

Renata Beatriz Silva

Estafilococos Coagulase Negativos isolados de pacientes com infecção
de corrente sanguínea: aspectos microbiológicos e imunológicos.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Patologia Humana, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Gonçalves de Oliveira

Uberaba-MG

2014

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

S583e Silva, Renata Beatriz Silva
Estafilococos coagulase negativos isolados de pacientes com infecção
de corrente sanguínea: aspectos microbiológicos e imunológicos / Renata
Beatriz Silva. -- 2014.
96 f. : il., fig., graf., tab.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do
Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2014
Orientadora: Profª Drª Adriana Gonçalves de Oliveira

1. Infecção. 2. *Staphylococcus*. 3. Fatores de virulência. I. Oliveira,
Adriana Gonçalves de. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III.
Título.

CDU 616-022.1

*Mas ajuntai tesouros no céu, onde nem a
traça nem a ferrugem consomem, e onde os ladrões
não roubam nem assaltam.
Porque onde estiver o vosso tesouro, aí estará
também o vosso coração”.*

(Mt 6, 20-21)

Dedico este trabalho ao meu sobrinho, Cauã Henrique, como incentivo para os seus estudos. Que um dia ele possa descobrir sua vocação e possa dedicar-se a ela, buscando não só o conhecimento, mas acima de tudo a sabedoria.

AGRADECIMENTO A DEUS E AOS PAIS

"Um pouco de ciência nos afasta de Deus.

Muito, nos aproxima."

(Louis Pasteur)

Agradeço a Deus, Pai de infinita bondade, pelo dom da minha vida.

A Ele sou grata pela minha vocação e por, a cada dia, seu Espírito Santo renovar em mim os dons da Fortaleza, Ciência e Entendimento, para que eu pudesse perseverar em minha trajetória de estudos e de formação profissional, buscando pouco a pouco cultivar o dom da Sabedoria.

Agradeço a Ele, que em seu amor infinito concedeu-me o privilégio de ser gerada e educada pelos melhores pais que Ele já criou.

Agradeço a minha mãe, Sandra, e ao meu pai, Renair, por estarem sempre ao meu lado sendo a prova mais concreta de que Deus nos ama incondicionalmente, que está sempre conosco e nos leva nos braços, quando não podemos seguir sozinhos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.

(Cora Coralina)

À minha orientadora, Profa. Dra. Adriana Gonçalves de Oliveira, pela oportunidade que me foi dada de voltar a trabalhar com a Microbiologia. Por compartilhar seu conhecimento. Mas acima de tudo, por compreender cada um de seus orientados, não apenas na condição de estudantes, mas como pessoas. Por acreditar em nossa capacidade de alcançar nossos objetivos, mesmo diante dos limites ou das adversidades que encontramos durante os anos de estudo.

Ao Prof. Luiz Cosme Cotta Malaquias, pela oportunidade de aprendizado e por disponibilizar a realização dos nossos últimos experimentos no laboratório de cultura de células da Universidade Federal de Alfenas. Mais do que um espaço físico para o desenvolvimento de atividades de pesquisa, encontramos o acolhimento que só as pessoas de espírito nobre conseguem oferecer.

AGRADECIMENTOS

Aos professores Anderson Assunção e Paulo Roberto, pela colaboração dada a este trabalho e aos demais desenvolvidos durante o tempo de doutorado.

Aos professores Jorge Kleber Chavasco, Marcos José Marques e Cássia Avelino Carneiro, pela disponibilidade em auxiliar-nos em Alfenas.

Pelos amigos da UFTM – Prof André Domingues e Prof Afonso Pelli, Fernanda, Kennio, Leonardo, Maxelle, Patricia, Natália, Larissa, Jaqueline, Beatriz, Elisson, Ana Carolina, Aline, Diego, Rodrigo, Igor, Celso, Luciene, Sônia, Sueli, Miguela.

Aos tripulantes do voo ECN, Felipe, Luiza, Roberta e Fernando: “sempre prontos para decolar.”

Aos amigos do laboratório de Microbiologia do SPC HC-UFTM: Lurdinha, Keila, Geane e *Marcelobacter baumanii*.

Aos amigos da UNIFAL-MG Vanderlei, Elenice, Marta, Fran, Marcelo, Toninho, às Raissas e aos professores Luiz Felipe, Amanda, Marília e Daniela, pelo acolhimento.

Às minhas amigas Mônica e Fernanda, pelo incentivo e auxílio na impressão do material para a banca.

Aos meus tios Antônio e Vera, meus primos Raphael, Yan Felipe, Wesley, Katiane, Ana Luiza e meu afilhado Pedro Lucas, pelo carinho ao me acolherem em sua casa.

Este trabalho foi realizado com os recursos financeiros da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba (FUNEPU), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

RESUMO

Estafilococos coagulase negativos (ECN) são os agentes mais frequentes de infecção de corrente sanguínea (ICS) e a resistência a antimicrobianos e a adesão bacteriana a biomateriais contribuem para a sua virulência. O objetivo deste trabalho foi estudar os aspectos microbiológicos e imunológicos dos ECN causadores de ICS em pacientes hospitalizados no HC-UFTM. As espécies foram identificadas por testes bioquímicos, confirmadas por PCR para os genes *sep*, *mva* e *fbl*. A avaliação da resistência a antimicrobianos foi avaliada por microdiluição e a presença do gene *mecA* por PCR. A produção de biofilme foi verificada por espectrofotometria e pesquisa dos genes *icaAB* e *atlE*. A indução de TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 foi avaliada pela estimulação de PBMCs humanas com bactérias inativadas por calor e posterior dosagem por citometria de fluxo. Foram analisados 90 isolados de hemoculturas (n=68) e suabes (n=22), com 78,90% (n=71) *S. epidermidis*, 8,89% (n=8) *S. haemolyticus*, 3,33% (n=3) *S. saprophyticus*, 2,22% (n=2) *S. cohnii*, 2,22% (n=2) *S. capitis*, 2,22% (n=2) *S. lugdunensis*, 1,11% (n=1) *S. hominis* e 1,11% (n=1) de *S. xylosus*. Todas as amostras foram resistentes a oxacilina, com CIM $\geq 256\mu\text{g/mL}$ em 31,11% delas, apenas uma amostra foi negativa para o gene *mecA* e todas sensíveis à vancomicina, com CIM de $4\mu\text{g/mL}$ em 65,56%. Revelaram-se produtoras de biofilme 61,76% das amostras causadoras de ICS e 43,64% das colonizantes, sendo 30,83% das amostras do primeiro grupo e 40,91% do segundo com produção intensa ($\text{DO} > 3,000 \text{ UB}$) ($p < 0,01$). Produção intensa e estatisticamente significativa ($p < 0,01$) ocorreu em 36,36% dos *S. epidermidis*. Foram positivos para *icaAB* 54,44% dos ECN e 76,67% para *atlE*, com diferença estatística significativa entre as espécies ($p < 0,0001$). Níveis de IL-12 foram menores para ECN infectantes e significativamente maiores ($p < 0,05$) para *S. haemolyticus*. Níveis significativamente maiores de IL-6 foram induzidos por *S. epidermidis*. Pode-se concluir que os ECN agentes de ICS apresentam *S. epidermidis* como espécie mais frequente; elevado padrão de resistência a oxacilina, mas sensibilidade à vancomicina; produção de biofilme, mas não essencialmente relacionada aos genes *icaAB* e *atlE* e as amostras mais virulentas foram capazes de gerar maior indução de mediadores da resposta imunológica.

Palavras-chave: Infecção. *Staphylococcus*. Fatores de virulência.

ABSTRACT

Coagulase-negative staphylococci (CNS) are the most frequent agents of bloodstream infection (BSI) and resistance to antimicrobial agents and bacterial adhesion to biomaterials contribute to its virulence. The objective of this work was to study the microbiological and immunological aspects of ECN causing ICS in patients hospitalized in HC-UFTM. The species were identified by biochemical tests and confirmed by PCR for *sep*, *mva* and *fbl* genes. Evaluation of antimicrobial resistance was done by microdilution tests and presence of *mecA* gene by PCR. Biofilm production was verified by spectrophotometry and research of *icaAB* and *atlE* genes. Induction of TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 and IL-12 was assessed by stimulating human PBMC with heat-inactivated bacteria and subsequent determination by flow cytometry. A total of 90 isolates from blood cultures (n = 68) and swabs (n = 22) were analyzed, with 78.90% (n = 71) *S. epidermidis*, 8.89% (n = 8) *S. haemolyticus*, 3.33% (n = 3) *S. saprophyticus*, 2.22% (n = 2) *S. cohnii*, 2.22% (n = 2) *S. capitis*, 2.22% (n = 2) *S. lugdunensis*, 1, 11% (n = 1) *S. hominis* and 1.11% (n = 1) *S. xylosus*. All samples were resistant to oxacillin, with MICs $\geq 256\mu\text{g/mL}$ in 31.11% of them, only one sample was negative for the *mecA* gene and all were sensitive to vancomycin, with MIC $4\mu\text{g/mL}$ at 65.56%. Biofilm production was observed in 61.76% of the samples causing ICS and 43.64% of colonizing, and 30.83% of the samples in the first group and 40.91% in the second showed intense production (OD > 3.000 BU) (p <0.01). Strong and statistically significant (p <0.01) production occurred in 36.36% of *S. epidermidis*. The *icaAB* gene was positive in 54.44% of ECN and *atlE* in 76.67%, with a statistically significant difference between species (p < 0.0001). Levels of IL-12 were smaller for infective CNS and significantly greater (p < 0.05) for *S. haemolyticus*. Significantly higher levels (p < 0.05) of IL-6 were induced by *S. epidermidis*. It can be concluded that ECN agents of ICS feature *S. epidermidis* as the most frequent species; High levels of oxacillin resistance, but sensitivity to vancomycin; biofilm production, but not essentially related to *icaAB* and *atlE* genes and the most virulent strains were able to generate greater induction of immune response mediators.

Keywords: Infection. *Staphylococcus*. Virulence factors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Espécies de ECN isoladas de pacientes com IPCS internados em um hospital público de ensino, no período de maio de 2010 a julho de 2012.	51
Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose para identificação genotípica de espécies de ECN isoladas de pacientes com IPCS internados em um hospital público de ensino, no período de maio de 2010 a julho de 2012.	52
Figura 3 – Perfil de resistência aos antimicrobianos oxacilina e vancomicina por ECN de pacientes com IPCS, internados em um hospital público de ensino, no período de maio de 2010 a julho de 2012.	53
Figura 4 – Formação de biofilme por ECN isolados de pacientes com IPCS, internados em um hospital público de ensino, no período de maio de 2010 a julho de 2012.	54
Figura 5 – Formação de biofilme por <i>S. epidermidis</i> isolados de pacientes com infecção primária de corrente sanguínea, internados em um hospital público de ensino, no período de maio de 2010 a julho de 2012.	55
Figura 6 – Relação entre a produção de biofilme e a CIM para oxacilina para ECN isolados de pacientes com IPCS, internados em um hospital público de ensino, no período de maio de 2010 a julho de 2012.	56
Figura 7 – Perfil de estimulação da produção de mediadores da resposta imunológica por ECN isolados de pacientes com IPCS, internados em um hospital público de ensino, no período de maio de 2010 a julho de 2012.	60
Figura 8 – Relação entre a formação de biofilme e a indução de mediadores da resposta imunológica por amostras de ECN isolados de pacientes com IPCS, internados em um hospital público de ensino, no período de maio de 2010 a julho de 2012.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados para identificação de espécies e estudo genotípico da produção de biofilme e resistência a oxacilina em amostras de <i>Estafilococos Coagulase Negativos</i>	43
Tabela 2 – Perfil microbiológico de ECN isoladas de pacientes com IPCS, internados em um hospital público de ensino, no período de maio de 2010 a julho de 2012.	54
Tabela 3 – Concentrações de mediadores da resposta imunológica obtida pela estimulação de células mononucleares com amostras de ECN, isoladas de pacientes com IPCS, internados em um hospital público de ensino, no período de maio de 2010 a julho de 2012.	57
Tabela 4 – Concentrações de mediadores da resposta imunológica obtida pela estimulação de células mononucleares com amostras de ECN, isoladas de pacientes com IPCS, internados em um hospital público de ensino, no período de maio de 2010 a julho de 2012.	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC: amostras colonizantes

AMP: *antimicrobial peptides* (peptídeos antimicrobianos)

ATCC: *American Type Culture Collection*

AtlE: autolysin E (autolisina E)

BAI: *biomaterial associated infection* (infecção associada a biomaterial)

BHI: *Brain Heart Infusion* (infusão de cérebro e coração)

CCIH: Comissão de Controle de Infecção Hospitalar

CIM: concentração inibitória mínima

CS: corrente sanguínea

DNA: *deoxiribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

D.O.: densidade óptica

ECN: Estafilococos Coagulase Negativos

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

HCl: cloreto de hidrogênio

HC-UFTM: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Ica: *intercelular adhesin* (adesina intercelular)

IH: Infecção hospitalar

IL: interleucina

INF: interferon

ICS: infecção de corrente sanguínea

IPCS: infecção primária de corrente sanguínea

ITU: infecção do trato urinário

µg: micrograma

µL: microlitro

mL: mililitro

mM: mili Molar

MH: Mueller-Hinton

NaCl: cloreto de sódio

nm: nanômetro

PAMP: *pathogenity associated molecular partterns* (padrões moleculares associados a patógenos)

pb: par de base

PBMC: *periphery blood mononuclear cells* (células mononucleares do sangue periférico)

PCR: *polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

PHA: fiohemaglutinina

pg: picograma

PGA: *poly-γ-glutamic acid* (ácido poli-γ-glutâmico)

pH: potencial de hidrogênio

PIA: *polysaccharide intercellular adhesin* (adesina polissacarídica intercelular)

PSM: *phenol solube modulins* (modulinas solúveis em fenol)

rpm: rotações por minuto

RPMI: meio de cultura celular *Roswell Park Memorial Institute*

SBF: soro bovino fetal

Silva, R.B. *Estafilococos Coagulase Negativos isolados de pacientes com infecção de corrente sanguínea: aspectos microbiológicos e imunológicos*, 2014.

SCC: *Staphylococcal Cassette Chromosome* (cassete cromossômico estafilococico)

SPC: Serviço de Patologia Clínica

TLR: receptores *toll-like*

TNF: *tumor necrosis factor* (fator de necrose tumoral)

TSB: *Trypticase Soy Broth*

U: unidade internacional

U.B.: unidade de biofilme

UV: ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

α : alfa

β : beta

$^{\circ}$ C: graus Celsius

$\geq$: maior e igual

$\pm$: mais ou menos

$>$: maior que

$\leq$: menor e igual

$<$: menor que

μ : micro

%: por cento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 HIPÓTESE	20
3 OBJETIVO GERAL	21
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4 JUSTIFICATIVA	22
5 REVISÃO DE LITERATURA	23
5.1 ASPECTOS HISTÓRICOS	23
5.2 O GÊNERO <i>STAPHYLOCOCCUS</i>	24
5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ECN	24
5.4 COLONIZAÇÃO	25
5.5 INFECÇÕES DE CORRENTE SANGUÍNEA	25
5.6 ESPÉCIES DE ECN	26
5.7 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS	29
5.7.1 Resistência a metilina/oxacilina	30
5.7.2 Resistência a vancomicina	30
5.8 FORMAÇÃO DE BIOFILME	31
5.9 RESPOSTA IMUNOLÓGICA A INFECÇÕES POR ECN	33
5.9.1 Ativação do processo de fagocitose	34
5.9.2 Citosinas e quimiocinas envolvidas na resposta a ECN	34

6 MATERIAL E MÉTODOS	38
6.1 APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	38
6.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO DE PACIENTES	38
6.3 OBTENÇÃO DE DADOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS DOS PACIENTES	39
6.4 COLETA DE AMOSTRAS	39
6.4.1 Hemoculturas	39
6.4.2 Suabes da pele e mucosa	39
6.5 ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS	40
6.6 AMOSTRAS DE REFERÊNCIA	40
6.7 IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DAS ESPÉCIES DE ECN	40
6.8 AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DA FORMAÇÃO DE BIOFILME	42
6.9 AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DA RESISTÊNCIA A OXACILINA E VANCOMICINA.....	43
6.9.1 Pesquisa de resistência heterogênea à vancomicina	44
6.10 AVALIAÇÃO GENOTÍPICA DO PERFIL MICROBIOLÓGICO DE ECN	45
6.10.1 Extração do DNA	45
6.10.2 Reação de amplificação	45
6.10.3 Análise dos produtos das PCRs	46
6.11 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA INDUÇÃO DE MEDIADORES DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA	47
6.11.1. Inativação das células bacterianas	47
6.11.2 Obtenção de amostras de sangue periférico	48
6.11.3 Isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)	48
6.11.4 Ensaio de estimulação de leucócitos	49
6.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
7 RESULTADOS	50
7.1 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES	50
5.2 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS	51
7.3 FORMAÇÃO DE BIOFILME	54
7.4 INDUÇÃO DE MEDIADORES DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA	60
8 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	62
9 CONCLUSÕES	80
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

1 INTRODUÇÃO

O reconhecimento da importância clínica de várias espécies de estafilococos coagulase negativos (ECN) diferentes de *S. epidermidis* tem aumentado nos últimos anos. Elas também fazem parte da microbiota da pele e mucosas humanas. Estes isolados estão associados a infecções hospitalares (IH) como endocardites, infecções associadas a cateteres intravasculares e próteses e uma variedade de infecções pós-operatórias, além de infecções oculares (MAKKI et al., 2011).

Várias técnicas têm sido usadas para caracterizar cepas de ECN responsáveis por infecções de corrente sanguínea e infecções relacionadas a dispositivos médicos, para determinar a origem clonal e para distinguir organismos de significado clínico daqueles comensais ou contaminantes (SLOOS et al., 2000).

A identificação de ECN a nível de espécies pode mudar o diagnóstico e a conduta terapêutica, já que isolados incomuns tem sido considerado agentes causais e padrões não usuais de resistência a antimicrobianos tem sido revelado (HWANG et al., 2011). Porém, o mecanismo de virulência mais importante em ECN é a habilidade de formar biofilme na superfície de dispositivos médicos internos. O estudo deste mecanismo teve início com *S. epidermidis*, que é utilizado como modelo para outras espécies (MØRETRØ et al., 2003).

Infecções por *S. epidermidis* podem levar a sepse e choque tóxico e a ocorrência de bacteremias por este microrganismo tem aumentado. Na sepse por *S. aureus* também foram induzidas disfunções hemodinâmicas como pressão arterial média diminuída, fração de ejeção reduzida e índice de volume sistólico aumentado ou normal (WAKABAYASHI et al., 1991). Diferenças específicas para cada cepa e cada espécie reveladas na capacidade indutora das citocinas por *Staphylococcus* revelaram a importância da virulência multifatorial destes microrganismos e sugerem que o padrão e o nível de resposta imunológica podem ser altamente variáveis na infecção (MEGYERI et al., 2002).

Apesar da complexidade da patofisiologia da inflamação sistêmica e da disfunção de órgãos, o fator de necrose tumoral TNF tem sido apontado como uma citocina central no choque séptico. Níveis plasmáticos elevados de TNF α foram observados em pacientes com

bacteremia por Gram positivos e foram observados efeitos deletérios no desenvolvimento da síndrome do choque séptico (MIRA et al., 1999).

Níveis elevados de IL-1 sugerem um papel importante para a resposta do hospedeiro a vários biomateriais na patogênese das infecções associadas a biomateriais, ao invés do grau de aderência da bactéria ao biomaterial. A inibição local da atividade da IL-1 poderia ser benéfica ao hospedeiro como um adjuvante terapêutico para as infecções associadas com biomateriais (BOELEN *et al*, 2000).

As infecções primárias de corrente sanguínea (IPCS) por estafilococos coagulase negativos envolvem, assim, a participação de fatores microbiológicos, relacionados a virulência bacteriana, e fatores imunológicos, relacionados a resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro na infecção.

Para análise destes fatores, neste trabalho, foram utilizadas avaliações fenotípicas e genotípicas para determinação da espécie, resistência a antimicrobianos e fatores de virulência, além da avaliação *in vitro* da produção de mediadores da resposta imunológica, por células mononucleares humanas (CMH) estimuladas com células inativadas de ECN.

2 HIPÓTESE

Esperamos encontrar diferenças nas características fenotípicas e genotípicas dos ECN – como a resistência a antimicrobianos, produção de biofilme e indução de elementos envolvidos nos mecanismos de defesa do hospedeiro – entre as diversas espécies ou entre amostras de origens distintas, que se relacionam-se entre si no estado de membros da microbiota e no desenvolvimento de IPCS por estes microrganismos.

3. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve por objetivo geral estudar os aspectos microbiológicos e imunológicos dos estafilococos coagulase negativos causadores de infecção primária de corrente sanguínea em pacientes hospitalizados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (HC-UFTM).

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos traçados neste estudo foram:

- Caracterizar as amostras de ECN quanto a espécie e susceptibilidade aos antimicrobianos oxacilina e vancomicina;
- Avaliar a produção de biofilme por amostras de ECN;
- Verificar a produção *in vitro* de mediadores da resposta imunológica (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12), envolvidas na infecção por ECN;
- Relacionar o perfil microbiológico de amostras de ECN com seu perfil indutor de citocinas.

4 JUSTIFICATIVA

O presente estudo justifica-se diante da ocorrência de isolados de ECN como agentes mais frequentes de infecções de corrente sanguínea no ambiente hospitalar, da multirresistência a antimicrobianos por estes microrganismos e sua capacidade de formar biofilme, envolvendo mecanismos multifatoriais. Não obstante, os estudos da resposta imunológica a estas infecções apresentam resultados diversos. Assim, a análise das características microbiológicas das espécies de ECN isoladas como agentes causais de infecções de corrente sanguínea poderão auxiliar no conhecimento do perfil epidemiológico destas bactérias no ambiente hospitalar, permitindo ações de prevenção e controle de infecções hospitalares. Além disso, a avaliação da produção de mediadores da resposta imunológica a estas infecções disponibiliza dados para a compreensão da relação dos ECN com o hospedeiro, como agentes etiológicos de infecções ou membros da microbiota natural.

5 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão da literatura apresentada neste trabalho ofereceu as bases teóricas para o desenvolvimento do estudo do perfil microbiológico das amostras de ECN isoladas dos pacientes com infecção de corrente sanguínea, bem como do estudo do perfil de mediadores da resposta imunológica gerado pela estimulação de células mononucleares humanas com estas amostras.

5.1 ASPECTOS HISTÓRICOS

Na década de 1870, o cirurgião Alexander Ogston observou em uma amostra de pus, coletada do fleboma eripielatóide da perna de um garoto de 12 anos, “lindos emaranhados, tufos e cadeias de microrganismos redondos e em grande número, que apareciam claros e distintos entre o pus e debris, todos corados com solução violeta de anilina”. Posteriormente, através de estudos adicionais, observou que a inoculação destes microrganismos causavam abscessos, que não se desenvolviam quando o pus contendo cocos era previamente tratado com fenol e aquecido; que uma dose de inóculo causava sintomas hematológicos, mas doses menores causavam apenas reações locais; que havia diferenças na resistência natural e individual a infecção por doses iguais inoculadas; e que alguns cocos não apresentavam a propriedade de causar supuração (SMITH, 1968).

Ogston defendia a ideia de que sepse e piemia não eram doenças hematológicas, como se acreditava, mas que o sangue era apenas o veículo para a disseminação de microrganismos patogênicos, que se desenvolviam em focos locais. A variação no curso e evolução da sepse e piemia dependiam do organismo, do órgão ou estrutura infectada e da susceptibilidade do indivíduo afetado (SMITH, 1968).

Em 1882, Ogston denominou os *Micrococcus* arranjados em forma de cachos de uvas *Staphylococcus* e mostrou que eles causavam doenças de aspectos diferentes das causadas pelos *Streptococcus*, arranjados em cadeias ou em forma de colar. E notou ainda que os *Staphylococcus* patogênicos causavam coagulação do plasma e que, em várias condições de

cultura, produziam pigmento amarelo ou laranjado. Em função desta patogenicidade, os microorganismos foram inicialmente chamados *Staphylococcus pyogenes* (SMITH, 1968).

5.2 O GÊNERO *STAPHYLOCOCCUS*

Os *Staphylococcus* pertencem família Staphylococcaceae e à microscopia apresentam-se como cocos isolados ou agrupados, com diâmetro de 0,5 a 1,5 µm e coloração violeta, quando corados pelo método de coloração de Gram. Estes microrganismos produzem a enzima catalase e são divididos em dois grupos quanto a capacidade de coagular o plasma, através da produção de coagulase (WINN et al., 2008).

Staphylococcus aureus apresenta teste positivo de coagulase em tubo e lâmina. *Staphylococcus hyicus*; *S. lutrae*; *S. intermedius*; *S. pseudintermedius*; *S. schleiferi* subsp. *coagulans* e *S. delphini* são positivos para o teste de coagulase e as demais espécies conhecidas são negativas para as pesquisas *in vitro* de coagulase (WINN et al., 2008).

5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ECN

Os ECN eram anteriormente reconhecidos como contaminantes de culturas, entretanto, estes microrganismos emergiram como patógenos de significado clínico, especialmente em pacientes imunocomprometidos, neonatos prematuros em unidades de terapia intensiva e em pacientes que passaram por procedimentos médicos complexos envolvendo a implantação de próteses ou dispositivos cardíacos ou cateteres (HWANG *et al.*, 2011).

A patogenicidade dos ECN pode relacionar-se à presença ou ausência de genes envolvidos no processo de virulência, como o operon adesina intercelular (*intercellular adesine*, *icaADBC*), o gene *atlE*, que codifica a proteína de superfície celular que liga-se a vitronectina na adesão inicial, e o gene *mecA*, que promove a síntese da proteína de ligação a penicilina PBP-2a, em cepas resistentes a meticilina (SHARMA et al., 2011).

Silva, R.B. *Estafilococos Coagulase Negativos isolados de pacientes com infecção de corrente sanguínea: aspectos microbiológicos e imunológicos*, 2014.

Os ECN são os microrganismos mais isolados em hemoculturas de pacientes internados em ambiente hospitalar, especialmente nos setores em que o uso de cateteres venosos centrais é mais frequente. Entre eles, *Staphylococcus epidermidis* é a espécie mais encontrada e caracteriza-se por alta taxa de resistência a meticilina (>80%), levando assim a um maior número de tratamento antibiótico empírico e maior consumo de glicopeptídeos. O prognóstico dos pacientes com este tipo de bacteremia, está associado a gravidade clínica do paciente e ao uso de tratamento empírico inadequado. Por sua vez, este último fator está associado a um maior índice de mortalidade (FERNÁNDEZ-RUFETE et al., 2012).

Os ECN também são a causa mais frequente de sepse em pacientes recém-nascidos internados em unidades de terapia intensiva neonatal em todo o mundo. Estes isolados são resistentes a antibióticos e assemelham-se a isolados de profissionais que atuam nestas unidades e aos isolados destes ambientes (HIRA et al., 2013).

5.4 COLONIZAÇÃO

Os ECN são habituais colonizantes da pele e mucosas humanas (Olivares *et al.*, 2012). Admite-se que ao nascer, os neonatos tornam-se colonizados por ECN sensíveis a antibióticos, já que cepas resistentes são encontradas com pouca frequência na população em geral. Sabe-se que ECN causadores de sepse em recém nascidos são isolados das mãos de profissionais que trabalham em unidades de terapia intensiva neonatal, mas a maneira como ocorrem a colonização da pele e intestino dos pacientes por ECN resistentes ainda requer maior investigação, sendo notada apenas a colonização do intestino por cepas resistentes desde o nascer, provavelmente pelo uso de antibióticos durante a hospitalização. Já na colonização da pele, as cepas de *S. haemolyticus* resistentes se sobrepõe às de *S. warneri* sensíveis, com o decorrer do período de internação (HIRA et al., 2013).

5.5 INFECÇÕES DE CORRENTE SANGUÍNEA

Silva, R.B. *Estafilococos Coagulase Negativos isolados de pacientes com infecção de corrente sanguínea: aspectos microbiológicos e imunológicos*, 2014.

Em recém-nascidos prematuros e pacientes internados em unidades de terapia intensiva pediátricas, os ECN são os principais agentes de infecções. Isto ocorre principalmente pela imaturidade do sistema imune destes pacientes, baixa idade gestacional e baixo peso, administração de esteroides e nutrição parenteral e à ruptura da integridade da pele e mucosas com o uso de cateteres, ventilação mecânica e sondas (OLIVARES et al., 2012).

Os cateteres venosos centrais são a principal via de acesso dos ECN à corrente sanguínea, favorecidos pelo maior diâmetro de sua luz, maior período de permanência e pelo fato de que algumas vezes estes dispositivos não podem ser retirados, mesmo na presença de sinais locais de inflamação, devido a impossibilidade de obtenção de outras vias de acesso nestes pacientes (OLIVARES et al., 2012).

Isolamentos repetidos de ECN de hemoculturas podem significar contaminação, se as amostras são coletadas com mais de um dia após a administração de terapia antimicrobiana adequada. As infecções por ECN tem sido definidas quando duas hemoculturas são positivas, com intervalo de dois dias entre elas, ou com uma hemocultura positiva acompanhada de elevação nos níveis de proteína C-reativa, dentro de dois dias da cultura positiva. Para pacientes com menos de um ano de idade, o Centro de Prevenção e Controle de Doenças define a infecção por ECN como o isolamento de ECN de uma ou duas hemoculturas, coletadas em ocasiões diferentes, ou de no mínimo uma hemocultura de paciente com cateter, acompanhado da presença clínica de sepse, ou seja, hiper ou hipotermia, apneia e bradicardia (JEAN-BAPTISTE et al., 2011).

5.6 ESPÉCIES DE ECN

São reconhecidas 42 espécies de ECN (EUZÉBY, 2013), algumas de caráter comensal ubíquo, encontrados na cavidade oral e garganta, e outras de localização específica como *S. capitis* na cabeça e *S. auricularis* no meato externo auditivo. Dependendo da resistência ou susceptibilidade a novobiocina, os ECN podem ser divididos em dois grupos. As espécies susceptíveis *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lugdunensis* e *S. schleiferi* e as

Silva, R.B. *Estafilococos Coagulase Negativos isolados de pacientes com infecção de corrente sanguínea: aspectos microbiológicos e imunológicos*, 2014.

espécies resistentes *S. saprophyticus* e *S. xylosus*, são isoladas de seres humanos (VON EIFF, 2002).

Staphylococcus epidermidis é fundamentadamente conhecido como causa de bacteremia, endocardite infecciosa, infecções do trato urinário e infecções cirúrgicas (KLOOS e BANNERMAN, 1994). É o membro do grupo dos estafilococos ECN mais frequentemente isolado, colonizando a pele e membranas mucosas do corpo humano e representando a maior parte da microbiota bacteriana normal deste habitat. Geralmente, o sucesso de *S. epidermidis* como um patógeno é atribuído a sua capacidade de aderir a superfícies e aí permanecer, sob a cobertura de biofilme. Em infecções em dispositivos de longa permanência, a formação de biofilme é considerada o principal fator de virulência. (VUONG e OTTO, 2002).

Em segundo lugar entre ECN na frequência de isolamento das culturas do sangue humano, *Staphylococcus haemolyticus* executa um papel importante em infecções hospitalares oportunistas relacionadas com dispositivos médicos implantados (FREDHEIM et al., 2009). *S. haemolyticus* tem o maior nível de resistência a antimicrobianos entre todas as espécies de ECN e a resistência a glicopeptídeos, teicoplanina e vancomicina é comum (ROGERS et al, 2009). Isso limita as opções terapêuticas disponíveis e faz de uma infecção por *S. haemolyticus* uma ameaça grave. Foi proposto que um polissacarídeo capsular é um importante fator de virulência em *S. haemolyticus*. A formação de biofilme *in vitro* tem sido relatada, mas os mecanismos moleculares envolvidos não foram esclarecidos. A presença de um operon *ica* também foi relatada, mas sua contribuição para a formação do biofilme é obscura (FREDHEIM et al., 2009).

Outro ECN, agente etiológico comum de infecção do trato urinário (ITU), *S. saprophyticus* produz urease como uma característica importante e litíase renal e infecção ureteral foram encontradas associadas com o microrganismo. *S. saprophyticus* é seguido apenas de *E. coli* como o organismo causador mais frequente de ITU não complicada em mulheres e também pode causar infecção urinária em homens de todas as idades. Apresenta capacidade de aderir às células uroepiteliais e colonizar o interior de cateteres, mas é suscetível aos antibióticos geralmente prescritos para pacientes com ITU, com exceção do ácido nalidíxico. Entretanto, a recorrência de ITU devido a *S. saprophyticus* é comum (RAZ, et al., 2005).

Silva, R.B. *Estafilococos Coagulase Negativos isolados de pacientes com infecção de corrente sanguínea: aspectos microbiológicos e imunológicos*, 2014.

Staphylococcus lugdunensis, como parte da microbiota normal da pele humana, particularmente nas axilas e regiões perineal e inguinal, favorece as infecções em pacientes em diálise peritoneal, devido à proximidade com a região de saída do cateter, caracterizando cerca de 3% das infecções por ECN (KOCH *et al.*, 2011). Alguns isolados podem produzir uma enzima ligada a parede celular (o fator *clumping*), que produz resultados positivos nos testes de coagulase em lâmina e ou aglutinação em látex rápida, podendo levar a erros de identificação do organismo como *S. aureus* no laboratório clínico. *S. lugdunensis* tem uma propensão para causar endocardite valvar (FRANK *et al.*, 2008). Entre os ECN, *S. lugdunensis* é o microrganismo mais virulento e agressivo. Sua virulência está relacionada à formação de biofilme, já que esta espécie geralmente é sensível aos antibióticos de uso comum, com apenas 10 a 30% dos isolados produtores de β -lactamases e rara presença do gene *mecA* (KOCH *et al.*, 2011).

S. hominis é um colonizante de regiões secas da pele como o antebraço e foi isolado com maior frequência da pele lesionada de enfermeiras em comparação com a pele íntegra. A *Staphylococcus hominis subsp. novobiosepticus* foram atribuídos surtos de isolados de hemoculturas entre neonatos e adultos. Entretanto é difícil a distinção fenotípica entre as duas subespécies (ZHANG *et al.*, 2013). Foram verificadas ausência do gene *mecA*, multirresistência a antimicrobianos e a vários íons e presença do elemento SCC*mec* em alguns poucos isolados (BOUCHAMI *et al.*, 2011; GARZA-GONZÁLEZ *et al.*, 2010). Apesar de sua patogenicidade ocasional, *S. hominis* pode ser um reservatório para o elemento genético SCC*mec*. Cepas resistentes a meticilina que colonizam a mucosa nasal podem ser tão comuns quanto em *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* e foram identificados isolados clínicos com prevalência relativamente alta (ZHANG *et al.*, 2013).

Quatro isolados de *S. cohnii* foram relatados como agentes de bacteremia em pacientes internados em uma unidade de terapia intensiva na Grécia. Dois isolados foram genotipicamente identificados como *S. cohnii subsp. ureolyticus* e dois foram fenotipicamente identificados de maneira incorreta como *S. xylosus*. Os isolados derivaram de um mesmo clone. Todos os isolados apresentaram perfil de multirresistência a antimicrobianos. A resistência a linezolida foi relacionada ao aumento no uso deste fármaco na UTI e sua transmissão a medidas inadequadas de higienização pelo profissional de enfermagem.

Entretanto, não foi constatada colonização nasal ou das mãos do profissional (THEUNISSEN et al., 2009).

Staphylococcus capitis é classificado em duas subespécies, *S. capitis subsp. urealyticus* e *subsp. capitis* e desenvolve sua capacidade de formar biofilme em meios com alta osmolaridade, sendo a produção quantitativa linearmente induzida por Cloreto de Sódio (MØRETRØ et al., 2003). O ser humano é a principal fonte e veículo de transmissão de *S. capitis* (HIRA et al., 2010) e sua emergência como patógeno oportunista foi sugerida em neonatos internados em unidades de terapia intensiva (RASIGADE et al., 2012). A participação de *S. capitis* foi relatada em infecções relacionadas a produção de biofilme como endocardite (NALMAS et al., 2008), bacteremias relacionadas a cateteres (TRISTAN et al., 2000) e ITU (OREN e MERZBACH, 1990).

Staphylococcus xylosus ocasionalmente é uma bactéria comensal da pele e mucosas humanas (NAGASE et al., 2002), promovendo a colonização provavelmente pela produção de biofilme (PLANCHON et al., 2006). Alguns artigos o descrevem como causador de infecções oportunistas em humanos como endocardite, sepse e pielonefrite aguda (CONRAD e WEST, 1984; KOKSAL et al., 2009; TSELENIS-KOTSOWILIS et al., 1982). Cepas causadoras de infecção demonstraram perfil de multirresistência a antimicrobianos (KOKSAL et al., 2009).

5.7 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

Entre ECN, as espécies diferem entre si com relação ao perfil de resistência a antimicrobianos e em alguns casos a terapia combinada é eficiente para cepas multirresistentes (SZYMANSKA et al., 2011).

Em pacientes neonatais a terapia antimicrobiana é reduzida à vancomicina, teicoplanina ou linezolida, pois está contraindicado o uso de antimicrobianos das famílias de fluoroquinolonas, sulfonamidas, tetraciclina ou daptomicina e há limitação no emprego de β -lactâmicos, devido a elevadas taxas de resistência na maioria das cepas (OLIVARES et al., 2012).

Silva, R.B. *Estafilococos Coagulase Negativos isolados de pacientes com infecção de corrente sanguínea: aspectos microbiológicos e imunológicos*, 2014.

5.7.1 Resistência a meticilina/oxacilina

Os ECN resistentes a meticilina, especialmente *S. epidermidis*, atuam como reservatórios de SCCmec para *S. aureus*, apesar do mecanismo de transferência não estar elucidado (LEBEAUX et al., 2011).

A resistência a meticilina em *Staphylococcus* resulta da aquisição da proteína de ligação a penicilina 2a (PBP-2a), uma transpeptidase que confere resistência a β -lactâmicos de amplo espectro, codificada pelo gene *mecA* (IWG-SCC, 2009). Um elemento genético móvel denominado Cassete Cromossômico Estafilocócico (*Staphylococcal Cassette Chromosome*, SCCmec) que carrega tanto o complexo gênico *mec* quanto o complexo gênico *ccr*. O primeiro é composto pelo gene *mecA* e seus genes regulatórios e o segundo por genes que codificam recombinases envolvidas na sua inserção e excisão cromossômica (HIRAMATSU et al., 2002; IWG-SCC, 2009). Onze tipos principais de SCCmec tem sido descritos em *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina, diferindo na combinação alotípica dos complexos gênicos *mec* e *ccr* com predominância de SCCmec IVa e V em cepas de *S. aureus* adquiridas na comunidade (ZONG et al., 2011; IWG-SCC, 2009; RUIMY et al., 2010). Além disso, em ECN há uma maior diversidade de elementos SCCmec, padrões não tipáveis de SCCmec, incluindo combinações de complexos *ccr-mec* que não se encaixam na classificação proposta para *S. aureus* e alótipos *ccr* múltiplos e não tipáveis (BARBIER et al., 2010; HANSEN e SOLLID, 2007; JAMALUDDIN et al., 2008; RUPPE et al., 2009).

5.7.2 Resistência a vancomicina

A resistência à vancomicina em ECN não está associada a presença dos genes *van* de resistência a glicopeptídeos encontrados em *Enterococcus* (CDC, 1997), mas a uma população heterogênea de células sensíveis a vancomicina e poucas células com vários graus de resistência (SCHWALBE et al., 1987). Estudos bioquímicos e da ultraestrutura por microscopia eletrônica de transmissão das amostras revelaram aumento significativo da

espessura da parede celular e na produção de peptídeoglicano, associado ao elevado número de resíduos livres de Dala-Dala, que levariam a uma redução da quantidade de moléculas de vancomicina a alcançar seus sítios de ação na síntese da parede celular próximo a membrana plasmática. Além disso, autolisinas presentes na parede celular também podem estar relacionadas ao seu acúmulo (HIRAMATSU, 2001).

Em cepas resistentes a metilina, o tratamento de infecções por ECN tem sido feito com vancomicina. Porém, o uso contínuo deste antibiótico tem elevado as CIM de 0,5mg/L para 2,0mg/L em um grande número de cepas. Apesar de estarem na faixa de sensibilidade elas acarretam algumas consequências clínicas como: redução da eficácia do antibiótico levando a falha terapêutica, necessidade de monitoramento em casos de artrite, osteomielite e pneumonia devido à baixa penetração tecidual, efeitos colaterais como supressão medular ou ototoxicidade, elevação dos custos hospitalares, maior tempo de eliminação da bactéria do sangue circulante, falha terapêutica de bacteremia com elevada mortalidade. (OLIVARES et al., 2011).

5.8 FORMAÇÃO DE BIOFILME

Outro importante fator que colabora para a virulência de ECN e está relacionado a patogenia de infecções relacionadas a dispositivos médicos é a aderência bacteriana a biomateriais. Ela depende tanto das características da superfície celular bacteriana quanto da natureza do polímero. As primeiras interações envolvem forças físico-químicas inespecíficas como a polaridade, interações hidrofóbicas e forças de van der Waal's. A adesão inicial e a hidrofobicidade da superfície celular tem sido relacionada com proteínas da superfície bacteriana. (VON EIFF, 2002).

Duas proteínas antigênicas de superfície relacionadas aos *Staphylococcus* SSP-1 e SSP-2 (*Staphylococci Superficies Protein 1/2*, proteína de superfície de *Staphylococcus*) contribuem para a aderência a poliestirenos e outras proteínas estão envolvidas, como a autolisina associada a superfície, AtlE (*Autolisin E*, autolisina E) (von Eiff, 2002). Autolisinas bacterianas são hidrolases de peptídeoglicano envolvidas na separação celular, divisão celular,

no *turnover* da parede celular e na lise bacteriana induzida por antimicrobianos e algumas são consideradas fatores de virulência, por estarem envolvidas na aderência bacteriana a células eucarióticas (MILOHANIC, 2001).

A autolisina AtlE de *S. epidermidis* está envolvida tanto na ligação da célula bacteriana a superfície inalterada de polímeros, quanto a vitronectina, o que sugere seu envolvimento na colonização de material implantado recoberto por esta proteína da matriz extracelular (VON EIFF, 2002).

Após a implantação de dispositivos médicos, rapidamente ocorre seu contato com o plasma e com proteínas da matriz extracelular que passam a recobrir a superfície do dispositivo, tais como fibrinogênio, fibronectina, vitronectina, trombospondina e fator de von Willebrand, facilitando a colonização (VON EIFF, 2002). Após aderir a superfícies, a bactéria multiplica-se e acumula-se formando grupos com várias camadas, através de adesão entre as células bacterianas, promovida pela adesina intercelular polissacarídica PIA (*polysaccharide intercellular adhesin*) (HEILMANN et al., 1996; HEILMANN e GÖTZ 1998), codificada pelo gene de adesão intercelular *ica* (*intercellular adhesion*) (PETERS et al., 1982).

No locus *icaADBC*, IcaA e IcaD produzem uma cadeia ativa de monômeros de N-acetilglicosamina, que tem sua elongação realizada pela proteína IcaC (GÖTZ, 1998). Após a exportação destes resíduos, parte de sua desacetilação é feita pela enzima IcaB, localizada na superfície celular bacteriana. Esta etapa introduz carga positivas no polímero, contribuindo para sua ligação a superficial e suas funções de formação do biofilme e evasão ao sistema imunológico (VUONG et al., 2004).

S. epidermidis produz ainda o exopolímero, ácido poli- γ -glutâmico (“*poly- γ -glutamic acid*” - PGA), que assim como a PIA, protege a bactéria de mecanismos importantes da defesa imune inata. Além do seu papel como parte da matriz extracelular do biofilme, PIA protege *S. epidermidis* dos neutrófilos, complemento, imunoglobulinas e peptídeos antimicrobianos (“*antimicrobial peptides*” – AMP). PGA promove o crescimento de *S. epidermidis* em elevadas concentrações de sal e é induzido sob estas condições, contribuindo para osmotolerância, e indicando um papel para o PGA durante a colonização de *S. epidermidis*. Além disso, o pseudopeptídeo PAC, que é sintetizado a partir de produtos do

polímero PGA, é essencial para a resistência de *S. epidermidis* a fagocitose por neutrófilos, apesar de seus baixos níveis de produção. *S. epidermidis* é o único organismo conhecido no qual PGA tem uma função na patogênese (OTTO, 2009).

5.9 RESPOSTA IMUNOLÓGICA A INFECÇÕES POR ECN

A patofisiologia da sepse e choque séptico é complexa e resulta da interação entre o patógeno e as vias de inflamação e coagulação (BONE et al., 1992; RUSSELL, 2006). A defesa inata do hospedeiro é integralmente ligada a estes processos (RUSSELL, 2006; ESMON, 2004).

Após a invasão tecidual as bactérias ativam o sistema complemento e macrófagos teciduais. Estas células ativadas produzem citocinas pró-inflamatórias como TNF α , IL-1 β e IL-8, que recrutam fagócitos do sangue circulante e direcionam uma adequada resposta mediada por células T (METZHITOV e JANEWAY, 1997). No sangue, as bactérias e seus produtos, desencadeiam uma resposta inflamatória sistêmica, caracterizada pela ativação massiva de macrófagos do sistema reticuloendotelial e leucócitos circulantes, liberação de citocinas, expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais e desenvolvimento de hipotensão. Se não for controlada a tempo, esta inflamação pode progredir para sepse, choque séptico e falência múltipla de órgãos (BRANDZAEG et al., 1996).

Em estudos do desenvolvimento de sepse por Gram-positivos, fragmentos da parede celular, bem como seus constituintes purificados, peptidoglicano e ácido lipoteicóico, promoveram a liberação de TNF α , IL-1 β e IL-6 por monócitos em cultura (BHAKDI et al., 1991; MATTSSON et al., 1993), dependente do complemento e imunoglobulinas (MATTSSON et al. 1994). Além dos monócitos, células T também produzem citocinas, quando estimuladas com componentes da parede células de bactérias Gram positivas (WANG et al., 2000).

No hospedeiro, o sistema imunológico inato é a primeira linha de defesa contra microrganismos invasores tais como *S. epidermidis* e age de uma forma não-específica. Os

neutrófilos fagocitam as bactérias para matá-las com espécies reativas de oxigênio e peptídeos antimicrobianos. A fagocitose ocorre mediante o reconhecimento de padrões moleculares associados a patogenicidade presentes nas bactérias (OTTO, 2009).

5.9.1 Ativação do processo de fagocitose

Mecanismos de defesa do hospedeiro que incluem fagocitose e produção de citocinas são ativados pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patogenicidade (“*pathogenity associated molecular partterns*” - PAMPs). Estes são estruturas da superfície bacteriana que o sistema imune inato reconhece através de receptores como os “*Toll-like*” – TLRs. Os PAMPs como lipoproteínas e ácidos lipoteicóico são comuns em bactérias Gram-positivas. Além disso, há vários relatos sugerindo que moléculas adicionais, que são específicas para *S. epidermidis*, podem estimular a resposta de defesa inata do hospedeiro (OTTO, 2009).

O reconhecimento de PIA pelo sistema imunológico humano, estimulando receptores TLR2, seria um exemplo interessante de interação esconde-esconde entre patógeno e hospedeiro. Isso significa que uma estrutura utilizada por *S. epidermidis* como evasão imune pode provocar mecanismos de defesa inata. Da mesma forma, modulinas solúveis em fenol (“*phenol solube modulins*” – PSMs) de *S. epidermidis* indicam efeito pró-inflamatório por sua semelhança às PSMs de *S. aureus*, para a qual a defesa do hospedeiro provoca confirmada atividade (Otto, 2009). Finalmente, um ácido lipoteicóico proinflamatório incomum de cadeia curta tem sido descrito em *S. epidermidis* e sua atividade pró-inflamatória permanece desconhecida. Assim, há uma clara necessidade de maior caracterização de moléculas de *S. epidermidis* que ativem as defesas do hospedeiro (OTTO, 2009).

5.9.2 Citocinas e quimiocinas envolvidas na resposta a ECN

Algumas citocinas podem mediar a defesa contra bactérias causadoras de infecções ativando as células imunes inatas e também pela definição de respostas imunes adaptativas. Citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e IL-6, desempenham um papel importante na indução da resposta imune. As citocinas estão envolvidas nos mecanismos patogênicos de infecções causadas por estafilococos, uma vez que estas bactérias podem atuar como fortes indutoras (MEGYERI, 2002).

Outro dado importante relacionado às citocinas é que os biomateriais implantados sempre induzem uma reação inflamatória, mas a intensidade pode variar, dependendo do produto químico e composição do material. A exposição de monócitos humanos ou granulócitos a biomateriais *in vitro*, induzem a produção de várias citocinas (BOELEN et al, 2000).

As células endoteliais medeiam a migração de leucócitos através da expressão de quimiocinas, incluindo IL-8, e moléculas de adesão induzidas por mediadores pró-inflamatórios, como o TNF- α . Estas moléculas associadas a célula endotelial facilitam o rolamento, adesão e migração dos leucócitos circulantes através da barreira das células endoteliais para locais de inflamação por um processo em várias etapas (TAJIMA et al., 2009).

O Fator de Necrose Tumoral, TNF (*tumor necrosis factor*) é produzido em reações inflamatórias e tem um papel importante na imunidade inata por ativar o fator nuclear de translocação NF κ B, considerando-se que a adesão da bactéria à membrana da célula hospedeira é o primeiro passo para a sua internalização. O TNF é produzido de maneira endógena e gera efeitos benéficos ou de detrimento para o hospedeiro, frente a infecções bacterianas. Células íntegras de estafilococos e peptidoglicano purificado tem se demonstrado fortes indutores de TNF em humanos e animais, *in vitro* e *in vivo* (TIMMERMAN et al., 1993; WAKABAYASHI et al. 1991).

A IL-1 é sintetizada e liberada por células mononucleares fagocitárias e possui propriedades pirogênicas e de promover a proliferação de linfócitos T (IKEJIMA et al., 1984). As citocinas pró-inflamatórias IL-1 α e IL-1 β exercem seu efeito pela interação com receptores IL-1 tipo I (IL-1R). O antagonista deste receptor também faz parte da família IL-1. Já o

receptor tipo II da IL-1 não possui função biológica, mas atua como competidor para os ligantes (DINARELLO, 1996). Atualmente, o papel da IL-1 na patogênese das infecções associadas a biomateriais (*biomaterial associated infection*, BAI) por *S. epidermidis* é desconhecida. Isto implica que, de uma maneira dependente do tipo de material, a presença de bactérias ou componentes de bactérias podem modular a reação inflamatória em resposta ao implante de biomateriais no tecido. Para uma biocompatibilidade é necessária uma resposta imunológica minuciosamente balanceada a fim de que uma forte reação patológica não se desenvolva. Elevados níveis de IL-1 parecem comprometer o hospedeiro, por estimular a persistência bacteriana e a inibição da produção de IL-4 (BOELEN et al, 2000).

A IL-6 liberada em locais de lesão ou infecção é uma citocina multifuncional que atua na regulação da resposta imunológica e reações de fase aguda (KISHIMOTO et al., 1995). É produzida por diferentes tipos celulares e atua através de sua ligação específica a receptores de superfície (ISHIMI et al., 1990). A IL-6 também está relacionada ao bloqueio da atividade supressora de células T regulatórias CD4⁺ e CD25⁺ (PASARE e MEDZHITOV, 2003). Sugere-se que IL-6 está envolvida na regulação da resposta inflamatória em infecções por bactérias Gram-positivas (DEHOUX et al., 1994). O papel da IL-6 na patofisiologia da inflamação em geral não foi elucidado, mas há relatos tanto de efeitos pró quanto anti-inflamatórios (AKIRA et al., 1993; VAN DER POLL e VAN DEVENTER, 1999).

A IL-8 é um quimiotático de neutrófilos que é sintetizada por células endoteliais e medeia a transmigração destes fagócitos através da ativação de células endoteliais. A inibição da produção de IL-8 em células endoteliais resulta numa diminuição da migração de neutrófilos através do endotélio (TAJIMA et al., 2009).

A IL-10 é uma citocina regulatória que reduz a atividade celular inflamatória e consequentemente a resistência inespecífica do organismo (REINIS et al., 2011). É produzida por linfócitos Th2 e monócitos e inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-1 e IL-8 e aumenta a expressão de IL-1ra. Níveis plasmáticos elevados de IL-10 tem sido descritos em pacientes com sepse. A administração exógena de IL-10 recombinante protege ratos de endotoxemia letal pela redução da liberação de TNF e a neutralização da IL-10 endógena destes animais aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias e a mortalidade (CARTMELL et al., 2003).

A IL-12 é produzida por células fagocitárias, células apresentadoras de antígenos e, em menor proporção, por linfócitos B a partir de estímulos dependentes ou independentes das células T, incluindo a interação com ligante CD40 e uma variedade de estímulos bacterianos. No início da infecção, a IL-12 induz a produção de IFN pelas células T e “*natural killer*” (NK). O *interferon* (IFN) ativa os fagócitos e aumenta sua habilidade de produzir mais IL-12. Em contraste, a IL-10 e outras citocinas da resposta Th2 regulam a produção e a atividade da IL-12. Este equilíbrio afeta assim a evolução da doença (MONTENEGRO *et al.*, 2002).

6 MATERIAL E MÉTODOS

As atividades foram desenvolvidas no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas e Naturais (ICBN) da UFTM, no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (HC-UFTM), nos laboratórios de Microbiologia e Imunologia Básica, Microbiologia Clínica da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) e Cultura Celular e Vacinas (UNIFAL-MG) e Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ - MG).

6.1 APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Este projeto de pesquisa constitui parte de outro intitulado “Epidemiologia das infecções hospitalares por estafilococos coagulase negativos em um hospital público de ensino”, previamente submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM, com o protocolo de número 1670.

6.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO DE PACIENTES

Foram incluídos neste estudo todos os pacientes com infecção de corrente sanguínea por ECN, internados no HC-UFTM, no período de maio de 2010 a julho de 2012, dos quais foram isoladas amostras de ECN de hemoculturas positivas. Também foram incluídas amostras de ECN isoladas de *suabes* da pele e mucosa de pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) Neonatal do HC-UFTM, no período entre janeiro de 2011 e dezembro de 2012.

Os critérios de definição de infecção primária de corrente sanguínea por ECN foram a ausência de infecções por ECN em outro sítio, presença de cateter intravenoso e resultados positivos de hemoculturas. Critérios clínicos durante o episódio de sepse também foram utilizados tais como febre ($>38^{\circ}\text{C}$), hipotermia ($<36^{\circ}\text{C}$), bradicardia ou taquicardia,

difficuldade respiratória, hipotensão e sinais de hipoperfusão periférica, intolerância alimentar e índices hematológicos anormais (ANVISA, 2009).

6.3 OBTENÇÃO DE DADOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS DOS PACIENTES

Dados demográficos e clínicos tais como, sinais clínicos e laboratoriais, sintomas de infecção, sítio da infecção, fatores de risco como comorbidades e procedimentos invasivos realizados, antibióticos utilizados, locais de internação no HC, evolução dos pacientes, idade e sexo, foram obtidos pela análise dos prontuários médicos e preenchimento do instrumento de coleta de dados (anexo 1).

6.4 COLETA DE AMOSTRAS

6.4.1 Hemoculturas

A coleta de sangue para hemocultura foi realizada de acordo as solicitações de rotina realizadas pela equipe médica do HC-UFTM. Para a coleta de amostras do sangue periférico, os profissionais responsáveis são orientados a coletar três frascos de 10 mL de sangue (dois para cultura aeróbia e um para cultura anaeróbia), para pacientes adultos, e dois frascos de 5 mL (um para cultura aeróbia e um para cultura anaeróbia), para pacientes pediátricos. As coletas devem ser realizadas seguindo as técnicas de antisepsia com álcool 70%, em sítios diferentes, fora de episódios de hipertermia e com 30 minutos de antecedência a administração de antibióticos prescritos ao paciente. Os frascos utilizados para a coleta são compatíveis com o equipamento automatizado de hemocultura utilizado no SPC do HC-UFTM (modelo BACTEC 9240).

6.4.2 Suabes da pele e mucosa

Silva, R.B. *Estafilococos Coagulase Negativos isolados de pacientes com infecção de corrente sanguínea: aspectos microbiológicos e imunológicos*, 2014.

A coleta de amostras de microrganismos colonizantes foi realizada friccionando suavemente os *suabes* esterilizado e umedecido em salina esterilizada sobre a pele da região periumbilical e da mucosa nasal do paciente e acondicionando-o em frasco com meio para transporte esterilizado. O mesmo processo foi realizado para as regiões perineal e inguinal. Os *suabes* foram utilizados para inoculação em agar sangue e posterior identificação de ECN.

6.5 ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

As amostras de ECN isoladas no laboratório de Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica (SPC) do HC-UFTM foram armazenadas em freezer a -20°C, para posterior caracterização fenotípica e molecular, realizada no Laboratório de Microbiologia do ICBN/UFTM e laboratórios de Microbiologia e Imunologia Básica e Microbiologia Clínica da UNIFAL-MG, e para estimulação de células mononucleares no Laboratório de Cultura de Células e Vacinas da UNIFAL-MG.

6.6 AMOSTRAS DE REFERÊNCIA

Nas provas de identificação de espécies, nos testes de sensibilidade a antimicrobianos (diluição em caldo) e de análise molecular foram usadas como controles amostras de referência da ATCC (*American Type Culture Collection*), *S. aureus* (ATCC 29213), *S. epidermidis* (ATCC 14990 e ATCC 35984) e *S. saprophyticus* (ATCC 35551).

6.7 IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DAS ESPÉCIES DE ECN

As amostras de ECN isolados de hemoculturas obtidas no SPC e as amostras de ECN isoladas de *suabes* da pele e mucosa de pacientes internados na UTI Neonatal do HC-UFTM foram conduzidas ao laboratório de Microbiologia do ICBN/UFTM para cultura em agar

sangue de carneiro para isolamento de colônias utilizadas para armazenamento e caracterização das cepas.

As amostras tiveram sua identificação de gênero confirmada com base na morfologia, tipo de agrupamento e comportamento tintorial pelo método de coloração de Gram, produção de catalase, ausência de produção de coagulase livre e ligada e resistência a furazolidona (WINN *et al.*, 2008).

A identificação em espécie foi feita com base nos resultados dos testes de suscetibilidade à novobiocina (5µg) e à polimixina (300U), produção de urease, prova do PYR (pyrrolidonyl-aminopeptidase), produção de ácidos a partir de carboidratos (manose, trealose e xilose) e atividade de DNase, adaptando-se o esquema proposto por Iorio *et al.* (2007).

Os testes de resistência a novobiocina e a polimixina foram realizados por disco difusão, usando discos contendo novobiocina (5µg) e polimixina (300U) em placa de Petri contendo agar Mueller-Hinton e suspensão do inóculo com turbidez equivalente ao tubo 0,5 da escala de Mac Farland. A leitura foi realizada após incubação por 24 h a 35-37° C. Foi considerada resistência quando observado halo de inibição do crescimento bacteriano ≤ 16 mm para novobiocina e < 10 mm para a polimixina (MURRAY *et al.*, 2007).

A produção de ácido a partir de carboidratos (manose, trealose e xilose) foi detectada em condições aeróbias inoculando a amostra de ECN em caldo BHI com azul de bromocresol 0,1% e solução estéril de cada carboidrato a 0,1%. A leitura foi realizada após incubação por 24 a 48 h a 35-37° C. A produção de ácido foi indicada pela viragem do indicador de pH para a cor amarela (WINN *et al.*, 2008).

Para avaliação da atividade da enzima PYR, foi aplicada uma gota de salina estéril sobre um disco contendo o substrato da enzima e em seguida depositada uma colônia isolada sobre o disco, que foi incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. Uma gota do reagente foi depositada sobre o inóculo e o aparecimento instantâneo de cor rosa foi considerada como prova positiva.

Para a detecção de atividade de DNase, as amostras de ECN foram inoculadas em agar DNase (Difco®) e incubadas por 24 h à 37°C. Foi adicionada solução de HCl a 1% sobre o agar. As placas foram examinadas e a presença de uma zona transparente em torno do

crescimento bacteriano, observado contra uma superfície de cor preta, em no máximo 60 minutos, foi considerada como resultado positivo (WINN *et al.*, 2008).

A produção de urease foi testada em caldo Uréia de Christensen (Difco®) e as placas inoculadas com uma colônia isolada foram incubadas por 24 a 48 h à 37°C. A cor púrpura do meio inoculado foi interpretada como um resultado positivo (WINN *et al.*, 2008).

6.8 AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DA FORMAÇÃO DE BIOFILME

A determinação fenotípica quantitativa da produção de biofilme foi realizada por método espectrofotométrico, descrito por Bernardi *et al.*, (2007), usando placas de cultura de tecidos com 96 poços e fundo em “U” esterilizadas.

As cepas de ECN foram inoculadas em tubos contendo 3,0 mL de Caldo Triptona Soja (*triptych soil broth*, TSB) suplementado com 0,25% de glicose e 1% de NaCl incubados a 35-37°C, em estufa bacteriológica, por uma noite.

Após este período esta cultura foi diluída à concentração de 1:100 em caldo TSB suplementado. A seguir, alíquotas de 200 µL desta suspensão foram transferidas para cada um dos poços da placa de poliestireno esterilizada e estas foram incubadas por 18 h a 37 °C, sob agitação. Estas placas foram previamente sensibilizadas com 200 µL de soro bovino fetal (SBF) esterilizado, durante uma noite e sob agitação, retirando-se o SBF após a sensibilização.

Após este período de crescimento bacteriano, o conteúdo de cada poço foi aspirado com uma pipeta automática multicanal e foram lavadas quatro vezes com 200 µL de tampão PBS esterilizado pH 7,2. A secagem da placa foi realizada em estufa a 60 °C por uma hora.

A fixação foi realizada com 200 µL de álcool etílico 99% por 30 minutos, seguida da aspiração do álcool e evaporação do resíduo a temperatura ambiente. A seguir, os poços foram corados com solução de Cristal Violeta de Gram por um minuto, lavados com água quatro vezes e a seguir, adicionados 200 µL de tampão PBS esterilizado pH 7,2.

A densidade óptica (D.O.) dos biofilmes bacterianos aderidos e corados foi lida com o auxílio de uma leitora para ELISA em comprimento de onda de 570 nm.

S. epidermidis ATCC 14990 e ATCC 35984 foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente. Caldo TSB suplementado esterilizado foi usado como branco. Os experimentos foram realizados em triplicata. Para cada amostra e para cada controle foram utilizados 5 pocinhos e para cada duas amostras dois pocinhos do branco.

Os valores da densidade óptica foram tomados como a média das leituras subtraídas da leitura do branco e desprezando-se os pocinhos de menor e o maior valor entre os cinco de amostra.

A produção de biofilme foi expressa em unidade de biofilme (UB), determinada pela relação entre a densidade óptica (D.O.) da amostra e a D.O. do controle negativo. A produção foi classificada em ausente ($UB < 2 \times$ Controle Negativo), fraca, moderada ou intensa (com valores de UB até 4, 8 e $> 8 \times$ Controle Negativo, respectivamente).

6.9 AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DA RESISTÊNCIA A OXACILINA E VANCOMICINA

A concentração inibitória mínima (CIM) para oxacilina e vancomicina foi determinada por meio da técnica de microdiluição em caldo, em placas de microtitulação estéreis, utilizando caldo Mueller-Hinton (MH) ajustado com cátions (Oxoid®, U.K.) para vancomicina e caldo MH ajustado com cátions suplementado com 2% de NaCl para oxacilina, conforme descrito pelo CLSI (2012).

Soluções-estoque 10 vezes concentradas de oxacilina e vancomicina foram preparadas em água destilada e esterilizadas por filtração (filtro Millipore® com poro de 0,22 µm) na concentração de 5120 µg/mL e 1280 µg/mL, respectivamente. Posteriormente, uma diluição intermediária das soluções-estoque foram feitas em caldo MH na proporção de 1:10. Em placa de microtitulação foram feitas diluições seriadas desta solução intermediária (50 µL) em caldo MH (50 µL). Em seguida, foram adicionados, 100 µL de uma suspensão bacteriana com turvação correspondente ao tubo nº 0,5 da escala de Mac Farland preparada a partir de uma

cultura de 18-24 horas, a 35°C e diluída em uma proporção de 1:100 em caldo MH. A placa de microtitulação foi incubada em estufa a 35°C e a leitura da CIM feita após 24 horas de incubação.

Para cada microplaca testada foi utilizado um controle negativo com a cepa *S. aureus* ATCC 29213. Para cada amostra testada foi utilizado um controle positivo contendo apenas o caldo e a suspensão bacteriana, e os controles de esterilidade contendo o caldo e a droga.

A CIM foi considerada como a menor concentração de antimicrobiano que inibiu completamente o crescimento do microrganismo nos pocinhos, conforme detectado a olho nu. Para a oxacilina, valores de CIM $\leq 0,25$ mg/L indicaram sensibilidade e valores $\geq 0,5$ mg/L indicaram que o ECN é resistente. Para a vancomicina, valores de CIM ≥ 32 µg/mL indicaram resistência, valores $8\mu\text{g/mL} \leq \text{CIM} \leq 32$ µg/mL resistência intermediária e valores CIM ≤ 4 µg/mL indicaram sensibilidade (CLSI, 2012).

6.9.1 Pesquisa de resistência heterogênea à vancomicina

O estudo do perfil populacional dos ECN para a resistência heterogênea à vancomicina foi realizado de acordo com estudos de Nunes *et. al.* (2006).

Soluções estoque de vancomicina (Sigma®) a 640 µg/mL foram preparadas em água destilada e esterilizadas por filtração. Para a realização de cada experimento, foram preparadas diluições seriadas dessas soluções estoque incorporadas em agar MH (Oxoid®), com concentrações de 4 µg/mL a 16 µg/mL. Os meios foram distribuídos em placas de Petri esterilizadas e descartáveis a uma espessura de 6 mm. Para cada amostra foram inoculados em cada concentração de vancomicina 100 µL de uma suspensão bacteriana com turvação correspondente ao tubo nº 0,5 da escala de Mac Farland preparada a partir de uma cultura de 18-24 horas, a 35-37 °C. A leitura foi feita após 18 h de incubação, a 35-37 °C. Para cada concentração foram utilizados dois controles negativos, um com a cepa *S. aureus* ATCC 29213 e outro contendo o caldo e a droga. Para cada amostra testada foi contado o número de colônias presentes em cada concentração.

6.10 AVALIAÇÃO GENOTÍPICA DO PERFIL MICROBIOLÓGICO DE ECN

6.10.1 Extração do DNA

O microrganismo crescido em 5 mL de caldo infusão de cérebro e coração (*brain heart infusion*, BHI) por 18 h foi centrifugado a 800 g por 10 min e o sobrenadante descartado. Posteriormente, o sedimento foi ressuspensionado em 5 mL de PBS, agitado por 30 min e novamente centrifugado a 800 g por 10 min. As células bacterianas lavadas foram transferidas para microtubos de 1,5 mL, em seguida foram adicionados 10 µL de acromopeptidase (10.000 U/mL) e incubados à 55°C por 30 min. Após incubação, 10% de SDS mais 5 µL de proteinase K (10mg/mL) foram adicionados e incubados em banho-maria à 37°C por 1 h. A suspensão resultante foi extraída duas vezes com fenol-clorofórmio e uma vez com clorofórmio, sendo que em cada etapa da extração foi feita centrifugação a 12.500 G utilizando microtubos esterilizados. O DNA bacteriano foi precipitado em etanol puro, *overnight* a -20°C e, posteriormente, lavado com etanol a 70% para retirar alguma contaminação por proteína. O precipitado foi ressuspensionado em 40 µL de tampão TE e esta solução foi usada como DNA molde (OLIVEIRA e DE LENCASTRE, 2002).

6.10.2 Reação de amplificação

As reações de polimerase em cadeia (*polymerase chain reactions*, PCRs) foram executadas com os primers descritos na tabela 1. As espécies de ECN *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. lugdunensis* foram confirmadas através da detecção dos *primers sep*, *mva* e *fbl*, respectivamente. Para a análise genotípica da resistência a meticilina foram utilizados os *primers mecA* P4 e *mecA* P7. Os genes *icaAB* e *AtlE* foram detectados com *primers* específicos (tabela 1).

A amplificação do DNA foi feita em um termociclador Gene Amp PCR System 9700 (PE APPLIED BIOSYSTEMS) e os parâmetros de cada reação foram descritos por Iorio et al. (2011), Schuenck et al. (2008), Pereira et al. (2010), Oliveira e De Lencastre (2002), Iorio et al. (2011) e Araújo et al. (2006).

Silva, R.B. *Estafilococos Coagulase Negativos isolados de pacientes com infecção de corrente sanguínea: aspectos microbiológicos e imunológicos*, 2014.

Tabela 1: Dados para identificação de espécies e estudo genotípico da produção de biofilme e resistência a oxacilina em amostras de *Estafilococos Coagulase Negativos*.

Genes	Sequências de Primers	Tamanho do Amplicon	Referências
<i>Sep</i>	F 5'-CAG TTA ATC GGT ATG AGA GC-3' R 5'-CTGTAG AGT GAC AGT TTG GT-3'	219 pb	Iorio et al. (2011)
<i>Mva</i>	SH1 5'-GGT CGC TTA GTC GGA ACA AT-3' SH2 5'-CAC GAG CAA TCT CAT CAC CT-3'	271 pb	Schuenck et al. (2008)
<i>Fbl</i>	F 5' -GTAAATAGCGAGGCACAAGC -3' R 5' -GGTAAATCGTATCTGCCGCT -3'	425 pb	Pereira et al. (2010)
<i>mecA</i>	P4 5'-TCCAGATTACAACCTTCACCAGG-3' P7 5'-CCACTTCATATCTTGTAACG-3'	162 pb	Oliveira e De Lencastre (2002)
<i>icaAB</i>	F 5'-TTA TCA ATG CCG CAG TTG TC-3' R 5'-GTT TAA CGC GAG TGC GCT AT-3'	546 pb	Iorio et al. (2011)
<i>atlE</i>	F 5' - GCTAAGGCACCAGTAAAAAGT -3' R 5' - GACCTCATCTTGTTTTACCCA -3'	480 pb	Araújo et al. (2006)

Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

6.10.3 Análise dos produtos das PCRs

Os produtos das PCRs foram aplicados em géis de agarose a 1,5% em tampão TAE 1X (Tris-acetato, 40 mM; EDTA 1mM, pH 8,0), e as eletroforeses realizadas a 90 V. Após as corridas eletroforéticas, os géis foram corados com brometo de etídio e observados em luz UV.

6.11 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA INDUÇÃO DE MEDIADORES DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA

A determinação da produção de citocinas foi realizada para 10 amostras isoladas de hemoculturas de pacientes com infecção, que apresentaram altas CIMs para oxacilina e vancomicina e maior produção *in vitro* de biofilme, e 10 amostras isoladas da pele e mucosa, que apresentaram baixas CIMs para oxacilina e vancomicina e menor produção *in vitro* de biofilme.

Os ensaios foram realizados adaptando-se a metodologia utilizada por Megyeri et al. (2002).

6.11.1. Inativação das células bacterianas

As amostras de ECN foram inoculadas em caldo TSB suplementado com 10% de glicose e incubadas a 37° C por 24h. Em seguida foram inoculadas em agar sangue de carneiro 5% e incubadas a 37° C por 24h. Uma colônia isolada foi obtida para coloração de Gram e outra para repique.

Foi realizado o repique de uma colônia de cada amostra para um tubo com 2 mL de caldo TSB. O inóculo foi incubado por 12h a 37° C. Em seguida foi centrifugado a 5000 rpm por 5 minutos.

Procedeu-se a 5 lavagens das células bacterianas adicionando-se 3 mL de tampão PBS esterilizado, homogeneizando-se manualmente e em seguida realizando centrifugação a 5000 rpm por 3 minutos e descartando-se o sobrenadante.

Ao final da quinta lavagem as células foram resuspendidas em 4mL de tampão PBS esterilizado e aliquotadas em 3 microtubos em volume de 1 mL. Os tubos foram aquecidos em banho maria a 81° C por 90 minutos e em seguida armazenados a -20° C.

Um dos tubos foi utilizado para pipetar 100 µL da suspensão para uma placa com agar BHI. A placa foi incubada a 37° C e ao final de 72h a ausência de crescimento bacteriano foi considerada como inativação das cepas de ECN.

As suspensões foram lidas em espectrofotômetro a 570 nm e o valor da absorbância utilizado para calcular a concentração de células, utilizando como branco tampão PBS e como padrão o tubo 0,5 da Escala de Mac Farland. Para os experimentos de estimulação de leucócitos foram preparadas suspensões de ECN com 20×10^7 células/mL.

6.11.2 Obtenção de amostras de sangue periférico

Para os ensaios de estimulação de leucócitos com ECN foram utilizadas amostras de sangue venoso periférico (30,0 mL) coletadas com anticoagulante (heparina), de doadores voluntários saudáveis maiores de 18 anos, pareados por sexo e idade.

6.11.3 Isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

O sangue venoso periférico (30mL) foi coletado de indivíduos voluntários saudáveis com heparina e cuidadosamente colocado sobre 15 mL de uma solução de Ficol-Hypaque em tubos plásticos cônicos (FALCON) de 50 mL. Os tubos foram centrifugados a 1500 rpm por 30 minutos a 24°C. Ao final da centrifugação, foi obtido um anel de células mononucleares na interface entre a solução de Ficoll e o plasma. O plasma foi retirado cuidadosamente e o anel de células coletado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e transferido para um tubo cônico de 50,0 mL (FALCON). O excesso de Ficoll foi removido por centrifugação lavando-se as células por 3 vezes com 30,0 mL de RPMI sem soro, a 24°C e 1500 rpm por 10 minutos. As células foram ressuspensas em 5,0 mL de RPMI contendo 4,75 g/L de Hepes, 10% de soro fetal bovino inativado, 1% de L-glutamina e 40 mg/mL de gentamicina.

A quantidade de células obtidas foi determinada por contagem em câmara de Neubauer, obtendo-se 1×10^7 células/mL. Todos os procedimentos foram realizados em condições estéreis utilizando-se capela de fluxo laminar, com exceção da contagem de células.

6.11.4 Ensaio de estimulação de leucócitos

Em microplacas foram pipetados 100 μ L da suspensão de PBMC, juntamente com 800 μ L de RPMI 1640 10% SBF e 100 μ L de suspensão de células bacterianas de ECN causadores e não-causadores de infecção hospitalar. No pocinho denominado de controle positivo foi utilizado PHA a 25 μ g/mL. A seguir, foram incubados por 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20° C, para posterior dosagem das citocinas por citometria de fluxo.

6.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados obtidos foram digitados em um banco de dados e analisados utilizando-se o programa de estatística SPSS (Versão 16,0; SPSS Inc., Chigaco, IL.).

As variáveis quantitativas foram testadas pela ANOVA e teste de Tukey. Os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão ($X \pm DP$).

A correlação entre duas variáveis com distribuição normal foi analisada pelo teste de *Pearson* (r).

As variáveis qualitativas foram expressas em proporções, sendo estas comparadas pelo teste do χ^2 . Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças em que a probabilidade (p) foi menor que 5% ($p < 0,05$).

7 RESULTADOS

No presente estudo foram analisadas 263 amostras de hemoculturas de pacientes internados em um hospital público de ensino no município de Uberaba-MG, Brasil. Destas amostras, 68 foram caracterizadas como causadoras de infecção primária de corrente sanguínea.

Entre os 68 pacientes com infecção primária de corrente sanguínea, 22 estavam internados na UTI Neonatal, no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2012, e entre estes 14 apresentaram culturas positivas para ECN isolados de *suabes* do cordão umbilical e ou mucosa nasal.

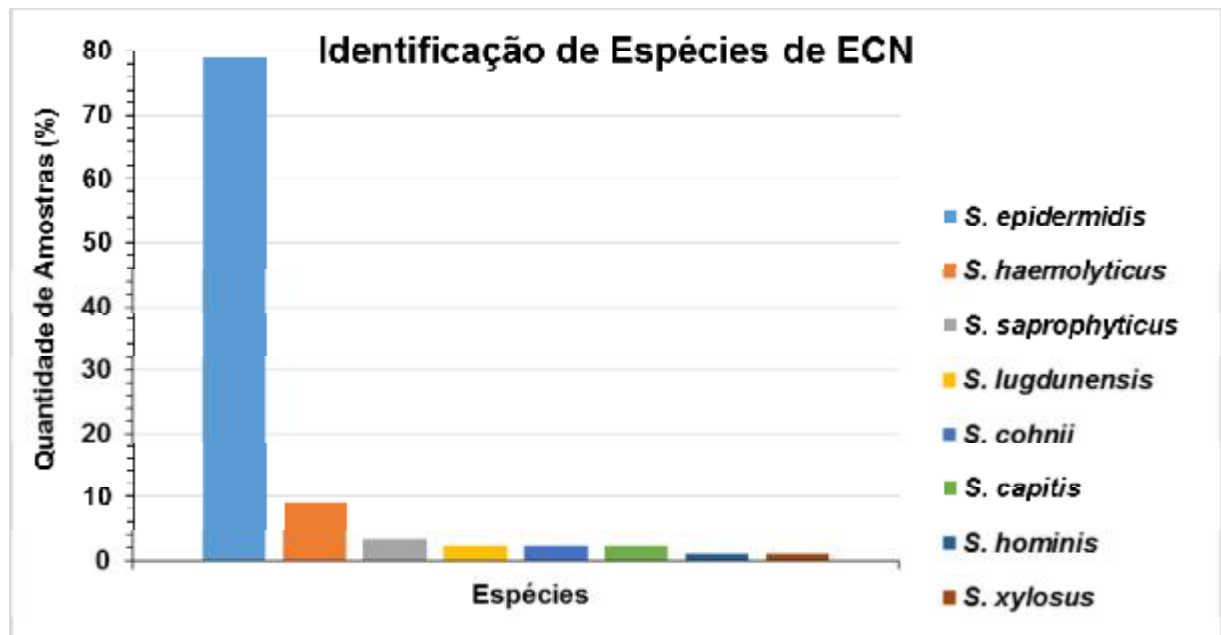
7.1 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES

Foram analisados 90 isolados de ECN, provenientes de hemoculturas (n=68) e de *suabes* (n=22) de pacientes com diagnóstico de IPCS, revelando um perfil de espécies com 78,90% (n=71) *S. epidermidis*, 8,89% (n=8) *S. haemolyticus*, 3,33% (n=3) *S. saprophyticus*, 2,22% (n=2) *S. cohnii*, 2,22% (n=2) *S. capitis*, 2,22% (n=2) *S. lugdunensis*, 1,11% (n=1) *S. hominis* e 1,11% (n=1) de *S. xylosus* (figura 1).

Apenas as amostras de *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. lugdunensis* foram confirmadas por identificação genotípica. Entre todas as amostras, 14,44% (n=13) foram negativas na pesquisa dos genes *sep*, *mva* e *fbl* e 10% (n=9), na identificação fenotípica, apontavam para outras espécies de ECN e 4 amostras identificadas como *S. epidermidis* por testes bioquímicos foram negativas na pesquisa do gene *sep*. A figura 2 mostra imagens de géis de eletroforese para a identificação de espécies.

Apesar de resultados concordantes entre os testes bioquímicos e genotípicos, 15,56% (n=14) das amostras de *S. epidermidis* foram identificadas como outras espécies de ECN nos testes bioquímicos. Entretanto, neste trabalho foi considerada a identificação genotípica.

Figura 1 – Espécies de ECN isoladas de pacientes com IPCS internados em um hospital público de ensino, no período de maio de 2010 a julho de 2012.



Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

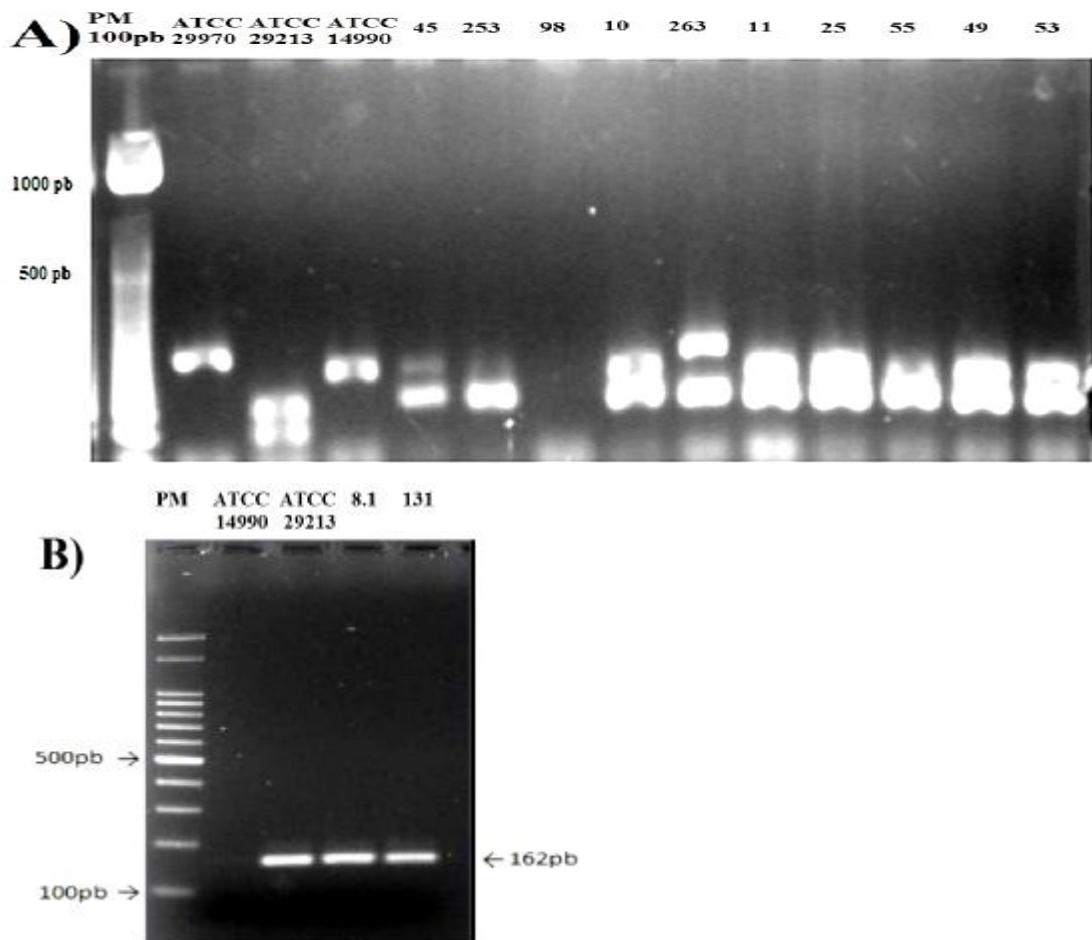
5.2 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

Na avaliação do perfil de resistência a oxacilina, todas as amostras foram resistentes. Os testes de microdiluição em caldo apresentaram faixas elevadas de concentração inibitória mínima (CIM) com 31,11% (n=28) das amostras isoladas de hemoculturas (n=27) e colonizantes (n=1) na faixa de CIM $\geq 256 \mu\text{g/mL}$ (figura 3a). A porcentagem de amostras positivas para o gene *mecA* foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) entre as espécies de ECN. Entre todas as amostras (n=90), apenas a amostra de *S. xylosus* apresentou resultado negativo para a pesquisa do gene *mecA*.

Nos estudos com a técnica de microdiluição em caldo para vancomicina, todas as amostras apresentaram-se na faixa de sensibilidade, com 65,56% das amostras causadoras de infecção (n=45) e colonizantes (n=14) apresentando CIM de $4 \mu\text{g/mL}$ (figura 3b).

Adicionalmente, estas amostras foram avaliadas pela técnica de PAP, porém não foi encontrada nenhuma amostra com o perfil de resistência heterogênea a vancomicina.

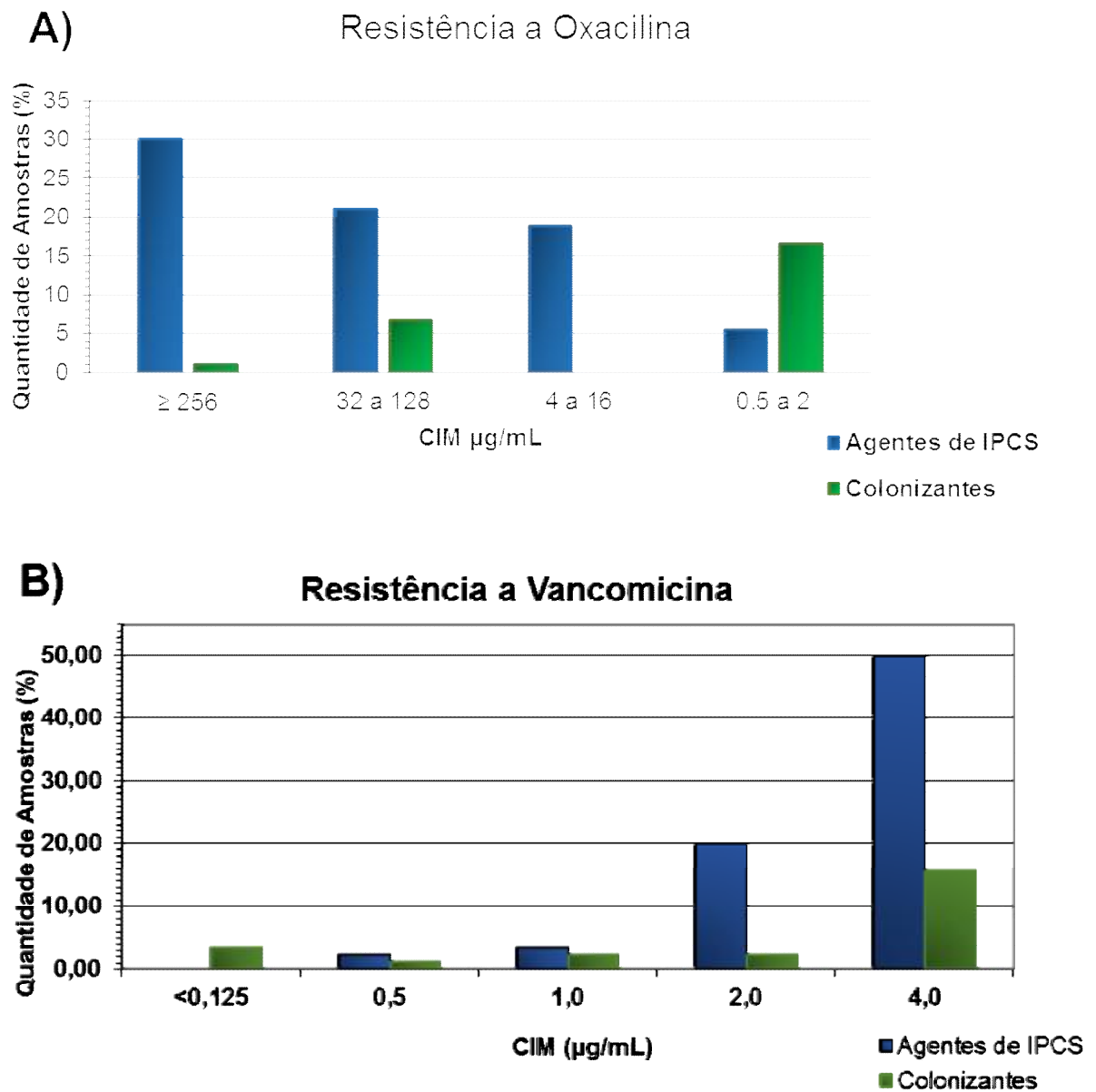
Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose para identificação genotípica de espécies de ECN isoladas de pacientes com IPCS internados em um hospital público de ensino, no período de maio de 2010 a julho de 2012.



Fonte: Do grupo de pesquisa, 2014. Eletroforeses em géis de agarose 1,5% mostrando a presença dos genes *mecA* (resistência a meticilina) (A) e *mecA*, *sep* (*S. epidermidis*) e *mva* (*S. haemolyticus*) (B). Amostras controles: ATCC 29970 (*S. haemolyticus*; *mecA*-), ATCC 29213 (*S. aureus*; *mecA*+) e ATCC 14990 (*S. epidermidis*; *mecA*-). A: amostras de ECN agentes de IPCS (45, 10, 11, 25, 49 são *S. epidermidis mecA*+; 98 *S. xylosus mecA*-; 263 *S. haemolyticus mecA*+; 55 *S. cohnii mecA*+, 253 *S. saprophyticus mecA*+). B: amostras de *S. epidermidis mecA*+ (8.1 colonização e 131 agente de IPCS).

Silva, R.B. *Estafilococos Coagulase Negativos isolados de pacientes com infecção de corrente sanguínea: aspectos microbiológicos e imunológicos*, 2014.

Figura 3 – Perfil de resistência oxacilina e vancomicina por ECN de pacientes com IPCS, internados em um hospital público de ensino, no período de maio de 2010 a julho de 2012.

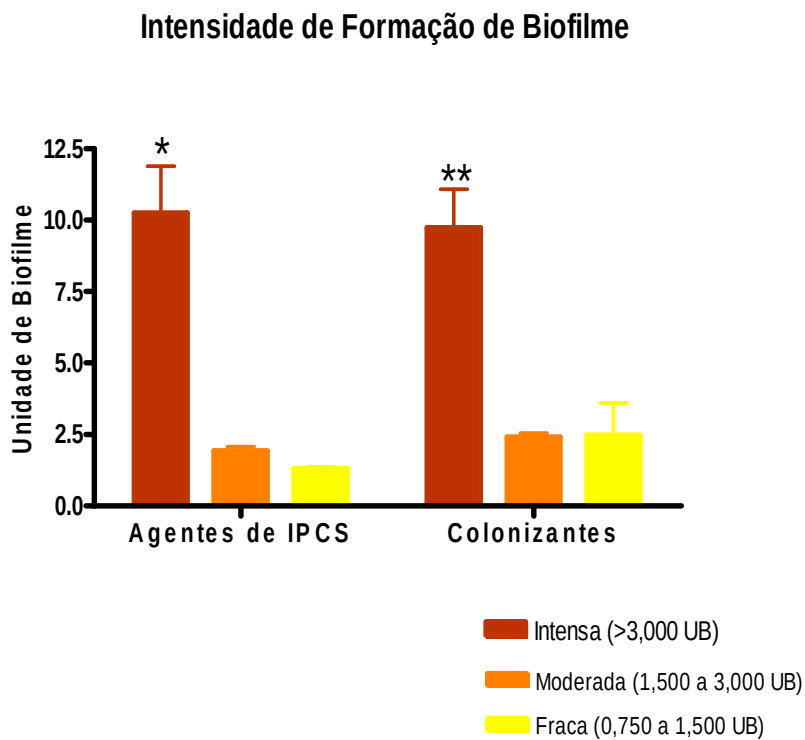


Fonte: Elaborada pela autora, 2014. Perfil de resistência a antimicrobianos com determinação da CIM. A: Resistência a oxacilina. B: Resistência a vancomicina.

7.3 FORMAÇÃO DE BIOFILME

Analisando-se a formação de biofilme *in vitro*, através do método espectrofotométrico, 61,76% (42/68) das amostras causadoras de IPCS e 63,63% (14/22) das amostras colonizantes revelaram-se produtoras de biofilme. Ao todo, 23,34% das amostras agentes de IPCS e 10% das colonizantes mostraram produção intensa (figura 4), sendo 30,88% (n=21) das amostras do primeiro grupo e 40,91% (n=9) do segundo grupo (DO > 3,000 UB) ($p < 0,01$).

Figura 4 – Formação de biofilme por ECN isolados de pacientes com infecção primária de corrente sanguínea, internados em um hospital público de ensino, no período de maio de 2010 a julho de 2012.



Fonte: Elaborado pela autora, 2014. IPCS: Infecção primária de corrente sanguínea; UB: unidade de biofilme.

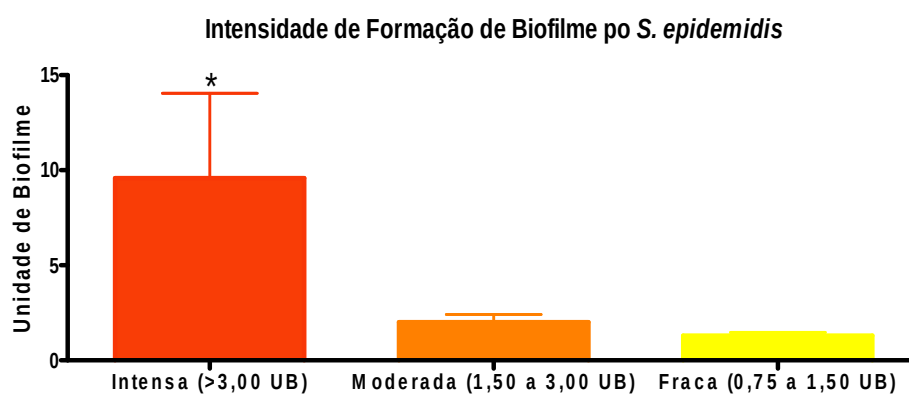
*: média estatisticamente superior no grupo de ECN agentes de IPCS com produção intensa em relação a produção moderada e fraca; $p < 0,01$; $\alpha = 0,01$; teste de Tukey. **: média estatisticamente superior no grupo de ECN colonizantes com produção intensa em relação a produção moderada e fraca; $p < 0,01$; $\alpha = 0,01$; teste de Tukey.

Silva, R.B. *Estafilococos Coagulase Negativos isolados de pacientes com infecção de corrente sanguínea: aspectos microbiológicos e imunológicos*, 2014.

Houve diferença estatística significativa ($p<0,01$) entre a quantidade de biofilme produzida pelas amostras classificadas como de produção intensa em comparação às de produção moderada, tanto no grupo de amostras isoladas de IPCS quanto no grupo de colonizantes.

Entre as amostras de ECN formadoras de biofilme ($n=55$), a espécie mais frequente foi *S. epidermidis*, com 36,36% (20/55) demonstrando produção intensa e diferença estatisticamente significativa ($p<0,01$) entre a quantidade de biofilme produzida pelas cepas de produção intensa e as de produção moderada, independente da origem da amostra (figura 5).

Figura 5 – Formação de biofilme por *S. epidermidis* isolados de pacientes com infecção primária de corrente sanguínea, internados em um hospital público de ensino, no período de maio de 2010 a julho de 2012.



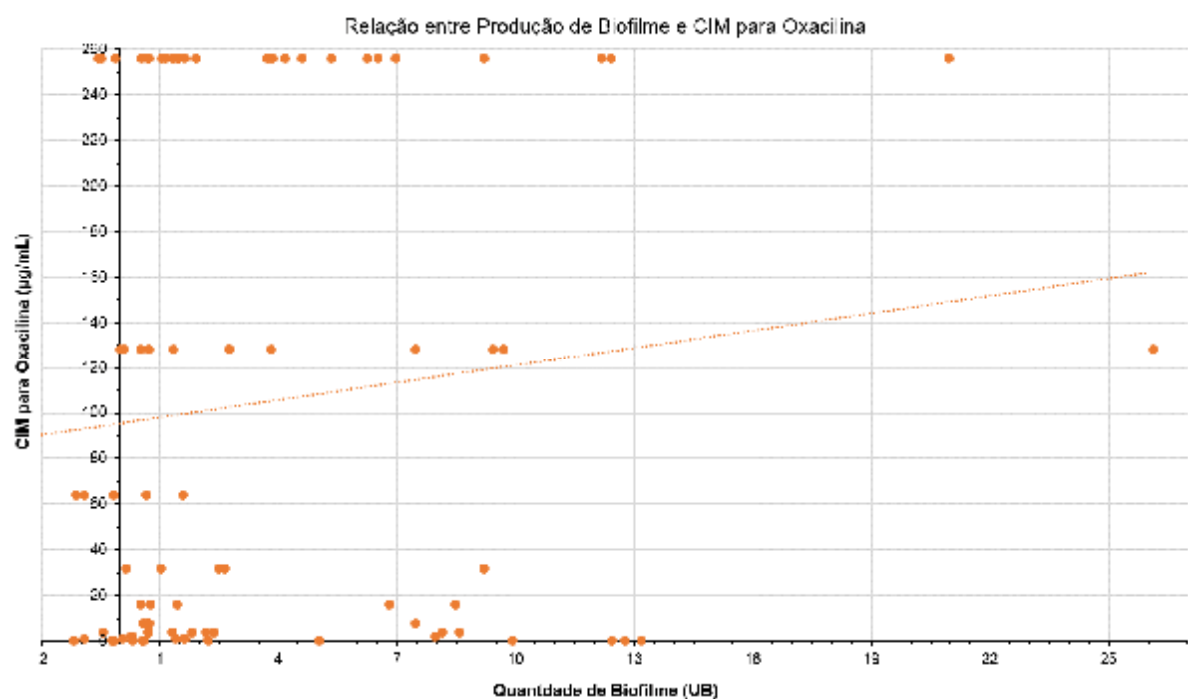
Fonte: Elaborado pela autora, 2104. UB: Unidade de biofilme. *: média estatisticamente superior entre *S. epidermidis* com produção intensa em relação a produção moderada e fraca; $p<0,01$; $\alpha=0,01$; teste de Tukey.

Ao relacionar formação de biofilme com a resistência a oxacilina, houve aumento na intensidade de produção de biofilme e nos valores de CIM para oxacilina (figura 6).

Nas pesquisas dos genes *icaAB* e *atlE*, foram positivas 54,44% (n=49) e 76,67% (n=69) das amostras, respectivamente. Entre as espécies houve diferença estatística significativa ($p < 0,0001$) na porcentagem de amostras positivas para a pesquisa de cada um destes genes.

Os resultados gerais das análises microbiológicas das amostras de ECN causadoras de IPCS e colonizantes foram dispostos na tabela 2.

Figura 6 – Relação entre a produção de biofilme e a CIM para oxacilina para ECN isolados de pacientes com IPCS, internados em um hospital público de ensino, no período de maio de 2010 a julho de 2012.



Fonte: Elaborado pela autora, 2014. CIM: Concentração Inibitória Mínima, UB: Unidade de Biofilme.

Tabela 2 – Perfil microbiológico de ECN isoladas de pacientes com IPCS, internados em um hospital público de ensino, no período de maio de 2010 a julho de 2012.

Espécies	Origem da Amostra	n (%)	Produção de Biofilme (UB)			Resistência a Antimicrobianos		
			Média	Gene	Gene	Vancomicina	Gene	Oxacilina
			(mín –máx)	<i>icaAB</i> (%)	<i>atlE</i> (%)	CIM 4 µg/mL (%)	<i>mecA</i> (%)	CIM > 256 µg/mL (%)
<i>S. epidermidis</i>	Infecção	56 (78,87)	1.33 (-1.11 – 20.95)	27 (38,03)	45 (63,38)	35 (49,29)	56 (78,87)	21 (29,58)
	Colonização	15 (21,13)	8,81 (1,405 – 26,126)	12 (61,97)	15 (36,62)	9 (12,68)	15 (21,13)	1 (1,41)
<i>S. haemolyticus</i>	Infecção	3 (37,50)	1.45 (0.51 – 7.97)	0	0	2 (25,00)	3 (37,50)	0
	Colonização	5 (62,50)	6,33 (2,75 – 12,76)	2 (25,00)	2 (25,00)	3 (37,50)	5 (62,50)	0
<i>S. saprophyticus</i>	Infecção	3 (100,00)	0.73 (-3.94 – 4.16)	2 (66,67)	2 (66,67)	2 (66,67)	3(100,00)	3 (100,00)
<i>S. lugdunensis</i>	Infecção	1 (50,00)	-	1 (50,00)	1 (50,00)	1 (50,00)	1 (50,00)	1 (50,00)
	Colonização	1 (50,00)	0	1 (50,00)	0	1 (50,00)	1 (50,00)	0
<i>S. hominis</i>	Infecção	1 (100,00)	1.00 (-0.124 – 9.69)	1 (100,00)	1 (100,00)	1 (100,00)	1 (100,00)	0
<i>S. cohnii</i>	Infecção	2 (100,00)	1.59 (1.05 – 6.25)	2 (100,00)	2 (100,00)	2 (100,00)	2 (100,00)	1 (50,00)
<i>S. xylosus</i>	Infecção	1 (100,00)	-	1 (100,00)	0	1 (100,00)	0	0
<i>S. capitis</i>	Infecção	2 (100,00)	6.97 (2.63 – 7.46)	0	1 (50,00)	2 (100,00)	2 (100,00)	1 (50,00)

UB: unidade de biofilme; n: número de amostras; %: porcentagem de amostras em relação ao “n” de cada espécie; min: valor mínimo; máx: valor máximo, -: valores constantes; CIM: concentração inibitória mínima.

7.4 INDUÇÃO DE MEDIADORES DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA

Para a estimulação de células mononucleares humanas *in vitro*, foram selecionadas 10 amostras de ECN provenientes de hemoculturas, com perfil de produção intensa de biofilme e valores elevados de CIM para oxacilina, e 10 amostras de ECN colonizantes, com perfil de ausência ou reduzida produção de biofilme e menores valores de CIM para oxacilina.

A dosagem de mediadores da resposta imunológica demonstrou valores aproximados de concentrações de TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-10 para os dois grupos, porém, a concentração de IL-12p70 foi maior para o grupo de ECN colonizantes, com média $\pm$ desvio padrão de $21,50 \pm 38,07$ pg/mL, em comparação às amostras isoladas de corrente sanguínea com $12,51 \pm 19,54$ pg/mL (tabela 3).

Já na avaliação interespecífica, maiores valores de concentrações de IL-12p70, TNF α , IL-1 β e IL-10 foram encontrados na estimulação celular com *S. haemolyticus*, independente da origem das amostras (tabela 4). A concentração de IL-12p70 induzida por *S. haemolyticus* em relação às espécies *S. epidermidis*, *S. lugdunensis* e *S. saprophyticus* foi maior e estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (figura 7).

As maiores concentrações de IL-6 e IL-8 foram induzidas pela estimulação das células com *S. epidermidis* (tabela 4) e houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na indução de IL-6 em relação às espécies *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis* e *S. saprophyticus* (figura 7).

Ao relacionar a quantidade de biofilme produzida pelas amostras de ECN com as concentrações de mediadores da resposta imunológica induzidas por elas na estimulação de PBMC, encontramos correlações positivas e estatisticamente significantes entre a quantidade de biofilme produzida por *S. epidermidis* isolados de hemoculturas de pacientes com IPCS e as concentrações de TNF α , IL-1 β , IL-10 e IL-12p70 (figura 8).

Tabela 3 – Concentrações de mediadores da resposta imunológica obtida pela estimulação de células mononucleares com amostras de ECN, isoladas de pacientes com IPCS, internados em um hospital público de ensino, no período de maio de 2010 a julho de 2012.

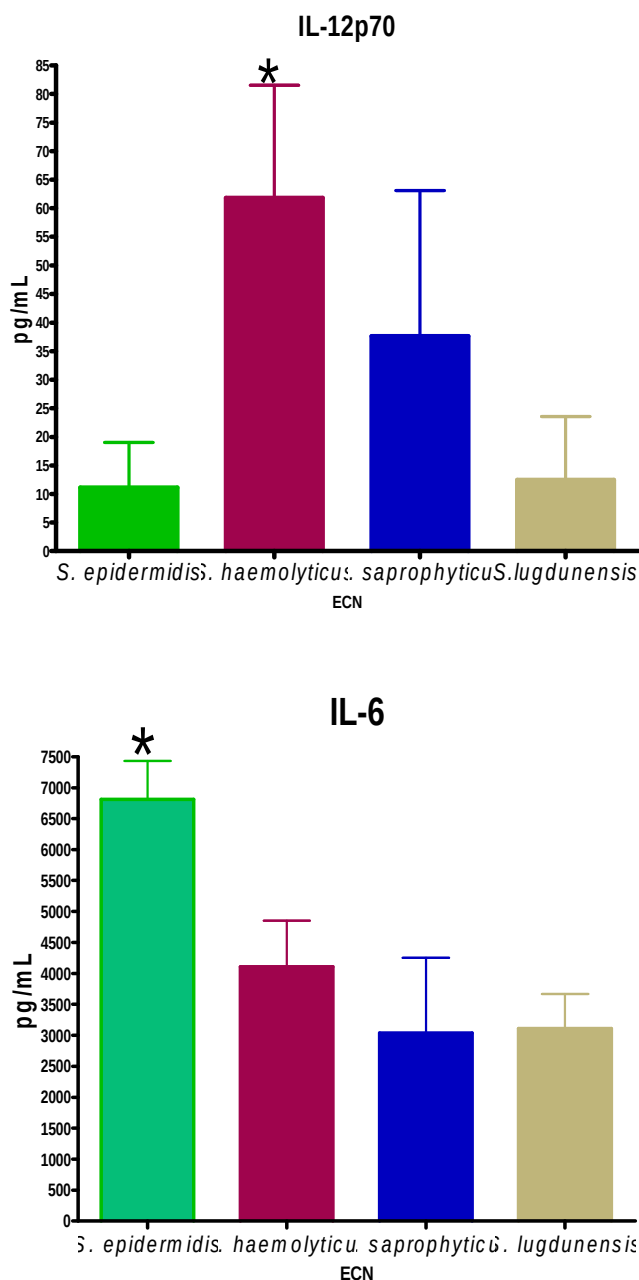
			Concentração em pg/mL (média ± desvio padrão)					
			TNF α	IL-1 β	IL-6	IL-8	IL-10	IL-12p70
Amostras isoladas de hemoculturas (n=10)			753,42 ± 546,15	2092,06 ± 1398,16	3405,52 ± 1186,69	4732,27 ± 2332,33	157,03 ± 134,69	12,51 ± 19,54
Amostras Colonizantes (n=10)			911,48 ± 486,12	2039,04 ± 1186,21	4077,82 ± 1078,91	5268,19 ± 1733,96	200,75 ± 151,51	21,50 ± 38,07

Tabela 4 – Concentrações de mediadores da resposta imunológica obtida pela estimulação de células mononucleares com amostras de ECN, isoladas de pacientes com IPCS, internados em um hospital público de ensino, no período de maio de 2010 a julho de 2012.

Concentração em pg/mL (média ± desvio padrão)						
	TNF α	IL-1 β	IL-6	IL-8	IL-10	IL-12p70
<i>S. epidermidis</i> (n=11)	661,59 ± 483,54	1516,17 ± 1628,22	6811,61 ± 620,08 ^b	5555,10 ± 2663,03	130,04 ± 56,66	11,13 ± 7,91
<i>S. haemolyticus</i> (n=4)	1523,31 ± 566,12	3080,27 ± 641,62	4107,01 ± 746,51	4466,91 ± 2250,78	261,78 ± 312,69	61,81 ± 19,73 ^a
<i>S. saprophyticus</i> (n=3)	1089,67 ± 141,85	2637,70 ± 677,42	3036,36 ± 1217,04	2020,22 ± 61694	101,71 ± 2,81	37,62 ± 25,44
<i>S. lugdunensis</i> (n=2)	915,10 ± 177,80	1859,43 ± 328,81	3109,55 ± 555,33	4259,64 ± 6421,85	194,84 ± 14,56	12,48 ± 11,08

a,b:p>0,05

Figura 7 – Perfil de estimulação da produção de mediadores da resposta imunológica por ECN isolados de pacientes com IPCS, internados em um hospital público de ensino, no período de maio de 2010 a julho de 2012.



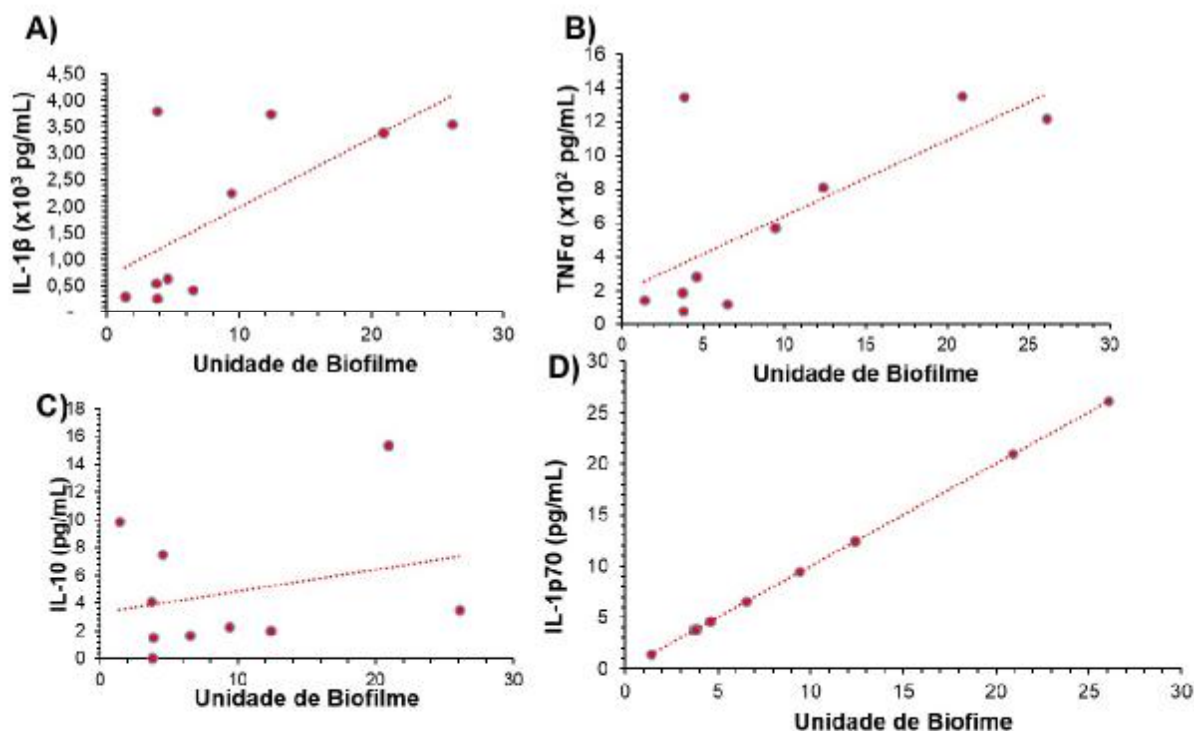
Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

*: médias estatisticamente maiores ($p < 0,05$), ANOVA, Teste de Tukey 5%.

Silva, R.B. *Estafilococos Coagulase Negativos isolados de pacientes com infecção de corrente sanguínea: aspectos microbiológicos e imunológicos*, 2014.

Figura 8 – Relação entre a formação de biofilme e a indução de mediadores da resposta imunológica por amostras de ECN isolados de pacientes com IPCS, internados em um hospital público de ensino, no período de maio de 2010 a julho de 2012.

Relação entre a Formação de Biofilme e a Indução de IL-1 β , TNF α , IL-10 e IL-12p70



Fonte: Elaborado pela autora, 2014. Correlações positivas e estatisticamente significantes entre a quantidade de biofilme produzida por *S. epidermidis* isolados de hemoculturas de pacientes com IPCS e as concentrações de IL-1 β ($r=0,67$), TNF α ($r=0,70$), IL-10 ($r=0,3$) e IL-12p70 ($r=0,25$). Coeficiente de Correlação de Pearson.

Silva, R.B. *Estafilococos Coagulase Negativos isolados de pacientes com infecção de corrente sanguínea: aspectos microbiológicos e imunológicos*, 2014.

8 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

S. epidermidis e outras espécies de ECN, como *S. hominis* e *S. haemolyticus*, são os principais componentes da microbiota da pele e mucosas humanas (KLOOS e MUSSELWHITE, 1975), porém ECN são os microrganismos predominantemente isolados de hemoculturas positivas (DECK et al., 2012), o que torna intrigante a interpretação das relações entre estes microrganismos com o hospedeiro humano, por suas características ambíguas.

Apesar do expressivo número de hemoculturas positivas para ECN (n=263), apenas uma pequena quantidade (n=68) foi clinicamente caracterizada como proveniente de um quadro de infecção primária de corrente sanguínea (25,86%), mostrando a ocorrência elevada de contaminação destas amostras.

Sabe-se que os ECN são os agentes etiológicos mais frequentes de bacteremias primárias ou relacionadas a cateteres vasculares, representando cerca de 40% do total e 72% daquelas causadas por Gram-positivos, sendo *S. epidermidis* o agente de dois terços das bacteremias por ECN e 25% do total (GARCÍA, 2011). Porém, entre os isolados de ECN provenientes de hemoculturas, 60 a 80% são resultantes da contaminação das amostras, durante a coleta de sangue, devido a técnicas inadequadas de antisepsia (DECK et al., 2012). Outro estudo recente realizado por pesquisadores suíços caracterizou como contaminantes 65% dos isolados das amostras, atribuindo a contaminação a aplicação incorreta de técnicas de antisepsia para a coleta (ELZI et al., 2012).

Estes dados contribuem para explicação de que podemos atribuir a elevada porcentagem de ECN contaminantes isolados das hemoculturas no hospital em estudo à inadequada técnica de coleta. Apesar da automação de hemoculturas, o isolamento frequente destes microrganismos pode advir da microbiota da pele dos pacientes ou da microbiota dos profissionais da saúde. Porém, mesmo entre as infecções primárias de corrente sanguínea, os ECN são os agentes mais frequentes (OLAECHEA et al., 2011) e estes dois pontos opostos reforçam a necessidade de

maior qualificação e conscientização dos profissionais envolvidos na coleta e manipulação das amostras, a fim de minimizar a interferência de fatores que contribuam para a dificuldade em se estabelecer a etiologia das bacteremias.

Em nossos estudos 82,35% (n=56) dos agentes etiológicos das IPCS foram identificadas como *S. epidermidis*, seguido por 4,42% (n=3) de *S. haemolyticus* e 2,94% (n=2) de *S. saprophyticus*, *S. cohnii* e *S. capitis*. Além deles, *S. hominis*, *S. lugdunensis* e *S. xylosus* também foram identificados em 1,47% (n=1) das amostras de hemoculturas.

Em conformidade com nossos resultados, a literatura apresenta *S. epidermidis* como o agente mais frequente nas análises microbiológicas de hemoculturas (MARTINS et al., 2013; USTULIN et al., 2012). Em segundo lugar entre os ECN, *S. haemolyticus* é identificado como agente patogênico isolado de hemoculturas (BARROS et al., 2011). *S. saprophyticus* é o segundo mais frequente causador de infecção do trato urinário em mulheres, mas suas complicações podem levar a pielonefrite e nefrolitíase e ainda alcançar a corrente sanguínea causando septicemia e endocardite (WIDERSTRÖM et al., 2012). *S. lugdunensis*, apesar de ser isolado com menor frequência (RAVAIOLI et al., 2012), é agente etiológico de endocardites valvares destrutivas e com risco de embolia (SIBAL, et al., 2011), além de ser encontrado também em bacteremias, infecções associadas a cateteres, próteses intravasculares, entre outras (CERCENADO, 2009; GARCÍA-LOZANO e AZNAR OROVAL, 2012). *S. hominis* também pode causar infecção de corrente sanguínea e outras infecções oportunistas (ZHANG, 2013).

Observando-se separadamente os resultados da identificação fenotípica das amostras utilizadas em nossos estudos, verifica-se que *S. epidermidis* (15,55%) foi identificado como outras espécies de ECN através dos testes bioquímicos utilizados. Dentro deste contexto de identificação de espécies, Blaiotta *et al.* (2010) afirmam que além da importância da identificação acurada de infecções por espécies de ECN por laboratórios microbiológicos, estudos demonstraram controvérsias nos métodos fenotípicos comparados com técnicas moleculares.

Devido ao aumento no significado clínico de ECN há uma necessidade de métodos mais precisos e sensíveis de identificação de espécies em amostras clínicas. Vários sistemas de identificação automatizados estão disponíveis no comércio. Eles permitem uma identificação mais acurada e mais rápida do que na identificação morfológica manual ou testes bioquímicos. No entanto, a acurácia destes sistemas pode ser comprometida pela variação na expressão de características fenotípicas e pela limitação dos bancos de dados. Estas limitações podem resultar em resultados ambíguos e impossibilidade de identificar isolados incomuns. Assim, métodos genotípicos de identificação de espécies também tem emergido como ferramentas diagnósticas nas infecções por ECN (HWANG et al., 2011).

A dificuldade na interpretação das provas bioquímicas, especialmente atividade da fosfatase alcalina e fermentação da manose, podem ter sido a causa de erros na identificação fenotípica. O esquema simplificado utilizado como referência neste trabalho foi desenvolvido testando-se 198 amostras de ECN e comparando-se com métodos padronizados e automatizado. Nele, 98,5% das amostras foram identificadas corretamente. Além disso, o esquema oferece as vantagens de ser mais rápido, econômico e prático do que os métodos de referência, tornando-se adequado para uso na rotina de laboratórios de Microbiologia (IORIO et al., 2007).

No laboratório de Microbiologia Clínica do hospital onde foram isoladas as amostras deste estudo, os ECN são identificados pelo método da coagulase em tubo como “*Staphylococcus coagulase negativo*” ou “*Staphylococcus saprophyticus*”, quando isolados em uroculturas. Nestes casos e nos de isolados de hemoculturas, procede-se a realização de antibiogramas. Assim, os resultados de identificação de espécies deste estudo podem disponibilizar dados sobre a epidemiologia das espécies de ECN.

Quanto a resistência a antimicrobianos, as amostras avaliadas no presente estudo todas foram resistentes a oxacilina e mostraram altos níveis de CIM com 31,11% dos isolados de colonização (n=2) e hemoculturas (n=26) na faixa $\geq 256,0$ µg/mL, incluindo amostras de *S. saprophyticus*, *S. capitis*, *S. cohnii* e *S. lugdunensis*.

Um estudo com amostras de ECN isolados de pacientes com bacteremia na Tunísia revelou *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. hominis* como as espécies mais frequentes de ECN resistentes a meticilina (BOUCHAMI et al., 2011). Allori *et al.* (2006) ainda afirmaram que as espécies de ECN mostraram aumento na resistência ao tratamento antimicrobiano com penicilina e β -lactâmicos sintéticos, representados pela oxacilina. Muitos destes microrganismos também apresentam resistência a outros antimicrobianos. Fármacos de uso corrente como cefalosporinas, macrolídeos, aminoglicosídeos e tetraciclina, foram ineficazes na inibição de várias espécies prevalentes de ECN. Como agravante, a multirresistência é carregada em um cassete cromossômico (SCC) que inclui o gene *mecA* de resistência a penicilinas semi-sintéticas (JOHN e HARVIN, 2007).

A resistência a oxacilina encontrada nas amostras de ECN isoladas no hospital em estudo e as avaliadas no contexto global, reforçam a necessidade de maior e constante racionalização do uso de antimicrobianos no ambiente hospitalar. A pressão seletiva sobre os microrganismos e os fatores de riscos a que os pacientes encontram-se expostos favorecem o aparecimento de cepas resistentes entre microrganismos presentes na microbiota humana e disseminação de genes de resistência entre diversas espécies, restringindo cada vez mais a terapêutica farmacológica. A hospitalização prolongada pode tornar os pacientes susceptíveis a infecções bacterianas graves causadas principalmente por microrganismos multirresistentes, como ECN resistentes a meticilina, selecionados no ambiente hospitalar. Dados da literatura mostram que a resistência nestes microrganismos aumentou de 60% para 90% positivas (HIGASHIDE et al., 2006).

A fim de se obter maior segurança na identificação de cepas resistentes, seria ideal a implementação da pesquisa de genes de resistência por PCR no laboratório de Microbiologia deste hospital. Um trabalho realizado no Canadá exemplifica a comprovada melhora nos resultados de tratamento antimicrobiano de IPCS, visto que o método molecular proporcionou 99% de especificidade e sensibilidade a pesquisa do gene *mecA* em amostras de ECN de hemoculturas (WANG et al., 2013).

Entre as amostras de ECN avaliadas em nossos estudos, 98,88% foram positivas para a pesquisa do gene *mecA*, sendo a única amostra negativa isolada de hemocultura e identificada como *S. xylosus*.

Recentemente o gene *mecA* foi identificado em 86% das amostras de ECN provenientes de hemoculturas, porém as CIM para oxacilina foi superior a 32 mg/L em apenas 11% das amostras (FLEER et al., 2012). Amostras de ECN, potenciais agentes de infecções alimentares, também demonstraram multirresistência a antimicrobianos e 81,5% de positividade para o gene *mecA* (FONTES et al., 2013). Já em um estudo com 180 amostras de ECN isoladas de pacientes pediátricos com bacteremia verdadeira, 54,5% das amostras foram resistentes a meticilina e positivas para a pesquisa do gene *mecA* (SAXENA et al., 2013).

A resistência a oxacilina em todas as amostras de ECN e as elevadas CIM encontradas neste trabalho podem ser atribuídas a rigorosa caracterização adotada para as IPCS e a elevada pressão seletiva no ambiente hospitalar, tanto para as amostras de hemoculturas quanto para as colonizantes. Este perfil de resistência encontrado em diversas espécies de ECN sustentam a necessidade de constante vigilância pela CCIH às medidas de controle e prevenção de infecções hospitalares. A implementação de técnicas moleculares de identificação de amostras resistentes possibilitaria maior rapidez, sensibilidade e especificidade nas análises, contribuindo para estas ações. Estudos com pesquisa de resistência a meticilina por métodos fenotípicos e genotípicos comprovam esta contribuição. A análise amostras isoladas de hemoculturas de neonatos revelaram 79,1% das amostras de ECN como resistentes a meticilina e 87% positivas para *mecA*, destacando a importância da pesquisa molecular de resistência na apropriada terapia antimicrobiana institucional (BAHMANI et al., 2013).

Além de *S. epidermidis*, outras espécies de ECN resistentes a oxacilina foram identificadas em nossas amostras, totalizando 21,10% (n=19) dos isolados. Valores de CIM superiores a 256 µg/mL e presença do gene *mecA* foram encontrados entre os isolados de hemoculturas.

Resultados semelhantes foram verificados em outros estudos. A avaliação da resistência a oxacilina em *S. saprophyticus* mostrou que 93 amostras com MIC entre 0,5 e 4 µg/mL foram negativas para a pesquisa do gene *mecA* enquanto 8 amostras com CIM superior a 64 µg/mL foram positivas (HIGASHIDE et al., 2006). Em 60 amostras de *S. capitis*, 85% delas foram resistentes a oxacilina e 90% apresentaram o gene *mecA* (CUI et al., 2013). No estudo de 4 amostras de *S. cohnii*, a CIM para oxacilina foi de 256 µg/mL e foi detectado gene *mecA* (THEUNISSEN et al., 2009). Estudos com *S. lugdunensis* apontam para CIM maior que 256 µg/mL e presença do gene *mecA* (TEE et al., 2003; STARLANDER et al., 2011).

A identificação de espécies de ECN diferentes de *S. epidermidis* como agentes de IPCS corroboram com dados recentes da literatura em que estes microrganismos aparecem como agentes etiológicos de septicemia em neonatos, apresentando resistência a meticilina e presença do gene *mecA* (SAXENA et al., 2013).

A única amostra negativa na pesquisa do gene *mecA* apresentou perfil de resistência a oxacilina com CIM de 2 µg/mL, além de resistência a norfloxacin e tetraciclina e resistência intermediária a clindamicina e sulfametoxazol-trimetoprim por testes de disco difusão (dados do grupo de pesquisa não demonstrados neste trabalho).

De acordo com Fleer *et al.* (2012), em ECN, a presença do gene *mecA* não está necessariamente associada a detecção de resistência a β-lactâmicos. A discrepância entre a detecção deste gene e a detecção da proteína PBP-2a está associada a maneira como ocorre a ligação dos β-lactâmicos ao sítio ativo desta molécula. Estudos cristalográficos mostraram que penicilinas e cefalosporinas ligam-se melhor, em contraste com a meticilina, o que retarda a formação do intermediário acil-PBP, essencial para a atividade inibitória do β-lactâmicos na função das PBP (LIM e STRYNADKA, 2002).

Além disso, a baixa expressão da proteína PBP-2a pode levar a diferenças entre a resistência a oxacilina e a outros β-lactâmicos visto que mesmo esta baixa expressão é suficiente para a resistência a oxacilina/meticilina, devido a sua característica de encaixe no sítio de ligação da PBP-2a. Ao mesmo tempo, β-lactâmicos mais antigos podem ser mais ativos diante de sua

maior afinidade no sítio de ligação. Baixas CIM de β -lactâmicos foram encontradas em cepas resistentes a oxacilina e picos plasmáticos de concentração maior que 2 mg/L foram obtidos, além da manutenção destes níveis (PULLEN et al., 2006). Isto sugere que esta concentração pode ser suficiente para a inibição do crescimento de ECN na corrente sanguínea de neonatos, permitindo o desenvolvimento da atividade do sistema imune e a eliminação das bactérias por opsonização e fagocitose (FLEER et al., 2012).

A resistência a antimicrobianos por cepas diferentes de *S. epidermidis* encontrada em nossas amostras requer atenção pelo fato de que este perfil pode significar a existência de reservatórios de genes de resistência para cepas com maior virulência e patogenicidade, tanto no ambiente hospitalar quanto na comunidade. É importante considerar ainda que a resistência a oxacilina na ausência do gene *mecA* pode estar relacionada a sua variante *mecC*, que faz parte do elemento SCC*mec* tipo XI, que já foi identificado em *S. xylosus* (HARRISON et al., 2013). Esta possibilidade pode ser averiguada através de novos estudos moleculares de resistência a antimicrobianos em ECN.

Quanto a pesquisa de resistência à vancomicina, todas as amostras foram sensíveis. Estes resultados são favoráveis, visto que todas as amostras foram resistentes a oxacilina e a resistência a outros antimicrobianos também foi constatada (dados do grupo de pesquisa não demonstrados neste trabalho), colocando à vancomicina como uma das poucas alternativas para o tratamento das infecções por ECN.

Comumente, a resistência a oxacilina em ECN, associada ao perfil de multirresistência, faz com que, em consequência, a vancomicina seja usada amplamente para o tratamento de infecções por estes microrganismos (SILVA et al., 2011). O uso frequente e contínuo de vancomicina tem elevado a CIM para 2 mg/L. Apesar deste valor estar dentro da faixa de sensibilidade, pode ocorrer falha terapêutica por perda da atividade *in vivo* (OLIVARES et al., 2012). Fernández-Rufete *et al.* (2012) relataram quatro casos de óbito de pacientes com bacteremia por ECN, em que a CIM para vancomicina foi maior que 2 μ g/mL. Mesmo em ECN

isolados da pele, 69% de amostras com CIM maior que 2 µg/mL, especialmente *S. epidermidis*, já foram registradas em um estudo realizado em Portugal (OLIVEIRA e CERCA, 2013).

A realização de testes microbiológicos que avaliem a CIM para vancomicina entre as cepas de ECN isoladas no hospital em estudo é de grande importância no ambiente hospitalar a fim de detectar antecipadamente cepas com sensibilidade reduzida à vancomicina.

Apesar de estarem na faixa de sensibilidade, em nossos estudos, a maioria das amostras (65,56%) apresentarem valores de CIM de 4 µg/mL, sem entretanto a detecção de resistência heterogênea. Isto reforça a necessidade de constante vigilância quanto a caracterização do perfil microbiológico das amostras de ECN no ambiente hospitalar. Em um estudo com amostras de ECN isolados de pacientes com bacteremia, realizado por Nunes *et al.* (2007), 81,6% das amostras de ECN resistentes a oxacilina foram avaliadas quanto a presença de resistência heterogênea a vancomicina e 30,8% delas mostraram crescimento na concentração de 6 µg/mL do glicopeptídeo. Outro estudo mais recente, encontrou amostras resistentes e com resistência heterogênea a vancomicina, em pacientes com histórico de uso de glicopetídeos e internados em UTI de um hospital na Turquia. O estudo mostrou aumento no número de amostras resistentes comparadas a resultados anteriores, indicando que esta pesquisa é necessária periodicamente (KUSCU et al., 2011).

Além da resistência a antimicrobianos, a capacidade de formar biofilme foi avaliada. Entre as amostras deste trabalho 61,76% dos ECN agentes de IPCS revelaram produção de biofilme e 30,83% foram classificadas como de produção intensa.

Os ECN são os agentes mais comuns de sepse associada a formação de biofilme em pacientes neonatos de baixo peso (BRADFORD et al., 2011). De maneira geral, o biofilme constitui um reservatório de patógenos por estar associado a resistência a agentes antimicrobianos e infecções crônicas. Em estudos avaliando isolados clínicos de *Staphylococcus*, 89% foram isolados de pacientes com infecções associadas a dispositivos médicos, sendo 38,7% produtores de biofilme (SHARVARI e CHITRA, 2012). Um estudo envolvendo pacientes pediátricos com diagnóstico de otite média, identificou 36,7% das amostras como ECN

Silva, R.B. *Estafilococos Coagulase Negativos isolados de pacientes com infecção de corrente sanguínea: aspectos microbiológicos e imunológicos*, 2014.

produtores de biofilme, com duas amostras de *S. epidermidis* (6,67%) como produtores fortes. Os resultados foram comparados com amostras de suabes nasais de crianças com rinossinusite, identificando 34,8% de ECN produtores de biofilme e duas amostras de *S. epidermidis* (8,69%) como produtores fortes (PALUCH-OLEN et al., 2011).

A maior porcentagem de ECN produtores de biofilme identificada em nossos estudos pode ser atribuída, dentre outros, ao fato de que estas amostras foram isoladas apenas de hemoculturas e de que a maior parte destes pacientes estavam internados em UTI (dados do estudo epidemiológico realizado pelo grupo de pesquisa). Desta maneira, as bactérias além de estarem expostas a ação intensa de antimicrobianos, estão expostas a uma maior ação direta de leucócitos na corrente sanguínea e estes dois fatores exigem a seleção de cepas formadoras de biofilme para que se estabeleça a IPCS, quando comparadas a amostras de outras origens.

Entre os ECN colonizantes 43,64% revelaram produção de biofilme, com 40,91% das amostras classificadas como de produção intensa.

Em Portugal, o estudo de 61 amostras de ECN isolados da pele mostrou que 57% eram produtores de biofilme, entre eles 34% com produção fraca, 10% moderada e 13% forte, porém, não houve diferença significativa entre a produção por *S. epidermidis* e outras espécies de ECN. O estudo sustenta a ideia de que a produção de biofilme é essencial em um ambiente como a pele, onde os ECN estão expostos ao atrito (OLIVEIRA e CERCA, 2013).

Nossos resultados também apontam para a presença de cepas produtoras de biofilme isoladas da pele, com percentual de produtores relativamente próximo. As diferenças de intensidade de produção encontradas nos estudos, tanto em amostras causadoras de IPCS quanto amostras colonizantes, também podem entre ser consideradas em relação a metodologia que avaliou a quantidade de biofilme formada. Isto porque o método espectrofotométrico com coloração pelo Cristal Violeta tem baixa reprodutibilidade, sendo influenciado pelas condições de crescimento bacteriano, natureza e concentração do solvente e tempo de eluição (PANTANELLA et al., 2013). Além disso, a produção de biofilme é regulada por diversos estímulos ambientais, por isso não pode prever a patogenicidade dos ECN. Cepas comensais

Silva, R.B. *Estafilococos Coagulase Negativos isolados de pacientes com infecção de corrente sanguínea: aspectos microbiológicos e imunológicos*, 2014.

também podem ser induzidas a produzir biofilme até mesmo quando estimuladas por produtos utilizados no ambiente hospitalar (BRADFORD et al., 2011).

Em nosso estudo, para apenas uma amostra produtora de biofilme não foi identificada a presença do gene *mecA* e no contexto geral foi verificado aumento na intensidade de produção de biofilme e dos valores de CIM para oxacilina.

Um estudo mexicano mostrou que 66% das amostras de *S. epidermidis* causadoras de infecções hospitalares não produziam biofilme e 64% delas eram positivas para o gene *mecA* de resistência a oxacilina. Entre os 34% das amostras produtoras de biofilme, 91% eram positivas para *mecA*. Assim, as taxas de resistência a antimicrobianos foram maiores entre as amostras produtoras de biofilme (CABRERA-CONTRERAS et al., 2013). Em outro estudo, com amostras isoladas da pele, a frequência de resistência a antimicrobianos foi significativamente maior entre as amostras produtoras de biofilme, mostrando uma associação entre estes dois fatores em isolados de indivíduos saudáveis na comunidade (OLIVEIRA e CERCA, 2013).

A exposição a agentes antimicrobianos e seleção de cepas resistentes no ambiente hospitalar em estudo pode levar a maior produção de biofilme, mesmo por amostras isoladas da pele, já que tratava-se de pacientes internados na UTI neonatal. De acordo com a literatura, bactérias produtoras de biofilme são refratárias ao uso de antimicrobianos e desta forma, a resistência a terapia antimicrobiana e a habilidade em formar biofilme podem estar intimamente relacionadas e alguns pesquisadores argumentam que isto seria uma adaptação dos ECN ao seu comensalismo na pele (OLIVEIRA e CERCA, 2013).

Nas pesquisas dos genes *icaAB* e *atlE*, foram positivas 54,44% (n=49) e 76,67% (n=69) das amostras, respectivamente. Entre as espécies houve diferença estatística significativa ($p < 0,0001$) na porcentagem de amostras positivas para a pesquisa de cada um destes genes.

Em um estudo recente, com 116 amostras de *Staphylococcus* isolados de cateteres, revelou a presença do gene *icaAB* em 4/70 de *S. epidermidis* e 2/25 de *S. haemolyticus* (EHLERS et al., 2013). Entre amostras de ECN de origem ocular e diferentes de *S. epidermidis*,

cerca de 40% foram positivas para *icaAB* (MAKKI et al., 2011). E na análise de ECN isolados da pele de profissionais de um laboratório clínico, em um hospital terciário na Índia, não foi encontrada a presença do gene *icaAB* (SOUMYA et al., 2013).

Nossos resultados, assim como descrito na literatura, mostram que a presença ou ausência do gene *ica* não indica exatamente a habilidade ou incapacidade de formar biofilme. Fredhein *et al.* (2009) argumentaram que PIA não é o elemento essencial nem necessariamente de maior importância na produção do biofilme. A expressão do operon *ica* e a formação de biofilme é bastante variável entre isolados de *Staphylococcus*. Em um estudo com 66 amostras de ECN, 73% das amostras apresentaram o gene *ica*, mas apenas 15% formaram biofilme *in vitro* (CHOKR et al., 2006). Estudos mostram que em vários isolados clínicos de *Staphylococcus* capazes de formar biofilme independentemente do operon *ica*, ele é mantido, expresso e regulado. Isso parece ocorrer devido ao fato de que, em algumas condições, proteínas e outras moléculas de superfície cooperam com PIA para a adesão intercelular (O’GARA, 2007).

Um estudo realizado no Rio de Janeiro, mostrou que os 26 isolados clínicos de *S. epidermidis* foram fortes produtores de biofilme *in vitro*, com 96,2% das amostras com produção associada a presença do gene *atlE* (BOTELHO et al., 2012).

A pesquisa de genes como *ica* e *atlE* no hospital em estudo levaria ao benefício de fornecer a identificação de possíveis causadores de infecção associada a dispositivos médicos em pacientes de maior risco, em menor tempo. Além de proporcionar melhor conhecimento da virulência de cepas presentes neste ambiente, como agentes de infecção ou colonizantes, beneficiando a atuação da CCIH.

A observação de que esta associação entre os fatores – resistência a antimicrobianos e produção de biofilme – poderiam favorecer a infecção por ECN, foi complementada pela análise da estimulação de células mononucleares por cepas de ECN isoladas de pacientes com IPCS.

A dosagem de mediadores da resposta imunológica demonstrou valores médios de concentrações de $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12p70 maiores para as amostras colonizantes.

Os níveis menores de $\text{TNF}\alpha$ induzidos por amostras isoladas de hemoculturas, porém aproximados das cepas colonizantes, podem relacionar-se à permanência destas bactérias na pele e mucosa dos pacientes, sem maior estimulação do processo de fagocitose. Já os níveis de IL-1 β induzidos pelos dois grupos de bactérias mostraram-se muito próximos, com média ligeiramente maior para as amostras isoladas de hemoculturas. Uma maior indução desta citocina em infecções associadas a dispositivos médicos, poderia gerar uma resposta inflamatória exagerada. Diferentes estudos com ECN mostraram que $\text{TNF}\alpha$ causou redução da internalização bacteriana por células endoteliais (OVIEDO-BOYSO et al., 2009) e a IL-1 β foi associada a persistência dos microrganismos, com desenvolvimento de resposta inflamatória e dano tecidual (BOELEN et al., 2000).

Já as menores concentrações de IL-6 induzidas por isolados de hemoculturas, mas também aproximadas das concentrações induzidas por ECN colonizantes, poderiam traduzir uma resposta inflamatória inicial e controle da multiplicação do microrganismo. Estudos anteriores mostraram que o ácido lipoteicóico (LTA) e peptidoglicano (PEG) geraram resposta inflamatória aguda com níveis elevados de IL-6 (LEEMANS et al., 2002).

Os menores valores encontrados na dosagem de IL-8 entre as amostras de hemoculturas podem relacionar-se a uma maior atividade quimiotática a fim de eliminar possíveis colonizantes agentes de infecções. Em estudos com mastócitos, *Staphylococcus* induziram a liberação de IL-8 e esta liberação parece levar ao recrutamento de neutrófilos (ROCHA DE SOUZA et al., 2008). Um estudo com células endoteliais mostrou que cepas virulentas reduziram a expressão de IL-8, com diminuição do recrutamento de polimorfonucleares (TAJIMA et al., 2006).

Houve também valores mais baixos de IL-10 e IL-12p70 na estimulação com amostras de hemoculturas, podendo traduzir entre as amostras isoladas da pele e mucosa, uma resposta Th1 que leve à eliminação de bactérias possivelmente patogênicas. Estudos mostraram que IL-10

inibe a produção de IFN e IL-12 (SASAKI et al., 2000). Já o desenvolvimento da resposta Th1 na pele e mucosas, através da estimulação da diferenciação de linfócitos Th1, pode aumentar a ativação de macrófagos promovendo a eliminação da bactéria (MEGYERI et al., 2002).

Nos ensaios de indução de citocinas e quimiocinas por ECN, níveis mais baixos de mediadores da resposta imune foram encontrados para cepas isoladas da corrente sanguínea (com exceção da dosagem de IL-1 β , que mostrou-se mais elevada para as cepas infectantes). Estes resultados associam-se aos de um estudo que avaliou a resposta imune desenvolvida por monócitos, macrófagos e PBMC infectados por *S. epidermidis* isolados de pacientes em diálise peritoneal com diagnóstico de peritonite e isolados da microbiota de indivíduos saudáveis. *S. epidermidis* causadores de peritonite mostraram-se menos imunogênicos que os pertencentes à microbiota, com menores níveis de IL-8 produzidos por monócitos. O estudo concluiu que *S. epidermidis* causadores de peritonite são menos imunogênicos que aqueles da microbiota e ativam menos neutrófilos, por isso conseguem inicialmente evadir a ação do sistema imune e colonizar os tecidos (JUNG et al., 2011).

Porém as médias obtidas em nossos ensaios foram muito próximas entre isolados da pele ou mucosa e isolados de hemoculturas. Isto leva a necessidade de uma análise posterior com maior número de amostras, visto que seis delas, encontradas entre as cepas colonizantes, podem corresponder a mesma cepa encontrada na corrente sanguínea, por corresponderem à mesma espécie (*S. epidermidis*) e serem isoladas do mesmo paciente com IPCS, no mesmo período de coleta de amostras.

Deve-se ressaltar ainda que os resultados encontrados *in vitro* não podem ser totalmente extrapolados para a resposta imunológica desenvolvida *in vivo*. Além disso, a produção de mediadores desta resposta pode variar de acordo com a idade e condições clínicas dos pacientes. As amostras de ECN utilizadas nestes ensaios eram, em sua maior parte, provenientes de pacientes neonatos (n=17) e idosos (n=2). Um estudo por citometria de fluxo avaliou as populações de linfócitos e a produção de citocinas e quimiocinas na estimulação por *S. epidermidis* em sangue de cordão de neonatos pré-termo e a termo e sangue periférico de

adultos. Apesar de exceções individuais, a resposta de citocinas em neonatos foi menor do que em adultos para IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e IFN- γ . Os níveis de IL-10 em neonatos foram menores do que em adultos. As diferenças nas subpopulações regulatórias de células T e NK entre neonatos e adultos, poderiam assim contribuir para respostas mediadas por citocinas nas infecções em neonatos (PEOPLES et al., 2009).

Já na análise dos dados, de acordo com as espécies e independente da origem das amostras, foram comparadas as médias das concentrações de citocinas e quimiocinas induzidas por estimulação de PBMC com *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus* e *S. lugdunensis*.

Nestas comparações, maiores níveis de TNF α , IL-1 β , IL-10 e IL-12p70 foram encontrados na estimulação com *S. haemolyticus*, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para IL-12p70 em relação às três demais espécies.

Estes resultados sugerem que, na presença das cepas de *S. haemolyticus*, a maior produção de TNF α levaria a uma maior atividade de neutrófilos, na tentativa de eliminação da bactéria. Os níveis elevados de IL-1 β poderiam gerar atividade pirogênica e proliferação de linfócitos T. Já as concentrações mais elevadas de IL-10 causariam maior inibição de IL-1, TNF e IL-12, com redução da eliminação bacteriana. Os níveis estatisticamente mais elevados de IL-12p70, indicariam que, em comparação às outras espécies, haveria maior indução de INF e ativação da fagocitose.

Em nossas análises, os níveis de IL-6 e IL-8 foram mais elevados na estimulação celular com *S. epidermidis* e houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a média de IL-6 em relação às outras três espécies. As concentrações mais elevadas indicam que na infecção por *S. epidermidis* haveria maior migração de neutrófilos e maior regulação da resposta inflamatória. Sabe-se que *S. epidermidis* isolado de hemocultura de pacientes neonatos demonstrou capacidade de induzir a liberação de IL-6, IL-8 e TNF α por células epiteliais brônquicas em cultura (HUSSAIN et al., 2013) e que a estimulação de células endoteliais por

peptídeoglicano isolado de *S. epidermidis*, também induziu a produção de IL-6 e TNF α (ROBERTSON et al., 2010).

Em outro estudo, células endoteliais vasculares (CEV) humanas e células do epitélio das vias aéreas inferiores (CEVAI) foram estimuladas por *S. epidermidis* isolados de hemoculturas de neonatos e revelaram níveis maiores de produção de IL-8, demonstrando que houve maior resposta quimiotática para *S. epidermidis* e uma maior transmigração de granulócitos para o tecido pulmonar na sepse em neonatos poderia contribuir ainda para o desenvolvimento de displasia bronco-pulmonar nestes pacientes (IVARSSON et al., 2013).

As infecções por *S. epidermidis* simuladas *in vitro* apontam para uma maior atividade quimiotática a fim de promover a fagocitose e a maior produção de IL-6, uma citocina regulatória contribuiria para que esta resposta fosse equilibrada, minimizando as possíveis lesões teciduais.

No entanto, a indução de mediadores da resposta imunológica poderia ser influenciada pela presença de biofilme, principal fator de virulência de ECN. Esta influência foi analisada ao relacionar a quantidade de biofilme produzida pelas amostras selecionadas para os ensaios de estimulação de PBMC, com os níveis de citocinas induzidos por elas.

Correlações positivas substanciais foram observadas entre a quantidade de biofilme e as concentrações de TNF α ($r=0,7$), IL-1 β ($r=0,67$) e IL-6 ($r=0,5$). Verificamos ainda uma correlação negativa ($r=-0,14$) entre a produção de biofilme e a indução de IL-8.

Como estas correlações traduzem a estimulação por antígenos bacterianos presentes nas cepas de ECN produtoras de biofilme e não a estimulação por antígenos desta estrutura propriamente dita, entendemos que as cepas capazes de produzir maiores quantidades de biofilme poderiam reduzir a indução de IL-8, visando à atenuação da migração de neutrófilos, como mecanismo de proteção à ação do sistema imunológico. Ao mesmo tempo elevaria a produção de TNF α , IL-1 β e IL-6 como reação à presença do biofilme com maior atividade de

neutrófilos buscando a sua eliminação, desenvolvimento de resposta inflamatória devido a persistência dos microrganismos e regulação desta resposta.

Encontramos relatos de que duas cepas de *S. epidermidis*, uma produtora de biofilme dependente de PIA e a outra, isogênica, produtora de biofilme independente da PIA, foram utilizadas para avaliar a indução de resposta imune em sangue de cordão umbilical e de adultos. A ativação do complemento pelas duas cepas foi menor no sangue de cordão, bem como os níveis de anticorpos contra PIA ou contra as bactérias. O biofilme dependente de PIA induziu maior ativação do sistema complemento e os níveis de IL-6 e IL-8 foram maiores (GRANSLO et al., 2013).

Entre nossas amostras, 70% delas eram positivas para o gene *ica*, estando de acordo com os níveis mais elevados de IL-6 relacionados à maior capacidade de produção de biofilme.

Um estudo avaliou a interação de PBMC e macrófagos derivados de monócitos com *S. epidermidis* nas fases plantônica e de biofilme. Estes últimos mostraram maior adesão e maior sobrevivência intracelular. Eles também mostraram menor produção de citocinas pró-inflamatórias e de resposta Th1, como TNF α , IL-12 e IFN- γ , porém com maior produção de IL-8, GM-CSF e IL-13, independente da estimulação das PBMC por células de *S. epidermidis* vivas ou fixadas por formalina (SPILIOPOULOU et al., 2012).

Estes dados diferem dos encontrados em nossos estudos, com maiores níveis de TNF α e menores níveis de IL-8 induzidos por cepas capazes de produzir biofilme. Entretanto, utilizamos amostras de diferentes espécies de ECN e isto pode explicar esta variação, já que encontramos diferenças na indução de citocinas interespecíficas.

Além disso, na resposta *in vivo* à presença de biofilme, além de fatores do hospedeiro e do microrganismo, fatores do microambiente em que a infecção se estabelece podem influenciar na resposta imunológica. A avaliação do papel de componentes presentes na dieta parenteral de pacientes sugeriu que a resposta de citocinas pró-inflamatórias pode ser modulada por lipídios e pela glicose, indicando que outros estudos poderão avaliar a aplicabilidade clínica destes dados e

o papel do monitoramento de citocinas em neonatos que recebam nutrição parenteral por longos períodos (HAASE et al., 2011).

Diante dos resultados obtidos neste estudo pode-se considerar que a alta porcentagem de contaminação de amostras de hemoculturas, indica falhas nos procedimentos de coleta. Entre as 68 amostras de ECN causadoras de infecção primária de corrente sanguínea a espécie mais frequente foi *S. epidermidis*, mas a diversidade de outras espécies de ECN mostra a importância de sua identificação na caracterização epidemiológica destes microrganismos. Para fins epidemiológicos, sugerimos que a identificação seja confirmada por métodos moleculares devido às discordâncias dos resultados da identificação fenotípica, que entretanto seria mais aplicável à rotina do hospital.

De maneira geral, as amostras mostraram níveis elevados de resistência a oxacilina. Estes dados requerem especial atenção pelo impacto na restrição de agentes antimicrobianos para tratamento de IPCS e outras infecções por ECN, já que espécies menos frequentes e encontradas na pele de pacientes também apresentaram este perfil, podendo representar reservatórios de genes de resistência a antimicrobianos. A pesquisa molecular destes genes nos isolados de pacientes com IPCS traria assim benefícios para o prognóstico de pacientes com infecções por ECN.

A sensibilidade a vancomicina foi detectada em todas as amostras, mas as CIM mostraram-se elevadas. Isto indica a necessidade de constante vigilância e realização de testes que avaliem a CIM para vancomicina, a fim de se prevenir e detectar antecipadamente uma possível e indesejável identificação de cepas com perfil de resistência a este fármaco, favorecendo as medidas de prevenção e controle de infecções hospitalares.

A maioria das amostras causadoras de IPCS mostraram produção *in vitro* de biofilme e amostras produtoras também foram observadas entre as colonizantes. Além disso, a quantidade de biofilme produzida foi maior em amostras que apresentaram maiores CIM para a oxacilina, indicando que os ECN isolados neste estudo podem apresentar maior tendência a resistência, dificultando a ação dos antimicrobianos. A pesquisa de genes associados a produção de biofilme

Silva, R.B. *Estafilococos Coagulase Negativos isolados de pacientes com infecção de corrente sanguínea: aspectos microbiológicos e imunológicos*, 2014.

revelou a presença dos genes *ica* e *atlE* na maioria das amostras, mas não somente entre as produtoras. Isto indica que uma avaliação molecular seria importante para se detectar a existência de potenciais agentes de infecções associadas a dispositivos médicos.

Com relação ao perfil de produção de mediadores da resposta imunológica, houve semelhança na indução de mediadores da resposta imune por cepas causadoras de IPCS e cepas colonizantes, porém menor entre as primeiras, enquanto níveis ligeiramente maiores de IL-1 β foram detectados. Estes dados não podem ser extrapolados para a realidade da resposta *in vivo*, mas podem servir como ponto de partida para estudos posteriores, que avaliem maior número de amostras e possam tentar estabelecer padrões que se relacionem com os quadros de IPCS, na tentativa de auxiliar o diagnóstico.

S. haemolyticus e *S. epidermidis* induziram níveis significativamente mais elevados de IL-12p70 e IL-6, respectivamente. Na resposta *in vitro*, estes resultados indicam maior estímulo para a fagocitose de *S. haemolyticus* e maior estímulo para a regulação da resposta inflamatória a *S. epidermidis*, espécies mais frequentes de ECN nas IPCS no hospital em estudo e que apresentaram resistência à oxacilina, sensibilidade a vancomicina, porém com elevadas CIM para a maioria das amostras, e capacidade variável de produção de biofilme.

A indução de TNF α , IL-1 β e IL-6 mostrou aumento e a indução de IL-8 redução com as maiores quantidades de biofilme produzidas pelas amostras indutoras, podendo-se concluir que entre elas, as mais virulentas foram também mais imunogênicas. Estudos posteriores com maior número de amostras podem assim buscar marcadores imunológicos que correlacionem-se com a produção de biofilme e o prognóstico do paciente, caso a resposta *in vivo* demonstre equivalência à resposta *in vitro*.

9 CONCLUSÕES

- *S. epidermidis* foi o agente mais frequente de IPCS, seguido por *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. capitis*, *S. lugdunensis*, *S. hominis* e *S. xylosus* e as amostras avaliadas, apresentaram resistência à oxacilina, confirmada pela presença do gene *mecA*, exceto *S. xylosus*, com elevados valores de CIM e sensibilidade a vancomicina;
- A formação de biofilme *in vitro* foi verificada na maioria das amostras, mas não necessariamente associada a presença dos genes *ica* e *atlE* e a quantidade de biofilme produzida foi maior em amostras que apresentaram maiores CIM para a oxacilina;
- Os níveis de indução de TNF α , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12p70 foram menores na estimulação com amostras isoladas da corrente sanguínea, exceto para IL-1 β , e entre as espécies de ECN, *S. haemolyticus* e *S. epidermidis* foram as mais imunogênicas, induzindo níveis significativamente mais elevados de IL-12p70 e IL-6, respectivamente;
- Houve correlação positiva e significativa entre a indução de TNF α , IL-1 β e IL-6 e correlação negativa entre a indução de IL-8 e a quantidade de biofilme produzida pelas amostras indutoras.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, ANVISA. Critérios Nacionais de Infecções relacionadas à Assistência à Saúde de Corrente Sanguínea, 2009. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acessado em: 10 out. 2009.

AKIRA S. et al. Interleukin-6 in biology and medicine. **Adv. Immunol.**, v. 54, n. 1, p. 78. 1993.

ALLORI, M.C.G. et al. Antimicrobial resistance and production of biofilms in clinical isolates of coagulase-negative *Staphylococcus* strains. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 29, n. 8, p. 1592—1596. 2006.

ARAÚJO, G.L. et al. Commensal isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* are also well equipped to produce biofilm on polystyrene surfaces. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, p. 855–864. 2006.

BAHMANI, N. et al. Survey of methicillin-resistant Strains of *Staphylococci* from Neonatal Septicemia for *mecA* gene. **Researcher**, v. 5, n. 11, p. 40-43. 2013.

BARBIER, F. 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*. **J. Infect. Dis.**, v. 202, p. 270 –281. 2010.

BARROS, E.M. et al. *Staphylococcus haemolyticus* as an Important Hospital Pathogen and Carrier of Methicillin Resistance Genes. **Journal of Clinical Microbiology** p. 166–168. 2011.

BHAKDI, S. et al. Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 4614-4620. 1991.

BLAIOTTA, G. et al. Diversity of *Staphylococcus* species strains based on partial *kat* (catalase) gene sequences and design of a PCR-restriction fragment length polymorphism assay for identification and differentiation of coagulase-positive species (*S. aureus*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, and *S. schleiferi* subsp. *coagulans*). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 192–201. 2010.

BOELEN, J.J. et al. Interleukin-1 receptor type I gene-deficient mice are less susceptible to *Staphylococcus epidermidis* biomaterial-associated infection than are wild-type mice. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 12, p. 6924-6931. 2000.

BONE, R.C. et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American

Silva, R.B. *Estafilococos Coagulase Negativos isolados de pacientes com infecção de corrente sanguínea: aspectos microbiológicos e imunológicos*, 2014.

College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. **Chest.**, v. 101, p. 1644-1655. 1992.

BOUCHAMI, O. et al. Antibiotic resistance and molecular characterization of clinical isolates of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci isolated from bacteremic patients in oncohematology. **Folia Microbiol (Praha)**, v. 56, n. 2, p. 122-130. 2011.

BOTELHO, A.M.N. et al. Characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from hospital indoor air and a comparative analysis between airborne and inpatient isolates of *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, p. 1136–1145. 2012.

BOUCHAMI, O. et al. Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus hominis* (MRSHo): Low Clonality and Reservoirs of SCCmec Structural Elements. **PLoS ONE.**, v. 6, n. 7, e21940. 2011

BRADFORD, R. et al. Coagulase-negative staphylococci in low birth weight infants: environmental factors affecting biofilm production in *Staphylococcus epidermidis*. **Curr. Microbiol.**, v. 62, n. 3, p. 850-854. 2011.

BRANDZAEG, P. et al. Net inflammatory capacity of human septic shock plasma evaluated by a monocyte-based target cell assay: identification of interleukin-10 as a major functional deactivator of human monocytes. **J. Exp. Med.**, v. 184, p. 51–60. 1996.

CABRERA-CONTRERAS, R. et al. Antibiotic resistance and biofilm production in *Staphylococcus epidermidis* strains, isolated from a tertiary care hospital in Mexico City. 2013.

CARTMELL, T. et al. Endogenous interleukin-10 is required for the defervescence of fever evoked by local lipopolysaccharide-induced and *Staphylococcus aureus*-induced inflammation in rats. **J. Physiol.**, v. 549, n. 2, p. 653–664. 2003.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. United States, 1997. **MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.** 1997. v.46, p.765–766. Erratum **MMWR Morb. Mortal Wkly Rep.** v. 46., p. 851. 1997.

CERCENADO, E. *Staphylococcus lugdunensis*: a unique coagulase-negative *Staphylococcus*. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v. 27, n. 3, p. 139–142. 2009.

CHOKR, A. et al. Correlation between biofilm formation and production of polysaccharide intercellular adhesin in clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, p. 381–388. 2006.

Silva, R.B. *Estafilococos Coagulase Negativos isolados de pacientes com infecção de corrente sanguínea: aspectos microbiológicos e imunológicos*, 2014.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twentieth information supplement.** Wayne: CLSI document M100-S20; 2012.

CONRAD, S.A.; WEST, B.C. Endocarditis caused by *Staphylococcus xylosus* associated with intravenous drug abuse. **J. Infect. Dis.**, v. 149, p. 826–827. 1984.

CUI, B. et al. Differences between two clinical *Staphylococcus capitis* subspecies as revealed by biofilm, antibiotic resistance, and pulsed-field gel electrophoresis profiling. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 9–14. 2013.

DEHOUX, M.S. et al. Compartmentalized cytokine production within the human lung in unilateral pneumonia. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 150, p. 710–716. 1994.

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. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 2, p. 382-388. 2002.

DECK, M.K. et al. Multicenter Evaluation of the *Staphylococcus Quick* FISH Method for Simultaneous Identification of *Staphylococcus aureus* and Coagulase- Negative Staphylococci Directly from Blood Culture Bottles in Less than 30 Minutes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 1994–1998. 2012.

DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v. 87, p. 2095–2147. 1996.

ELZI, L. et al. How to discriminate contamination from bloodstream infection due to coagulase-negative staphylococci: a prospective study with 654 patients. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 8, p. E355-E361, 2012.

EHLERS, M. et al. Molecular characterisation of staphylococci roll-plated from catheter tips. **South Afr. J. Epidemiol. Infect.**, v. 28, n. 3, p.223. In:Congress Abstracts: 5th FIDSSA Conference. Champagne Sports Resort Drakensberg, KwaZulu Natal, South Africa. 2013.

ESMON, C.T. Interactions between the innate immune and blood coagulation systems. **Trends Immunol.**, v. 25, p.536-542. 2004.

EUZÉBY, J.P. Listo of prokariotic name with standing in nomenclature. Disponível em: <http://www.bacterionet/s/staphylococcus.html>, acesso em 2 mar. 2014.

Silva, R.B. *Estafilococos Coagulase Negativos isolados de pacientes com infecção de corrente sanguínea: aspectos microbiológicos e imunológicos*, 2014.

FERNÁNDEZ-RUFETE, A. et al. Bacteriemias por *Staphylococcus* coagulasa negativa: análisis de factores pronóstico e influencia del tratamiento antibiótico. **Rev. Esp. Quimioter.**, v. 25, n. 3, p. 199-205. 2012.

FLEER, A. et al. Reduced expression of PBP-2A by neonatal *mecA*-positive coagulase negative staphylococci (CoNS) blood isolates: b-lactams are useful first-line agents for the treatment of neonatal CoNS sepsis, restricting the use of vancomycin. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 67, p. 1616–1618. 2012.

FONTES, C.O. et al. Prevalence, antimicrobial resistance, and virulence characteristics of *mecA*-encoding coagulase-negative staphylococci isolated from soft cheese in Brazil. **J. Food. Sci.**, v. 78, n. 4M, p. 594-599. 2013.

FRANK, K.L. et al. From clinical microbiology to infection pathogenesis: how daring to be different works for *Staphylococcus lugdunensis*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 21, n. 1, p. 111–133, 2008.

FREDHEIM, E.G.A. et al. Biofilm Formation by *Staphylococcus haemolyticus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 1172–1180. 2009.

GARCÍA, M.S. Bacteriemia primaria y bacteriemia relacionada con catéter por estafilococos coagulasa-negativos. ¿Una complicación sin importancia? **Med. Intensiva.**, v. 35, n. 4, p. 206-207. 2011.

GARCÍA-LOZANO, T.; AZNAR OROVAL, E. Isolation by *Staphylococcus lugdunensis*. Pathogens or contaminants in haematology-oncology patients? **Semergen.**, v. 38, n. 1, p. 65-66. 2012.

GARZA-GONZÁLEZ, E. et al. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci. A review and the experience in a tertiary-care setting. **Epidemiol. Infect.**, v. 138, p. 645–654. 2010.

GOTZ, F. Characterization of the *N*-acetylglucosyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 18586–18593. 1998.

GRANSLO, H.N. et al. *Staphylococcus epidermidis* biofilms induce lower complement activation in neonates as compared with adults. **Pediatr. Res.**, v. 73, n. 3, p. 294-300. 2013.

HAASE, B. et al. The modulatory effect of lipids and glucose on the neonatal immune response induced by *Staphylococcus epidermidis*. **Inflamm. Res.**, v. 60, n. 3, p. 227-232. 2011.

Silva, R.B. *Estafilococos Coagulase Negativos isolados de pacientes com infecção de corrente sanguínea: aspectos microbiológicos e imunológicos*, 2014.

HANSSEN, A.M.; SOLLID, J.U. Multiple staphylococcal cassette chromosomes and allelic variants of cassette chromosome recombinases in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from Norway. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, p. 1671–1677. 2007.

HARRISON, E.M. et al., A *Staphylococcus xylosus* Isolate with a New *mecC* Allotype. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 1524–1528. 2013.

HEILMANN, C. et al. Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 277–282. 1996.

HEILMANN, C.; GÖTZ, F. Further characterization of *Staphylococcus epidermidis* transposon mutants deficient in primary attachment or intercellular adhesion. **Zentralbl Bakteriол.**, v. 287, p. 69–83. 1998.

HIRA, V. et al. Colonization Dynamics of Antibiotic-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci in Neonates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 51, n. 2, p. 595–597. 2013.

HIGASHIDE, M. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus* isolates carrying Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* have emerged in urogenital tract infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 6, p. 2061–2068. 2008.

HIRAMATSU, K. et al. Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 292, p. 67–74. 2002.

HUSSAIN, R. et al. Modulation of ENaC, CFTR, and iNOS expression in bronchial epithelial cells after stimulation with *Staphylococcus epidermidis* (94B080) and *Staphylococcus aureus* (90B083). **APMIS.**, v. 121, n. 9, p. 814–826. 2013.

HWANG, S.M. et al. *tuf* Gene sequence analysis has greater discriminatory power than 16S rRNA sequence analysis in identification of clinical isolates of coagulase-negative Staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 4142–4149. 2011.

IKEJIMA, T. et al. Induction of Human Interleukin-1 by a Product of *Staphylococcus aureus* associated with toxic shock syndrome. **J. Clin. Invest.**, v. 73, p. 1312–1320. 1984.

INTERNATIONAL WORKING GROUP ON THE CLASSIFICATION OF STAPHYLOCOCCAL CASSETTE CHROMOSOME ELEMENTS (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 53, p. 4961–4967. 2009.

IORIO, N. L. et al., Simplified and reliable scheme for species-level identification of Staphylococcus clinical isolates. **Journal Clinical Microbiology**, v. 45, n. 8, p. 2564–2569. 2007.

Silva, R.B. *Estafilococos Coagulase Negativos isolados de pacientes com infecção de corrente sanguínea: aspectos microbiológicos e imunológicos*, 2014.

- IORIO, N.L.P. et al., Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* carrying biofilm formation genes: detection of clinical isolates by multiplex PCR. **International Microbiology**, v. 14, p. 13-17. 2011.
- ISHIMI, Y. et al. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. **J. Immunol.**, v. 145, p. 3297–3303. 1990.
- IVARSSON, M. et al. *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* trigger different interleukin-8 and intercellular adhesion molecule-1 in lung cells: implications for inflammatory complications following neonatal sepsis. **Acta. Paediatr.**, v. 102, n. 10, p. 1010-1016. 2013.
- JAMALUDDIN, T.Z. et al. Extreme genetic diversity of methicillin resistant *Staphylococcus epidermidis* strains disseminated among healthy Japanese children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, p. 3778 –3783. 2008.
- JEAN-BAPTISTE, N. et al. Coagulase-negative Staphylococcal Infections in the Neonatal Intensive Care Unit. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 32, n. 7, p. 679–686. 2011.
- JOHN, J.F.; HARVIN, A.M. History and evolution of antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci: susceptibility profiles of new anti-staphylococcal agents. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 3, n. 6, p. 1143–1152. 2007.
- JUNG, K. et al. Low Immunogenicity Allows *Staphylococcus epidermidis* to Cause PD Peritonitis. **Peritoneal Dialysis International**, v. 31, p. 672-678. 2011.
- KISHIMOTO, T. et al. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. **Blood**, v. 86, p. 1243–1254. 1995.
- KLOOS, W.E.; BANNERMAN, T.L. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 7, p. 117–140. 1994.
- KLOOS, W.E.; MUSSELWHITE, M.S. Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. **Appl. Microbiol.**, v. 30, p. 381–385. 1975.
- KOCH, L.D. et al. Recurrent exit-site infection due to *Staphylococcus lugdunensis* - a virulent coagulase-negative *Staphylococcus*. **Peritoneal Dialysis International**, v. 31, n. 3, p. 372-373. 2011.
- Silva, R.B. *Estafilococos Coagulase Negativos isolados de pacientes com infecção de corrente sanguínea: aspectos microbiológicos e imunológicos*, 2014.

KOKSAL, F. et al. Antibiotic resistance patterns of coagulase-negative *Staphylococcus* strains isolated from blood cultures of septicemic patients in Turkey. **Microbiol. Res.**, v. 164, p. 404–410. 2009.

KUŞCU, F. et al. Investigation of reduced vancomycin susceptibility in methicillin resistant staphylococci. **Mikrobiyol Bul.**, v. 45, n. 2, p. 248–257. 2011.

LEBEAUX, D. et al. Evolution of nasal carriage of methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococci* in a remote population. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p. 315–323. 2011.

LEEMANS, J.C. et al. Differential Role of Interleukin-6 in Lung Inflammation Induced by Lipoteichoic Acid and Peptidoglycan from *Staphylococcus aureus*. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 165, p. 1445–1450. 2002.

LIM, D.; STRYNADKA, N.C. Structural basis for the β lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat. Struct. Biol.*, v. 9, p. 870–876. 2002.

MAKKI, A.R. et al. Phenotypic and genotypic characterization of coagulase negative *Staphylococci* (CoNS) other than *Staphylococcus epidermidis* isolated from ocular infections. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 52, n.12. 2011.

MARTINS, A. et al. Antimicrobial resistance and persistence of *Staphylococcus epidermidis* clones in a Brazilian university hospital. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, 2013.

MATTSSON, E. et al. Peptidoglycan and teichoic acid from *Staphylococcus epidermidis* stimulate human monocytes to release tumor necrosis factor- α , interleukin- β and interleukin-6. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 7, p. 281–287. 1993.

MEGYERI, K. et al. Induction of cytokine production by different staphylococcal strains. **Cytokine**, v. 19, n. 4, p. 206–212. 2002.

METZHITOV, R.; JANEWAY, C.A.Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 9, p. 4–9. 1997.

MILOHANIC, E. et al. The autolysin Ami contributes to the adhesion of *Listeria monocytogenes* to eukaryotic cells via its cell wall anchor. **Mol Microbiol.**, v. 39, p. 1212–1224. 2001.

MIRA, J.P. et al. Association of TNF2, a TNF- α promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality. **JAMA**, v. 282, p. 561–568. 1999.

Silva, R.B. *Estafilococos Coagulase Negativos isolados de pacientes com infecção de corrente sanguínea: aspectos microbiológicos e imunológicos*, 2014.

MONTENEGRO, S.M. et al. Enhanced interleukin-12 and CD40 ligand activities but reduced *Staphylococcus aureus* Cowan 1-induced responses suggest a generalized and progressively impaired type 1 cytokine pattern for human schistosomiasis. **Infect Immun.**, v. 70, n. 11, p. 5903-5912. 2002.

MØRETRØ T. et al. Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among staphylococci from food and food processing environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 69, p. 5648–5655. 2003.

MURRAY, P.R. **Manual of Clinical Microbiology**. Washington, DC: ASM Press, p. 390-441, 2007.

NAGASE, N. et al. Isolation and species distribution of staphylococci from animal and human skin. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 64, p. 245–250. 2002.

NALMAS, S. et al. *Staphylococcus capitis* prosthetic valve endocarditis: report of two rare cases and review of literature. **Heart Lung**, v. 37, p. 380–384. 2008.

NUNES, A.P.F. et al. Heterogeneous Resistance to Vancomycin and Teicoplanin Among *Staphylococcus* spp. Isolated from Bacteremia. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n.3, p. 345-350. 2007.

O’GARA, J.P. *ica* and beyond: biochemical mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 270, p. 179–188. 2007.

OLAECHEA, P.M. et al. Impacto de la bacteremia primaria y relacionada con cateter intravascular causada por *Staphylococcus* coagulasa negativo em pacientes críticos. **Med. Intensiva**, v. 35, n. 4, p. 217-225, 2011.

OLIVARES, M.F. et al. Activity of vancomycin, ciprofloxacin, daptomycin and linezolid against coagulase negative staphylococci bacteremia. **Rev. Esp. Quimioter.**, v. 24, n. 2, p. 74-78. 2011.

OLIVARES, M.F. et al. Actividad de vancomicina, teicoplanina y linezolid en *Staphylococcus* coagulase negativos resistentes a meticilina en aislados de hemocultivos pediátricos. **Ver. Esp. Quimioter.**, v. 25, n. 1, p. 25-30. 2012.

OLIVEIRA, F.; CERCA, N. Antibiotic resistance and biofilm formation ability among coagulase-negative staphylococci in healthy individuals from Portugal. **The Journal of Antibiotics**, p. 1-6. 2013.

Silva, R.B. *Estafilococos Coagulase Negativos isolados de pacientes com infecção de corrente sanguínea: aspectos microbiológicos e imunológicos*, 2014.

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.**, v. 46, p. 2155–61, 2002.

OREN, I.; MERZBACH, D. Clinical and epidemiological significance of species identification of coagulase-negative staphylococci in a microbiological laboratory. **Isr. J. Med. Sci.**, v. 26, p. 125–128. 1990.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* – the ‘accidental’ pathogen. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 7, p. 555–567. 2009.

OVIEDO-BOYSO, J. et al. TNF- α reduces the level of *Staphylococcus epidermidis* internalization by bovine endothelial cells. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 292, p. 92–99. 2009.

PALUCH-OLÉS, J. et al. The phenotypic and genetic biofilm formation characteristics of coagulase-negative staphylococci isolates in children with otitis media. **Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.**, v. 75, n. 1, p. 126–130. 2011.

PANTANELLA, F. et al. Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. **Ann. Ig.**, v. 25, p. 31–42. 2013.

PASARE, C.; MEDZHITOV, R. Toll pathway-dependent blockade of CD4⁺ CD25⁺ T cell-mediated suppression by dendritic cells. **Science**, v. 299, p. 1033–1036. 2003.

PEOPLES, J.D. et al. Neonatal cord blood subsets and cytokine response to bacterial antigens. **Am. J. Perinatol.**, v. 26, n. 9, p. 647–657. 2009.

PETERS, G. et al. Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. **J. Infect. Dis.**, v. 146, n. 4, p. 479–482. 1982.

PEREIRA, E.M. et al. Detection of *Staphylococcus lugdunensis* by a new species-specific PCR based on the *fbl* gene. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 58, p. 295–298. 2010.

PLANCHON, S. et al. Formation of biofilm by *Staphylococcus xylosus*. **Int. J. Food. Microbiol.**, v. 109, p. 88–96. 2006.

PULLEN, J. et al. Population pharmacokinetics and dosing of flucloxacillin in preterm and term neonates. **Ther. Drug. Monit.** v. 28, p. 351–358. 2006.

RASIGADE, J.P. et al., Methicillin resistant *Staphylococcus capitis* with reduced vancomycin susceptibility causes late-onset sepsis in intensive care neonates. **PLoS One**. 7:e31548. 2012.

Silva, R.B. *Estafilococos Coagulase Negativos isolados de pacientes com infecção de corrente sanguínea: aspectos microbiológicos e imunológicos*, 2014.

RAVAIOLI, S. et al. *Staphylococcus lugdunensis*, an aggressive coagulase-negative pathogen not to be underestimated. **Int. J. Artif. Organs.**, v. 35, n. 10, p. 742-53. 2012.

RAZ, R. et al. Who are you *Staphylococcus saprophyticus*? **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, p. 896–898. 2005.

REINIS, A. et al. An in vitro and in vivo study on the intensity of adhesion and colonization by *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* on originally synthesized biomaterials with different chemical composition and modified surfaces and their effect on expression of TNF- α , β -defensin 2 and IL-10 in tissues. **Medicina (Kaunas)**, v. 47, n. 10, p. 560-565. 2011.

ROGERS, K.L. et al. Coagulase-negative staphylococcal infections. **Infect. Dis. Clin. North. Am.**, v. 23, n. 1, p. 73-98. 2009

ROBERTSON, J. Peptidoglycan derived from *Staphylococcus epidermidis* induces Connexin43 hemichannel activity with consequences on the innate immune response in endothelial cells. **Biochem. J.**, v. 432, p. 133–143. 2010.

ROCHA-DE-SOUZA, C.M. Human mast cell activation by *Staphylococcus aureus*: interleukin-8 and tumor necrosis factor alpha release and the role of toll-like receptor 2 and CD48 molecules. **Infect. Immun.**, v. 76, n. 10, p. 4489-4497. 2008.

RUIMY, R. et al., Are host genetics the predominant determinant of persistent nasal *Staphylococcus aureus* carriage in humans? **J. Infect. Dis.**, v. 202, p. 924 –934. 2010.

RUPPE, E. et al., Diversity of staphylococcal cassette chromosome *mec* structures in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* strains among outpatients from four countries. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 53, p. 442– 449. 2009.

RUSSELL, J.A., Management of sepsis. **N. Engl. J. Med.**, v. 355, p. 1699-1713. 2006.

SAMANT SHARVARI, A; PAI CHITRA, G. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in clinical isolates of staphylococci. **Int. J. Pharm. Bio. Sci.**, v. 3, n.4B, p. 724 – 733. 2012.

SAXENA, S. et al. Detection of *mecA* genes and antibiotic susceptibility pattern of coagulase negative staphylococci in neonatal intensive care unit of tertiary care hospitals. **American Journal of Research Communication**, 2013.

SCHUENCK, R.P. et al. Multiplex PCR assay to identify methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 52, p. 431–435. 2008.

Silva, R.B. *Estafilococos Coagulase Negativos isolados de pacientes com infecção de corrente sanguínea: aspectos microbiológicos e imunológicos*, 2014.

SCHWALBE, R.S. et al., Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. **N. Engl. J. Med.**, v. 316, p. 927–931. 1987.

SHARMA, P. et al., Conventional and molecular characterization of coagulase-negative staphylococcus in hospital isolates. **Indian J. Pathol. Microbiol.**, v. 54, p. 85-89. 2011.

SLOOS, J.H. et al., Performance of phenotypic and genotypic methods to determine the clinical relevance of serial blood isolates of *Staphylococcus epidermidis* in patients with septicemia. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 2488–2493. 2000.

SMITH, G. Ogston the Bacteriologist. In: Staphylococci. **The British Journal of Surgery**. v. 52. p. 917-920. 1965.

SOUMYA, K.R. et al. Antibiotic susceptibility and multiplex PCR analysis of Coagulase Negative Staphylococci isolated from laboratory workers. **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci**. v. 2, n. 11, p. 266-272. 2013.

SPILIOPOULOU, A.I. et al. Bacterial adhesion, intracellular survival and cytokine induction upon stimulation of mononuclear cells with planktonic or biofilm phase *Staphylococcus epidermidis*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 330, n. 1, p. 56-65. 2012.

STARLANDER, G. et al. First documented case of a *Staphylococcus lugdunensis* strain carrying the *mecA* gene in Northern Europe. **Infection Ecology and Epidemiology**, v. 1, p. 8410. 2011.

SZYMANSKA, G. et al., Species-Specific Sensitivity of Coagulase-Negative Staphylococci to Single Antibiotics and their Combinations. **Polish. Journal of Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 155–161. 2011.

TAJIMA, A. et al. Inhibition of endothelial interleukin-8 production and neutrophil transmigration by *Staphylococcus aureus* beta-hemolysin. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 1, p. 327–334., 2009.

TEE, W.S.N. et al. *Staphylococcus lugdunensis* carrying the *mecA* gene causes catheter-associated bloodstream infection in premature neonate. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 519–520. 2003.

THEUNISSEN, C. et al., Linezolid-Resistant *Staphylococcus cohnii*, Letters. **Emerging Infectious Diseases**. www.cdc.gov/eid, v. 15, n. 1, 2009.

TIMMERMAN, C. P. et al., Induction of release of tumor necrosis factor from human monocytes by staphylococci and staphylococcal peptidoglycans. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 4167–4172. 1993.

Silva, R.B. *Estafilococos Coagulase Negativos isolados de pacientes com infecção de corrente sanguínea: aspectos microbiológicos e imunológicos*, 2014.

TRISTAN, A. et al., Biology and pathogenicity of staphylococci other than *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*, p. 572–586. In Fischetti, V.A., Novick, R.P., Ferretti, J.J., Portnoy, D.A., Rood, J.I., Gram-positive pathogens. **ASM Press**, 2000.

TSELENIS-KOTSOWILIS, A.D. et al., Acute pyelonephritis caused by *Staphylococcus xylosus*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 16, p. 593–594. 1982.

USTULIN, D.R.; CUNHA, M.L.R.S. Methods for Detection of Oxacillin Resistance among Coagulase-Negative Staphylococci Recovered from Patients with Bloodstream Infections at the Hospital in Brazil. **J. Virol. Microbiol.**, 2012.

VAN DER POLL, T.; VAN DEVENTER, S.J.H. Interleukin-6 in bacterial infection and sepsis: innocent bystander or essential mediator? In: Vincent JL, editor. Yearbook of intensive care and emergency medicine. Berlin: **Springer-Verlag.**, p. 43–53. 1999.

VON EIFF, C. et al., CoN *Staphylococci* infections. Pathogenesis of infections due to coagulase negative *Staphylococci*. **The Lancet Infectious Diseases.**, v. 2, p. 677–685. 2002

VUONG, C.; OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* infections. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 481–489. 2002.

VUONG, C. et al. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 54881–54886. 2004.

WAKABAYASHI, G., *Staphylococcus epidermidis* induced complement activation, tumor necrosis factor and interleukin-1, a shock-like state and tissue injury in rabbits without endotoxemia. **J. Clin. Invest.**, v. 87, p. 1925–1935. 1991.

WANG, B. et al. Direct *mecA* polymerase chain reaction testin of blood culture bottles growing Gram-positive cocci and the clinical potential in optimizing antibiotic therapy for staphylococcal bacteremia. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 75, p. 37–41, 2013.

WANG, J.E. et al., Peptidoglycan and Lipoteichoic Acid from *Staphylococcus aureus* induce tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 (IL-6), and IL-10 production in both T cells and monocytes in a human whole blood model. **Infection and Immunity.**, v. 68, n. 7, p. 3965–3970. 2000.

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.

Silva, R.B. *Estafilococos Coagulase Negativos isolados de pacientes com infecção de corrente sanguínea: aspectos microbiológicos e imunológicos*, 2014.

WINN, W.C. et al. Koneman, diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 6ª ed. Guanabara Koogan. 2008.

ZHANG, Z. et al. A Small Peptide with Therapeutic Potential for Inflammatory Acne Vulgaris. PLoS ONE, v. 8, n. 8. 2013.

ZHANG, L. et al., Multilocus sequence typing and further genetic characterization of the enigmatic pathogen, *Staphylococcus hominis*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, e66496. 2013.

ZONG, Z. et al., Diversity of SCCmec elements in methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococci* clinical isolates. **PLoS ONE**, v. 6, n.5, e20191. 2011.

Silva, R.B. *Estafilococos Coagulase Negativos isolados de pacientes com infecção de corrente sanguínea: aspectos microbiológicos e imunológicos*, 2014.

Anexo 1

Parecer Consubstanciado
PROTOCOLO DE PROJETO DE PESQUISA COM ENVOLVIMENTO DE SERES HUMANOS

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: Epidemiologia das infecções hospitalares por estafilococos coagulase negativos em um hospital público de ensino

PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Adriana Gonçalves de Oliveira

INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM

DATA DE ENTRADA NO CEP/UFMT: 14/05/2010

PROTOCOLO CEP/UFMT: 1670

O coordenador/autoridade do projeto recebe remuneração referente ao cargo de professor adjunto (40 h/DG) do DCEB, Disciplina de Microbiologia, não sendo requerida remuneração extra.

13. ADEQUAÇÃO DO TERMO DE CONSENTIMENTO E FORMA DE OBTÊ-LO
 O Termo não será obtido.

14. ESTRUTURA DO PROTOCOLO – O protocolo foi adequado para atender às determinações da Resolução CNS 196/96.

15. COMENTÁRIOS DO RELATOR, FRENTE À RESOLUÇÃO CNS 196/96 E COMPLEMENTARES

PARECER DO CEP: APROVADO
 (O relatório anual ou final deverá ser encaminhado um ano após o início do protocolo).
DATA DA REUNIÃO: 13/05/2010

Prof. Ana Paula Soares dos Santos
 Coordenadora

INSTRUMENTO COLETA DE DADOS -ECN

Identificação:	
Número de Registro: RG:	Procedência:
Idade:	Origem: () Casa () Outro hospital:
Sexo: Naturalidade:	Número de hospitalizações anteriores: Quanto tempo atrás:
Internação	
Data :	
Causa:	
Locais de internação	Tempo de internação (em dias)
	Tempo total de internação:
Comorbidades:	
() Prematuridade	() Hipertensão arterial
() Baixo peso ao nascimento Valor: gr	() Transplantado Qual órgão ?
() Bolsa rota maior que 18 horas () Insuficiência Renal	() Neoplasia Qual?
() Cardiopatia () Diabetes mellitus	() imunossupressores () SIDA () Desnutrição
Procedimentos invasivos	
() Intubação Orotraqueal.	() Sonda vesical de demora
() Dissecção venosa	() Nutrição parenteral.
() PICC	() Drenos Qual ?
() Intracath	() Hemodiálise () Diálise Peritoneal
() Duplo lúmen	() Shunt ventrículo peritoneal

☐ Cateter umbilical		☐ Outros Qual ?	
Antibióticos em uso:	Dosagem	Tempo de uso	
Notificação - Identificação da bactéria			
Data da cultura:		Espécime clínico do qual foi isolada a bactéria:	
Local em que o paciente estava quando foi feita a notificação:		Perfil de sensibilidade:	
Dados Clínicos			
<u>Sinais Vitais</u>		<u>Exame físico</u>	
☐ Hipertermia ☐ Taquicardia ☐ Hipotermia ☐ Bradicardia ☐ Taquipnéia ☐ Hipotensão arterial ☐ Bradipnéia ☐ Apnéia		☐ Hipoatividade ☐ Letargia ☐ Rebaixamento do nível de consciência ☐ Palidez cutânea ☐ Outros:	
Dados Laboratoriais			
☐ Leucocitose ☐ Leucopenia ☐ Plaquetopenia ☐ Diminuição da PCR			
Tipo de Infecção			
☐ Hospitalar ☐ Da comunidade ☐ Contaminação ☐ Sepses primária ☐ Sepses secundária Relacionado à qual procedimento ? Relacionada à qual sítio primário ?			
Evolução			
☐ Alta Data: ☐ Óbito ☐ Óbito relacionado à infecção hospitalar Data: ☐ Transferência Data:			