SCC*mec* detectados por PCR multiplex.

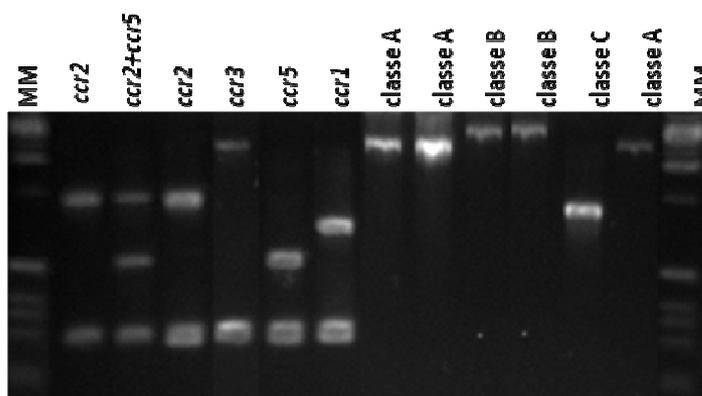


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose das seqüências gênicas que codificam para os tipos de SCC*mec* em amostras de SCN isoladas de neonatos; MM- marcador molecular

Tabela 11: Tipos de SCCmec detectados em 69 amostras de oito espécies de SCN resistentes à oxacilina isoladas de neonatos nos hospitais, HC-UFU e IMMFM

| Hospital | Espécie | Nº de amostras | M-PCR1 | M-PCR 2 | Tipo de SCCmec/(%) |
|----------|-------------------------------|----------------|-------------------------|------------------------------------|--------------------|
| | | | Tipo de gene <i>ccr</i> | Tipo de classe do gene <i>mecA</i> | |
| HC-UFU | <i>S. epidermidis</i> | 5 | 3 | A | III (24) |
| | <i>S. epidermidis</i> | 4 | 2 | B | IV (19) |
| | <i>S. haemolyticus</i> | 7 | 5 | C | V (38) |
| | <i>S. warneri</i> | 1 | 5 | C | V |
| | <i>S. epidermidis</i> | 2 | - | - | NT |
| | <i>S. hominis</i> | 1 | - | - | NT (19) |
| | <i>S. capitis urealyticus</i> | 1 | - | - | NT |
| | | | | | |
| IMMFM | <i>S. epidermidis</i> | 2 | 2 | A | II (4) |
| | <i>S. epidermidis</i> | 4 | 3 | A | III (8) |
| | <i>S. epidermidis</i> | 11 | 2 | B | IV (23) |
| | <i>S. epidermidis</i> | 1 | 5 | C | V |
| | <i>S. haemolyticus</i> | 4 | 5 | C | V (15) |
| | <i>S. capitis capitis</i> | 2 | 5 | C | V |
| | <i>S. epidermidis</i> | 14 | - | - | NT |
| | <i>S. haemolyticus</i> | 7 | - | - | NT |
| | <i>S. hominis</i> | 1 | - | - | NT (50) |
| | <i>S. warneri</i> | 1 | - | - | NT |
| | <i>S. cohnii</i> | 1 | - | - | NT |

HC-UFU – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia; IMMFM – Instituto Municipal da Mulher Fernando Magalhães; M-PCR 1- PCR multiplex utilizando oligonucleotídeos para a detecção do gene *mecA*, *ccr1*, *ccr2*, *ccr3*, *ccr4* e *ccrC*; M-PCR 2 – PCR multiplex para a detecção da classe do gene *mecA*, A, B ou C; NT – não tipável

A Tabela 12 mostra a classificação das 28 amostras não tipáveis, de acordo com Kondo e colaboradores (2007). Onze amostras, duas isoladas no HC-UFU e nove isoladas no IMMFM apresentaram apenas o gene *mecA*. Sete e quatro amostras de *S. epidermidis* isoladas no IMMFM apresentaram três e dois genes *ccr* diferentes, respectivamente.

Tabela 12: Perfis das 28 amostras de SCN resistentes à oxacilina isoladas de neonatos nos hospitais, HC-UFU e IMMFM, que foram não tipáveis pelos métodos utilizados

| Hospital | Espécie | Nº de amostras | M-PCR ₁ | | | | | | M-PCR ₂ | | |
|----------|-------------------------------|----------------|--------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------------|-------------|-------------|
| | | | <i>mecA</i> | <i>ccr1</i> | <i>ccr2</i> | <i>ccr3</i> | <i>ccr4</i> | <i>ccr5</i> | <i>mecA</i> | <i>mecB</i> | <i>mecC</i> |
| HC-UFU | <i>S. epidermidis</i> | 2 | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | <i>S. hominis</i> | 1 | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| | <i>S. capitis urealitycus</i> | 1 | + | + | - | - | - | - | + | - | - |
| IMMFM | <i>S. haemolyticus</i> | 7 | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | <i>S. hominis</i> | 1 | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | <i>S. warneri</i> | 1 | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | <i>S. epidermidis</i> | 3 | + | - | - | + | + | + | + | - | - |
| | <i>S. epidermidis</i> | 3 | + | - | + | - | + | + | - | - | + |
| | <i>S. epidermidis</i> | 1 | + | - | + | - | + | + | - | + | - |
| | <i>S. epidermidis</i> | 1 | + | - | + | - | + | - | + | - | - |
| | <i>S. epidermidis</i> | 1 | + | - | + | - | + | - | - | + | - |
| | <i>S. epidermidis</i> | 1 | + | - | - | - | + | + | + | - | - |
| | <i>S. epidermidis</i> | 1 | + | - | - | + | + | - | - | - | - |
| | <i>S. epidermidis</i> | 1 | + | - | - | - | - | - | - | - | + |
| | <i>S. epidermidis</i> | 1 | + | - | - | - | - | - | - | + | - |
| | <i>S. epidermidis</i> | 1 | + | - | + | - | - | - | - | - | - |
| | <i>S. cohnii</i> | 1 | + | - | - | - | - | - | + | + | - |

HC-UFU – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia; IMMFM – Instituto Municipal da Mulher Fernando Magalhães; NT – não tipável; M-PCR 1- PCR multiplex utilizando oligonucleotídeo para a detecção do gene *mecA*, *ccr1*, *ccr2*, *ccr3*, *ccr4* e *ccrC*; M-PCR 2 – PCR multiplex para a detecção da classe do gene *mec*, A, B ou C

A correlação entre o tipo de cassete *mec* presente e a susceptibilidade antimicrobiana foi analisada para todas as 69 amostras de SCN resistentes à oxacilina. A Tabela 13 mostra a correlação entre as taxas de resistência e os tipos de SCC*mec* encontrados. Entre as 15 amostras com SCC*mec* tipo IV, as maiores taxas de resistência foram observada para sulfametoxazol/trimetoprima e gentamicina (60%), cloranfenicol (46%) e eritromicina (40%). Entre as 15 amostras com SCC*mec* tipo V, foi observada susceptibilidade à maioria das classes de antimicrobianos, exceto para a tetraciclina, cuja taxa de resistência foi de 67%. As amostras com SCC*mec* tipo III foram aquelas menos sensíveis aos antimicrobianos, e apresentaram altas taxas de resistência a gentamicina (100%), sulfametoxazol/trimetoprima (88%), eritromicina (77%), clindamicina (66%) ciprofloxacina e cloranfenicol (55%). As amostras não tipáveis apresentaram um perfil de susceptibilidade semelhante ao das amostras em SCC*mec* tipo III. Somente duas amostras SCC*mec* tipo II foram detectadas, sendo ambas resistentes sulfametoxazol/trimetoprima.

Tabela 13: Correlação entre resistência antimicrobiana e tipos de SCC*mec* em 69 amostras de SCN resistentes à oxacilina isoladas de neonatos

| Antimicrobiano* | Número (%) de amostras | | | | |
|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------|
| | SCC <i>mec</i> II (n=2) | SCC <i>mec</i> III (n=9) | SCC <i>mec</i> IV (n=15) | SCC <i>mec</i> V (n=15) | Não tipável (n=28) |
| Ciprofloxacina | 0 | 5 (55) | 3 (15) | 4(29) | 19 (68) |
| Clindamicina | 0 | 6 (66) | 5 (25) | 3 (21,5) | 12 (41) |
| Cloranfenicol | 0 | 5 (55) | 7 (46) | 1 (7) | 4 (14) |
| Eritromicina | 1 (50) | 7 (77) | 8 (40) | 6 (40) | 19 (68) |
| Gentamicina | 1 (50) | 9 (100) | 9 (60) | 5(33,5) | 20 (69) |
| Mupirocina | 1 (50) | 3 (33) | 1 (6,6) | 0 | 3 (10) |
| Rifampicina | 0 | 4 (44) | 0 | 0 | 5 (17) |
| Sulfametoxazol/Trimetoprima | 2(100) | 8 (88) | 9 (60) | 4(29) | 20 (69) |
| Teicoplanina | 1(50) | 1 (11) | 1 (6,6) | 3(21,5) | 2 (7) |
| Tetraciclina | 0 | 1 (11) | 2 (13,3) | 10(67) | 4 (14) |

Na Tabela 14 estão apresentadas as CMI's para oxacilina de acordo com o tipo de cassete *mec*. Os resultados mostram que todas as 9 amostras com SCC*mec* tipo III apresentaram CMI's elevados, maiores ou iguais a 64 µg/mL de oxacilina, enquanto que entre as 15 amostras com SCC*mec* tipo IV as CMI's variaram entre 0,5 e 4 µg/mL. As 15 amostras com SCC*mec* tipo V apresentaram CMI's para oxacilina variando de 1 a 64 µg/mL. As amostras não tipáveis apresentaram CMI's mais variadas, que se estenderam de 0,5 a ≥ 256 µg/mL de oxacilina.

Tabela 14: Correlação entre concentração mínima inibitória para oxacilina e tipos de SCC*mec* em 69 amostras de SCN resistentes à oxacilina isoladas de neonatos nos hospitais HC-UFU e IMMFM

| CMI para oxacilina (µg/mL) | Número de amostras | | | | | | | | | | Total (%) |
|----------------------------------|-------------------------|-----|----|---|----|-------------------------|-----|----|---|----|-----------|
| | HC-UFU | | | | | IMMFM | | | | | |
| | Tipos de SCC <i>mec</i> | | | | | Tipos de SCC <i>mec</i> | | | | | |
| | II | III | IV | V | NT | II | III | IV | V | NT | |
| 0,5 | - | - | - | - | 1 | - | - | 2 | - | 1 | 5 (7,3) |
| 1 | - | - | 2 | 1 | - | - | - | 5 | 1 | 5 | 14 (20,3) |
| 2 | - | - | - | - | - | 1 | - | 3 | - | 1 | 5 (7,3) |
| 4 | - | - | 2 | 3 | 1 | 1 | - | 1 | 1 | 3 | 12 (17,4) |
| 8 | - | - | - | 4 | 2 | - | - | - | - | 3 | 9 (13) |
| 16 | - | - | - | - | - | - | - | - | 2 | - | 2(3) |
| 32 | - | - | - | - | - | - | - | - | 2 | 1 | 2 (3) |
| 64 | - | 1 | - | - | - | - | 1 | - | 2 | - | 4 (5,8) |
| 128 | - | 2 | - | - | - | - | 3 | - | - | 1 | 6 (8,7) |
| ≥ 256 | - | 2 | - | - | - | - | - | - | - | 9 | 10 (14,5) |
| Total | - | 5 | 4 | 8 | 4 | 2 | 4 | 11 | 8 | 24 | 69 (100) |

HC-UFU – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia; IMMFM – Instituto Municipal da Mulher Fernando Magalhães; CMI: concentração mínima inibitória; NT – não tipável

4.4 Características gerais e perfis genotípicos das amostras de SCN isoladas no HC-UFU e IMMFM

A diversidade genômica foi avaliada para 67 amostras de SCN, pela técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), após tratamento com a enzima de restrição *SmaI*. As amostras selecionadas para a análise estão listadas na Tabela 15. Dentre elas, estão todas as amostras resistentes à oxacilina pertencentes às duas espécies prevalentes: *S. epidermidis* (43) e *S. haemolyticus* (18). Adicionalmente foram analisadas seis amostras de secreção ocular isoladas no HC-UFU, que foram selecionadas, devido a sua alta prevalência, sendo duas de *S. hominis*, uma sensível e outra resistente à oxacilina, e quatro de *S. epidermidis* sensíveis à oxacilina.

Tabela 15: Amostras selecionadas para a análise da diversidade genômica pela técnica de PFGE

| Espécie | Hospital | | Total de amostras |
|---|-----------|-----------|-------------------|
| | HC-UFU | IMMFM | |
| <i>S. epidermidis</i> resistente à oxacilina | 11 | 32 | 43 |
| <i>S. haemolyticus</i> resistente à oxacilina | 7 | 11 | 18 |
| <i>S. epidermidis</i> sensíveis à oxacilina isoladas de secreção ocular | 4 | - | 4 |
| <i>S. hominis</i> sensíveis à oxacilina isoladas de secreção ocular | 1 | - | 1 |
| <i>S. hominis</i> resistente à oxacilina isoladas de secreção ocular | 1 | - | 1 |
| Total | 24 | 43 | 67 |

Os genótipos descritos foram designados com letras maiúsculas para cepas de *S. epidermidis* e minúsculas para *S. haemolyticus*. Aos subtipos dentro do mesmo genótipo foram adicionados números subsequentes.

Um total de 41 perfis de fragmentação do DNA genômico foi obtido nas 67 amostras de SCN analisadas, incluídos em 32 genótipos. Para *S. epidermidis* foram descritos quatro perfis dentro de 4 genótipos, enquanto para *S. haemolyticus* foram observados 2 perfis em 2 genótipos. Entre as 11 amostras de *S. epidermidis* resistentes à oxacilina foram encontrados quatro genótipos, designados como A (4 amostras), B, C (3) e D (1). Todas as amostras do genótipo “A” tiveram o mesmo tipo de SCCmec (tipo III), enquanto as amostras do genótipo “B” apresentaram o SCCmec IV + *ccrC* (Tabela 16). Entre as sete amostras de *S. haemolyticus* resistentes à oxacilina, quatro (57%) pertenciam ao genótipo “a” e três (43%) ao genótipo “b”, e todas apresentaram SCCmec tipo V. A

Figura 8 mostra os genótipos obtidos por PFGE para as sete amostras de *S. haemolyticus* e 10 de *S. epidermidis* resistente à oxacilina, isoladas no HC-UFU.

A Figura 9 apresenta os genótipos obtidos por PFGE para 6 amostras de secreção ocular das espécies *S. hominis* (2 amostras) e *S. epidermidis* (4 amostras) sensíveis, isoladas no HC-UFU. As quatro amostras de *S. epidermidis* sensíveis à oxacilina apresentaram o mesmo genótipo. As duas amostras de *S. hominis*, uma sensível e outra resistente à oxacilina apresentaram perfis não relacionados.

Tabela 16: Características gerais das 21 amostras de cinco espécies de SCN resistentes à oxacilina isoladas de neonatos no HC-UFU

| Nº da amostra | Paciente Sexo/Peso (g) | Fatores de Risco e/ou doença de base | Espécime Clínico | Data de isolamento | CMI 4µg/mL oxacilina | Tipos de SCCmec | Genótipo |
|--------------------------------------|------------------------|--------------------------------------|------------------|--------------------|----------------------|-----------------|----------|
| <i>S. epidermidis</i> | | | | | | | |
| 348s | F /1400 | PMT, Pneumonia | Sangue | 03/2001 | 4,0 | IV+ <i>ccrC</i> | B |
| 356s* | F/750 | PMT, Pneumopatia, Icterícia | Sec.ocular | 09/2002 | 256 | III | A |
| 359s | F /3480 | Pneumopatia | Ponta de cateter | 06/2002 | 1,0 | IV | C |
| 360s | F /2640 | Pneumopatia | Sangue | 08/2002 | 0,5 | NT | C |
| 361s | F /2200 | PMT, Pneumopatia, Anoxia | Ponta de cateter | 05/2001 | 128 | III | A |
| 364s | F/ 2400 | Anoxia, MFI | Sangue | 11/2001 | 1,0 | IV | C |
| 365s | M /990 | PMT, Pneumopatia, Apnéia, | Sangue | 04/2001 | 4,0 | IV+ <i>ccrC</i> | B |
| 367s | F/ 3700 | Cirurgia abdominal, Anemia | Sangue | 06/2001 | 4,0 | IV+ <i>ccrC</i> | B |
| 369s | F/ 930 | PMT, Apnéia, Bradicardia | Sangue | 03/2002 | 256 | III | A |
| 377s | F /1030 | PMT, Pneumopatia | Sangue | 10/ 2002 | 64 | III | D |
| 382s | F /1090 | PMT, Pneumopatia | Sangue | 09/2002 | 128 | III | A |
| <i>S. haemolyticus</i> | | | | | | | |
| 343s | M /1560 | ND | Sangue | 06/2002 | 8,0 | V | a |
| 350s | F /1310 | PMT, Pneumopatia, Anoxia | Sec. ocular | 04/2002 | 4,0 | V | b |
| 351s | F/ 810 | PMT, Pneumopatia, Apnéia | Sangue | 09/2002 | 1,0 | V | b |
| 352s | F /1500 | Meningite, Anoxia | Sangue | 12/2001 | 8,0 | V | a |
| 358s | F/ 770 | PMT, Apnéia | Sangue | 12/2001 | 8,0 | V | a |
| 366s | F/3380 | Anoxia, convulsão | Ponta de cateter | 12/2002 | 4,0 | V | b |
| 368s | F /1890 | Pneumopatia, Anoxia | Sangue | 09/2002 | 4,0 | V | a |
| <i>S. capitis urealyticus</i> | | | | | | | |
| 372s | F /1000 | PMT, Pneumopatia, SMH | Sec. ouvido | 09/2001 | 8,0 | NT | nd |
| <i>S. hominis</i> | | | | | | | |
| 353s | F /1220 | PMT, Pneumopatia, SMH | Sec. ocular | 07/2001 | 8,0 | NT | nd |
| <i>S. warneri</i> | | | | | | | |
| 366s | F /2450 | Pneumopatia, Cianose | Ponta de cateter | 01/2002 | 8,0 | NT | nd |

HC-UFU – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia; CMI – concentração mínima inibitória; F- feminino; M- masculino; PMT – prematuros; MFI – Má formação intestinal; SMH -Síndrome da membrana hialina; DH- distúrbio hidrolítico; * - paciente foi a óbito; Sec. ocular – secreção ocular; Sec. Ouvido – secreção de ouvido; NT – não tipável; nd – não determinado

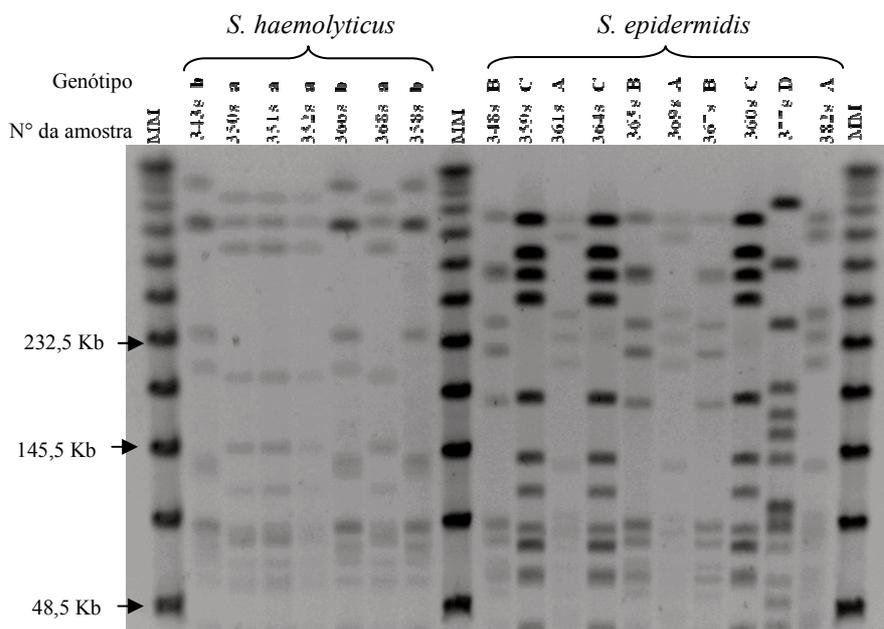


Figura 8: Genótipos obtidos por PFGE para amostras das espécies *S. haemolyticus* e *S. epidermidis*, resistente à oxacilina isoladas no HC-UFU; M: marcador molecular

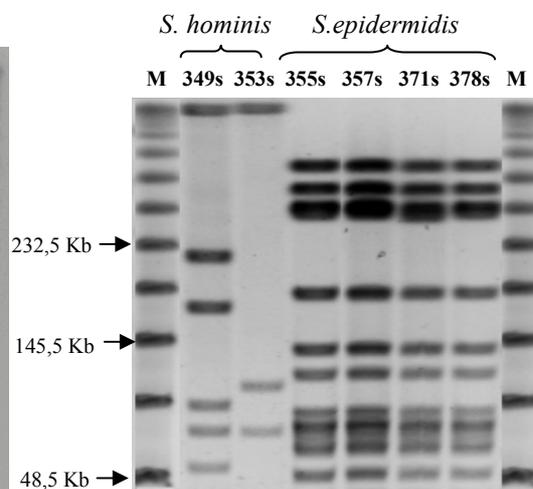


Figura 9: Genótipos obtidos por PFGE para amostras das espécies *S. hominis* e *S. epidermidis* sensível à oxacilina isoladas de secreção ocular no HC-UFU; M: marcador molecular

A Tabela 17 mostra as características gerais das 32 amostras de *S. epidermidis* resistente à oxacilina isoladas no IMMFM. Para 43 amostras de *S. epidermidis* foram observados 26 perfis de fragmentação em 18 genótipos, que foram designados como “E, F, G, H, I, J, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, V e X”. A Figura 10 apresenta os representantes dos genótipos obtidos por PFGE para amostras de *S. epidermidis* isoladas no IMMFM. O genótipo “E” foi observado em cinco (15,6%) amostras que apresentaram SCCmec tipo IV (4 amostras) e em uma amostra não tipável apresentando uma similaridade de 80% quando analisadas no dendograma (Figura 11). Amostras do genótipo “F” (4), apresentaram similaridade de 94%.

Tabela 17: Características gerais das 32 amostras de *S. epidermidis* resistente à oxacilina isoladas de neonatos no IMMFM.

| Nº da amostra | Paciente Sexo/ Peso (g) | Fatores de Risco e/ou doença de Base | Espécime Clínico | Data de isolamento | CMI 4µg/mL oxacilina | Tipos de SCCmec | Genótipo |
|---------------|-------------------------|--------------------------------------|------------------|--------------------|----------------------|-----------------|----------------|
| 548s | nd | nd | Sangue | 06/07 | 8,0 | NT | F ₁ |
| 550s | F/2240 | Pneumopatia; Gemência | Sangue | 06/07 | 2,0 | IV | U |
| 551s | M /3050 | Pneumopatia; Gemência | Sangue | 06/07 | 0,5 | IV | N |
| 552s | M /1610 | PMT; Pneumopatia; PIG | Sangue | 06/07 | 128 | III | L |
| 555s* | F/1810 | PMT; Má formação | Sangue | 08/07 | 4,0 | NT | E ₂ |
| 559s | F /1855 | PMT; Pneumopatia | Sangue | 09/07 | 1,0 | IV | E ₅ |
| 561s | F /1360 | PMT ; Pneumopatia | Sangue | 09/07 | 1,0 | IV | G ₁ |
| 563s | F /1190 | PMT; Pneumopatia | Ponta de cateter | 10/07 | 0,5 | NT | F ₃ |
| 565s | nd | nd | Sangue | 10/07 | 1,0 | V | M |
| 570s | nd | nd | Urina | 10/07 | 4,0 | IV | S |
| 571s | M /2335 | PMT; Pneumopatia | Sangue | 11/07 | 128 | III | I |
| 572s | M /2770 | Impetigo | Sangue | 11/07 | 64 | III | V |
| 574s | M/ 985 | PMT; SMH; Pneumopatia | A.traqueal | 11/07 | 2,0 | IV | G ₁ |
| 580s | M/1675 | PMT; Enterocolite | Sangue | 11/07 | 1,0 | NT | K |
| 585s | F /1350 | PMT; Pneumopatia | Sangue | 12/07 | 8,0 | NT ₁ | J |
| 587s | M /2865 | Asfixia; Dist. Abdominal | Sangue | 12/07 | 1,0 | NT | P |
| 588s | nd | nd | Sangue | 12/07 | 2,0 | NT | H |
| 589s | F /1520 | PMT; PIG | Sangue | 01/08 | 1,0 | IV | R |
| 590s | M /1290 | PMT | Sangue | 01/08 | 2,0 | IV | G ₂ |
| 591s | F /1045 | PMT; Apnéia | Sangue | 02/08 | 4,0 | II | Q |
| 592s | M /4270 | GIG; Hidrocele bilateral | Sangue | 02/08 | 2,0 | II | T |
| 593s | nd | nd | Sangue | 02/08 | 1,0 | IV | E ₁ |
| 594s* | F/700 | PMT; Pneumopatia; SMH | Sangue | 02/08 | 1,0 | IV | E ₃ |
| 597s | F /920 | PMT; Pneumopatia | Sangue | 02/08 | 128 | IV | I |
| 595s | F /2330 | PMT; Pneumopatia | Sangue | 02/08 | 1,0 | III | X |
| 599s | M /1215 | PMT; Pneumopatia | Sangue | 03/08 | 4,0 | NT | H |
| 601s | M /1180 | PMT; Pneumopatia | Sangue | 03/08 | 8,0 | NT | H |
| 605s | M /2515 | Pneumopatia; anemia | Sangue | 04/08 | 0,5 | NT | O |
| 606s | F /1150 | PMT; Pneumopatia | Sangue | 04/08 | 4,0 | NT | F ₁ |
| 614S | F /3120 | Impetigo neonatal | Sangue | 05/08 | 0,5 | IV | E ₄ |
| 615s | M /2350 | Hipoglicemia | Sangue | 06/08 | 32 | NT | J |
| 616s | nd | nd | Sangue | 06/08 | 10 | NT | F ₂ |

IMMFM- Instituto Municipal da Mulher Fernando Magalhães; CMI – concentração mínima inibitória; PMT – prematuros; PIG – pequeno para a idade gestacional; GIG – gigante para a idade gestacional; SMH -Síndrome da membrana hialina; DH- distúrbio hidrolítico; NT- não tipável; Sec. abscesso – secreção abscesso; A. traqueal – aspirado traqueal; nd – Não determinado; * - paciente foi a óbito

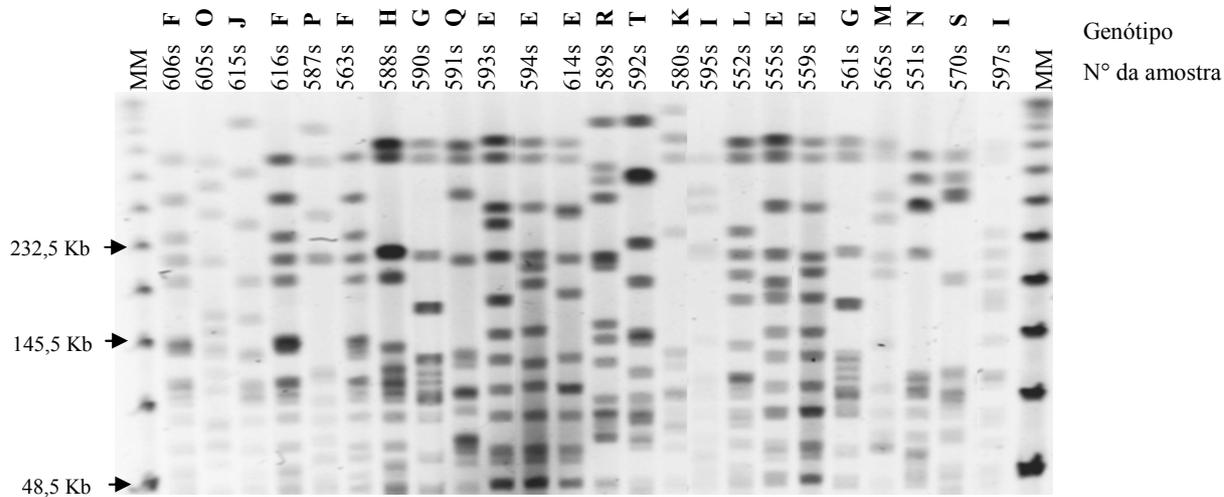


Figura 10: Genótipos obtidos por PFGE de 24 amostras de *S. epidermidis*, isoladas no IMMFM; MM: marcador molecular

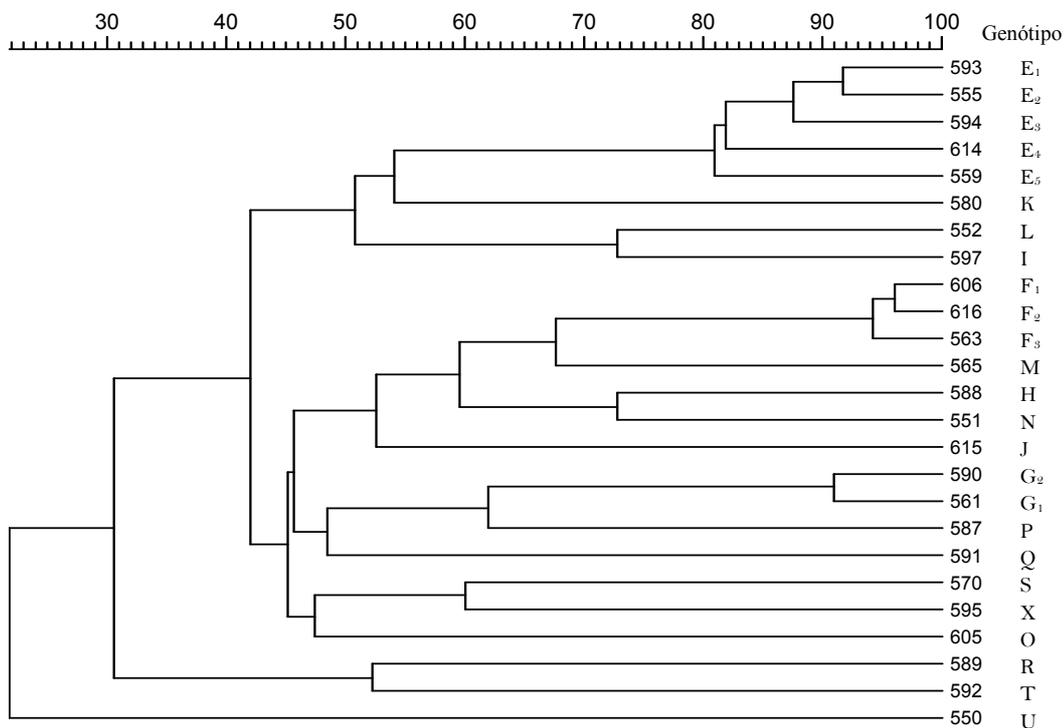


Figura 11: Dendrograma obtido por análise computadorizada de 25 perfis representativos das amostras de *S. epidermidis* resistentes à oxacilina, isoladas no IMMFM (Figura 10)

A Tabela 18 mostra as características gerais das 16 amostras de cinco espécies de SCN resistentes à oxacilina isoladas no IMMFM. Seis perfis de fragmentação do DNA genômico foram obtidos para 11 amostras de *S. haemolyticus* resistentes a oxacilina analisadas, que foram incluídas em cinco genótipos, designados como “c” (4 amostras), “d” (3), “e” (2), “f” (1), “g” (1). A Figura 12 apresenta os perfis de fragmentação obtidos por PFGE para 7 amostras de *S. haemolyticus* isoladas no IMMFM, enquanto a Figura 13 (dendrograma) apresenta a análise computadorizada obtidas para estes genótipos, na qual observamos a existência de dois perfis (“e” e “c”) que englobaram amostras com similaridade de mais de 90%.

Tabela 18: Características gerais das 16 amostras de cinco espécies de SCN resistentes à oxacilina isoladas de neonatos no IMMFM.

| Nº da amostra | Paciente Sexo/Peso (g) | Fatores de Risco e/ou doença de base | Espécime Clínico | Data de isolamento | CMI 4µg/mL oxacilina | Tipos de SCCmec | Genótipo |
|----------------------------------|------------------------|--------------------------------------|------------------|--------------------|----------------------|-----------------|----------------|
| <i>S. haemolyticus</i> | | | | | | | |
| 553s | nd | nd | Sangue | 07/07 | 64 | V | d |
| 554s | nd | nd | Sec.abcesso | 07/07 | 4,0 | V | g |
| 558s | F/1195 | PMT | Sangue | 08/07 | >256 | NT | f |
| 560s | F/1440 | PMT; Pneumopatia | Sangue | 09/07 | >256 | NT | c |
| 576s | F/820 | PMT | Sangue | 10/07 | 16 | V | d |
| 568s | nd | nd | Sangue | 10/07 | >256 | NT | c |
| 573s | F/990 | PMT | Sangue | 11/07 | >256 | NT | c |
| 582s | M/1040 | PMT; SMH; Apnéia | Sangue | 12/07 | >256 | NT | c |
| 586s* | M/2770 | Impetigo; Pneumopatia | Sangue | 12/07 | 16 | V | d |
| 617s | nd | nd | Sangue | 06/08 | >256 | NT | e ₁ |
| 618s | F/1435 | PMT; Pneumopatia | Sangue | 06/08 | >256 | NT | e ₂ |
| <i>S. capitis capitis</i> | | | | | | | |
| 575s | nd | nd | Sangue | 08/10/07 | 32 | V | nd |
| 607s | nd | nd | Sangue | 19/04/08 | 64 | V | nd |
| <i>S. hominis</i> | | | | | | | |
| 598s | M/3020 | nd | Sangue | 10/03/08 | 1,0 | NT | nd |
| <i>S. warneri</i> | | | | | | | |
| 562s | M/1420 | PMT; Pneumopatia; Sífilis | Ponta de cateter | 04/10/07 | >256 | NT | nd |
| <i>S. cohnii</i> | | | | | | | |
| 603s | M/975 | PMT; Pneumopatia | Sangue | 22/03/08 | 128 | NT | nd |

IMMFM- Instituto Municipal da Mulher Fernando Magalhães; PMT – prematuro; SMH – Síndrome da Membrana Hialina; CMI – concentração mínima inibitória; nd – não determinado; * - paciente foi a óbito;

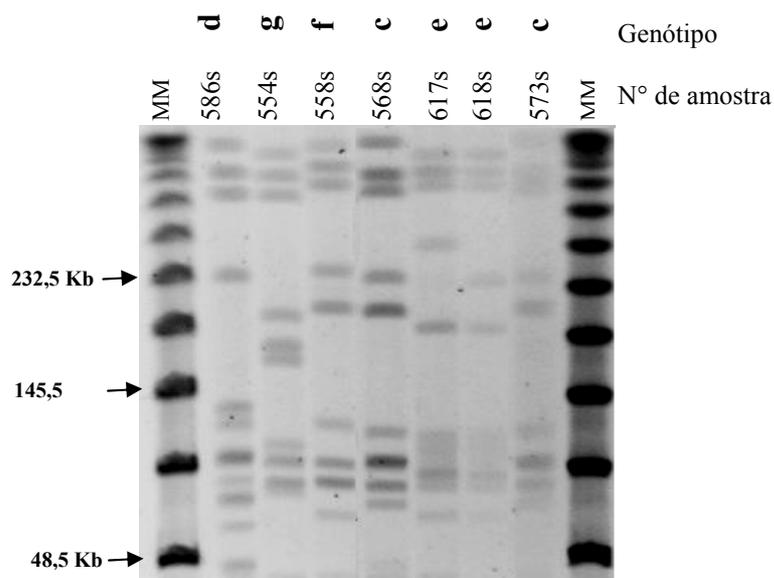


Figura 12: Genótipos obtidos por PFGE de 7 amostras de *S. haemolyticus* isoladas no IMMFM; MM: marcador molecular

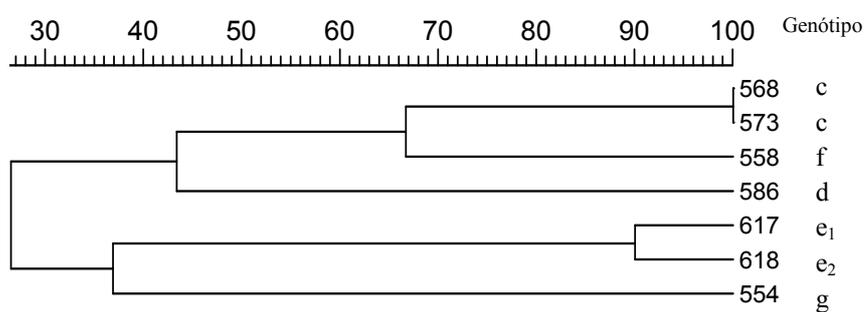


Figura 13: Dendrograma obtido por análise computadorizada de 7 perfis representativos das amostras de *S. haemolyticus* resistentes à oxacilina, isoladas no IMMFM (Figura 12)

Alguns aspectos relacionados a 70 neonatos, como taxa de prematuridade e baixo peso foram avaliados. A prematuridade foi encontrada como fator de risco para 65% (47) dos pacientes, estando associada ao baixo peso ($\leq 2500\text{g}$) na maioria dos casos. Todos os pacientes, de ambos os hospitais, necessitaram de procedimentos invasivos. Pneumopatia foi à principal doença de base (46%; 33 paciente) observada nos pacientes de ambos os hospitais. A Figura 14 mostra ar entre as taxas de infecções precoces e tardias e o peso em 70 neonatos internados no HC-UFU e IMMFM.

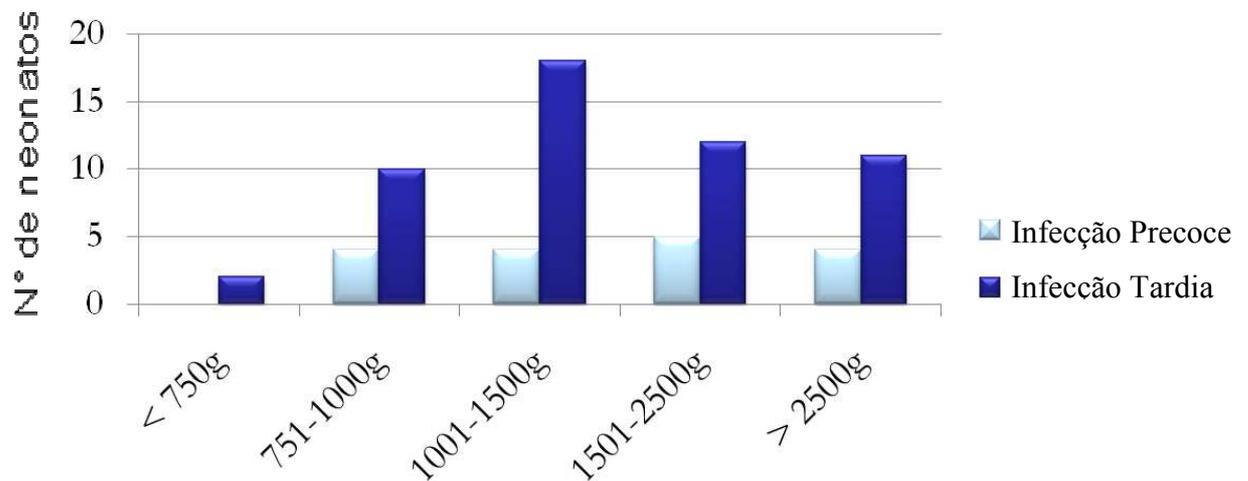


Figura 14: Relação entre as taxas de infecções precoce e tardia e o peso em 70 neonatos internados no HC-UFU e IMMFM

5 DISCUSSÃO

Os *Staphylococcus* são habitantes comuns da microbiota humana (BANNERMAN & PEACOCK, 2007) e, em decorrência deste fato, são responsáveis por cerca de metade das IRAS. Os SCN têm sido patógenos relevantes neste tipo de infecção, sendo, principalmente, responsáveis por aquelas infecções relacionadas a dispositivos médicos (ARNASON *et al.*, 2008; GARLAND *et al.*, 2008). Em UTINs, os SCN têm sido detectados em alta frequência em diferentes infecções, responsáveis por taxas que variam de 24% (CHAN *et al.*, 2007) a 44,8% (BABAZONO *et al.*, 2008). Sua presença tem sido relevante em bacteriemias neonatais, com taxas variando de 37% a 75% (SOHN *et al.*, 2001; COUTO *et al.*, 2007; GRAY *et al.*, 2007; MIREYA *et al.*, 2007; HIRA *et al.*, 2007). No Brasil, a presença desse patógeno em infecções neonatais têm variado de 34% a 51% (NAGATA, BRITO & MATSUO, 2002; COUTO *et al.*, 2007; TÁVORA *et al.*, 2008), sendo também frequentes em bacteriemias (69%) (VON DOLINGER DE BRITO *et al.*, 2007).

No presente estudo, foram avaliadas 84 amostras de SCN, isoladas de diferentes sítios de neonatos internados nas UTINs de dois hospitais brasileiros: (a) HC-UFU, uma instituição federal localizada em Uberlândia, MG, no período de janeiro/2001 a dezembro/2002, e (b) IMMFM, uma instituição municipal localizada no Rio de Janeiro, RJ, no período de junho/2007 a julho/2008. O sítio de isolamento mais frequente, em ambos os hospitais, foi o sangue (73,8%), seguido de secreção ocular (11,9%), confirmando os relatos anteriores que apresentam as infecções da corrente sanguínea como prevalentes em UTINs. Mireya e colaboradores (2007) também encontraram resultados semelhantes aos nossos, com a maioria das amostras de SCN sendo isoladas de sangue (73,3%) e de secreção ocular (16,6%) em UTINs.

Em nosso estudo, a identificação das amostras de SCN isoladas de neonatos foi realizada, inicialmente, utilizando-se um método bioquímico miniaturizado, e sua confirmação foi obtida por PCR espécie-específico, para amostras de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*. Apesar da já descrita subjetividade na leitura de testes colorimétricos, empregados na identificação de SCN (COUTO *et al.*, 2001), os resultados fenotípicos encontrados foram concordantes com os resultados moleculares, para as duas espécies investigadas. A atipia bioquímica é um dos problemas enfrentados por profissionais que trabalham com esse tipo de microrganismo (IORIO *et al.*, 2007). Em nosso estudo,

foram detectadas duas (4%) amostras de SCN, com perfis bioquímicos atípicos para a espécie *S. epidermidis*, e que foram relacionados ao teste da fosfatase. Iorio e colaboradores (2007) encontraram taxas elevadas (55,6%) de amostras de SCN com perfil bioquímico atípico, principalmente em amostras das espécies *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* e *S. hominis*. Contudo, os autores encontraram apenas 5 (2,5%) amostras atípicas para o teste da fosfatase, sendo duas da espécie *S. epidermidis*, resultado similar ao observado no presente estudo.

A espécie *S. epidermidis*, em geral, é a mais isolada em infecções por SCN, e a com maior potencial patogênico deste grupo (BANNERMAN & PEACOCK, 2007; ROGER *et al.*, 2009). Além disso, essa espécie é responsável por até 75% das infecções tardias neonatais estafilocócicas (MUSSI-PINHATA & NASCIMENTO, 2001; WEISMAN, 2004). Milisavjevic e colaboradores (2005) identificaram *S. epidermidis* como responsável por 30% das IRAS, em duas UTINs de um hospital norte americano. HIRA e colaboradores (2007) também detectaram a presença do *S. epidermidis* em 58% das infecções neonatais avaliadas. Em nosso estudo, as espécies prevalentes de SCN apresentaram taxas equivalentes, em ambos os hospitais avaliados, sendo *S. epidermidis* a espécie mais isolada, identificada em cerca de 60% das amostras, em cada uma das instituições avaliadas, dados estes concordantes com a literatura mencionada.

Devido à boa absorção oral, a clindamicina tem sido usada no tratamento de infecções de pele e tecidos moles causadas por *Staphylococcus* (NAVANEETH, 2006). Contudo, a resistência a esse fármaco tem sido mencionada. Segundo Ciraj e colaboradores (2009), a incidência de resistência à clindamicina induzida pela eritromicina, em amostras de *Staphylococcus*, varia de acordo com a localização geográfica. No presente estudo, observamos que houve esse tipo de variação, já que, no IMMFM, localizado no Rio de Janeiro, foram encontradas apenas 4 (7%) amostras com resistência induzida, enquanto no HC-UFU, localizado em Uberlândia, foram detectadas 12 (40%) amostras com esse perfil. Porém, é importante destacar que oito dessas amostras foram identificadas como *S. epidermidis*, das quais quatro foram geneticamente relacionadas.

Apesar de já ter sido descrita susceptibilidade reduzida aos glicopeptídeos, como a vancomicina (HIRAMATSU *et al.*, 1997; GARRET *et al.*, 1999; NUNES *et al.*, 2002), ou mesmo altas taxas de resistência, como no caso da teicoplanina (RAPONI *et al.*, 2005; HOPE *et al.*, 2008), entre amostras de SCN analisadas no presente estudo apresentaram-se sensíveis à vancomicina, enquanto uma taxa reduzida de resistência

(8%) foi observada para a teicoplanina. Esse tipo de resistência foi observado entre amostras de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, espécies de SCN que apresentam tendência a desenvolver resistência aos glicopeptídeos (NUNES *et al.*, 2006).

A principal resistência antimicrobiana detectada em *Staphylococcus* é à oxacilina, que vêm aumentando nas últimas décadas em decorrência do uso contínuo deste antimicrobiano (DIEKEMA *et al.*, 2003). Um estudo envolvendo vigilância de taxas antimicrobianas, realizado a partir de dados obtidos de cerca de 20 países europeus, tem demonstrado que, com exceção da tetraciclina, as taxas de resistência encontradas para *S. epidermidis*, são superiores às observadas para *S. aureus*, tanto para amostras de infecções comunitárias, quanto entre aquelas relacionadas a cuidados associados à saúde (FLUIT *et al.*, 2001). Um estudo desenvolvido por nosso grupo com amostras de *Staphylococcus* isoladas de bacteriemias, em um hospital terciário do Rio de Janeiro, durante 2001 e 2002, detectou 52% de amostras resistentes à oxacilina, sendo 26% de *S. aureus* e 81,6% de SCN (NUNES *et al.*, 2007). Dados semelhantes foram encontrados no presente estudo, no qual 82% das amostras de SCN foram resistentes a esse antimicrobiano, com destaque para as espécies *S. epidermidis* (84%) e *S. haemolyticus* (100%). Já as taxas de resistência à penicilina, eritromicina, gentamicina e sulfametoxazol/trimetoprima foram similares entre as duas espécies. Como já tem sido descrito, esses patógenos apresentam maior resistência e, entre os *Staphylococcus*, são as espécies que se destacam em relação a esta característica, principalmente a espécie *S. haemolyticus* (BIAVASCO *et al.*, 2000; RAPONI *et al.*, 2005; CASTRO *et al.*, 2006).

Quando comparado ao *S. aureus*, os SCN resistentes à oxacilina podem ser até seis vezes mais resistentes (DIEKEMA *et al.*, 2001; COUTO *et al.*, 2007). Em UTINs, a resistência em SCN pode atingir taxas elevadas, alcançando até 92% (VILARI *et al.*, 2000). Hira e colaboradores (2007) observaram taxas de resistência à oxacilina de 87% para amostras de SCN isoladas de neonatos, durante o ano de 2003. Szewczyk, Piotrowski & Rózska (2000) isolaram amostras de neonatos e ambiente, e observaram taxas de resistência de 79% e 83%, respectivamente. O estabelecimento de amostras de SCN resistentes à oxacilina no ambiente hospitalar tem se tornado preocupante uma vez que essas amostras, predominantemente envolvidas em IRAs, podem acumular resistência a outras classes de antimicrobianos, potencialmente transmissível ao *S. aureus* e a outros microrganismos (MIRAGAIA *et al.*, 2002).

A detecção da resistência à oxacilina é um aspecto extremamente importante, visto que a observação precoce e precisa desta resistência pode auxiliar no estabelecimento de uma antibioticoterapia correta no combate à infecção. Diversos trabalhos, comparando metodologias para a detecção fenotípica de resistência à oxacilina têm sido realizados. Grande parte deles aponta o disco de cefoxitina (NOWAK, *et al.*, 2006; JAIN, AGARWAL & VERMA, 2008) e/ou a triagem em ágar, contendo 4µg/mL de oxacilina (FERREIRA *et al.*, 2003) como as metodologias mais adequadas para detectar amostras de SCN que possuem o gene *mecA*. No presente estudo, foram utilizadas essas duas técnicas para detectar amostras resistentes à oxacilina, além da determinação da CMI e do teste de difusão com disco de oxacilina. Utilizando a técnica de PCR para detecção do gene *mecA* como técnica padrão, os testes mostraram 100% de concordância na análise das 84 amostras, incluindo cinco amostras de *S. epidermidis* heterorresistentes que apresentaram crescimento não confluyente em ágar triagem e valores baixos de CMI. Em nosso estudo, também foi observada uma alta correlação entre resistência a beta-lactâmicos e multirresistência antimicrobiana, como já tem sido relatado (GROHS, 2008).

Devido à pressão seletiva ocasionada pelo uso contínuo de diversos antimicrobianos, o SCC*mec*, cassete cromossômico no qual está inserido o gene *mecA*, foi agrupando cada vez mais determinantes de resistência a diversas classes de drogas (ITO *et al.*, 2001) Em decorrência, também foram surgindo ao longo dos anos, diferentes configurações de cassete, permitindo que o mesmo fosse classificado em diferentes tipos (ZHANG *et al.*, 2005, JANSEN *et al.*, 2006; OLIVEIRA, MILHEIRIÇO & DE LENCASTRE, 2006; DESCLOUX, ROSSANO & PERRETEEN, 2008). Contudo, poucos são os relatos, na literatura, sobre a caracterização dos tipos de SCC*mec* em amostras de SCN (MOMBACH PINHEIRO MACHADO *et al.*, 2007; KONDO *et al.*, 2007; IBRAHEM *et al.*, 2009), contrastando com vários dados relacionados à amostras ORSA (ITO *et al.*, 2004; BOYLE-VAVRA *et al.*, 2005; GEROGIANNI *et al.*, 2006; OLIVEIRA, MILHEREIÇO & DE LENCASTRE, 2006).

Nosso estudo revelou a predominância de dois tipos de SCC*mec*, IV (15 amostras; 21,7%) e V (15; 21,7%), entre as 69 amostras de SCN resistentes à oxacilina. A grande maioria das amostras foi não tipável (40,8%). Entre as 15 amostras com SCC*mec* tipo IV analisadas, foram observadas taxas elevadas de susceptibilidade aos antimicrobianos em geral, incluindo rifampicina, sulfametoxazol/trimetoprima, ciprofloxacina, tetraciclina, mupirocina e teicoplanina. Esses resultados se assemelham

aqueles descritos para amostras ORSA, que carregam o SCC*mec* IV e tem se apresentado sensíveis à grande parte das classes de antimicrobianos disponíveis (KILIC *et al.*, 2006; MORONEY *et al.*, 2007). Essa susceptibilidade se justifica pelo tamanho reduzido do cassete *mec* IV, que agrega um menor número de determinantes de resistência (MA *et al.*, 2002).

Os poucos estudos que analisaram amostras de SCN em relação ao seu cassete de resistência relataram a predominância do SCC*mec* tipo IV, com taxas de até 41% (HANSEN & SOLLID, 2007; MIRAGAIA *et al.*, 2007; MOMBACH PINHEIRO MACHADO *et al.*, 2007; RUPPÉ *et al.*, 2008; IBRAHEM *et al.*, 2009). Em Paris, um estudo observou que dentre as 96 amostras de SCN, 28 (29%) apresentavam o SCC*mec* tipo IV, 25 (26%) o tipo V e 42 (43,7%) eram não tipáveis (RUPPÉ *et al.*, 2008). Esse mesmo trabalho mostrou que o complexo *ccr2* e o *mec* classe B, típico do SCC*mec* tipo IV, eram predominantes em *S. epidermidis*, enquanto o *ccrC* e *mec* classe C (SCC*mec* tipo V) foram detectados, principalmente, em *S. haemolyticus*, sugerindo que *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* sejam os principais reservatórios dos tipos IV e V, respectivamente. Nossos achados estão de acordo com os relatos anteriores, já que todas as amostras com SCC*mec* tipo IV foram da espécie *S. epidermidis*, enquanto 73,3% daquelas com tipo V eram *S. haemolyticus*.

Apesar de todas amostras de *S. haemolyticus* carreadoras de SCC*mec* tipo V terem sido resistentes à oxacilina, com valores intermediários de CMI (1 a 64 µg/mL), elas apresentaram altas taxas de susceptibilidade à ciprofloxacina, clindamicina, cloranfenicol, mupirocina, rifampicina e sulfametoxazol/trimetoprima. Assim como para amostras tipo IV, aquelas com SCC*mec* tipo V são consideradas de origem comunitária, e portanto com maior sensibilidade demonstrando que está havendo uma alteração na epidemiologia de infecções por SCN, que são essencialmente hospitalares (BANNERMAN e PEACOCK, 2007). Katayama, Ito e Hiramatsu (2001) encontraram o *mec* classe C, característico do SCC*mec* tipo V, em 31 das 38 amostras de *S. haemolyticus* analisadas. Uma justificativa para os níveis intermediários de CMI para oxacilina, encontrados no presente estudo, para essa espécie, pode estar associada com a deleção do *mecI* e *mecRI*, após a inserção do IS431L, formando a estrutura designada como *mec* classe C (KATAYAMA, ITO e HIRAMATSU, 2001).

Apenas 13% das amostras de SCN apresentaram o SCC*mec* tipo III, um cassete com múltiplos genes de resistência (HIRAMATSU *et al.*, 2001; ITO *et al.*, 2001). Todas as amostras foram identificadas como *S. epidermidis* e apresentaram resistência a várias

classes de antimicrobianos, exceto a vancomicina e linezolida. A análise da CMI para oxacilina nessas amostras mostrou um valor mínimo de 64 μ g/mL. Esses resultados estão em concordância com aqueles observados para amostras ORSA tipo III, avaliadas em estudos anteriores (VIVONI *et al.*, 2006; AMORIM *et al.*, 2007).

Ao contrário do encontrado em hospitais norte-americanos, nos quais amostras ORSA carreando o SCC*mec* tipo II são prevalentes (MCDOUGAL *et al.*, 2003; KILIC *et al.*, 2006; FOWLER *et al.*, 2007) poucos estudos relatam o isolamento de amostras com esse tipo de cassete *mec* no Brasil. Um estudo, conduzido por De Miranda e colaboradores (2007), com 81 amostras isoladas de um hospital universitário do Rio de Janeiro em 2005, apontou a presença de apenas uma amostra carreando o SCC*mec* tipo II. Recentemente, um estudo de nosso grupo detectou 15% de amostras ORSA tipo II, causando infecções em pacientes de dois hospitais gerais do Rio de Janeiro (CABOCLO, 2008). Entre amostras de SCN, Mombach Pinheiro Machado e colaboradores (2007), mostraram apenas 3% de amostras SCC*mec* tipo II, em um hospital de Porto Alegre, RS. No presente estudo, foram observadas duas amostras de *S. epidermidis*, isoladas no IMMF, carreando o SCC*mec* tipo II. Estas apresentaram resistência a apenas cinco antimicrobianos, além dos beta-lactâmicos. É provável que esse tipo de amostra, esteja sendo introduzido nos hospitais brasileiros, assim como tem sido descrito para amostras ORSA (TRINDADE *et al.*, 2005).

Na Finlândia, Ibrahim e colaboradores (2009) determinaram o tipo de SCC*mec* em 61 amostras hospitalares de SCN isoladas de “swab” nasal, pela técnica desenvolvida por Oliveira e de Lencastre (2002) para *S. aureus*. Os autores observaram que 90% dessas amostras não foram tipáveis quanto ao cassete SCC*mec*. Em contrapartida, quando esses mesmos autores compararam com a técnica descrita por Kondo e colaboradores (2007), somente 38% das amostras não foram tipáveis, e as demais foram classificadas como SCC*mec* tipo IV (33%), tipo V (18%), tipo I (6%) e tipo II (5%). Em nosso estudo, nós utilizamos a técnica de Kondo e colaboradores (2007), e detectamos 40,8% de amostras não tipáveis, valor aproximado aquele encontrado por Ibrahim e colaboradores (2009). Essas amostras apresentaram-se tão resistentes quanto aquelas do tipo III, apesar da elevada variação na distribuição de CMI para oxacilina, (na faixa de 0,5 a \geq 256 μ g/mL). Essas características já haviam sido comentadas para esse tipo de amostra anteriormente (HANSSEN & SOLLID, 2007).

Em 28 (40%) das 69 amostras analisadas não foi possível determinar o tipo de SCC*mec*, pois estas apresentavam mais de um tipo de *ccr* ou ausência de classe *mec*.

Onze amostras, duas isoladas no HC-UFU e nove isoladas no IMMFM apresentaram apenas o gene *mecA*. Sete amostras apresentaram combinações de três *ccr* diferentes, enquanto quatro apresentaram combinações de dois *ccr* diferentes. Uma amostra apresentou um novo tipo de SCC*mec*, ainda sem nomenclatura (*ccr1* e classe *mec A*). Vale ressaltar que estudos anteriores, utilizando a técnica de tipagem do SCC*mec* empregado no presente estudo (KONDO *et al.*, 2007) também observaram ausência de *ccr*, de classe *mec*, presença de mais de um *ccr*, bem como a nova combinação ainda não nomeada (*ccr1* e classe *mecA*), em amostras de SCN resistentes à oxacilina (RUPPÉ *et al.*, 2008; IBRAHEM *et al.*, 2009).

Diferenças nas prevalências de diferentes tipos de SCC*mec* observadas entre os dois hospitais avaliados, tais como: ausência de amostras SCC*mec* tipo II no HC-UFU, prevalência do SCC*mec* tipo V (38%) nas amostras do HC-UFU e das não tipáveis (50%) no IMMFM, podem ser justificadas pelos diferentes períodos avaliados (2001-2002 e 2006-2008) e pela localização geográfica. Além disso, considera-se que os dados obtidos são, em geral, um reflexo da população estudada.

A técnica de PFGE, empregada para análise de genótipos microbianos, tem sido bastante utilizada para estudos epidemiológicos em geral, apesar de ser mais usada no estudo de surtos hospitalares (KREDIET *et al.*, 2004; MILISAVLJEVIV *et al.*, 2005; SAIDA *et al.*, 2006). A utilização de outras técnicas moleculares, como MLST, associadas ao PFGE tem mostrado que praticamente 70% das amostras de ORSA, isoladas de diversas localidades, pertencem a cinco genótipos epidêmicos principais, demonstrando serem estas linhagens de sucesso, pela capacidade de persistirem e disseminarem inter e intracontinentes (OLIVEIRA, TOMASZ & DE LENCASTRE, 2002). Entre os SCN, a caracterização molecular de amostras hospitalares de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* (SAIDA *et al.*, 2006; MILISAVLJEVIV *et al.*, 2005), através de PFGE, tem revelado considerável diversidade genética (LINA, 1992; BOGADO *et al.*, 2002; NUNES *et al.*, 2005), embora a presença de genótipos prevalentes entre amostras ORSE venha sendo observada, principalmente em UTINs (VILLARI *et al.*, 2000; RAIMUNDO *et al.*, 2002; KREDIET *et al.*, 2004; FOKA *et al.*, 2006),

No presente estudo, 67 amostras de SCN foram analisadas por PFGE para determinação dos genótipos prevalentes, entre elas todas as 43 amostras de *S. epidermidis* resistentes à oxacilina (ORSE) e as 18 amostras de *S. haemolyticus* resistentes à oxacilina (ORSH). Adicionalmente, também foram analisadas quatro

amostras de *S. epidermidis* sensíveis e duas de *S. hominis* (uma resistente e outra sensível), isoladas de secreção ocular no HC-UFU. As quatro amostras de *S. epidermidis* sensíveis à oxacilina apresentaram o mesmo perfil de fragmentação no PFGE e fenótipo de resistência induzida à clindamicina, porém não foram relacionadas com outras duas amostras de ORSE, também isoladas de secreção ocular. As amostras de *S. hominis*, isoladas de secreção ocular, também não apresentaram relação genotípica. A presença de quatro amostras de *S. epidermidis* com o mesmo genótipo, e isoladas no mesmo período (01/2001-11/2001) no HC-UFU, demonstra que houve um surto naquela UTIN, provavelmente envolvendo profissionais de saúde na transmissão dessas cepas. Surto em UTINs por *Staphylococcus* têm sido descritos na literatura, envolvendo tanto amostras de *S. aureus* (LIN *et al.*, 2007) quanto de SCN (SAIDA *et al.*, 2006; MILISAVLJEVIV *et al.*, 2005)

Após análise das 11 amostras de ORSE isoladas no HC-UFU, foram detectados três genótipos entre 10 delas, enquanto entre as sete amostras de ORSH, foram encontrados somente dois genótipos, indicando uma possível contaminação cruzada entre os pacientes. Observamos, inclusive, que os tipos de SCCmec foram coincidentes dentro do mesmo genótipo. Milisavljeviv e colaboradores (2005), ao analisarem 173 amostras de *S. epidermidis* isoladas de duas UTINs e das mãos da equipe de saúde nessas unidades (61 e 112 amostras, respectivamente), detectaram 57 genótipos. Contudo, os autores encontraram um genótipo comum entre as amostras isoladas de pacientes e de profissionais de saúde. Tabe e colaboradores (1998) identificaram um genótipo prevalente entre amostras multirresistentes de ORSH isoladas de pacientes e da equipe médica de UTIN no Japão, sugerindo que a equipe médica poderia ser responsável pela disseminação do mesmo no ambiente hospitalar.

Diversidade genômica maior foi observada entre as amostras de SCN isoladas no IMMFM, embora mais de 50% (18) das amostras ORSE tenham sido incluídas em cinco genótipos (E, F, G, H, I), entre os 18 identificados. Entre as amostras de ORSH, foram detectados cinco genótipos, porém 63% das amostras pertenciam somente a 2 genótipos (c e d). Esses achados indicam uma possível contaminação cruzada entre os pacientes, tanto em relação às amostras ORSE quanto em relação às ORSH. Nos EUA, Foka e colaboradores (2006) analisaram 132 amostras de SCN resistentes à oxacilina, isoladas de neonatos pré-termo e observaram a presença de um genótipo prevalente de *S. epidermidis* e outro de *S. haemolyticus*, sendo encontrado em 67% das amostras ORSE e 62,5% das ORSH. Nunes e colaboradores (2005), ao avaliarem a diversidade clonal de

69 amostras de ORSE e ORSH, isoladas de nove hospitais brasileiros, observaram 16 genótipos para ORSE, sendo que 52% das amostras pertenciam a apenas dois genótipos. As amostras ORSH foram divididas em 15 genótipos, mostrando uma maior diversidade genômica entre elas. Miragaia e colaboradores (2007) após classificar 217 amostras de *S. epidermidis* em 74 STs, concluíram que a alta diversidade genômica nesta espécie pode estar relacionada a necessidade em se adaptar a diferentes ambientes, já que seu “habitat” é amplo e o contato com outras amostras e outras espécies é freqüente, contribuindo para o aumento nas taxas de recombinação e aquisição de SCCmec.

Os resultados desse estudo demonstram, assim como já descrito para amostras de *S. aureus*, a existência de um grande número de amostras de SCN não multirresistentes, apresentando SCCmec dos tipos IV e V em infecções associadas à cuidados da saúde. Cabe lembrar que esses tipos de cassetes são encontrados em amostras comunitárias de *Staphylococcus*, mas estavam presentes em 43,5% de nossas amostras hospitalares resistentes à oxacilina, demonstrando uma alteração na epidemiologia de infecções por SCN. Outro aspecto relevante é que nas duas UTINs estudadas muitos pacientes apresentavam baixa idade gestacional e baixo peso ao nascer, tendo sido verificado que 63% dos neonatos apresentavam peso ao nascer < 2500g. Esses fatores de risco são importantes para aquisição de IRAS, o que pode comprometer o controle e a prevenção destas infecções, já que também foi evidenciada, em ambas as instituições, a disseminação de amostras com o mesmo genótipo. Portanto, avaliações continuadas de amostras de *Staphylococcus*, isoladas especialmente de neonatos, investigando aspectos moleculares da resistência à oxacilina e características genômicas são de relevância em nosso meio.

5 DISCUSSÃO

Os *Staphylococcus* são habitantes comuns da microbiota humana (BANNERMAN & PEACOCK, 2007) e, em decorrência deste fato, são responsáveis por cerca de metade das IRAS. Os SCN têm sido patógenos relevantes neste tipo de infecção, sendo, principalmente, responsáveis por aquelas infecções relacionadas a dispositivos médicos (ARNASON *et al.*, 2008; GARLAND *et al.*, 2008). Em UTINs, os SCN têm sido detectados em alta frequência em diferentes infecções, responsáveis por taxas que variam de 24% (CHAN *et al.*, 2007) a 44,8% (BABAZONO *et al.*, 2008). Sua presença tem sido relevante em bacteriemias neonatais, com taxas variando de 37% a 75% (SOHN *et al.*, 2001; COUTO *et al.*, 2007; GRAY *et al.*, 2007; MIREYA *et al.*, 2007; HIRA *et al.*, 2007). No Brasil, a presença desse patógeno em infecções neonatais têm variado de 34% a 51% (NAGATA, BRITO & MATSUO, 2002; COUTO *et al.*, 2007; TÁVORA *et al.*, 2008), sendo também frequentes em bacteriemias (69%) (VON DOLINGER DE BRITO *et al.*, 2007).

No presente estudo, foram avaliadas 84 amostras de SCN, isoladas de diferentes sítios de neonatos internados nas UTINs de dois hospitais brasileiros: (a) HC-UFU, uma instituição federal localizada em Uberlândia, MG, no período de janeiro/2001 a dezembro/2002, e (b) IMMFM, uma instituição municipal localizada no Rio de Janeiro, RJ, no período de junho/2007 a julho/2008. O sítio de isolamento mais frequente, em ambos os hospitais, foi o sangue (73,8%), seguido de secreção ocular (11,9%), confirmando os relatos anteriores que apresentam as infecções da corrente sanguínea como prevalentes em UTINs. Mireya e colaboradores (2007) também encontraram resultados semelhantes aos nossos, com a maioria das amostras de SCN sendo isoladas de sangue (73,3%) e de secreção ocular (16,6%) em UTINs.

Em nosso estudo, a identificação das amostras de SCN isoladas de neonatos foi realizada, inicialmente, utilizando-se um método bioquímico miniaturizado, e sua confirmação foi obtida por PCR espécie-específico, para amostras de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*. Apesar da já descrita subjetividade na leitura de testes colorimétricos, empregados na identificação de SCN (COUTO *et al.*, 2001), os resultados fenotípicos encontrados foram concordantes com os resultados moleculares, para as duas espécies investigadas. A atipia bioquímica é um dos problemas enfrentados por profissionais que trabalham com esse tipo de microrganismo (IORIO *et al.*, 2007). Em nosso estudo,

foram detectadas duas (4%) amostras de SCN, com perfis bioquímicos atípicos para a espécie *S. epidermidis*, e que foram relacionados ao teste da fosfatase. Iorio e colaboradores (2007) encontraram taxas elevadas (55,6%) de amostras de SCN com perfil bioquímico atípico, principalmente em amostras das espécies *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* e *S. hominis*. Contudo, os autores encontraram apenas 5 (2,5%) amostras atípicas para o teste da fosfatase, sendo duas da espécie *S. epidermidis*, resultado similar ao observado no presente estudo.

A espécie *S. epidermidis*, em geral, é a mais isolada em infecções por SCN, e a com maior potencial patogênico deste grupo (BANNERMAN & PEACOCK, 2007; ROGER *et al.*, 2009). Além disso, essa espécie é responsável por até 75% das infecções tardias neonatais estafilocócicas (MUSSI-PINHATA & NASCIMENTO, 2001; WEISMAN, 2004). Milisavjevic e colaboradores (2005) identificaram *S. epidermidis* como responsável por 30% das IRAS, em duas UTINs de um hospital norte americano. HIRA e colaboradores (2007) também detectaram a presença do *S. epidermidis* em 58% das infecções neonatais avaliadas. Em nosso estudo, as espécies prevalentes de SCN apresentaram taxas equivalentes, em ambos os hospitais avaliados, sendo *S. epidermidis* a espécie mais isolada, identificada em cerca de 60% das amostras, em cada uma das instituições avaliadas, dados estes concordantes com a literatura mencionada.

Devido à boa absorção oral, a clindamicina tem sido usada no tratamento de infecções de pele e tecidos moles causadas por *Staphylococcus* (NAVANEETH, 2006). Contudo, a resistência a esse fármaco tem sido mencionada. Segundo Ciraj e colaboradores (2009), a incidência de resistência à clindamicina induzida pela eritromicina, em amostras de *Staphylococcus*, varia de acordo com a localização geográfica. No presente estudo, observamos que houve esse tipo de variação, já que, no IMMFM, localizado no Rio de Janeiro, foram encontradas apenas 4 (7%) amostras com resistência induzida, enquanto no HC-UFU, localizado em Uberlândia, foram detectadas 12 (40%) amostras com esse perfil. Porém, é importante destacar que oito dessas amostras foram identificadas como *S. epidermidis*, das quais quatro foram geneticamente relacionadas.

Apesar de já ter sido descrita susceptibilidade reduzida aos glicopeptídeos, como a vancomicina (HIRAMATSU *et al.*, 1997; GARRET *et al.*, 1999; NUNES *et al.*, 2002), ou mesmo altas taxas de resistência, como no caso da teicoplanina (RAPONI *et al.*, 2005; HOPE *et al.*, 2008), entre amostras de SCN analisadas no presente estudo apresentaram-se sensíveis à vancomicina, enquanto uma taxa reduzida de resistência

(8%) foi observada para a teicoplanina. Esse tipo de resistência foi observado entre amostras de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, espécies de SCN que apresentam tendência a desenvolver resistência aos glicopeptídeos (NUNES *et al.*, 2006).

A principal resistência antimicrobiana detectada em *Staphylococcus* é à oxacilina, que vêm aumentando nas últimas décadas em decorrência do uso contínuo deste antimicrobiano (DIEKEMA *et al.*, 2003). Um estudo envolvendo vigilância de taxas antimicrobianas, realizado a partir de dados obtidos de cerca de 20 países europeus, tem demonstrado que, com exceção da tetraciclina, as taxas de resistência encontradas para *S. epidermidis*, são superiores às observadas para *S. aureus*, tanto para amostras de infecções comunitárias, quanto entre aquelas relacionadas a cuidados associados à saúde (FLUIT *et al.*, 2001). Um estudo desenvolvido por nosso grupo com amostras de *Staphylococcus* isoladas de bacteriemias, em um hospital terciário do Rio de Janeiro, durante 2001 e 2002, detectou 52% de amostras resistentes à oxacilina, sendo 26% de *S. aureus* e 81,6% de SCN (NUNES *et al.*, 2007). Dados semelhantes foram encontrados no presente estudo, no qual 82% das amostras de SCN foram resistentes a esse antimicrobiano, com destaque para as espécies *S. epidermidis* (84%) e *S. haemolyticus* (100%). Já as taxas de resistência à penicilina, eritromicina, gentamicina e sulfametoxazol/trimetoprima foram similares entre as duas espécies. Como já tem sido descrito, esses patógenos apresentam maior resistência e, entre os *Staphylococcus*, são as espécies que se destacam em relação a esta característica, principalmente a espécie *S. haemolyticus* (BIAVASCO *et al.*, 2000; RAPONI *et al.*, 2005; CASTRO *et al.*, 2006).

Quando comparado ao *S. aureus*, os SCN resistentes à oxacilina podem ser até seis vezes mais resistentes (DIEKEMA *et al.*, 2001; COUTO *et al.*, 2007). Em UTINs, a resistência em SCN pode atingir taxas elevadas, alcançando até 92% (VILARI *et al.*, 2000). Hira e colaboradores (2007) observaram taxas de resistência à oxacilina de 87% para amostras de SCN isoladas de neonatos, durante o ano de 2003. Szewczyk, Piotrowski & Różalska (2000) isolaram amostras de neonatos e ambiente, e observaram taxas de resistência de 79% e 83%, respectivamente. O estabelecimento de amostras de SCN resistentes à oxacilina no ambiente hospitalar tem se tornado preocupante uma vez que essas amostras, predominantemente envolvidas em IRAs, podem acumular resistência a outras classes de antimicrobianos, potencialmente transmissível ao *S. aureus* e a outros microrganismos (MIRAGAIA *et al.*, 2002).

A detecção da resistência à oxacilina é um aspecto extremamente importante, visto que a observação precoce e precisa desta resistência pode auxiliar no estabelecimento de uma antibioticoterapia correta no combate à infecção. Diversos trabalhos, comparando metodologias para a detecção fenotípica de resistência à oxacilina têm sido realizados. Grande parte deles aponta o disco de cefoxitina (NOWAK, *et al.*, 2006; JAIN, AGARWAL & VERMA, 2008) e/ou a triagem em ágar, contendo 4µg/mL de oxacilina (FERREIRA *et al.*, 2003) como as metodologias mais adequadas para detectar amostras de SCN que possuem o gene *mecA*. No presente estudo, foram utilizadas essas duas técnicas para detectar amostras resistentes à oxacilina, além da determinação da CMI e do teste de difusão com disco de oxacilina. Utilizando a técnica de PCR para detecção do gene *mecA* como técnica padrão, os testes mostraram 100% de concordância na análise das 84 amostras, incluindo cinco amostras de *S. epidermidis* heterorresistentes que apresentaram crescimento não confluyente em ágar triagem e valores baixos de CMI. Em nosso estudo, também foi observada uma alta correlação entre resistência a beta-lactâmicos e multirresistência antimicrobiana, como já tem sido relatado (GROHS, 2008).

Devido à pressão seletiva ocasionada pelo uso contínuo de diversos antimicrobianos, o SCC*mec*, cassete cromossômico no qual está inserido o gene *mecA*, foi agrupando cada vez mais determinantes de resistência a diversas classes de drogas (ITO *et al.*, 2001) Em decorrência, também foram surgindo ao longo dos anos, diferentes configurações de cassete, permitindo que o mesmo fosse classificado em diferentes tipos (ZHANG *et al.*, 2005, JANSEN *et al.*, 2006; OLIVEIRA, MILHEIRIÇO & DE LENCASTRE, 2006; DESCLOUX, ROSSANO & PERRETEN, 2008). Contudo, poucos são os relatos, na literatura, sobre a caracterização dos tipos de SCC*mec* em amostras de SCN (MOMBACH PINHEIRO MACHADO *et al.*, 2007; KONDO *et al.*, 2007; IBRAHEM *et al.*, 2009), contrastando com vários dados relacionados à amostras ORSA (ITO *et al.*, 2004; BOYLE-VAVRA *et al.*, 2005; GEROGIANNI *et al.*, 2006; OLIVEIRA, MILHEREIÇO & DE LENCASTRE, 2006).

Nosso estudo revelou a predominância de dois tipos de SCC*mec*, IV (15 amostras; 21,7%) e V (15; 21,7%), entre as 69 amostras de SCN resistentes à oxacilina. A grande maioria das amostras foi não tipável (40,8%). Entre as 15 amostras com SCC*mec* tipo IV analisadas, foram observadas taxas elevadas de susceptibilidade aos antimicrobianos em geral, incluindo rifampicina, sulfametoxazol/trimetoprima, ciprofloxacina, tetraciclina, mupirocina e teicoplanina. Esses resultados se assemelham

aqueles descritos para amostras ORSA, que carregam o SCCmec IV e tem se apresentado sensíveis à grande parte das classes de antimicrobianos disponíveis (KILIC *et al.*, 2006; MORONEY *et al.*, 2007). Essa susceptibilidade se justifica pelo tamanho reduzido do cassete *mec* IV, que agrega um menor número de determinantes de resistência (MA *et al.*, 2002).

Os poucos estudos que analisaram amostras de SCN em relação ao seu cassete de resistência relataram a predominância do SCCmec tipo IV, com taxas de até 41% (HANSEN & SOLLID, 2007; MIRAGAIA *et al.*, 2007; MOMBACH PINHEIRO MACHADO *et al.*, 2007; RUPPÉ *et al.*, 2008; IBRAHEM *et al.*, 2009). Em Paris, um estudo observou que dentre as 96 amostras de SCN, 28 (29%) apresentavam o SCCmec tipo IV, 25 (26%) o tipo V e 42 (43,7%) eram não tipáveis (RUPPÉ *et al.*, 2008). Esse mesmo trabalho mostrou que o complexo *ccr2* e o *mec* classe B, típico do SCCmec tipo IV, eram predominantes em *S. epidermidis*, enquanto o *ccrC* e *mec* classe C (SCCmec tipo V) foram detectados, principalmente, em *S. haemolyticus*, sugerindo que *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* sejam os principais reservatórios dos tipos IV e V, respectivamente. Nossos achados estão de acordo com os relatos anteriores, já que todas as amostras com SCCmec tipo IV foram da espécie *S. epidermidis*, enquanto 73,3% daquelas com tipo V eram *S. haemolyticus*.

Apesar de todas amostras de *S. haemolyticus* carreadoras de SCCmec tipo V terem sido resistentes à oxacilina, com valores intermediários de CMI (1 a 64 µg/mL), elas apresentaram altas taxas de susceptibilidade à ciprofloxacina, clindamicina, cloranfenicol, mupirocina, rifampicina e sulfametoxazol/trimetoprima. Assim como para amostras tipo IV, aquelas com SCCmec tipo V são consideradas de origem comunitária, e portanto com maior sensibilidade demonstrando que está havendo uma alteração na epidemiologia de infecções por SCN, que são essencialmente hospitalares (BANNERMAN e PEACOCK, 2007). Katayama, Ito e Hiramatsu (2001) encontraram o *mec* classe C, característico do SCCmec tipo V, em 31 das 38 amostras de *S. haemolyticus* analisadas. Uma justificativa para os níveis intermediários de CMI para oxacilina, encontrados no presente estudo, para essa espécie, pode estar associada com a deleção do *mecI* e *mecRI*, após a inserção do IS431L, formando a estrutura designada como *mec* classe C (KATAYAMA, ITO e HIRAMATSU, 2001).

Apenas 13% das amostras de SCN apresentaram o SCCmec tipo III, um cassete com múltiplos genes de resistência (HIRAMATSU *et al.*, 2001; ITO *et al.*, 2001). Todas as amostras foram identificadas como *S. epidermidis* e apresentaram resistência a várias

classes de antimicrobianos, exceto a vancomicina e linezolida. A análise da CMI para oxacilina nessas amostras mostrou um valor mínimo de 64 μ g/mL. Esses resultados estão em concordância com aqueles observados para amostras ORSA tipo III, avaliadas em estudos anteriores (VIVONI *et al.*, 2006; AMORIM *et al.*, 2007).

Ao contrário do encontrado em hospitais norte-americanos, nos quais amostras ORSA carreando o SCC*mec* tipo II são prevalentes (MCDOUGAL *et al.*, 2003; KILIC *et al.*, 2006; FOWLER *et al.*, 2007) poucos estudos relatam o isolamento de amostras com esse tipo de cassete *mec* no Brasil. Um estudo, conduzido por De Miranda e colaboradores (2007), com 81 amostras isoladas de um hospital universitário do Rio de Janeiro em 2005, apontou a presença de apenas uma amostra carreando o SCC*mec* tipo II. Recentemente, um estudo de nosso grupo detectou 15% de amostras ORSA tipo II, causando infecções em pacientes de dois hospitais gerais do Rio de Janeiro (CABOCLO, 2008). Entre amostras de SCN, Mombach Pinheiro Machado e colaboradores (2007), mostraram apenas 3% de amostras SCC*mec* tipo II, em um hospital de Porto Alegre, RS. No presente estudo, foram observadas duas amostras de *S. epidermidis*, isoladas no IMFM, carreando o SCC*mec* tipo II. Estas apresentaram resistência a apenas cinco antimicrobianos, além dos beta-lactâmicos. É provável que esse tipo de amostra, esteja sendo introduzido nos hospitais brasileiros, assim como tem sido descrito para amostras ORSA (TRINDADE *et al.*, 2005).

Na Finlândia, Ibrahim e colaboradores (2009) determinaram o tipo de SCC*mec* em 61 amostras hospitalares de SCN isoladas de “swab” nasal, pela técnica desenvolvida por Oliveira e de Lencastre (2002) para *S. aureus*. Os autores observaram que 90% dessas amostras não foram tipáveis quanto ao cassete SCC*mec*. Em contrapartida, quando esses mesmos autores compararam com a técnica descrita por Kondo e colaboradores (2007), somente 38% das amostras não foram tipáveis, e as demais foram classificadas como SCC*mec* tipo IV (33%), tipo V (18%), tipo I (6%) e tipo II (5%). Em nosso estudo, nós utilizamos a técnica de Kondo e colaboradores (2007), e detectamos 40,8% de amostras não tipáveis, valor aproximado aquele encontrado por Ibrahim e colaboradores (2009). Essas amostras apresentaram-se tão resistentes quanto aquelas do tipo III, apesar da elevada variação na distribuição de CMI para oxacilina, (na faixa de 0,5 a \geq 256 μ g/mL). Essas características já haviam sido comentadas para esse tipo de amostra anteriormente (HANSSEN & SOLLID, 2007).

Em 28 (40%) das 69 amostras analisadas não foi possível determinar o tipo de SCC*mec*, pois estas apresentavam mais de um tipo de *ccr* ou ausência de classe *mec*.

Onze amostras, duas isoladas no HC-UFU e nove isoladas no IMMFM apresentaram apenas o gene *mecA*. Sete amostras apresentaram combinações de três *ccr* diferentes, enquanto quatro apresentaram combinações de dois *ccr* diferentes. Uma amostra apresentou um novo tipo de SCC*mec*, ainda sem nomenclatura (*ccr1* e classe *mecA*). Vale ressaltar que estudos anteriores, utilizando a técnica de tipagem do SCC*mec* empregado no presente estudo (KONDO *et al.*, 2007) também observaram ausência de *ccr*, de classe *mec*, presença de mais de um *ccr*, bem como a nova combinação ainda não nomeada (*ccr1* e classe *mecA*), em amostras de SCN resistentes à oxacilina (RUPPÉ *et al.*, 2008; IBRAHEM *et al.*, 2009).

Diferenças nas prevalências de diferentes tipos de SCC*mec* observadas entre os dois hospitais avaliados, tais como: ausência de amostras SCC*mec* tipo II no HC-UFU, prevalência do SCC*mec* tipo V (38%) nas amostras do HC-UFU e das não tipáveis (50%) no IMMFM, podem ser justificadas pelos diferentes períodos avaliados (2001-2002 e 2006-2008) e pela localização geográfica. Além disso, considera-se que os dados obtidos são, em geral, um reflexo da população estudada.

A técnica de PFGE, empregada para análise de genótipos microbianos, tem sido bastante utilizada para estudos epidemiológicos em geral, apesar de ser mais usada no estudo de surtos hospitalares (KREDIET *et al.*, 2004; MILISAVLJEVIV *et al.*, 2005; SAIDA *et al.*, 2006). A utilização de outras técnicas moleculares, como MLST, associadas ao PFGE tem mostrado que praticamente 70% das amostras de ORSA, isoladas de diversas localidades, pertencem a cinco genótipos epidêmicos principais, demonstrando serem estas linhagens de sucesso, pela capacidade de persistirem e disseminarem inter e intracontinentes (OLIVEIRA, TOMASZ & DE LENCASTRE, 2002). Entre os SCN, a caracterização molecular de amostras hospitalares de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* (SAIDA *et al.*, 2006; MILISAVLJEVIV *et al.*, 2005), através de PFGE, tem revelado considerável diversidade genética (LINA, 1992; BOGADO *et al.*, 2002; NUNES *et al.*, 2005), embora a presença de genótipos prevalentes entre amostras ORSE venha sendo observada, principalmente em UTINs (VILLARI *et al.*, 2000; RAIMUNDO *et al.*, 2002; KREDIET *et al.*, 2004; FOKA *et al.*, 2006),

No presente estudo, 67 amostras de SCN foram analisadas por PFGE para determinação dos genótipos prevalentes, entre elas todas as 43 amostras de *S. epidermidis* resistentes à oxacilina (ORSE) e as 18 amostras de *S. haemolyticus* resistentes à oxacilina (ORSH). Adicionalmente, também foram analisadas quatro

amostras de *S. epidermidis* sensíveis e duas de *S. hominis* (uma resistente e outra sensível), isoladas de secreção ocular no HC-UFU. As quatro amostras de *S. epidermidis* sensíveis à oxacilina apresentaram o mesmo perfil de fragmentação no PFGE e fenótipo de resistência induzida à clindamicina, porém não foram relacionadas com outras duas amostras de ORSE, também isoladas de secreção ocular. As amostras de *S. hominis*, isoladas de secreção ocular, também não apresentaram relação genotípica. A presença de quatro amostras de *S. epidermidis* com o mesmo genótipo, e isoladas no mesmo período (01/2001-11/2001) no HC-UFU, demonstra que houve um surto naquela UTIN, provavelmente envolvendo profissionais de saúde na transmissão dessas cepas. Surto em UTINs por *Staphylococcus* têm sido descritos na literatura, envolvendo tanto amostras de *S. aureus* (LIN *et al.*, 2007) quanto de SCN (SAIDA *et al.*, 2006; MILISAVLJEVIV *et al.*, 2005)

Após análise das 11 amostras de ORSE isoladas no HC-UFU, foram detectados três genótipos entre 10 delas, enquanto entre as sete amostras de ORSH, foram encontrados somente dois genótipos, indicando uma possível contaminação cruzada entre os pacientes. Observamos, inclusive, que os tipos de SCCmec foram coincidentes dentro do mesmo genótipo. Milisavljeviv e colaboradores (2005), ao analisarem 173 amostras de *S. epidermidis* isoladas de duas UTINs e das mãos da equipe de saúde nessas unidades (61 e 112 amostras, respectivamente), detectaram 57 genótipos. Contudo, os autores encontraram um genótipo comum entre as amostras isoladas de pacientes e de profissionais de saúde. Tabe e colaboradores (1998) identificaram um genótipo prevalente entre amostras multirresistentes de ORSH isoladas de pacientes e da equipe médica de UTIN no Japão, sugerindo que a equipe médica poderia ser responsável pela disseminação do mesmo no ambiente hospitalar.

Diversidade genômica maior foi observada entre as amostras de SCN isoladas no IMMFM, embora mais de 50% (18) das amostras ORSE tenham sido incluídas em cinco genótipos (E, F, G, H, I), entre os 18 identificados. Entre as amostras de ORSH, foram detectados cinco genótipos, porém 63% das amostras pertenciam somente a 2 genótipos (c e d). Esses achados indicam uma possível contaminação cruzada entre os pacientes, tanto em relação às amostras ORSE quanto em relação às ORSH. Nos EUA, Foka e colaboradores (2006) analisaram 132 amostras de SCN resistentes à oxacilina, isoladas de neonatos pré-termo e observaram a presença de um genótipo prevalente de *S. epidermidis* e outro de *S. haemolyticus*, sendo encontrado em 67% das amostras ORSE e 62,5% das ORSH. Nunes e colaboradores (2005), ao avaliarem a diversidade clonal de

69 amostras de ORSE e ORSH, isoladas de nove hospitais brasileiros, observaram 16 genótipos para ORSE, sendo que 52% das amostras pertenciam a apenas dois genótipos. As amostras ORSH foram divididas em 15 genótipos, mostrando uma maior diversidade genômica entre elas. Miragaia e colaboradores (2007) após classificar 217 amostras de *S. epidermidis* em 74 STs, concluíram que a alta diversidade genômica nesta espécie pode estar relacionada a necessidade em se adaptar a diferentes ambientes, já que seu “habitat” é amplo e o contato com outras amostras e outras espécies é freqüente, contribuindo para o aumento nas taxas de recombinação e aquisição de SCCmec.

Os resultados desse estudo demonstram, assim como já descrito para amostras de *S. aureus*, a existência de um grande número de amostras de SCN não multirresistentes, apresentando SCCmec dos tipos IV e V em infecções associadas à cuidados da saúde. Cabe lembrar que esses tipos de cassetes são encontrados em amostras comunitárias de *Staphylococcus*, mas estavam presentes em 43,5% de nossas amostras hospitalares resistentes à oxacilina, demonstrando uma alteração na epidemiologia de infecções por SCN. Outro aspecto relevante é que nas duas UTINs estudadas muitos pacientes apresentavam baixa idade gestacional e baixo peso ao nascer, tendo sido verificado que 63% dos neonatos apresentavam peso ao nascer < 2500g. Esses fatores de risco são importantes para aquisição de IRAS, o que pode comprometer o controle e a prevenção destas infecções, já que também foi evidenciada, em ambas as instituições, a disseminação de amostras com o mesmo genótipo. Portanto, avaliações continuadas de amostras de *Staphylococcus*, isoladas especialmente de neonatos, investigando aspectos moleculares da resistência à oxacilina e características genômicas são de relevância em nosso meio.

6 CONCLUSÕES

- Dentre 84 amostras de SCN isoladas de neonatos, nos dois hospitais avaliados, HC-UFU (2001- 2002) e IMMFM (2007-2008), oito espécies diferentes foram identificadas, sendo *S. epidermidis* (61%) e *S. haemolyticus* (21%), as espécies prevalentes, isoladas principalmente de sangue.

- Todos os testes utilizados para detecção de resistência à oxacilina foram concordantes com a presença do gene *mecA*, que foi detectado em 82% das amostras de SCN isoladas. Doze (40%) amostras isoladas no HC-UFU e quatro (7,4%) isoladas no IMMFM apresentaram resistência à clindamicina induzida por eritromicina (Teste D+).
- A tipagem do SCC*mec* mostrou que pode estar ocorrendo uma mudança no perfil de resistência em amostras hospitalares de SCN, uma vez que 43,5%, apresentaram os tipos IV e V, cassetes característicos de amostras comunitárias, apesar de grande parte das amostras (40,6%) ser não tipável.
- No HC-UFU, entre as amostras de *S. epidermidis* resistentes à oxacilina, foram detectados apenas três genótipos prevalentes, enquanto as amostras de *S. haemolyticus* foram incluídas em dois genótipos. Adicionalmente, todas as amostras do mesmo genótipo, em ambos os casos, apresentaram o mesmo SCC*mec* e valores similares de CMI, confirmando a caracterização das amostras e sua transmissão cruzada na UTIN do hospital.
- No IMMFM foi observada grande diversidade genômica entre as 54 amostras de SCN. Para as 32 amostras de *S. epidermidis* resistentes foram observados 18 genótipos, embora mais de 50% delas pertencesse a apenas cinco genótipos (E, F, G, H, I). Entre as amostras de *S. haemolyticus*, 63% foi incluído em dois genótipos (c e d). Amostras do mesmo genótipo, em ambos os casos, também apresentaram o mesmo tipo de SCC*mec* e valores similares de CMI, também configurando transmissão cruzada nessa UTIN.
- Baixo peso (< 2500g) considerado como um dos principais fatores de risco em neonatos foi observado em 65% dos pacientes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Neonatologia: Critérios nacionais de infecção relacionadas à assistência à saúde**. Outubro de 2008

AMORIM, M.L., FARIA, N.A., OLIVEIRA, D.C., VASCONCELOS, C., CABEDA, J.C., MENDES, A.C., CALADO, E., CASTRO, A.P., RAMOS, M.H., AMORIM, J.M., DE LENCASTRE, H. 2007. Changes in the clonal nature and antibiotic resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with spread of the EMRSA-15 clone in a tertiary care Portuguese hospital. *J. Clin. Microbiol.* 45: 2881-2888.

- ARCHER, G.L. *Staphylococcus epidermidis and other coagulase-negative staphylococci*. In: Principles and practice of infectious diseases. Edited by Mandall, G.L., Bennet, J. E., Dolin, R., Churchill Livingstone, New York, 2000.
- ARNASON, S.; THORS, V.S.; GUDNASON, T.; KRISTINSSON, K.G. & HARALDSSON, A. **Bacteraemia in children in Iceland 1994-2005**. Laeknabladid, 94(8), 523-9, 2008.
- BABAZONO, A.; KITAJIMA, H.; NISHIMAKI, S.; NAKAMURA, T.; SHIGA, S.; HAYAKAWA, M.; TANAKA, T.; SATO, K.; NAKAYAMA, H.; IBARA, S.; UNE, H. & DOI, H. **Risk factors for nosocomial infection in the neonatal intensive care unit by the Japanese Nosocomial Infection Surveillance (JANIS)**. Acta Med Okayama. 62(4), 261-8, 2008.
- BALDAN, R.; CAVALLERIO, P.; PARLATO, C.; ROCCHETTI, A.; LOMOLINO, G.; VELLINI, S.; PESCE, F.; CIRILLO, D.M. & FOSSATI, L. **Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* SCCmec type IV: nosocomial transmission and colonisation of healthcare workers in a neonatal intensive care unit**. J Hosp Infect., 69(3), 304-6, 2008.
- BALTIMORE, R.S. **Neonatal nosocomial infections**. Semin Perinatol., 22, 25-32, 1998.
- BAKER, J.S.; HACKETT, M.F. & SIMARD, D.J. **Variations in bacitracin susceptibility observed in *Staphylococcus* and *Micrococcus* species**. J. Clin. Microbiol., 23(5), 963-964, 1986.
- BANG, A.T.; BANG, R.A.; STOLL, B.J.; BAITULE, S.B.; REDDY, H.M. & DESHMUKH, M.D. **Is home-based diagnosis and treatment of neonatal sepsis feasible and effective? Seven years of intervention in the gadchiroli field trial (1996 to 2003)**. J. Perinatol., 25, S62-S71, 2005.
- BANNERMAN, T.L. & PEACOCK, S.J. ***Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grown aerobically**. In: *Manual of Clinical Microbiology*, 384-404, Edited by Murray, P.R.; Barron, E.J.; Tenover, F.C. & Tenover, R.H. (eds), 8th ed, ASM Press. Washington, DC., 2007.
- BARTON, L., HODGMAN, J.E. & PAVLOVA, Z. **Causes of death in the extremely low birth weight infant**. Pediatrics. 193, 446-451, 1999.
- BEARMAN, G.M. & WENZEL, R.P. **Bacteremias: a leading cause of death**. Arch. Med. Res., 36(6), 646-59, 2005.
- BERGLUND C, SÖDERQUIST B. **The origin of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate at a neonatal ward in Sweden-possible horizontal transfer of a staphylococcal cassette chromosome mec between methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus aureus***. Clin Microbiol Infect. 14(11):1048-56, 2008.
- BIAVASCO, F., VIGNAROLI, C., LAZZARINI, R., VARALDO, P., E. **Glycopeptide susceptibility profiles of *Staphylococcus haemolyticus* bloodstream isolates**. Antimicrob Agents Chemother. 44(11):3122-6, 2000.
- BIZARRO, M.J. & GALLAGHER, G. **Antibiotic-Resistant Organisms in the Neonatal Intensive Care Unit**. Semin Perinatol. 31, 26-32, 2007.
- BIZARRO, M.J.; RASKIND, C.; BALTIMORE, R.S.; GALLAGHER, P.G. **Seventy-five years of neonatal sepsis at Yale: 1928-2003**. Pediatrics. 116(3), 595-602, 2005.
- BOGADO, I.; LIMANSKY, A.; SUTICH, E.; MARCHIARO, P.; MARZI, M.; PUTERO, J. & VIALE, A. **Molecular characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from a neonatal intensive care unit**. Infect Control Hosp Epidemiol., 23, 447-51, 2002.
- BOYLE-VAVRA, S., ERESHEFSKY, B., WANG, C.C., DAUM, R.S. 2005. **Successful multiresistant community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage from Taipei, Taiwan, that carries either the novel Staphylococcal chromosome cassette mec (SCCmec) type VT or SCCmec type IV**. J. Clin. Microbiol. 43: 4719-4730, 2005.

CABOBLO, R. *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina isolados de hospitais do Rio de Janeiro: aspectos fenotípicos e moleculares da resistência e correlação com virulências e genótipos. *Mestrado (Microbiologia)*. Universidade Federal do Rio de Janeiro.100p.2008.

CASEY, A.L.; LAMBERT, P. A & ELLIOT, T.S.J. *Staphylococci*. *Intern J Antimicrobial Agents.*, 3, S23-S32, 2007.

CASTRO, E.C.M. & LEITE, A.J.M. **Hospital mortality rates of infants with birth weight less than or equal to 1,500g in the northeast of Brazil.** *J. Pediatr.*, 83(1), 27-32, 2007.

CASTRO, N.; LOAIZA-LOEZA, M.S.; CALDERÓN-NAVARRO, A.; SÁNCHEZ, A. & SILVA-SÁNCHEZ, J. **Molecular study of methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* in a Mexican hospital.** *Rev. Invest. Clin.*, 58(6), 580-5, 2006.

CELEBI, S; HACIMUSTAFAOGLU, M.; OZDEMIR, O. & OZAKIN, C. **Nosocomial Gram-positive bacterial infections in children: results of a 7 year study.** *Pediatr Int.*, 49(6),875-82, 2007.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC, 2008). Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/healthDis.html>>, Capturado em: 09/12/2008.

CENTER, K.J.; REBOLI, A.C.; HUBLER, R.; RODGERS, G.L. & LONG, S.S. **Decrease vancomycin susceptibility of coagulase-negative staphylococci in neonatal intensive care unit: Evidence of spread of *Staphylococcus warneri*.** *J. Clin. Microbiol.*, 14 (10), 4660-4665, 2003.

CHAN, P.C.; HUANG, L.M.; LIN, H.C.; CHANG, L.Y.; CHEN, M.L.; LU, C.Y.; LEE, P.I; CHEN, J.M.; LEE, C.Y.; PAN, H.J.; WANG, J.T.; CHANG, S.C.; CHEN, Y.C.; **Control of an outbreak of pandrugresistant *Acinetobacter baumannii* colonization and infection in a neonatal intensive care unit.** *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007; 28:423–29.

CHAVES, F.; GARCÍA-ÁLVAREZ M.; SANZ, F.; ALBA, C. & OTERO J.R. **Nosocomial spread of a *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* strain causing sepsis in a neonatal intensive care unit.** *J. Clin. Microbiol.* 43,4877- 79, 2005.

CHEN, Y.Y., CHOU, Y.C. & CHOU, P. **Impact of nosocomial infection on cost of illness and length of stay in intensive care units.** *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, 26(3), 281-87, 2005.

CIMOLAI, N. ***Staphylococcus aureus* outbreaks among newborns: new frontiers in an old dilemma.** *Am J Perinatol* 20, 125-136, 2003.

CIRAJ, A.M.; VINOD, P.; SREEJITH, G. & RAJANI, K.. **Inducible clindamycin resistance among clinical isolates of *staphylococci*.** *Indian J Pathol Microbiol.* 52(1), 49-51, 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing.** Approved standards: M100-S16. Wayne, Pennsylvania, USA, 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing.** Approved standards: M100-S16. Wayne, Pennsylvania, USA, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI. **Methodes for dilution antimicrobial susceptibility testes for bacteria that grow aerobically.** Approved standards: M7-A7. Wayne, Pennsylvania, USA, 2006b.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Approved standards: M2-A9.** Wayne, Pennsylvania, USA, 2006a.

CONE, L. A; SONTZ, E. M.; WILSON, J. W. & MITRUKA, S. N. ***Staphylococcus capitis* endocarditis due to a transvenous endocardial pacemaker infection: Case report and review of *Staphylococcus***

capitis endocarditis. J Infect, Dis. 9, 335-339, 2005.

COUTO, R.C.; CARVALHO, E.A.; PEDROSA, T.M.; PEDROSO, E.R.; NETO, M.C. & BISCIONE, F.M. **A 10-year prospective surveillance of nosocomial infections in neonatal intensive care units**. Am J Infect Control. 35(3),183-9,2007.

COUTO, I.; PEREIRA, S.; MIRAGAIA, M.; SANCHES, I.S. & DE LENCASTRE, H. **Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by internal transcribed spacer PCR**. J. Clin. Microbiol., 39(9), 3099-103, 2001.

CUNHA, M.L.; RUGOLO, L.M. & LOPES, C.A. **Study of virulence factors in coagulase-negative staphylococci isolated from newborns**. Mem Inst Oswaldo Cruz.101(6),661-8, 2006.

DE MIRANDA, O.P., SILVA-CARVALHO, M.C., RIBEIRO, A., PORTELA, F., CORDEIRO, R.P., CAETANO, N., VIDAL, C.F., FIGUEIREDO, A.M.S. 2007. **Emergence in Brazil of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCCmec IV that are related genetically to the USA800 clone**. Clin Microbiol Infect. 13: 1165-1172, 2007.

DERESINSKI, S. **Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: An evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey**. Clin. Infect. Dis. 40, 562–73, 2005.

DESCLOUX, S.; ROSSANO, A. & PERRETEN, V. **Characterization of new staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) and topoisomerase genes in fluoroquinolone- and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius***. J. Clin. Microbiol., 46(5), 1818-23, 2008.

DIEKEMA, D.J.; PFALLER, M.A.; JONES, R.N.; DOEM, G.V.; KUGLER, K.C.; BEACH, M.L.; SADER, H.S. & SENTRY GROUP. **Trends in antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infections in the USA, Canada and Latin America**. I.J. Antimicrobial. Agents., 13, 257-71, 2000.

DIEKEMA, D.J.; PFALLER, M.A.; SCMITZ, F.J.; SMAYEVSKY, J.; BELL, J.; JONES, R.N.; BEACH, M. & SENTRY GROUP. **Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific Region for the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997-1999**. Clin. Infect. Dis. 32(2), S114-132, 2001.

DIEKEMA, D.J, PFALLER, M.A., JONES, R.N. & SENTRY participants Groups. **Age related trends in pathogen frequency and antimicrobial susceptibility of bloodstream isolates in North America: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program 1997-2000**. Int. J. Antimicrob Agents. 20,412-418, 2002.

DIEKEMA, D.J.; BEEKMANN, S.E.; CHAPIN, K.C.; MOREL, K.A.; MUNSON, E. & DOERN, G.V. **Epidemiology and outcome of nosocomial and community-onset bloodstream infection**. J Clin Microbiol. 41(8), 3655-60, 2003.

EDWARDS, J.R.; PETERSON, K.D.; ANDRUS, M.L.; DUDECK, M.A.; POLLOCK, D.A. & HORAN, T.C. **National Healthcare Safety Network Facilities. National Healthcare Safety Network (NHSN) Report, data summary for 2006 through 2007, issued November 2008**. Am J Infect Control. 36(9), 609-26, 2008.

EFIRD, M.M.; ROJAS, M.A.; LOZANO, J.M.; BOSE, C.L.; ROJAS, M.X.; RONDÓN, M.A.; RUIZ, G.; PIÑEROS, J.G.; ROJAS, C.; ROBAYO, G.; HOYOS, A.; GOSENDI, M.E.; CRUZ, H. & LEON, A. **Epidemiology of nosocomial infections in selected neonatal intensive care units in Colombia, South America**. J Perinatol. 25(8),531-6, 2005.

ENDTZ, H.P.; BRAAK, N.; VERBRUGH, H.A. & BELKUM, A. **Vancomycin resistance: status quo and quo vadis**. Eur J periatr., 156, 423-427, 1999.

EUZÈBY, J.P. **List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature-Genus *Staphylococcus***. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/cv.html>. 2008.

EVANS, N.J. & RUTTER, N. **Development of the *S. epidermis* in the newborn**. Biol. Neonates. 49, 74-80, 1986.

FERREIRA, R.B.R.; IORIO, N.L.P.; MALVAR, K.L.; NUNES, A.P.F.; FONSECA, L.S.; BASTOS, M.C.F. & SANTOS, K.R.N. **Coagulase-negative staphylococci: comparison of phenotypic and genotype oxacillin susceptibility tests and evaluation of the agar screening tests by using different concentrations of oxacillin**. J. Clin. Microbiol., 41(3), 3609-14, 2003.

FLUIT, A.C., JONES, M.E., SCHMITZ, F.J., ACAR, J., GUPTA, R., VERHOEF, J. **Antimicrobial susceptibility and frequency of occurrence of clinical blood isolates in Europe from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997 and 1998**. Clin. Infect. Dis. 30: 454-460, 2000.

FOKA, A., CHINI, V., PETINAKI, E., KOLONITSIOU, F., ANASTASSIOU, E.D., DIMITRACOPOULOS, G., SPILIOPOULOU, I. **Clonality of slime-producing methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci disseminated in the neonatal intensive care unit of a university hospital**. Clin Microbiol Infect;12(12):1230-3, 2006.

FOSTER, T.J. 2005. **Immune Evasion by Staphylococci**. Microbiology. 3: 948-958.

FOWLERS, G.J.R.; NELSON, C.L.; MCINTYRE, L.M.; KREISWIRTH, B.N.; ARCHER, G.L.; FEDERSPIEL, J.; NAIDICH, S.; REMORTEL, B.; RODE, T.; BROWN, P.; RELLER, L.B.; COREY, G.R. & GILL, S.R. **Potential associations between hematogenous complications and bacterial genotype in *Staphylococcus aureus* infection**. J. Infect. Dis., (5), 738-747, 2007.

FRANK, K.L.; POZO, J.L. & PATEL, R. **From clinical microbiology to infection pathogenesis: How daring to be different works for *Staphylococcus lugdunensis***. Clin. Microbiol., 21 (1), 111-133, 2008.

FRENEY, J. Y. ; BRUN, M. ; BES, H. ; MEUGNIER, F. ; GRIMONT, P. A. D. ; GRIMONT, C. ; NERVI & FLEURETTE, J. ***Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., two species from human clinical specimens**. Int J. Syst. Bacteriol., 38, 168-172, 1988.

FUCHS, P.C.; JONES, R.N. & BARRY, A.L. **Interpretive criteria for disk diffusion susceptibility testing of mupirocin, a topical antibiotic**. J. Clin. Microbiol., 28(3), 608-609, 1990.

GARCIA, P.; BENITEZ, R.; LAM, M.; SALINAS, A.M.; WIRTH, H.; ESPINOZA, C.; GARAY, T.; DEPIX, M.S.; LABARCA, J. & GUZMAN, A.M. **Coagulase-negative staphylococci: clinical, microbiological and molecular features to predict true bacteraemia**. J. Med. Microbiol. 53,67-72, 2004.

GARCÍA-MARTÍN, M.; LAEDELLI-CLARET, P.; JIMÉNZ-MOLEÓN, J.J.; BUENO-CAVANILLAS, A.; LUNA-DEL-CASTILLO, J.D. & GÁLVEZ-VARGAS, R. **Proportion of hospital of deaths potentially attributable to nosocomial infection**. Infect. Control. Hosp. Epidemiol., 22(11) 213-216, 2001.

GARLAND, J.S.; ALEX, C.P.; SEVALLIUS, J.M.; MURPHY, D.M.; GOOD, M.J.; VOLBERDING, A.M.; HOFER, L.L.; GORDON, B.J. & MAKI, D.G. **Cohort study of the pathogenesis and molecular epidemiology of catheter-related bloodstream infection in neonates with peripherally inserted central venous catheters**. Infect. Control. Hosp. Epidemiol., 29(3), 243-9, 2008.

GAYNES, R.P.; EDWARDS, J.R.; JARVIS, W.R.; CULVER, D.H. & TOLSON, J.S. **Nosocomial infections among neonates in high-risk nurseries in the United States**. Pediatrics., (98) 357-61, 1996.

GEROGIANNI, I., MPATAVANIS, G., GOURGOULIANIS, K., MANIATIS, A., IRIS SPILIOPOULOU, I., PETINAKI, E. **Combination of staphylococcal chromosome cassette SCCmec type V and Pantón-Valentine leukocidin genes in a methicillin resistant *Staphylococcus aureus* that caused necrotizing pneumonia in Greece**. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 56: 213-216, 2006.

- GOLDMANN, D.A. **Coagulase-negative *staphylococci*: interplay of epidemiology and bench research.** Am. J. Infect. Control., 8(3), 211-221, 1990.
- GÖTZ, F. ***Staphylococcus* and biofilms.** Mol Microbiol. 43, 1367-1378, 2002.
- GRAF, B.M. & MARTIN, E. **The intensive care physician and control of antimicrobial resistance.** Int J Antimicrob Agents. 16(4), 511-4, 2000.
- GRAY, J.W. **Surveillance of infection in neonatal intensive care units.** Early Hum Dev., 83(3), 157-63, 2007.
- GROHS, P. **Trends in *Staphylococcus aureus* antimicrobials susceptibilities: Is methicillin still a relevant multiresistance marker?** Pathol. Biol. (Paris), 1, Jun 27, 2008.
- HANSEN, A.M., KJELDSEN, G. & SOLLID, J.U.E. **Local variants of staphylococcal cassette chromosome *mec* in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci: Evidence of horizontal gene transfer?** Antimicrob. Agents Chemother., 48(1), 285-296, 2004.
- HEALY, C.M. & BAKER, C.J. **Maternal immunization.** Pediatr. Infect. Dis. J., 26 (10), 945-947, 2007.
- HIRA, V.; SLUIJTER, M.; ESTEVÃO, S.; HORST-KREFT, D.; OTT, A.; DE GROOT, R.; HERMANS, P.W. & KORNELISSE, R.F. **Clinical and molecular epidemiologic characteristics of coagulase-negative staphylococcal bloodstream infections in intensive care neonates.** Pediatr Infect Dis J. 26(7), 607-12, 2007.
- HIRAMATSU, K.; CUI, L.; KURODA, M. & ITO, T. **The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus*.** Trends Microbiol., 9(10), 486-493, 2001.
- HIRAMATSU, K.; HANAKI, H.; INO, T.; YABUTA, K.; OGURI, T. & TENOVER, F.C. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility.** J. Antimicrob. Chemother. 40, 135-136, 1997.
- HOLMES, R.L. & JORGENSEN, H. **Inhibitory activities of 11 antimicrobial agents and bactericidal activities of vancomycin and daptomycin against invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates obtained from 1999 through 2006.** Antimicrob Agents Chemother. 52(2), 757-60, 2008.
- HOLTFRETER, S.; GRUMANN, D.; SCHMUDDE, M.; NGUYEN, H.T.T.; EICHLER, P.; STROMMINGER, B.; KOPRON, K.; KOLATA, J.; GIEDRUS-KALEMBA, S.; STEINMETZ, I.; WITTE, W. & BRÖKER, B.M. **Clonal Distribution of Superantigen genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates.** J Clin Microbiol., 45(8), 2669-2680, 2007.
- HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T. & WILLIAMS, S.T. **Gram-positive cocci.** In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 532-558. 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 1994.
- HORBAR, J.D. **The Vermont Oxford Network Evidence: based quality improvement for neonatology.** Pediatrics., 103, 350-359, 1999.
- HUDOME, S.M. & FISHER, M.C. **Nosocomial infections in the neonatal intensive care.** Curr. Op. infect. Dis. 14,307-307, 2001.
- IBRAHEM, S.; SALMENLINNA, S.; LYYTIKÄINEN, O.; VAARA, M. & VUOPIO-VARKILA, J. **Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strains from bacteraemic patients.** Clin Microbiol Infect., 14(11), 1020-7, 2008.
- IBRAHEM, S.; SALMENLINNA, S.; VIROLAINEN, A.; KERTTULA, A.M.; INEN, O. L.; JÄGERROOS, H. ; BROAS, M. & VUOPIO-VARKILA, J. **Carriage of Methicillin-Resistant Staphylococci and Their SCC*mec* Types in a Long-Term-Care Facility.** J Clin Microbiol., 46(1), 32-37, 2009.

ING, H.B.; BADDOUR, L.M. & BAYER, A.S. **Bacteremia and infective endocarditis: pathogenesis, diagnosis, and complications.** In: *The Staphylococci in Human Disease*, Crossley, K.B. & Archer, G.L. (eds), Churchill Livingstone, New York, USA. p.331-355, 1997.

IORIO, N. L.P.; FERREIRA, R. B. R.; SCHUENCK, R. P.; MALVAR, K. L.; BRILHANTE, A. P.; NUNES, A.P.F; BASTOS, C.C.R. & SANTOS, K.R.N. **Simplified and Reliable Scheme for Species-Level Identification of *Staphylococcus* Clinical Isolates.** J. Clin. Microbiol., 45 (8), 2564–2569, 2007.

ITO, T.; OKUMA, K.; MA, X.X.; YUZAMA, H. & HIRAMATSU, K. **Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC.** Drug Resist Updat., 6(1),41-52, 2003.

ITO, T.; KATAYAMA, Y.; ASADA, k.; MORI, N.; TSUTSUMIMOTO, K.; TIENSATORN, C.; & HIRAMATSU, K. **Structural comparasion of three type of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Antimicrob. Agents Chemother., 45, 1323-1336, 2001.

ITO, T.; MA, X.X.; TAKEUCHI, F.; OKUMA, K.; YUZAWA, H. & HIRAMATSU, K. **Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccr*.** Antimicrob. Agents Chemother. 48 (7), 2637-2651, 2004.

JAIN, A.; AGARWAL, J. & BANSAL, S. **Prevalence of methicillin-resistant, coagulase-negative staphylococci in neonatal intensive care units: findings from a tertiary care hospital in India.** J Med Microbiol., 53(9), 941-4, 2004.

JAIN, A.; AGARWAL, A. & VERMA, R.K. **Cefoxitin disc diffusion test for detection of meticillin-resistant staphylococci.** J. Med. Microbiol., 57(8), 957-61, 2008.

JAMALUDDIN, T.Z.; KUWAHARA-ARAI, K.; HISATA, K.; TERASAWA, M.; CUI, L.; BABA, T.; SOTOZONO, C.; KINOSHITA, S.; ITO, T. & HIRAMATSU, K. **Extreme genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strains disseminated among healthy Japanese children.** [J Clin Microbiol.](#) 46(11), 3778-83, 2008

JANSEN, W.T.M; BEITSMA, M.M.; KOEMAN, C.J.; VAN WAMEL, W.J.B.; VERHOEF, J. & FLUIT, A.C. **Novel mobile variants of staphylococcal cassette chromosome *mec* in *Staphylococcus aureus*.** Antimicrob.l Agents and Chemother. 50 (6) 2072-2078, 2006.

HIRAMATSU, K.; ARITAKA, N.; HANAKI, H.; KAWASAKI, S.; HOSODA, Y.; HORI, S.; FUKUCHI, Y. & KOBAYASHI, I. **Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin.** Lancet. 6;350(9092), 1670-3, 1997.

KARTHIKEYAN, G. & PREMKUMAR, K. **Neonatal sepsis: *Staphylococcus aureus* as the predominant pathogen.** Ind. J. Ped. 68,715-717, 2001.

KATAYAMA Y, ITO T, HIRAMATSU K. **Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*.** Antimicrob Agents Chemother;45(7):1955-63, 2001

KAUFMAN, D & FAIRCHILD, K.D. **Clinical microbiology of bacterial and fungal sepsis in very low birth weight babies.** Clin Microbiol Rev 17, 638-680, 2004.

KELLONG, J. A.; FERRENTINO, F.L; GOODSTEIN, M.H.; LISS, J.; SHAPIRO S.L. & BANKERT, D.A. **Frequency of low level bacteremia in infants from birth to two months of ages.** Pediatr. Infect. Dis. J., 16, 381-385, 1997.

KILBRIDE, H.W. G. & PREMKUMAR, K. **Neonatal sepsis: *Staphylococcus aureus* as the predominant pathogen.** Ind. J. Ped., 68,715-717, 2003.

KILIC, A.; LI, H.; STRATON, C.W., TANG, Y-W. **Antimicrobial susceptibility patterns and staphylococcal cassette chromosome *mec* types of, as well as Panton- Valentine leukocidin**

occurrence among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from children and adults in middle Tennessee. *J. Clin. Microbiol.* 44: 4436- 4440, 2006.

KLOOS, W.E. & BANNERMAN, T.L. **Update on clinical significance of Coagulase-Negative *Staphylococci***. *Clin. Microbiol.*, 7, 117-140, 1994.

KOLLEF, M. H. **Inadequate antimicrobial treatment: An important determinant of outcome for hospitalized patients**. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, 31(4), 131-138, 2000.

KONDO, Y.; ITO, T.; MA, X.X.; WATANABE, S.; KREISWIRTH, B.N.; ETIENNE, J. & HIRAMATSU, K. **Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions**. *Antimicrob Agents Chemother.* 51(1), 264-74, 2007.

KOZITSKAYA, S.; OLSON, M.E.; FEY, P.D.; WITTE, W.; OHLSEN, K. & ZIEBUHR, W. **Clonal analysis of *Staphylococcus epidermidis* isolates carrying or lacking biofilm-mediating genes by multilocus sequence typing**. *J Clin Microbiol.* 43(9), 4751-7, 2005.

KREDIET, T.G.; BEURSKENS, F.J.; VAN DIJK, H.; GERARDS, L.J. & FLEER, A. **Antibody responses and opsonic activity in sera of preterm neonates with coagulase-negative staphylococcal septicemia and the effect of the administration of fresh frozen plasma**. *Pediatr Res.*, 43(5), 645-51, 1998.

KREDIET, T.G.; JONES, M.E.; JANSSEN, K.; GERARDS, L.J. & FLEER, A. **Prevalence of molecular types and *mecA* gene carriage of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: relation top nosocomial septicemia**. *J.Clin. Microbiol.*y, 39, 3376-3378, 2001.

KREDIET, T.G.; MASCINI, E.M.; ROOIJ, E.; VLOOSWIJK, J.; PAAUW, A.; GERARDS, L.J. & FLEER, A. **Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococci causing sepsis in a neonatal intensive care unit over an 11 year period**. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 922-995, 2004.

KUBICA. M.; GUZIK, K.; KOZIEL, J.; ZAREBSKI, M.; RICHTER, W.; GAJKOWSKA, B.; GOLDA, A.; MACIAG-GUDOWSKA, A.; BRIX, K.; SHAW, L.; FOSTER, T. & POTEPA, J. **A Potential New Pathway for *Staphylococcus aureus* Dissemination: The Silent Survival of *S. aureus* Phagocytosed by Human Monocyte-Derived Macrophages**. *PLoS ONE.* 9(3), 1-16, 2008.

LACROIX, J. **What tests can help diagnose and estimate the severity of sepsis?** *J. Pediatr.* 83(4), 297-298, 2007.

LANG, S.; LIVESLEY, M. A.; LAMBERT, P.A.; ELLIOT, J. & ELLIOT, T.S. **The genomic diversity of coagulase-negative staphylococci associated with nosocomial infection**. *J.Hosp. Infect.*, 43,187-193, 1999.

LEUNG, M.J., NUTTAL, N., PRYCE, T.M., COOMBS, G.W. & PEARMAN, J.W. **Colony variation in *Staphylococcus lugdunensis***. *J. Clin. Microbiol.*, 36 (10), 3096-3098, 1998.

LIN, Y.C.; LAUDERDALE, T.L.; LIN, H.M.; CHEN, P.C.; CHENG, M.F.; HSIEH, K.S. & LIU, Y.C. **An outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in patients of a pediatric intensive care unit and high carriage rate among health care workers**. *J Microbiol Immunol Infect.* 40(4), 325-34, 2007.

LINA, B.; VANDENESCH, F.; ETIENNE, J; KREISWIRTH, B. & FLEURETTE, J. **Comparasion of coagulase-negative staphylococci by pulsed-field gel eletrophoresis**. *FEMS Microbiol. Leet.* 92,133-138, 1992.

LINHARDT, F.; ZIEBURHR,W.; MEYER, P.; WITTE, W. & HACKER, J. **Pulsed-field gel eletrophoresis of genomic restriction fragments as a tool for the epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci**. *FEMS Microbiol. Leet.* 92,181-186, 1992.

- LIVERMORE, D.M. **Antibiotic resistance in staphylococci.** Int. J. of Antim. Agen., 16(1), S3-S10, 2000.
- LONGSHAW, C.M.; FARRELL, A.M.; WRIGHT, J.D. & HOLLAND, K.T. **Identification of a second lipase gene, *gehD*, in *Staphylococcus epidermidis*: comparison of sequence with those of other staphylococcal lipases.** Microbiology. 146 (6), 1419-27, 2000.
- LOUREIRO, M.M.; DE MORAES, B.A.; QUADRA, M.R.; PINHEIRO, G.S.; SUFFYS, P.N. & ASENSI, M.D. **Molecular epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from newborns in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil.** Mem Inst Oswaldo Cruz.,95, 777-82, 2000.
- MA, X.X.; ITO, T.; TIENSASITORN, C.; JAMKLANG, M.; CHONGTRAKOOL, P.; BOYLE-VAVRA, S.; DAUM, R.S. & HIRAMATSU, K. **Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain.** Antimicrob. Agents Chemother., 46, 1147-1152, 2002.
- MCDUGAL, L.K., STEWARD, C., D., KILLGORE, G.E., CHAITRAM, J.M., MCALLISTER, S.K., TENOVER, F.C. **Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database.** J. Clin. Microbiol. 41: 5513-5120. 2003.
- MAC FADDIN, J.F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria.** 312, WILLIAMS & WILKINS Company, Baltimore, USA, 1977
- MACHADO, A.B.M.P.; REITER, K.C.; PAIVA, R.M & BARTH, A.L. **Distribution of staphylococcal cassette chromosome *mec* (*SCCmec*) types I, II, III and IV in coagulase-negative staphylococci from patientes attending a tertiary hospital in southern Brazil.** J Med. Microbiol., 56,1-7, 2007.
- MACK, D.; DAVIES, A.P.; HARRIS, L.G.; ROHDE, H.; HORSTKOTTE, A.; & KNPBLOCH, J.K.M. **Microbial interactions in *Staphylococcus epidermidis* biofilms.** Anal Bioanal Chem., 387, 399-408, 2007.
- MALTEZOU, H.C. & GIAMARELLOU, H. **Community-acquired methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* infections.** Int J Antimicrob Agents., 27, 87-96, 2006.
- MARSHALL, J. & SWEENEY, D. **Microbial infection and the septic response in critical surgical illness. Sepsis, not infection, determines outcome.** Arch surg. 125, 17-23, 1990.
- MARTINEAU, F.; PICARD, F. J.; LANSAC, N.; MENARD, C.; ROY, P. H.; OUELLETE, M. & BERGERON, M. G. **Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*.** Antmicrob. Agents Chemother. 44, 231-238, 2000.
- MASON, W J; BLEVINS, J S; BEENKEN, K; WIBOWO, N; OJHA, N & SMELTZER, M.S. **Multiplex PCR protocol for the diagnosis of staphylococcal infection.** J Clin Microbiol 39, 3332-3338, 2001.
- MILISAVLJEVIC, V.; WU, F.; CIMMOTTI, J.; HAAS, J.; DELLA-LATTA, P.; LARSON, E. & SAIMAN, L. **Genetic relatedness of *Staphylococcus epidermidis* from infected infants and staff in the neonatal intensive care unit.** Am J Infect Control.,33(6), 341-7, 2005.
- MIRAGAIA M, COUTO I, PEREIRA SF, KRISTINSSON KG, WESTH H, JARLØV JO, CARRIÇO J, ALMEIDA J, SANTOS-SANCHES I, DE LENCASTRE H. **Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones: evidence of geographic dissemination.** J Clin Microbiol.;40(2):430-8, 2002.
- MIRAGAIA. M.; THOMAS, J.C.; COUTO, I.; ENRIGHT, M.C. & DE LENCASTRE, H. **Inferring a population structure for *Staphylococcus epidermidis* from multilocus sequence typing data.** J Bacteriol., 189(6), 2540-52, 2007.
- MIREYA, U.A.; MARTI, P.O.; XAVIER, K.V, LATORRE, O. C.; MARTÍN, M.M. & CAMPINS, M.M. **Nosocomial infections in paediatric and neonatal intensive care units.** J Infect., 54, 212–220, 2007.

MOMBACH PINHEIRO MACHADO, A.B., REITER, K.C., PAIVA, R.M., BARTH, A.L. **Distribution of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) types I, II, III and IV in coagulase-negative staphylococci from patients attending a tertiary hospital in southern Brazil.** J. Med. Microbiol. 56: 1328-1333, 2007.

MONSEN, T.; RÖNNMARK, M.; OLOFSSON, C. & WISTRÖM, J. **An inexpensive and reliable method for routine identification of staphylococcal species.** Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 17(5), 327-35, 1998.

MORONEY, S.M., HELLER, L.C., ARBUCKLE, J., TALAVERA, M., WIDEN, R.H. Staphylococcal cassette chromosome *mec* and Panton-Valentine leukocidin characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. J. Clin. Microbiol, 2007.

MUSSI-PINHATA, M.M. & NASCIMENTO, S.D. **Neonatal nosocomial infections.** J. Pediatr., 77(1), S81-S96, 2001.

NAGATA, E.; BRITO, A.S.; MATSUO, T. **Nosocomial infections in a neonatal intensive care unit: incidence and risk factors.** Am J Infect Control., 30, 26-31, 2002.

NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE (NNIS) **System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004.** Am. J. Infect. Control., 32, 470-85, 2004.

NAVANEETH B.V. **A preliminary in vitro study on inducible and constitutive clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* from a South Indian tertiary care hospital.** Int J Infect Dis, 10, 184-5, 2006.

NOWAK, T., BALCERCZAK, E., MIROWSKI, M., SZEWCZYK, E. M. **Detection of methicillin resistance in hospital environmental strains of coagulase-negative staphylococci.** Pol J Microbiol. 2006;55(4):339-43, 2006

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

NUNES, A.P.F.; TEIXEIRA, L.T.; IORIO, N.L.P.; BASTOS, C.C.R.; FONSECA, L.S.; SOUTO-PADRÓN, T.; SANTOS, K.R.N. **Heterogeneous resistance to vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus warneri* clinical strain: characterization of glycopeptide susceptibility profiles and cell wall thickening.** Int J Antimicrob Agents. 27, 307-315, 2006.

OLIVEIRA, D.C. & DE LENCASTRE, H. **Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Antimicrob. Agents Chemother. 46, 2155-2161, 2002.

OLIVEIRA, D.C., MILHEIRIÇO, C. DE LENCASTRE, H. **Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec* type VI.** Antimicrob Agents Chemother., 50(10), 3457-3459, 2006.

OLIVEIRA, D.C., TOMASZ, A., DE LENCASTRE, H. 2002. **Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Lancet Infect. Dis. 2: 180-189, 2002.

OTTO, M. **Virulence factors of coagulase-negative staphylococci.** Front. Biosci., 9, 841-863, 2004.

PALAVECINO, E. **Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections.** Clin Lab Med., 24(2), 403-18, 2004.

PANERO, A.; PACIFICO, L.; ROSSINI, N.; MANCUSO, G.; STEGAGNO, M. & CHIESA, C. **Interleukin-6 in neonates with early and late onset infection.** *Pediatric Infect Dis. J.*, 16, 370-375, 1997.

PAYNE, N.R.; CARPENTER, J.H.; BADGER, G.J.; HORBAR, J.D. & ROGOWSKI, J. **Marginal Increase in cost and excess length of stay associated with nosocomial bloodstream infections in surviving very low birth weight infants.** *Pediatrics*. 114 (2) 348-354, 2004.

PESSOA-SILVA, C.L.; MIYASAKI, C.H.; ALMEIDA, M.F.; KOPELMAN, B.I.; RAGGIO, R.L. & WEY, S.B. **Neonatal late-onset bloodstream infection: attributable mortality, excess of length of stay and risk factors.** *Europ. J. Epidemiol.*, 17, 715-720, 2001.

PFALLER, M.A.; JONES, R.N.; DOERN, G.V.; SADER, H.S.; KUGLER, K.C. & BEACH, M.L. **Survey of blood stream infections attributable to gram-positive cocci: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and Latin America from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. SENTRY Participants Group.** *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 33, 283-297, 1999.

PITCHER, D.G.; SAUDERS, N.A. & OWEN, R.J. **Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate.** *Lett. Appl. Microbiol.*, 8(9), 1551-6, 1989.

RAIMUNDO, O., HEUSSLER, H., BRUHN, J.B., SUNTRARACHUN, S., KELLY, N., DEIGHTON, M.A., GARLAND, S.M. **Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococcal bacteraemia in a newborn intensive care unit.** *J Hosp Infect.* 2002 May;51(1):33-42, 2002

RAPONI, G.; GHEZZI, M.C.; GHERARDI, G.; DICUONZO, G.; CAPUTO, D.; VENDITTI, M.; ROCCO, M.; MICOZZI, A. & MANCINI, C. **Antimicrobial susceptibility, biochemical and genetic profiles of *Staphylococcus haemolyticus* strains isolated from the bloodstream of patients hospitalized in critical care units.** *J. Chemother.*, 17(3), 264-9, 2005.

RAZ, R.; COLODNER, R. & KUNIN, C.M. **Who are you – *Staphylococcus saprophyticus*?** *Clin Infect Dis.* 40, 896-898, 2005.

RICE, L.B. **Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria.** *Am Infet Control.* 34(5) S11-19, 2006.

ROGERS, K.L.; FEY, P.D. & RUPP, M.E. **Coagulase-negative staphylococcal infections.** *Infect Dis Clin North Am.*, 23(1), 73-98, 2009.

RUPPE, E.; BARBIER, F.; MESLI, Y.; MAIGA, A.; COJOCARU, R.; BENKHALFAT, M.; BENCHOUK, S.; HASSAINE, H.; MAIGA, I.; DIALLO, A.; KOUMARE, A. K.; OUATTARA, K.; SOUMARE, S.; DUFOURCQ, J.-B.; NARETH, C.; SARTHOU, J.-L.; ANDREMONT, A. & RUIMY, R. **Diversity of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Structures in Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* Strains among Outpatients from Four Countries.** *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 442-449, 2009.

SADER, H.S.; JONES, R.N.; GALES, A.C.; SILVA, J.B.; PIGNATARI, A.C. & THE SENTRY PARTICIPANTS GROUP (LATIN AMERICA). **SENTRY antimicrobial surveillance program report: latin and brazilian results for 1997 though 2001.** *Braz J Infect. Dis.* 8(1), 25-79, 2004.

SAIDA, N. B.; FERJÉNI, A.; BENHADJTAHER, N.; MONASTIRI, K. & BOUKADIDA, J. **Clonality of clinical methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolates in a neonatal intensive care unit.** *Pathol Biol* 54, 337-342, 2006.

SAKAI, H.; PROCOP, G.W.; KOBAYASHI, N.; TOGAWA D.; WILSON D.A.; BORDEN L.; KREBS V. & BAUER T.W. **Simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci in positive blood cultures by real-time PCR with two fluorescence resonance energy transfer probe sets.** *J Clin Microbiol.* 42, 5739- 44, 2004.

SALYERS, A.A. & WHITT, D.D. **Bacterial pathogenesis: a molecular approach.** 216-231, 2th ed, ASM Press. Washington, DC. USA, 2003.

- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Extraction and purification of plasmid DNA. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd ed.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY. Appendix A.5. 1989.
- SANTOS, K.R.; TEIXEIRA, L.M.; LEAL, G.S.; FONSECA, L.S. & GONTIGO FILHO, P.P. **DNA typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: isolates and factors associated with nosocomial acquisition in two Brazilian university hospitals.** J. Med. Microbiol., 48,17-23, 1999.
- SARKAR, S.; BHAGAT,I.; DECRISTOFARO, J.D.; WISWELL, T.E. & SPITZER, A.R. **A study of the role of multiple site blood cultures in the evaluation of neonatal sepsis.** J.Perinatol. 26, 18-22, 2006.
- SCHUENCK, R.P.; PEREIRA, E.M.; IORIO, N.L. & DOS SANTOS, K.R. **Multiplex PCR assay to identify methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*.** FEMS Immunol Med Microbiol. *In Press*, 2008.
- SCHWARTZ, D.C.; SAFRAN,W.; WELSH,J.; HAAS, R.; GOLDENBERG, M. & CANTOR, C. R. **New techniques for purifying DNAs and studying their properties and packaging.** Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47, 189-195, 1983.
- SECHI, L.A.; PINNA,A.; PUSCEDDU, C.; FADDA, G.; CARTA, F. & ZANETTI, S. **Molecular characterization and antibiotic susceptibilities of ocular isolates of *Staphylococcus epidermidis*.** J. Clin. Microbiol., 37, 3031-3033, 1999.
- SKOW, A.; MANGOLD, K.A.; TAJUDDIN, M.; HUNTINGTON, A.; FRITZ, B.; THOMSON, J. J. & KAUL, K.L. **Species-Level Identification of Staphylococcal Isolates by Real-Time PCR and Melt Curve Analysis.** J Clin Microbiol., 43, 2876-80, 2005.
- SOHN, A.H.; GARRETT, D.O.; SINKOWITZ-COCHRAN, R.L.; GROHSKOPF, L.A., LEVINE, G.L.; STOVER, B.H.; SIEGEL, J.D.; JARVIS, W.R. & PEDIATRIC PREVENTION NETWORK. **Prevalence of nosocomial infections in neonatal intensive care unit patients: Results from the first national point-prevalence survey.** J Pediatr.,139(6), 821-7, 2001.
- SPANU, T.; SANGUINETTI, M.; CICCAGLIONE, D.; D'INZEO, T.; ROMANO, L.; LEONE, F. & FADDA, G. **Use of the VITEK 2 system for rapid identification of clinical isolates of staphylococci from bloodstream infections.** J. Clin. Microbiol. 41, 4259-4263, 2003.
- SRIVASTAVA, S. & SHETTY, N. **Healthcare-associated infections in neonatal units: lessons from contrasting worlds.** J Hosp Infect. 65(4), 292-306, 2007.
- STEIN, M.; NAVON-VENEZIA, S. & CHMELMITSKY, I. **An outbreak of new, nonmultidrug-resistance, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain (SCC*mec* type IIIa variant-1) in neonatal intensive care unit transmitted by a staff member.** Pediatr Infect Dis J., 25, 557-559, 2006.
- STOLL, B.J.; HANSEN, N.; FANAROFF, A.A.; WRIGHT, L.L.; CARLO, W.A.; EHRENKRANZ, R.A.; LEMONS, J.A.; DONOVAN, E.F.; STARK, A.R.; TYSON, J.E.; OH, W.; BAUER, C.R.; KORONES, S.B.; SHANKARAN, S.; LAPTOOK, S.A.R.; STEVENSON, D.K.; PAPILE, L.A. & POOLE, W.K. **Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network.** Pediatrics. 110, 285-291, 2002.
- STREIT, J.M.; JONES, R.N.; SADER, H.S. &FRITSCH, T.R. **Assessment of pathogen occurrences and resistance profiles among infected patients in the intensive care unit: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America, 2001).** Int J Antimicrob Agents.24(2), 111-8, 2004.
- STRUNK, T.; RICHMOND, T.; SIMMER, K.; CURRIE, A.; LEVY, O. & BURGNER, D. **Neonatal immune response to coagulase-negative staphylococci.** Curr Opin Infect Dis. 20, 370-375, 2007.
- SWARTZ, M.N. **Impact of antimicrobial agents and chemotherapy.** *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 2009-2016, 2000.
- SZEECEZYK, E.M.; PIOTROSWISKI, A. & RÓZALSKA, M. **Predominant staphylococci in the**

intensive care unit of a paediatric hospital. J. Hosp. Infect., 45, 145-154, 2000.

TABE, Y., NAKAMURA, A., OGURI, T., IGARI, J. **Molecular characterization of epidemic multiresistant *Staphylococcus haemolyticus* isolates.** Diagn Microbiol Infect Dis.;32(3):177-83, 1998.

TÁVORA, A.C.; CASTRO, A.B.; MILITÃO, M.A.; GIRÃO, J.E.; RIBEIRO, K.D.E.C. & TÁVORA, L.G. **Risk factors for nosocomial infection in a Brazilian neonatal intensive care unit.** Braz J Infect Dis. 12(1),75-9, 2008.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V.; MICKELSEN, P.A.; MURRAY, B.E.; PERSING, D.H. & SWAMINATHAN, B. **Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing.** J Clin Microbiol. 33, 2233-9, 1995.

TOLDOS, C.M.; YAGÜE, G.; ORTIZ, G. & SEGOVIA, M. **Assessment of multiple coagulase-negative isolated in blood cultures using pulsed-field gel electrophoresis.** Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 16, 581-586, 1997.

TRINDADE, P., PACHECO, R.L., COSTA, S.F., ROSSI, F., BARONE, A.A., MAMIZUKA, E.M., LEVIN, A.S. **Prevalence of SCCmec type IV in nosocomial bloodstream isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** J. Clin. Microbiol. 43, 3435-3437, 2005.

VENKATESH, M. P., PLACENCIA, F. & WISMAN, L.E. **Coagulase- Negative Staphylococcal infections in the neonate and child: An update.** Semin Pediatr Infect Dis. 17, 120-127, 2006.

VILLARI, P.; SARNATARO, C. & IACUZIO, L. **Molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* in a neonatal intensive care unit over a three-year period.** J. Clin. Microbiol., 38 (5), 1740-1746, 2000.

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

VON DOLINGER DE BRITO D, DE ALMEIDA SILVA H, JOSE OLIVEIRA E, ARANTES A, ABDALLAH VO, TANNUS JORGE M, GONTIJO FILHO PP. ET AL. **Effect of neonatal intensive care unit environment on the incidence of hospital-acquired infection in neonates.** J Hosp Infect., 65, 314-318,2007.

VON EIFF, PETERS, G. & HEILMANN, C. **Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci.** Lancet. 2, 677-685, 2002.

VUONG, C. & OTTO, M. ***Staphylococcus epidermidis* infections.** Microbes and Infections, 4,481-489, 2002.

VUONG, C.; KOCIANOVA, S.; VOYICH, J.M.; YAO, Y.; FISCHER, E.R.; DELEO, F.R. & OTTO, M. **A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence.** J Biol Chem., 24; 279(52), 54881-6, 2004.

WEI, S.; CHIU, H.; HUNG,K.; WANG,J.; SU,B.; LIN, H.; LIN, T. & LIN, H. **Epidemiologic trends in nosocomial bacteremia in a neonatal intensive care unit.** J. Microbiol. Immunol. Infect. 38, 283-288, 2005.

WEISMAN, L. E. **Coagulase-negative staphylococcal disease: emerging therapies for the neonatal and pediatric patient.** Curr. Opin. Infect. Dis. 17, 237-241, 2004.

WERTHEIM, H.F; WALSH, E.; CHOUDHURRY, R.; MELLES, D.C.; BOELEN, H.A.; MIAJLOVIC, H.; VERBRUGH, H.A.; FOSTER, T. & VAN BELKUM, A. **Key role for clumping factor B in *Staphylococcus aureus* nasal colonization of humans.** Plos. Med. 5(1), 104-112, 2008.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Prevention of hospital-acquired infection: a practical guide**. 2nd edition, 2006.

WILKINSON, B.J. 1997. **Biology**. In: The Staphylococci in human disease. Crossley K.B. & Archer G.L.(eds). Churchill Livingstone. New York, USA. p. 1-38.

WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S.M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R.P. & EDMOND, M.B. **Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study**. Clin Infect Dis, 39(3), 309-17,2004.

ZAIDI, A.K.M.; HUSKINGS, W.C.; THAYER, D.; BHUTTA, Z.A.; ABBAS, Z. & GOLDMANN, D.A. **Hospital-acquired neonatal infections in developing countries**. Lancet. 365, 1175-1188, 2005.

ZHANEL, G.G.; DECORBY, M.; LAING, N.; WESHNOWESKI, B.; VASHISHT, R.; TAILOR, F.; NICHOL, K.A.; WIERZBOWSKI, A.; BAUDRY, P.J.; KARLOWSKY, J.A.; LAGACÉ-WIENS, P.; WALKTY, A.; MCCRACKEN, M.; MULVEY, M.R.; JOHNSON, J.; CANADIAN ANTIMICROBIAL RESISTANCE ALLIANCE (CARA) & HOBAN, D.J. **Antimicrobial-resistant pathogens in intensive care units in Canada: results of the Canadian National Intensive Care Unit (CAN-ICU) study, 2005-2006**. Antimicrob Agents Chemother., 52(4), 1430-7, 2008.

ZHANG, K.; MCCLURE, J.A.; ELSAYED, S.; LOUIE, T. & CONLY, J.M. **Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of Staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus***. J. Clin. Microbiol. 43(10), 5026-5033, 2005.

ZINGG, W.; POSFAY-BARBE, K.M.; PITTET, D. **Healthcare-associated infections in neonates**. Curr. Opin. Infect. Dis 21, 228-234, 2008.

ZWET, W.C.V.D; DEBETS-OSENKOPP, Y.J.; REINDER, E.; KAPI, M.; SAVELKOUL, P.H.M.; ELBURG, R.M.V.; HIRAMATSU, K. & VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M.J.E. **Nosocomial spread of *Staphylococcus capitis* strain with heteroresistance to vancomycin in a neonatal intensive care unit**. J. clin. Microbiol. 40 (7), 2520-2525, 2002.

ANEXO 1

RIO**Comitê de Ética em Pesquisa**

Parecer nº 239A/2007

Rio de Janeiro, 17 de dezembro de 2007.

Sr(a) Pesquisador(a),

Informamos a V.Sa. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde - CEP SMS-RJ -, constituído nos Termos da Resolução CNS nº 196/96 e, devidamente registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, recebeu, analisou e emitiu parecer sobre a documentação referente ao Protocolo de Pesquisa, conforme abaixo discriminado:

PROCOLO DE PESQUISA Nº 195/07

TÍTULO: Staphylococcus coagulase-negativos isolados de neonatos prematuros: prevalência de espécies, susceptibilidade à oxacilina e diversidade clonal.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Milena Borgo Azevedo.

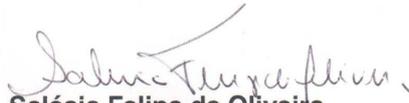
UNIDADE ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: Hospital Maternidade Fernando Magalhães.

DATA DA APRECIÇÃO: 17/12/2007.

PARECER: APROVADO

Ressaltamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (*item VII. 13.d., da Resolução CNS/MS Nº 196/96*).

Esclarecemos, ainda, com relação aos Protocolos, que o CEP/SMS deverá ser informado de fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo, devendo o pesquisador apresentar justificativa, caso o projeto venha a ser interrompido e/ou os resultados não sejam publicados.


Salésia Felipe de Oliveira
Vice-Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO 2

FICHA DE DADOS DOS PACIENTES

Hospital: _____

Data : _____ Paciente: _____ Registro:

_____ Local: _____

Sexo: _____ Peso: _____

Tempo de hospitalização: _____ Doença Base: _____

Diagnóstico Clínico: _____

Procedimento invasivos: SIM () NÃO ()

Qual (is): _____

Presença de cateter: SIM () NÃO ()

Qual: _____

Antimicrobianos: SIM () NÃO ()

Nome: _____ Início: _____ Término: _____ Via: _____

Óbito: SIM () NÃO ()

Observação: _____

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)