

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MURILO DE ASSIS POSTAUE

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FENOTÍPICA DE *Staphylococcus* COAGULASE-NEGATIVO ISOLADOS DA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL DE UM HOSPITAL PÚBLICO DA CIDADE DE DOURADOS/MS

DOURADOS/MS
2018

MURILO DE ASSIS POSTAUE

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FENOTÍPICA DE *Staphylococcus* COAGULASE-NEGATIVO ISOLADOS DA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL DE UM HOSPITAL PÚBLICO DA CIDADE DE DOURADOS/MS

Trabalho de Conclusão de Curso, aprovado pela Banca Examinadora como requisito parcial da obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia, da Universidade Federal da Grande Dourados.

Aprovado em: 10/12/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Silvana Beutinger Marchioro

Me. Marcelo dos Santos Barbosa

Prof.^a Dr.^a. Suzana Meira Ribeiro

DOURADOS/MS
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

P857c Postaue, Murilo De Assis
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FENOTÍPICA DE Staphylococcus
COAGULASE-NEGATIVO ISOLADOS DA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA
NEONATAL DE UM HOSPITAL PÚBLICO DA CIDADE DE DOURADOS/MS [recurso
eletrônico] / Murilo De Assis Postaue. -- 2018.

Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Silvana Beutinger Marchioro.

TCC (Graduação em Biotecnologia)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2018.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Staphylococcus coagulase-negativo. 2. Infecções hospitalares. 3. Recém-nascidos.
I. Marchioro, Silvana Beutinger. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Lara Ramalho Simonetti, que foi minha amiga durante todas as melhores e piores fases de minha vida, compartilhando dos bons momentos e me consolando e ajudando a seguir em frente nos maus momentos. Imortalizo em palavras o quanto você foi e é especial para mim, e espero que esta oferta, um trabalho tão importante para mim, seja o suficiente como entrada para tudo que devo a você.

AGRADECIMENTOS

A meus amigos Igor, Caroline, Matheus, Maria, Thalles, Leticia, Carolina, Marcelo, Rafaela e Lara, que me acompanharam durante todo o caminho, servindo de apoio para me tornar a pessoa que sou hoje.

A Universidade Federal da Grande Dourados, seu corpo docente e administração, que proporcionaram um ambiente de qualidade para obtenção de conhecimento do qual sem ele não seria possível a conclusão deste trabalho, e o auxílio financeiro de bolsa de Iniciação Científica.

A minha orientadora Silvana Beutinger Marchioro, pelo suporte e tempo cedido exclusivamente para minha formação.

Aos meus pais, Elciane e Ali, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Aos colegas de laboratório, Marcelo, Carolina, Caroline, Leticia, Andressa e Gleyce que me ensinaram muito durante os anos de convivência e trabalho.

A professora Cláudia, que sempre acolheu todos seus alunos como filhos e se dedica dia e noite para dar o melhor e da forma mais tranquila possível para seus “pequenos”.

A Emily, por ter feito os dias estressantes e cansativos serem mais leves e alegres.

E a todos que participaram e auxiliaram de forma direta e indireta em minha formação como acadêmico e pessoa, meu muito obrigado.

EPÍGRAFE

“As coisas não precisam ter acontecido para serem verdadeiras. Contos e sonhos são as sombras de verdades que irão resistir quando os meros fatos forem poeira e cinzas, e esquecidos.”

Sandman – Neil Gaiman

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1. Gênero <i>Staphylococcus</i> sp.....	15
2.2. <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativo.....	16
2.3. Resistência a antimicrobianos em <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativo mediada pelos genes <i>mecA</i> e <i>femA</i>	18
2.4. Biofilme	20
2.5. Infecções hospitalares associadas a recém-nascidos.....	21
3. OBJETIVOS.....	23
3.1. Objetivo geral.....	23
3.2. Objetivos específicos.....	23
4. MATERIAL E METODOS.....	24
4.1. Coleta e análise preliminar das amostras.....	24
4.2. Extração de DNA.....	24
4.3. Reação em cadeia da polimerase.....	25
4.4. Teste de aderência em placa.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
6. CONCLUSÃO.....	34
7. REFERÊNCIAS.....	35

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BHI – Infusão cérebro coração

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

femA – Fator Essencial para Resistência a Meticilina

LPCS – Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde

MS – Mato Grosso do Sul

nucA – Precursor de Termonuclease A

pb – Pares de Base

PBP – Proteína Ligadora de penicilina

PBP2' – Proteína Ligadora de Penicilina 2'

PIA – Polissacarídeo de adesina intercelular

SCCmec – Cassete Cromossômico *mec* de *Staphylococcus*

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

sp. – Espécie

Taq – DNA Polimerase Termoestável

TBE – Tris Borato EDTA

T.E – Tris EDTA

UFGD – Universidade Federal da Grande Dourados

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers específicos para os genes <i>nucA</i> , <i>mecA</i> e <i>femA</i>	26
Tabela 2. Dados cruzados entre espécie bacteriana e sítio de culturas isoladas	29
Tabela 3. Dados cruzados entre espécies bacterianas e presença dos genes <i>mecA</i> e <i>femA</i>	31
Tabela 4. Dados moleculares e fenotípicos analisados neste estudo em cada amostra individual.....	32

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Separação filogenética de espécies e subespécies de *Staphylococcus sp.*, separados por características chaves de diagnósticos como proposto por Lamers et al.....16

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localização da proteína ligadora de penicilina em bactérias gram-positivas.

.....19

Figura 2. Representação do processo de aglomeração e formação de bio-filme.....21

ABSTRACT

The coagulase-negative *Staphylococcus* are gram positive bacteria that can be easily found living harmoniously in the skin of humans, however these microorganisms are among the most frequent causes of nosocomial infections, since they possess the opportunist feature, taking advantage of sick patients. These bacteria can produce biofilm, sticking and colonizing more easily both patients and medical instruments. This scenario worsened after the emergence of methicillin-resistant strains. The aim of this study was to characterize coagulase-negative *Staphylococcus* strains, isolated from the neonatal intensive care unit of a public hospital in Dourados/MS, that had an oxacillin resistance profile as: the absence of the *nucA* gene, which confirms that the isolates are not *Staphylococcus aureus*. The *mecA* gene, that confers resistance to beta lactam. And the *femA* gene, that regulates the resistance, rising it. The microplate adhesion technique was also used to semi-quantify the biofilm production of these samples. A total of 33 samples were isolated from august 2016 to august 2017, and their species were determined by the Phoenix™ BD automated system and later confirmed by the PCR technique through the absence of the *nucA* gene. Of the 33 samples 100% possessed the *mecA* gene. The *femA* gene was found in 9% (3) of the samples. The microplate adhesion test detected the biofilm production in 6 (18.1%) of the samples, with only 1 producing strongly, the other 5 producing poorly. The data presented in this study reveal that strains of great pathogenic potential are in circulation, and it is hoped that through this information it will be possible to assist health professionals in creating new means and mechanisms to combat future hospital infections, avoiding expenses, reducing hospitalization time and minimizing mortality.

Key-words: Coagulase-negative *Staphylococcus*; Nosocomial infections; Neonates.

RESUMO

Os *Staphylococcus* coagulase-negativo, são bactérias gram-positivas que podem ser encontradas facilmente vivendo na microbiota humana de forma harmoniosa, porém estes microrganismos estão entre os mais frequentes em infecções nosocomiais, já que eles apresentam a característica oportunista, se aproveitando do sistema debilitado de pacientes enfermos. Essas bactérias podem produzir biofilme, se aderindo e colonizando mais facilmente tanto os pacientes quanto instrumentos médicos. Este cenário piorou após o surgimento de cepas resistentes a meticilina. Sabendo disso, este estudo teve como objetivo caracterizar as cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa isoladas da unidade de terapia intensiva neonatal de um hospital público de Dourados/MS, que possuíam perfil de resistência para oxacilina, quanto a ausência do gene *nucA*, que confirma que os isolados não são *Staphylococcus aureus*. O gene *mecA* que confere a resistência a beta lactâmicos. E quanto o gene *femA* que regula a resistência, acentuando-a. Também foi efetuada a técnica de aderência em placa para semiquantificar a produção de biofilme destes isolados. Um total de 33 amostras foram isoladas no período de agosto de 2016 até agosto de 2017, tendo suas espécies determinadas pelo sistema automatizado Phoenix™ BD e posteriormente confirmado pela técnica de PCR através da ausência do gene *nucA*. Das 33 amostras 100% possuíam o gene *mecA*. Já o gene *femA* foi encontrado em 9% (3) das amostras. O teste de aderência em placa detectou a produção de biofilme em 6 (18,1%) das amostras, sendo que apenas 1 produz de forma forte, as outras 5 produzem fracamente. Os dados apresentados neste estudo revelam que cepas de grande potencial patogênico estão em circulação, e se espera que através destas informações seja possível auxiliar os profissionais da saúde na criação de novos meios e mecanismos para combater futuras infecções hospitalares, evitando gastos, reduzindo tempo de internação e minimizando a mortalidade.

Palavras-chave: *Staphylococcus* coagulase-negativo; Infecções hospitalares; Recém-nascidos.

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a ANVISA (2008), as bactérias do gênero *Staphylococcus sp.*, estão entre os agentes mais frequentes relacionados a enfermidades humanas, sendo que os processos infecciosos mais comuns causados por estes microrganismos são: pneumonias, bacteremias, infecções de pele, infecções de tecidos moles, infecções relacionadas de próteses e cateteres venosos e meningites.

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são gram-positivas do tipo cocos, catalase positiva e na maioria das vezes anaeróbias facultativas. O membro mais conhecido deste gênero é o *Staphylococcus aureus*, uma das únicas espécies do gênero que produzem coagulase, que possui grande patogenicidade e que por muito tempo foi visto como o único representante importante e não inofensivo deste gênero (BECKER *et al.*, 2014). Porém no final da década de 70 o potencial patogênico das espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativo finalmente chamou atenção da comunidade médica e começaram a ser estudados, principalmente por seu potencial risco em infecções hospitalares (PARISI, 1985).

Os *Staphylococcus* coagulase-negativo podem ser facilmente encontrados colonizando a pele e mucosas do ser humano de forma comensal, mas eles são organismos oportunistas, e por isso se aproveitam de hospedeiros imunocomprometidos para causar infecções graves (CUSTÓDIO *et al.*, 2012). Por ser facilmente encontrado colonizando a pele e ser oportunista este microrganismo se mostrou especialmente recorrente em infecções hospitalares, sendo hoje o microrganismo mais comum encontrado em infecções de corrente sanguínea em pacientes sobre cuidados médicos invasivos, como o uso de cateteres e próteses (BARBIER *et al.*, 2010).

As infecções hospitalares causadas por *Staphylococcus* coagulase-negativo são facilitadas por apresentarem uma capacidade de formação de biofilme, um aglomerado complexo de células envoltos por uma matriz constituída principalmente de polissacarídeos que aumenta a aderência, resistência e longevidade da colônia (Greco-Stewart *et al.*, 2013). Estes biofilmes se aderem em instrumentos e materiais utilizados recorrentemente no âmbito hospitalar, como cateteres, próteses e marca-passos cardíacos, causando infecções e cronicidade das mesmas (Greco-Stewart *et al.*, 2013). Esta é uma realidade preocupante para os recém-nascidos internados na unidade de terapia intensiva neonatal, já que possuem um sistema imunológico imaturo, e precisam de cuidado constante e muitas vezes invasivos para a administração

de medicamentos e nutrientes. Tornando-os alvos recorrentes de infecções hospitalares por *Staphylococcus* coagulase-negativo (CORDEIRO, 2007).

Os casos de infecções causadas por *Staphylococcus* coagulase-negativo apenas se agravou após o surgimento de cepas resistentes a antimicrobianos, mais especificamente a meticilina. As espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativo resistentes a meticilina apresentam resistência a virtualmente todos os antimicrobianos do grupo das penicilinas, por apresentarem uma proteína modificada na parede celular que possui uma afinidade reduzida a beta lactâmicos, dificultando muito o tratamento dessas infecções, aumentando o tempo de internação e mortalidade (BAPTISTA, 2013). Sabendo disso, este estudo teve como objetivo detectar em amostras de *Staphylococcus* coagulase-negativo, isolados de UTI Neonatal de um hospital público de Dourados, a presença dos genes de resistência *mecA* e *femA*, semiquantificar a produção de biofilme e confirmar que não se tratam de *Staphylococcus aureus* pela ausência do gene *nucA*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Gênero *Staphylococcus* sp.

O gênero *Staphylococcus* sp. faz parte da família *Micrococcae*, assim como os gêneros *Planococcus*, *Micrococcus* e *Stomatococcus*. Os representantes do gênero *Staphylococcus* sp. são gram positivos, catalase positivos, imóveis, não-esporulados, possuem aproximadamente de 0,5 µm a 1,5 µm de diâmetro, normalmente anaeróbias facultativas e podem se apresentar de várias formas: isolados, aos pares, em cadeias curtas, ou agrupamentos irregulares como um cacho de uva (MURRAY *et al.*, 2014).

Essas bactérias do gênero *Staphylococcus* são encontradas na microbiota normal da pele e mucosa do ser humano, e normalmente não apresentam nenhum tipo de risco a saúde do hospedeiro, mas pessoas imunocomprometidas, recém-nascidos e pacientes sujeitos a procedimentos invasivos estão sujeitas a serem alvos de infecções, sendo assim patógenos oportunistas (BECKER *et al.*, 2014). Quando infectado, um paciente pode apresentar quadros clínicos graves como bacteremias, septicemias e sepses neonatal (ROSA *et al.*, 2009).

As espécies deste gênero são frequentemente divididas em dois grandes grupos de interesse de acordo com a presença ou não de coagulase, sendo que das quarenta e sete espécies do gênero, trinta e oito atingem o pré-requisito necessário para serem considerados coagulase-negativo (**Quadro 1**).

Quadro 1. Separação filogenética de espécies e subespécies de *Staphylococcus sp.*, separados por características chaves de diagnósticos como proposto por Lamers et al.*

Oxidase	Negativo							
Novobiocina	Suscetível							
Coagulase	Negativo	Positivo ¹ - Variável ² - Negativo ³			Negativo			
Grupo de espécie	Hycus-Intermedius			Epidermidis-Aureus				
Grupo de Cluster	Muscae	Hycus	Intermedius	Aureus	Epidermidis	Warneri	Haemolyticus	Lugdunensis
Espécies	<i>S. muscae</i> <i>S. microti</i> <i>S. rostri</i>	<i>S. hycus</i> ² <i>S. agnetis</i> ² <i>S. chromogenes</i> ³ <i>S. felis</i> ³	<i>S. intermedius</i> ¹ <i>S. delphini</i> ¹ <i>S. lutrae</i> ¹ <i>S. pseudintermedius</i> ¹ <i>S. schleiferi</i> <i>ssp. schleiferi</i> ² <i>ssp. coagulans</i> ¹	<i>S. aureus</i> <i>ssp. aureus</i> ¹ <i>ssp. anaerobius</i> ¹ <i>S. simiae</i> ¹	<i>S. epidermidis</i> <i>S. capitis</i> <i>ssp. capitis</i> <i>ssp. urealyticus</i> <i>S. caprae</i> <i>S. saccharolyticus</i>	<i>S. warneri</i> <i>S. pasteurii</i>	<i>S. haemolyticus</i> <i>S. devriesei</i> <i>S. hominis</i> <i>ssp. novobiosepticus</i> <i>S. jettensis</i> <i>S. petrasii</i> <i>ssp. croceilyticus</i> <i>ssp. petrasii</i>	<i>S. lugdunensis</i>
Oxidase	Negativo							Positivo
Novobiocina	Suscetível				Resistente			
Coagulase	Negativo							
Grupo da espécie	Auricularis	Simulans	Saprophyticus				Sciuri	
Grupo de Cluster	Auricularis	Simulans-Carnosus	Pettenkoferi-Massiliensis	Saprophyticus	Cohnii-Nepalensis	Arlettae-Kloosii	Sciuri	
Espécies	<i>S. auricularis</i>	<i>S. simulans</i> <i>S. carnosus</i> <i>ssp. carnosus</i> <i>ssp. utilis</i> <i>S. condimenti</i> <i>S. piscifermentans</i>	<i>S. pettenkoferi</i> <i>S. massiliensis</i>	<i>S. saprophyticus</i> <i>ssp. saprophyticus</i> <i>ssp. bovis</i> <i>S. equorum</i> <i>ssp. linens</i> <i>S. gallinarum</i> <i>S. succinus</i> <i>ssp. succinus</i> <i>ssp. casei</i> <i>S. xylosus</i>	<i>S. cohnii</i> <i>ssp. cohnii</i> <i>ssp. urealyticus</i> <i>S. nepalensis</i>	<i>S. arlettae</i> <i>S. kloosii</i>	<i>S. sciuri</i> <i>ssp. sciuri</i> <i>ssp. carnaticus</i> <i>ssp. rodentium</i> <i>S. fleurettii</i> <i>S. lentus</i> <i>S. stepanovicii</i> <i>S. vitulinus</i>	

2.2. *Staphylococcus* coagulase-negativo

A divisão entre *Staphylococcus* coagulase-positivo e coagulase-negativo deu-se primeiramente como uma forma de diferenciar a até então considerada única espécie patogênica, *Staphylococcus aureus*, de todos os outros membros do gênero, que eram ditos não-virulentos e inofensivos (BECKER et al., 2014). Além do teste fenotípico da coagulase, outro procedimento extremamente sensível é utilizado como forma de confirmação da espécie bacteriana *Staphylococcus aureus*: A amplificação do gene *nucA*, pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), já que este

*Fonte: BECKER et al., 2014

gene, codificador de uma nucleasse extracelular termoestável, só pode ser encontrada em membros da espécie *Staphylococcus aureus* (SAHEBEKHTIARI *et al.*, 2011).

O estigma de que os *Staphylococcus* coagulase-negativo são inofensivos se manteve durante muito tempo, e foi penoso para que esta visão errônea fosse alterada. O pesquisador Pulverer G. relatou que em 1965 a comunidade médica foi muito resistente em aceitar que seu artigo intitulado “*Coagulase-negative staphylococci as pathogenic agents*”, no qual relatou um caso letal de endocardite causado por *Staphylococcus* coagulase-negativo, fosse aprovado e publicado, pela descrença de que essas bactérias pudessem ser virulentas. Porém a partir do final da década de 70, com a ajuda de pesquisas sobre a epidemiologia e patogenicidade dos *Staphylococcus* coagulase-negativo, essas espécies foram reconhecidas como agentes importantes em infecções hospitalares (CORDEIRO, 2007).

Atualmente os *Staphylococcus* coagulase-negativo se igualam aos *Staphylococcus aureus* em importância e até os supera em casos de infecções hospitalares ou como causa primária das infecções das feridas externas, por apresentarem uma taxa de infecção em humanos muito elevada (BERNARDI, 2005). O “*National Nosocomial Infection Surveillance System*” mostrou que de 1990 à meados de 1999 os *Staphylococcus* coagulase-negativo foram os patógenos mais comuns descritos em isolados de bacteremias e em pacientes especiais (KLOOS *et al.*, 1994). Sendo que as espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativo mais recorrentes nesse tipo de caso são: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus simulans* e *Staphylococcus saprophyticus* (WOLLER III *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2013).

Existe uma associação entre o aumento dramático de infecções nosocomiais de *Staphylococcus* coagulase-negativo com surgimento e agravamento da resistência desses patógenos a agentes antimicrobianos (ARCHER *et al.*, 1994), e o aumento da frequência de utilização de procedimentos médicos invasivos, já que é sabido que muitas espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativo são grandes produtoras de uma matriz de aderência (biofilme), que facilita na colonização de superfícies bióticas e abióticas (ROHDE *et al.*, 2010; BERNARDI *et al.*, 2007).

2.3. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus* coagulase-negativo mediada pelos genes *mecA* e *femA*

Antimicrobianos são substâncias utilizadas no tratamento de infecções causadas por microrganismos. Estas substâncias podem apresentar dois principais mecanismos de ação, a inibição do crescimento bacteriano através da ação bacteriostática, e a destruição de uma população bacteriana, por uma ação bactericida, levando estes organismos a morte celular (BAPTISTA, 2013).

Entretanto, a partir de 1950, quando esses antimicrobianos começaram a ser amplamente utilizadas de forma indiscriminada, tornando-se agentes seletivos exercendo uma pressão, antes inexistente, no meio levando a seleção, e surgimento, da resistência bacteriana (RAPINI *et al.*, 2004). O termo resistência bacteriana se refere a microrganismos que não se inibem pelas concentrações habituais alcançadas no sangue ou tecidos do correspondente antimicrobiano (YE, 2018).

Esta resistência a antimicrobianos já está presente em dezenas de espécies de bactérias de espécies e é especialmente preocupante nos casos de infecções hospitalares. Segundo dados de 2002 da *Food And Drug Association*, aproximadamente 70% das bactérias que causam infecções hospitalares são resistentes a pelo menos uma das drogas comumente utilizadas para o tratamento das infecções (RAPINI *et al.*, 2004).

O gênero *Staphylococcus sp.* não é exceção no que se tange a resistência a antimicrobianos, e pode ser observada uma resistência a todos os compostos da classe das penicilinas em representantes tanto da espécie *Staphylococcus aureus*, chamados de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA), quanto em membros do grupo dos *Staphylococcus* coagulase-negativo, chamados de *Staphylococcus* coagulase-negativo resistentes a meticilina (DOSNELES *et al.*, 2018). Esta variante resistente de *Staphylococcus* coagulase-negativo já está circulando em grande quantidade no mundo, sendo relatado por Sader *et al.* que 80% das amostras de *Staphylococcus* coagulase-negativo isoladas de sangue entre os anos de 1997 a 2001, na América Latina, eram resistentes a oxacilina (SADER *et al.*, 2004; SECCHI *et al.*, 2008).

A resistência a meticilina observada nos membros do gênero *Staphylococcus* possuem o mesmo funcionamento para todas as espécies, sendo que ela se dá pela presença de uma proteína modificada chamada *Penicillin Bind Protein 2^a* (PBP2a) ou

Penicillin Bind Protein 2' (PBP'2) que, diferentemente das outras PBP (**Figura 1**), possui uma baixa afinidade para com os antimicrobianos beta-lactâmicos, conferindo assim a habilidade da bactéria de se desenvolver e multiplicar em um meio contendo virtualmente qualquer representante da classe das penicilinas (RANI *et al.*, 2014;).

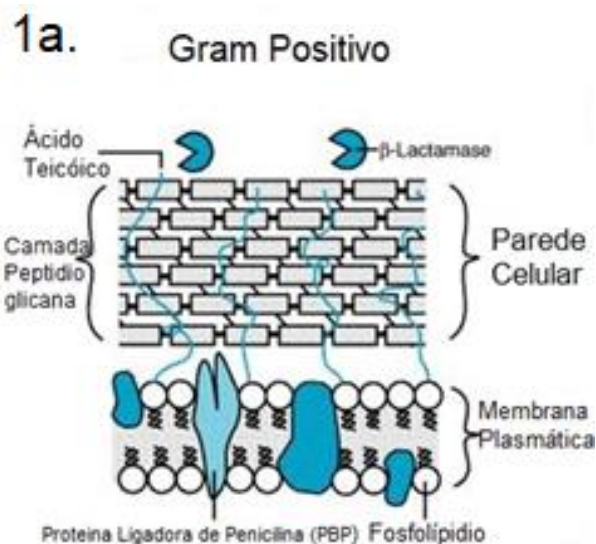


Figura 1: Localização da proteína ligadora de penicilina em bactérias gram-positivas*.

Esta proteína modificada é codificada pelo gene *mecA*, um gene de origem cromossômica que fica localizado em um elemento genético móvel denominado *Staphylococcal cassette chromosome mec* (SCC*mec*) (CHLEBOWICZ *et al.*, 2012). Porém foi relatado em diversos estudos uma heterogeneidade no nível de resistência apresentado por *Staphylococcus sp.* resistentes a meticilina que apresentavam o gene *mecA*, deixando a entender que existe outro ou outros fatores que influenciam na resistência antimicrobiana destas espécies (MIRAGAIA *et al.*, 2018).

Tentar explicar este fenômeno levou a descoberta de um segundo gene chamado *femA*, que está relacionado a um alto nível de resistência em *Staphylococcus sp.*, já que em sua ausência o nível de resistência cai drasticamente, e não está relacionado ao aumento ou diminuição da expressão do gene *mecA*, ou seja, um gene de ação independente que possui uma relação de aumento da resistência a meticilina (VERAS *et al.*, 2008).

*Fonte: TORTORA *et al.*, 2016

2.4. Biofilme

Biofilme é uma população complexa de células que pode se ligar a uma superfície biótica ou abiótica e envolvida por uma matriz de polissacarídeos que contém uma miríade de substâncias além de proteínas, DNA e RNA (FONSECA, 2010). O polissacarídeo que compõe a matriz extracelular do biofilme é chamado polissacarídeo de adesina intercelular (PIA), referida muitas vezes como slime ou muco bacteriano, que permite às células se aglomerarem, formando grandes amontoados de múltiplas camadas, chamado de biofilme (PINTO, 2010).

A formação de um biofilme se dá basicamente por duas fases com duas etapas cada, na primeira fase ocorre a adesão primária e a proliferação para formar pequenos amontoados celulares, enquanto que na fase secundária ocorre a produção de slime e a formação de biofilme (**Figura 2**). Após a formação completa do biofilme, o mesmo começa a liberar células planctônicas de sua matriz, podendo causar um estado crônico de infecção (ZMANTAR *et al.*, 2010).

A produção de biofilme é considerada um grande fator de virulência, por aumentar a capacidade de colonização, ter grande resistência a fagocitose e resistir a tratamentos com antimicrobianos (GRECO-STEWART *et al.*, 2013). A capacidade de se aderir a praticamente qualquer superfície, funcionar como uma barreira física para evitar entrar em contato com antimicrobianos e o sistema imune do hospedeiro, e reduzir o metabolismo e taxa de replicação das células que fazem parte do biofilme, faz com que o ele seja especialmente difícil de se eliminar, muitas vezes tendo como único prognóstico a remoção da área ou material colonizado (MANANDHAR *et al.*, 2018).

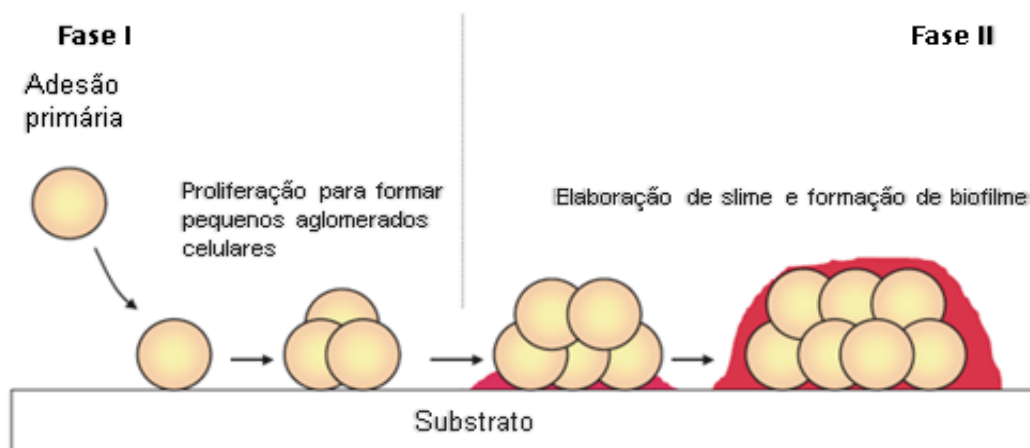


Figura 2. Representação do processo de aglomeração e formação de biofilme*.

Os *Staphylococcus* coagulase-negativo, particularmente o *Staphylococcus epidermidis*, são grandes produtores e causadores de infecções nosocomiais relacionadas a produção de biofilme, justamente por aderirem muito facilmente a próteses, cateteres, marca-passo cardíaco artificial e outros equipamentos de uso médico invasivos ou próteses em geral, que são utilizados normalmente em pacientes crônicos ou imunocomprometidos, alvos preferíveis dos *Staphylococcus* coagulase-negativo (BERNARDI, 2005). Por esta característica ser tão importante foram desenvolvidas técnicas fenotípicas *in vitro* para a detecção e semi-quantificação das cepas de bactérias que conseguem produzir biofilme. Das técnicas criadas para este fim uma das mais comuns é o teste de aderência em placa, que consegue detectar e semi-quantificar a produção de biofilme de amostras em uma placa de microdiluição de 96 poços com o auxílio de um leitor de Elisa (GUIMARÃES *et al.*, 2012).

2.5. Infecções hospitalares associadas a recém-nascidos

Infecções hospitalares, de acordo com a ANVISA, são infecções adquiridas após a internação do paciente que se manifesta durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares (ANVISA, 2005). Porém em recém-nascidos (RN), por terem apenas vivido no ambiente hospitalar, este conceito se modifica para toda infecção adquirida durante ou após o nascimento, com exceção das infecções adquiridas por via transplacentária como AIDS, hepatite B entre outras (CORDEIRO, 2007).

* Fonte: ARCIOLA *et al.*, 2002

Os recém-nascidos, principalmente prematuros, são um grupo de risco especialmente importante por apresentarem um sistema imune imaturo, epiderme imatura e por muitas vezes terem a necessidade de passar por cuidados médicos invasivos para a administração de medicamentos ou substâncias nutritivas, como por exemplo o uso de cateteres (SILVA *et al.*, 2013), que acabam funcionando como porta de entrada para microrganismos como os *Staphylococcus* coagulase-negativo (FRANCESCHI *et al.*, 2010).

Os *Staphylococcus* coagulase-negativo possuem um alto nível de risco potencial de bacteremia nosocomial entre recém-nascidos de baixo peso, e o aumento nesse tipo de quadro observado nos últimos vinte anos tem sido associado ao avanço da medicina, que vem permitindo a sobrevivência de crianças prematuras ao nascimento e à sua longa permanência em ambiente hospitalar (CUNHA *et al.*, 2002; ANDERSON-BERRY *et al.*, 2011). O principal fator de risco para recém-nascidos necessitados de cuidado intensivo é a presença de biofilme, por estes se aderirem aos equipamentos que comumente entram em contato com a corrente sanguínea do paciente (BECKER *et al.*, 2014).

Um estudo realizado no Hospital de Porto Alegre contabilizou que 57,1% dos pacientes menores de 1 ano possuíam resultados de hemocultura positivas para *Staphylococcus* coagulase-negativo (COSTA *et al.*, 2002), e já um estudo de D'Angio *et al.*, demonstrou que após quatro semanas do nascimento, 100% dos recém-nascidos prematuros acompanhados apresentavam colonização de *Staphylococcus epidermidis*, dos quais 95% produziam biofilme e 82% eram resistentes a múltiplos antimicrobianos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Efetuar a caracterização molecular e fenotípica de cepas de *Staphylococcus* sp. coagulase-negativo isoladas de pacientes da unidade de terapia intensiva neonatal de um Hospital Público de Dourados/MS.

3.2. Objetivos Específicos

Determinar a ausência do gene *nucA*, encontrados apenas em *Staphylococcus aureus*, pela técnica de PCR, em amostras de *Staphylococcus* coagulase-negativo;

Identificar a presença do gene *mecA*, relacionado a resistência antimicrobiana a meticilina, pela técnica de PCR;

Identificar a presença do gene *femA*, relacionado a níveis acentuados de resistência a antimicrobianos, pela técnica de PCR, nos *Staphylococcus* coagulase-negativo;

Semi-quantificar a produção de biofilme, pelo teste de aderência em placa, nos isolados de *Staphylococcus* sp. coagulase-negativo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta e análise preliminar das amostras

As amostras foram coletadas de pacientes da unidade de terapia Intensiva neonatal de um hospital público na cidade de Dourados/MS entre as datas de agosto de 2016 e agosto de 2017, e analisadas pelo sistema automatizado Phoenix™ BD quanta a espécie bacteriana e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos. As amostras foram plaqueadas em ágar sangue e armazenadas à 4 °C pelos funcionários do hospital até serem transportadas para o Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde (LPCS) na Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). No LPCS as amostras foram transferidas em duplicatas para criotubos contendo 2 mL de caldo Brain Heart Infusion 2x (BHI) glicerinado e colocadas em estufa por 24 horas à 37 °C. Após este período uma das duplicatas foi armazenada em freezer a -20 °C para uso posterior, e a outra foi armazenada em ultrafreezer a -80 °C como backup. O critério de inclusão foram amostras de *Staphylococcus* coagulase-negativo com perfil de resistência a oxacilina. Já o de exclusão todas as amostras duplicadas do mesmo paciente, amostras de indígenas e amostras de pacientes com mais de 28 dias de idade.

4.2. Extração de DNA

As amostras tiveram seu DNA extraído utilizando o protocolo descrito por Sambrook *et al.* (2012), com algumas adaptações: Culturas frescas foram crescidas em meio líquido BHI, para então 1.5 mL serem transferidos para eppendorfs, e centrifugadas por 2 minutos a 14.000 rpm. O pellet formado foi ressuscitado em 600 µl de T.E 1x e adicionado de 30 µl de SDS a 20% e 3 µl de proteinase K a 2 mg/mL. As amostras então foram acondicionadas em estufa a 37 °C por 2 horas sem agitação, para depois serem adicionadas de 500 µl de fenol clorofórmio, passadas no vórtex e centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm. Neste momento ocorre a formação de duas fases, da qual foram retirados 500 µl da fase superior e transferidos para um novo eppendorf. Foram adicionados 10 µl de NaCl a 5 M e 1 mL de etanol absoluto gelado para a precipitação e incubados a -20 °C por 2 horas. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm, e tiveram seu sobrenadante descartado, adicionando então 1 mL de álcool 70% para a precipitação e repetindo a centrifugação de 10 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante é mais uma vez descartado e se é adicionado 50 µl de T.E 1x para ressuscitar o DNA. Finalizada

toda a extração as amostras tiveram seu DNA quantificados pelo espectrofotômetro Biodrop.

4.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As reações de PCR para os genes *nucA*, *mecA* e *femA* foram realizadas de acordo com os parâmetros e primers (**Tabela 1**) descritos respectivamente por Kim *et al.* (2001), Azimian *et al.* (2012) e Ardic *et al.* (2005), com modificações. Para o gene *nucA* foi usado 2.1 µl de tampão (1x), 0.6 µl de cada primer (0.5 µM), 0.3 µl de DNTP (200 µM), 0.9 µl de MgCl₂ (2.5 mM), 0.12 µl de Taq, 7.98 µl de água estéril e 2.4 µl de DNA, totalizando uma reação final de 15 µl. Já para o gene *mecA* foram utilizados 1.5 µl de tampão (1x), 0.75 µl de cada primer (0.5 µM), 0.3 µl de DNTP (200 µM), 0.75 µl de MgCl₂ (2.5 mM), 0.15 µl de Taq, 8.4 µl de água estéril e 2.4 µl de DNA, totalizando uma reação final de 15 µl. E por último para o gene *femA* foram utilizados 2.5 µl de tampão (1x), 1.0 µl de cada primer (0.5 µM), 0.625 µl de DNTP (200 µM), 1.5 µl de MgCl₂ (2.5 mM), 0.25 µl de Taq, 14.12 µl de água estéril e 4.0 µl de DNA, totalizando uma reação final de 25 µl. As condições utilizadas para a realização da PCR foram: 94 °C por 5 minutos, seguidos de 37 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 59 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto e 30 segundos e uma extensão final de 72 °C por 3 minutos e 30 segundos para o gene *nucA*; 94 °C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 57 °C por 45 segundos e 72 °C por 30 segundos e uma extensão final de 72 °C por 5 minutos para o gene *mecA*; e 92 °C por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de 92 °C por 1 minuto, 56 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto e uma extensão final de 72 °C por 3 minutos. Os produtos de PCR foram analisados em eletroforese de gel de agarose a 1,5% de concentração, que foram preparados da seguinte forma: O gel foi feito com 90 mL de TBE 0.5x e 1.35 g de agarose; foram aplicados em cada poço do gel 2 µl do DNA amplificado através da técnica de PCR, 2µl de tampão de corrida e 2 µl de gel red. A corrida foi realizada a 80 V por 110 minutos e o gel foi visualizado em fotodocumentador.

Tabela 1. Primers específicos para os genes *nucA*, *mecA* e *femA*.

GENE	PRIMER	SEQUÊNCIA	REFERÊNCIA
<i>nucA</i>	FOWARD	GCGATTGATGGTGATACGGTT	Kim <i>et al.</i> , 2001
	REVERSE	AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	
<i>mecA</i>	FOWARD	AGAAGATGGTATGTGGAAGTTAG	Azimian <i>et al.</i> , 2012
	REVERSE	ATGTATGTGCGATTGTATTGC	
<i>femA</i>	FOWARD	CTTACTTACTGCTGTACCTG	Ardic <i>et al.</i> , 2005
	REVERSE	ATCTCGCTTGTGTGTGC	

4.4. Teste de aderência em placa

O teste de semiquantificação por aderência em placa foi efetuada de acordo com o método descrito por Iorio *et al.* (2012) e adaptado por Gaspar (2018), com pequenas modificações: Primeiramente as amostras foram inoculadas e crescidas por 24 horas, à 37 °C, em meio Brain Heart Infusion (BHI) ágar. Em seguida foram padronizadas à 0,5 da escala MacFarland em tubos de ensaio contendo 3 mL de salina. Posteriormente, 20 µL das suspensões padronizadas foram distribuídas em triplicata nos poços de uma placa de poliestireno de micro diluição, com 96 poços, contendo 180 µL de meio BHI em cada poço, para então serem incubadas a 37 °C por 24 horas. Após este período o meio foi descartado, e a placa foi gentilmente lavada quatro vezes por imersão em água destilada, e invertida para secagem por 15 minutos a temperatura ambiente. Já secos os poços foram adicionados de 200 µL de cristal violeta, e a placa repousada à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, a placa foi lavada gentilmente com água destilada corrente para a retirada do excesso de corante e invertida, à temperatura ambiente, por 15 minutos para nova secagem. Então, foi adicionado 200 µL de etanol 96% em cada poço para a análise da densidade ótica com o auxílio de um leitor de microplacas com filtro de 490 nm. Meio BHI estéril foi utilizado como controle negativo à produção de biofilme.

Os valores de densidade ótica foram interpretados segundo Stepanovic *et al.* (2000), com alterações propostas por Iorio *et al.* (2012). Para a classificação, quatro categorias foram criadas: não produtora, fracas, moderadas e fortes produtoras de biofilme. Foi determinado um valor N a partir da média do valor de densidade ótica do controle negativo, adicionado de três vezes o valor de seu desvio padrão, e as

amostras classificadas conforme: densidade ótica $\leq N$ = Não produtor de biofilme; $N < \text{densidade ótica} \leq 2N$ = Fraco produtor de biofilme; $2N < \text{densidade ótica} \leq 4N$ = Moderado produtor de biofilme; e densidade ótica $> 4N$ = Forte produtor de biofilme.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período do estudo 33 amostras se enquadraram nos critérios de inclusão da pesquisa, sendo de pacientes não indígenas, com menos de 29 dias de idade, apresentando perfil de resistência a oxacilina e que se encontravam na UTI neonatal, sendo assim coletadas e analisadas.

Das 33 amostras estudadas, 25 (75,7%) são provenientes de hemocultura, 7 (21,2%) de ponta de cateter e 1 (3,0%) de urocultura (**Tabela 2**), sendo que os *Staphylococcus* coagulase-negativo são os principais microrganismos encontrados em infecções de corrente sanguínea, justamente por procedimentos invasivos como cateteres permitirem um transporte dos mesmos da pele, aonde ele é um microrganismo comensal, até o sistema circulatório do paciente (ELZI *et al.*, 2012).

Assim como podemos ver na **Tabela 2** as espécies bacterianas encontradas nas 33 amostras foram: 21 (63,3%) *Staphylococcus epidermidis*, 6 (18,1%) *Staphylococcus haemolyticus*, 3 (9,0%) *Staphylococcus saprophyticus*, 2 (6,0%) *Staphylococcus capitis* e 1 (3,0%) *Staphylococcus warneri*. Marshall *et al* (1998), analisou 2340 amostras de infecções causadas por *Staphylococcus*, e dessas 1242 foram identificadas como *Staphylococcus epidermidis*, que é considerado o microrganismo mais recorrente em infecções da corrente sanguínea (MIURA, 2002). Já em um estudo de Cunha *et al* (2002), das 117 amostras de *Staphylococcus* coagulase-negativo isoladas de recém-nascidos, 91 (77,8%) eram da espécie *Staphylococcus epidermidis*, sendo que este presente estudo encontrou um número similar deste microrganismo isolados de recém-nascidos (63,3%). Por outro lado, Silbert *et al* (1997) observou um valor ainda maior, chegando a encontrar o *Staphylococcus epidermidis* em mais de 90% das hemoculturas positivas de recém-nascido analisadas em seu estudo, que se dá pela espécie *Staphylococcus epidermidis* ter demonstrado um maior sucesso evolutivo em comparação com outras espécies bacterianas por ser extremamente versátil (WIDERSTRÖM *et al.*, 2012).

Tabela 2. Dados cruzados entre espécie bacteriana e sítio de culturas isoladas.

	Espécie bacteriana					Total
	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. capitis</i>	<i>S. warneri</i>	
Hemocultura	17	4	3	1	-	25
Ponta de Cateter	3	2	-	1	1	7
Urocultura	1	-	-	-	-	1
						33

Após a extração do DNA, PCR e eletroforese em gel de agarose para o gene *nucA*, responsável pela confirmação molecular das espécies de *Staphylococcus aureus*, nenhuma amostra (0%) foi encontrada como positiva, confirmando que todas as amostras de *Staphylococcus* analisadas neste estudo são de fato *Staphylococcus* coagulase-negativo. Em estudo efetuado por Palomares *et al.* (2003), foram testadas 100 amostras de *Staphylococcus aureus* e 20 de *Staphylococcus* coagulase-negativo quanto ao gene *nucA* de forma a confirmar especificidade do teste, resultando que todas as linhagens de *S. aureus* foram positivas quanto a presença do gene, enquanto todas as *Staphylococcus* coagulase-negativo não apresentaram o gene em questão. Já Brakstad *et al.* (1992), testou 7 amostras de *S. aureus* contra 27 de *Staphylococcus* coagulase-negativo, resultando na amplificação do gene *nucA* em todas as *S. aureus* e em nenhuma de *Staphylococcus* coagulase-negativo. A detecção do gene *nucA* por PCR é a técnica molecular padrão para a confirmação da espécie *Staphylococcus aureus*, e vem sendo utilizada a décadas para este fim, apresentando alta especificidade e sensibilidade, podendo assim, confirmar que as amostras do presente estudo são de fato *Staphylococcus* coagulase-negativo, pois nenhuma amostra (0%) apresentaram à amplificação do gene *nucA* (YAGCI *et al.*, 2013).

O resultado da PCR para o gene *mecA*, responsável pela resistência a meticilina, que confere de forma cruzada resistência a todos os antimicrobianos da classe das penicilinas, foi positivo para todas as 33 amostras (100%) (**Tabela 3**), demonstrando que a resistência a oxacilina apresentada fenotipicamente são mediadas pelo gene *mecA* e não outro mecanismo, e que este perfil de resistência encontrado não eram provenientes de falsos-positivo. Kredit *et al.* (2003), encontrou em isolados de *Staphylococcus* coagulase-negativo vindos da UTI uma prevalência do gene *mecA* de 70 a 92% entre os anos de 1991 e 2001, mostrando que a presença da resistência é uma forte pressão seletiva que vem apenas crescendo nos últimos anos. Um estudo

ainda mais recente feito por Khadra *et al.* (2010) encontrou o gene *mecA* em 28 dos 71 isolados de *Staphylococcus* coagulase-negativo de um hospital da Índia. Já Giusti *et al.* (1999), mostrou que de 152 isolados de *Staphylococcus* coagulase-negativo encontrados em neonatos, 48,6% apresentaram a presença do gene *mecA*, um valor muito inferior ao estudo atual que encontrou o gene *mecA* em 100% das amostras analisadas. Uma possível explicação para os dados encontrados pode ser encontrada no estudo efetuado por Rosa *et al.* (2009), que encontrou o gene *mecA* em 75% das 100 amostras de *Staphylococcus* coagulase-negativo isolados da saliva de profissionais de enfermagem. Estes profissionais por estarem em constante contato com pacientes imunocomprometidos como recém-nascidos necessitados de cuidados especiais podem acabar contaminando os pacientes ou materiais que entraram em contato direto com os mesmos (HIRA *et al.*, 2013).

O gene *femA*, relacionado ao agravamento da resistência a meticilina, e outros antimicrobianos da classe das penicilinas, foi detectado em 3 (9,0%) das 33 amostras (**Tabela 3**), sendo que das 3 positivas para o gene *femA*, 2 (66,6%) eram da espécie *Staphylococcus epidermidis*, e 1 (33,3%) da espécie bacteriana *Staphylococcus saprophyticus*. Moussallem *et al.* (2007), detectou que 40% das amostras de *Staphylococcus* coagulase-negativo *mecA* positivas isoladas de recém-nascidos também eram positivas para o gene *femA*, um número superior ao encontrado no presente estudo que foi de 9,0%. Em um estudo efetuado por VERAS *et al.* (2008) foi observada a presença do gene *femA* em 3 isolados de *Staphylococcus* coagulase-negativo, de um total de 8 amostras, totalizando 37,5% de positividade para o gene *femA*, um valor muito superior ao encontrado no presente estudo. De acordo com Vanuffel *et al.* (1999), o gene *femA* foi inicialmente caracterizado como exclusivo para *S. aureus*, mas com o tempo ele começou a ser encontrado em outras espécies de *Staphylococcus*, como por exemplo *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. hominis* e *S. simulans*, o que corrobora com os achados deste estudo que encontraram a presença do gene *femA* nas espécies *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus*.

Tabela 3. Dados cruzados entre espécies bacterianas e presença dos genes *mecA* e *femA*.

Gene	Espécie Bacteriana					Total
	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. capitis</i>	<i>S. warneri</i>	
<i>mecA</i>	21	6	3	2	1	33
<i>femA</i>	2	-	1	-	-	3

Quanto ao Teste de Aderência em Placa, efetuado para semi-quantificar a produção de biofilme nas amostras, obtivemos um N de valor 0,188. Este valor ao ser comparado com o das amostras individuais resultou no achado de 6 (18,1%) isolados de *Staphylococcus* coagulase-negativo, positivos quanto a produção de biofilme (**Tabela 4**), sendo que destes, 1 (16,6%) apresentou forte produção de biofilme e 5 (83,3%) demonstraram fraca produção de biofilme. Bernardi et al. (2007), analisou a produção de biofilme em 27 amostras de *Staphylococcus* coagulase-negativo isoladas de cateter venoso central e recebeu uma positividade de 81,4%. Porém, de acordo com um estudo de Hira et al. (2007), apenas 48% de suas amostras de *Staphylococcus* coagulase-negativo isoladas de neonatos apresentaram a produção de biofilme, sendo que desses 40% eram fortes produtores e 60% fracos produtores de biofilme. Já QU et al. (2010), efetuou um estudo com isolados de *Staphylococcus* coagulase-negativo retirados de recém-nascidos com peso muito baixo, encontrando produção de biofilme em 91,6% de suas 24 amostras. Os dados apresentados pelo presente estudo mostram que 18,1% das amostras analisadas produzem biofilme, sendo que é sabido que cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativo produtoras de biofilme podem se aderir irreversivelmente a superfícies abióticas e se manterem viáveis mesmo fora de um organismo por um longo período (ZMANTAR et al., 2010).

Tabela 4. Dados moleculares e fenotípicos analisados neste estudo em cada amostra individual.

Amostra	Sítio de Cultura	Espécie	<i>nucA</i>	<i>mecA</i>	<i>femA</i>	Densidade Ótica	Biofilme
1	Hemocultura	<i>S. saprophyticus</i>	-	+	-	2,071	FORTE
2	Hemocultura	<i>S. capitis</i>	-	+	-	0,106	X
3	Hemocultura	<i>S. epidermidis</i>	-	+	-	0,129	X
4	Hemocultura	<i>S. epidermidis</i>	-	+	-	0,135	X
5	Hemocultura	<i>S. epidermidis</i>	-	+	-	0,120	X
6	Hemocultura	<i>S. epidermidis</i>	-	+	-	0,150	X
7	Hemocultura	<i>S. epidermidis</i>	-	+	-	0,142	X
8	Hemocultura	<i>S. epidermidis</i>	-	+	-	0,181	X
9	Ponta de cateter	<i>S. epidermidis</i>	-	+	-	0,158	X
10	Hemocultura	<i>S. epidermidis</i>	-	+	-	0,136	X
11	Hemocultura	<i>S. haemolyticus</i>	-	+	-	0,101	X
12	Hemocultura	<i>S. epidermidis</i>	-	+	-	0,151	X
13	Hemocultura	<i>S. haemolyticus</i>	-	+	-	0,162	X
14	Hemocultura	<i>S. epidermidis</i>	-	+	-	0,172	X
15	Ponta de cateter	<i>S. capitis</i>	-	+	-	0,151	X
16	Hemocultura	<i>S. epidermidis</i>	-	+	-	0,214	FRACA
17	Ponta de cateter	<i>S. epidermidis</i>	-	+	-	0,146	X
18	Ponta de cateter	<i>S. haemolyticus</i>	-	+	-	0,141	X
19	Hemocultura	<i>S. haemolyticus</i>	-	+	-	0,175	X
20	Hemocultura	<i>S. epidermidis</i>	-	+	+	0,182	X
21	Hemocultura	<i>S. epidermidis</i>	-	+	+	0,209	FRACA
22	Hemocultura	<i>S. epidermidis</i>	-	+	-	0,160	X
23	Hemocultura	<i>S. epidermidis</i>	-	+	-	0,253	FRACA
24	Hemocultura	<i>S. saprophyticus</i>	-	+	+	0,134	X
25	Hemocultura	<i>S. saprophyticus</i>	-	+	-	0,146	X
26	Hemocultura	<i>S. epidermidis</i>	-	+	-	0,169	X
27	Ponta de cateter	<i>S. epidermidis</i>	-	+	-	0,145	X
28	Hemocultura	<i>S. haemolyticus</i>	-	+	-	0,189	FRACA
29	Urocultura	<i>S. epidermidis</i>	-	+	-	0,179	X
30	Ponta de cateter	<i>S. warneri</i>	-	+	-	0,114	X
31	Ponta de cateter	<i>S. haemolyticus</i>	-	+	-	0,115	X
32	Hemocultura	<i>S. epidermidis</i>	-	+	-	0,101	X
33	Hemocultura	<i>S. epidermidis</i>	-	+	-	0,199	FRACA

**+”: Positivo; “-“: Negativo; densidade ótica $\leq 0,188$ = Não produtor de biofilme; $0,188 < \text{densidade ótica} \leq 0,376$ = Fraco produtor de biofilme; $0,376 < \text{densidade ótica} \leq 0,752$ = Moderado produtor de biofilme; e densidade ótica $> 0,752$ = Forte produtor de biofilme; FORTE: Forte produção de biofilme; FRACA: Fraca produção de biofilme; X: Não apresenta produção de biofilme.

A amostra 21 da **Tabela 4** apresentou todas as características estudadas neste trabalho, possuindo o gene *mecA*, *femA* e apesar de fraca a produção de biofilme. Todas essas características a torna a linhagem de *Staphylococcus* coagulase-negativo de maior risco potencial para neonatos das amostras analisadas neste estudo, já

que possui resistência a meticilina e outros beta-lactâmicos expressa de forma acentuada e a capacidade de se aderir e colonizar com mais facilidade materiais bióticos e abióticos, que posterior tornam-se vetores para novas infecções ou doenças crônicas (ARDIC *et al.*, 2006; BERNARDI *et al.*, 2007).

6. CONCLUSÃO

Este estudo explorou questões e disponibilizou informações de extrema relevância para o acompanhamento e prevenção de infecções hospitalares, principalmente aquelas direcionadas a recém-nascidos internados em UTI neonatal. A prevalência de amostras encontradas possuindo o gene *mecA* e por vezes acompanhado do gene *femA* e a produção de biofilme, em recém-nascidos é uma questão preocupante, e neste quesito os dados disponibilizados neste trabalho visam auxiliar os profissionais da saúde na criação de novas estratégias e ações de prevenção de forma a aumentar a eficácia do controle e combate sobre as infecções nosocomiais causadas em neonatos.

7. REFERÊNCIAS

PARISI, Joseph T. Coagulase-negative staphylococci and the epidemiological typing of *Staphylococcus epidermidis*. **Microbiological reviews**, v. 49, n. 2, p. 126, 1985.

DE SILVA, G. D. I. et al. The ica operon and biofilm production in coagulase-negative staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 2, p. 382-388, 2002.

KREDIET, Tannette G. et al. Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococci causing sepsis in a neonatal intensive care unit over an 11-year period. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 3, p. 992-995, 2004.

BERNARDI, Adilson César Abreu. Estudo de amostras de *Staphylococcus coagulase-negativa* quanto a formação de biofilme. 2005.

CUNHA, Maria de Lourdes Ribeiro de et al. Estudo da produção de beta-lactamase e sensibilidade às drogas em linhagens de estafilococos coagulase-negativos isolados de recém-nascidos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, p. 281-290, 2002.

RODRIGUES, Robson. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Revista Análises Clínicas**, v. 1, n. 1, p. 21-32, 2017.

D'ANGIO, Carl T. et al. Surface colonization with coagulase-negative staphylococci in premature neonates. **The Journal of pediatrics**, v. 114, n. 6, p. 1029-1034, 1989.

CASSAT, James E.; LEE, Chia Y.; SMELTZER, Mark S. Investigation of biofilm formation in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. In: **Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) protocols**. Humana Press, 2007. p. 127-144.

CHRISTENSEN, Gordon D. et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. **Journal of clinical microbiology**, v. 22, n. 6, p. 996-1006, 1985.

HIRA, Vishal et al. Clinical and molecular epidemiologic characteristics of coagulase-negative staphylococcal bloodstream infections in intensive care neonates. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 26, n. 7, p. 607-612, 2007.

ARCHER, Gordon L.; CLIMO, Michael W. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 10, p. 2231, 1994.

MARSHALL, Steven A. et al. *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from blood stream infections: frequency of occurrence, antimicrobial susceptibility, and molecular (*mecA*) characterization of oxacillin resistance in the SCOPE program. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 30, n. 3, p. 205-214, 1998.

FRANCESCHI, Alessandra Tomazi; DA CUNHA, Maria Luzia Chollopetz. Eventos adversos relacionados ao uso de cateteres venosos centrais em recém-nascidos hospitalizados. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 18, n. 2, p. 196-202, 2010.

LI, X. et al. A study of the regulating gene of femA from methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical isolates. **Journal of International Medical Research**, v. 36, n. 3, p. 420-433, 2008.

KIZAKI, M.; KOBAYASHI, Y.; IKEDA, Y. Rapid and sensitive detection of the femA gene in staphylococci by enzymatic detection of polymerase chain reaction (ED-PCR): comparison with standard PCR analysis. **Journal of Hospital Infection**, v. 28, n. 4, p. 287-295, 1994.

ALBORN JR, William E. et al. **FemA gene of staphylococcus epidermidis, femA protein, and vectors and microorganisms comprising the femA gene**. U.S. Patent n. 5,587,307, 24 dez. 1996.

RAJU, S.; CHANDRAKANTH, R. Kelmani; PATIL, S. A. High-level oxacillin and gentamycin resistance with reduced susceptibility to vancomycin in Staphylococcus aureus-carrying mecA and femA gene complex. **Current microbiology**, v. 54, n. 6, p. 429-434, 2007.

VANNUFFEL, Pascal et al. Molecular characterization of femA from Staphylococcus hominis and Staphylococcus saprophyticus, and femA-based discrimination of staphylococcal species. **Research in microbiology**, v. 150, n. 2, p. 129-141, 1999.

MOUSSALLEM, Bruno Campolino; KURY, Charbell Miguel Haddad; MEDINA-ACOSTA, Enrique. Detecção dos genes mecA e femA, marcadores moleculares de resistência a meticilina, em Staphylococcus spp. isolados de pacientes admitidos em uma Unidade Neonatal de Tratamento Intensivo. **Revista Científica da Faculdade de Medicina de Campos**, v. 2, n. 2, p. 02-09, 2007.

GRECO-STEWART, Valerie S. et al. Biofilm formation by Staphylococcus capitis strains isolated from contaminated platelet concentrates. **Journal of medical microbiology**, v. 62, n. 7, p. 1051-1059, 2013.

ARCIOLA, Carla Renata; CAMPOCCIA, Davide; MONTANARO, Lucio. Detection of biofilm-forming strains of Staphylococcus epidermidis and S. aureus. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 2, n. 5, p. 478-484, 2002.

CULLER, Hebert Fabricio. **Formação de biofilme por Escherichia coli enteropatógena atípica**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

COSTA, Daniela Gomez et al. Acalasia na doença de Chagas é diferente de acalasia idiopática?: Experiência do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. **Revista HCPA. Porto Alegre. Vol. 22, n. 2 (ago. 2002), p. 5-10**, 2002.

MIURA, Ernani. Infecção pelo estafilococo coagulase-negativa em recém-nascidos: mito ou verdade?. **Jornal de pediatria. Rio de Janeiro. Vol. 78, n. 4 (2002), p. 257-258**, 2002.

IORIO, Natalia Lopes Pontes et al. Characteristics related to antimicrobial resistance and biofilm formation of widespread methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* ST2 and ST23 lineages in Rio de Janeiro hospitals, Brazil. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 72, n. 1, p. 32-40, 2012.

DE GIUSTI, M. et al. Phenotypic detection of nosocomial *mecA*-positive coagulase-negative staphylococci from neonates. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 44, n. 3, p. 351-358, 1999.

BAPTISTA, Maria Galvão de Figueiredo Mendes et al. **Mecanismos de resistência aos antibióticos**. 2013. Dissertação de Mestrado.

MELO, Poliana de Castro et al. Estudo fenotípico e genotípico da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isolados dos casos de mastite subclínica bovina. 2008.

SECCHI, Carina et al. Identification and detection of methicillin resistance in non-epidermidis coagulase-negative staphylococci. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 4, p. 316-320, 2008.

PALOS, Marinésia Aparecida Prado et al. Microbiota das mãos de mães e de profissionais de saúde de uma maternidade de Goiânia. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 11, n. 3, 2009.

MURRAY, Patrick; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. **Microbiología médica**. Elsevier Brasil, 2015.

PALOMARES, Concepción et al. Rapid detection and identification of *Staphylococcus aureus* from blood culture specimens using real-time fluorescence PCR. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 45, n. 3, p. 183-189, 2003.

RANI, Nidhi et al. Quercetin 3-O-rutinoside mediated inhibition of PBP2a: computational and experimental evidence to its anti-MRSA activity. **Molecular BioSystems**, v. 10, n. 12, p. 3229-3237, 2014.

KACICA, Marilyn A. et al. Prevention of gram-positive sepsis in neonates weighing less than 1500 grams. **The Journal of pediatrics**, v. 125, n. 2, p. 253-258, 1994.

GUIMARÃES, Gabriela et al. Caracterização fenotípica, produção de biofilme e resistência aos antimicrobianos em isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de casos de mastite em bovinos e bubalinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 12, p. 1219-1224, 2012.

ZMANTAR, Tarek et al. A microtiter plate assay for *Staphylococcus aureus* biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation. **The new microbiologica**, v. 33, n. 2, p. 137, 2010.

CUNHA, Maria de Lourdes Ribeiro de et al. Significância clínica de estafilococos coagulase-negativa isolados de recém-nascidos. **Jornal de Pediatria**, p. 279-288, 2002.

KLOOS, Wesley E.; BANNERMAN, Tammy L. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. **Clinical microbiology reviews**, v. 7, n. 1, p. 117-140, 1994.

Rapini L.S et al. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de Staphylococcus sp. isoladas de queijo tipo coalho. **Arq. Bras. Med**, v. 56, n. 1, p. 130-133, 2004.

BERNARDI, ADILSON CÉSAR ABREU; PIZZOLITTO, Elisabeth Loshchagin; PIZZOLITTO, Antonio Carlos. Detecção da produção de slime por estafilococos coagulase-negativa isolados de cateter venoso central. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 57-66, 2007.

D'AZEVEDO, Pedro A. et al. Suscetibilidade à novobiocina na identificação de amostras de Staphylococcus coagulase negativos (SCoN) isolados de hemoculturas. **RBAC**, v. 39, n. 4, p. 303-304, 2007.

SILBERT, Suzane et al. Staphylococcus sp. coagulase-negativa em hemoculturas de pacientes com menos de sessenta dias de idade: infecção versus contaminação. **J Pediatr (Rio J)**, v. 73, n. 3, p. 161-5, 1997.

BECKER, Karsten; HEILMANN, Christine; PETERS, Georg. Coagulase-negative staphylococci. **Clinical microbiology reviews**, v. 27, n. 4, p. 870-926, 2014.

MACHADO, Alice Beatriz Mombach Pinheiro. Resistência à metilina mediada pelo gene mecA nos Staphylococcus spp coagulase negativa. 2007.

CUNHA, Maria de Lourdes Ribeiro de et al. Significância clínica de estafilococos coagulase-negativa isolados de recém-nascidos. **Jornal de Pediatria**, p. 279-288, 2002.

CORDEIRO, Denise Nogueira da Gama. Significância clínica da presença de Staphylococcus coagulase-negativo isolados de recém-nascidos de uma unidade de terapia intensiva neonatal em Brasília-DF. 2007.

ARDIC, Nurittin et al. Investigation of aminoglycoside modifying enzyme genes in methicillin-resistant staphylococci. **Microbiological research**, v. 161, n. 1, p. 49-54, 2006.

AZIMIAN, Amir et al. Genetic characterization of a vancomycin-resistant Staphylococcus aureus isolated from respiratory tract of a hospitalized patient in a university hospital in north east of Iran. **Journal of clinical microbiology**, p. JCM. 01727-12, 2012.

KIM, C.-H. et al. Optimization of the PCR for detection of Staphylococcus aureus nuc gene in bovine milk. **Journal of dairy science**, v. 84, n. 1, p. 74-83, 2001.

ZMANTAR, Tarek et al. A microtiter plate assay for Staphylococcus aureus biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation. **The new microbiologica**, v. 33, n. 2, p. 137, 2010.

ROSA, Juliana de Oliveira et al. Detecção do gene *mecA* em estafilococos coagulase negativa resistentes à oxacilina isolados da saliva de profissionais da enfermagem. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 4, p. 398-403, 2009.

SADER, Helio S. et al. SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p. 25-79, 2004.

LAMERS, Ryan P. et al. Phylogenetic relationships among *Staphylococcus* species and refinement of cluster groups based on multilocus data. **BMC evolutionary biology**, v. 12, n. 1, p. 171, 2012.

GASPAR, Livia Maria de Amorim Costa. Desenvolvimento de nanocarreadores poliméricos para a desestruturação de biofilmes de agentes patogênicos. 2018.

FONSECA, Joana Filipa Sochas Germano da. **Avaliação da capacidade de adesão e produção de biofilme em enterococos clínicos e alimentares**. 2010. Tese de Doutorado.

STEPANOVIĆ, Srdjan et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of microbiological methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000.

MOTA, Rinaldo Aparecido et al. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

SAMBROOK, J., GREEN, M. R. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2012.

STAPHYLOCOCCUS spp: Importância clínica. 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controlere/rede_rm/cursos/boas_praticas/mo- dulo4/imp_sta.htm>. Acesso em: 09 nov. 2018.

ANVISA. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Pediatria: prevenção e controle de infecção hospitalar**. - Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

CUSTÓDIO, Janaína et al. Avaliação microbiológica das mãos de profissionais da saúde de um hospital particular de Itumbiara, Goiás. **Revista de Ciências Médicas**, v. 18, n. 1, 2012.

BARBIER, François et al. Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the community: high homology of SCCmec IVa between *Staphylococcus epidermidis* and major clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Journal of infectious diseases**, v. 202, n. 2, p. 270-281, 2010.

SAHEBEKHTIARI, Navid et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk of bovine subclinical mastitis in Tehran and Mashhad. **Acta microbiologica et immunologica Hungarica**, v. 58, n. 2, p. 113-121, 2011.

SILVA, Andre Ricardo Araujo da et al. Infecções relacionadas à assistência à saúde por *Staphylococcus coagulase negativa* em unidade de terapia intensiva neonatal. **Rev Bras Ter Intensiva**, v. 25, n. 3, p. 239-44, 2013.

ROHDE, Holger et al. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. **European journal of cell biology**, v. 89, n. 1, p. 103-111, 2010.

CHLEBOWICZ, Monika Anna. **The influence of mobile genetic elements on fitness, virulence and drug resistance of *Staphylococcus aureus***. 2012.

PINTO, Jaqueline Becker. *Staphylococcus coagulase negativo não epidermidis* isolados de cateter venoso central: biofilme e resistência. 2010.

TORTORA, Gerard J.; CASE, Christine L.; FUNKE, Berdell R. **Microbiologia-12ª Edição**. Artmed Editora, 2016.

ELZI, L. et al. How to discriminate contamination from bloodstream infection due to coagulase-negative staphylococci: a prospective study with 654 patients. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 9, p. E355-E361, 2012.

WIDERSTRÖM, M. et al. Coagulase-negative staphylococci: update on the molecular epidemiology and clinical presentation, with a focus on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus*. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 31, n. 1, p. 7-20, 2012.

YAGCI, S. et al. Prevalence and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis patients. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 1, p. 77-84, 2013.

KHADRI, Habeeb; ALZOHAIRY, Mohammad. Prevalence and antibiotic susceptibility pattern of methicillin-resistant and coagulase-negative staphylococci in a tertiary care hospital in India. **International Journal of Medicine and Medical Sciences**, v. 2, n. 4, p. 116-120, 2010.

HIRA, Vishal et al. Colonization dynamics of antibiotic-resistant coagulase-negative *Staphylococci* in neonates. **Journal of clinical microbiology**, v. 51, n. 2, p. 595-597, 2013.

ANDERSON-BERRY, Ann et al. Risk factors associated with development of persistent coagulase-negative staphylococci bacteremia in the neonate and associated short-term and discharge morbidities. **Neonatology**, v. 99, n. 1, p. 23-31, 2011.

VERAS, Jamaira Fereira et al. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 4, p. 410-415, 2008.

QU, Yue et al. Antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from very low birth weight babies: comprehensive comparisons of bacteria at different stages of biofilm formation. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 9, n. 1, p. 16, 2010.

MANANDHAR, Sarita et al. Biofilm Producing Clinical Staphylococcus aureus Isolates Augmented Prevalence of Antibiotic Resistant Cases in Tertiary Care Hospitals of Nepal. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2749, 2018.

WOLLER III, John A. et al. Predictors of Surgical Intervention in Dialysis Patients With Infective Endocarditis. In: **Open Forum Infectious Diseases**. US: Oxford University Press, 2018. p. ofy265.

YE, Xiaohua. a molecular epidemiological study of methicillin-resistant and methicillin-susceptible Staphylococcus aureus contamination in the airport environment. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 2363-2375, 2018.

DORNELES, Elaine MS et al. Genetic diversity and antimicrobial resistance in Staphylococcus aureus and coagulase-negative Staphylococcus isolates from bovine mastitis in Minas Gerais, Brazil. **MicrobiologyOpen**, p. e736, 2018.

MIRAGAIA, Maria. Factors contributing to the evolution of mecA-mediated β -lactam resistance in staphylococci: update and new insights from whole genome sequencing (WGS). **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2723, 2018.