

**DULCINÉA BLUM MENEZES**

**ESTUDO DE CEPAS CLÍNICAS E DE MICROBIOTA DE**  
*Staphylococcus epidermidis* **ISOLADAS DE**  
**COLONIZAÇÃO/INFECÇÃO HOSPITALAR**  
**RELACIONADAS A CATETER VASCULAR**

**CAMPINAS**

**2005**

**DULCINÉA BLUM MENEZES**

**ESTUDO DE CEPAS CLÍNICAS E DE MICROBIOTA DE**  
*Staphylococcus epidermidis* **ISOLADAS DE**  
**COLONIZAÇÃO/INFECÇÃO HOSPITALAR**  
**RELACIONADAS A CATETER VASCULAR**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas para a obtenção do Título de  
Doutor em Clínica Médica, área de concentração em  
Ciências Básicas.*

**ORIENTADORA:** *Profa. Dra. MARIA LUIZA MORETTI*

**CAMPINAS**

**2005**

UNIVERSIDADE	BC
CHAMADA	UNICAMP
	M524e
EX	
NUMERO BC/	66562
COD. CIB/	16-P-00086-05
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
REÇO	11,00
DATA	14/12/05
CPD	

biog-idi 374333

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**  
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

M542e-  
M524e

Menezes, Dulcinéa Blum  
Estudo de cepas clínicas e de microbiota de *Staphylococcus epidermidis* isoladas de colonização/infecção hospitalar relacionadas a cateter vascular. / Dulcinéa Blum Menezes. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador: Maria Luiza Moretti  
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Microbiota (Medicina). 2. Biofilme. 3. Infecção hospitalar. 4. Genotipagem. 5. *Staphylococcus epidermidis*. 6. Reação em cadeia da polimerase. 7. Eletroforese em gel de campo pulsado. 8. Cateterismo Venoso Central. I. Moretti, Maria Luisa. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

(Slp/fcm)

## Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Luiza Moretti

### Membros:

1. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elza Massae Mamizuza
2. Prof. Dr. Plínio Trabasso
3. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Angélica Zaninelli Schreiber
4. Prof. Dr. Rogério de Jesus Pedro
5. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Luíza Moretti

Curso de pós-graduação em Clínica Médica, Área de Concentração Ciências Básicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 15/07/2005

## DEDICATÓRIA

**A Deus e a sua virgem mãe Maria**, sob o título de N<sup>a</sup> Sra. do Carmo, por estarem comigo sempre, mesmo quando muitas vezes não os sinto próximos.

**Aos meus pais** Djalma e Viviane e **meus irmãos** Yáskara, Djalma Jr, Danuska, Desirê, Ismael, Angélica, Jezrael e Thierry, por mesmo distantes, saber que estão, como portos seguros, em minhas oscilações.

**Aos meus amigos** que conviveram comigo nesta etapa de amadurecimento profissional e crescimento pessoal.

**Aos pacientes** envolvidos neste trabalho, que embora representados de maneira anônima neste estudo, tive a oportunidade de conhecê-los pessoalmente, e que mui compreensivamente me acolheram, mesmo atravessando períodos árdus em suas vidas.

À Prof. Dra. Maria Luiza Moretti, por tudo que foi vivido, aprendido e conquistado todos estes anos. Que deste o começo abriu as portas de seu laboratório a mim, depositando a confiança profissional em meu trabalho, e acima de tudo, a verdadeira amizade, o carinho e confiança pessoal que está além da polida amizade profissional.

Trabalho realizado no Laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Infecciosas, da Disciplina de Infectologia do Departamento de Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 01/09692-5.

## **AGRADECIMENTOS**

---

Aos meus amigos pós-graduandos do Laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Infecciosas, que o convívio diário nos proporcionou compartilharmos sonhos, problemas e soluções. Em especial a Orlando José Bratfich. Aos amigos Ana Beatriz Alkimim Teixeira, Ana Cecília Nastrini Delgado, Débora de Cássia Pires Geiger, Maria Sileuda Moreira de Oliveira, Mônica Leal Alcure, Rogério Kuboyama e Dra. Maria Clara Padoveze, a quem também agradeço pela cooperação nos levantamentos dos dados clínicos dos pacientes e a Sônia R.P.E. Dantas.

Aos professores, médicos e amigos da Disciplina de Infectologia do Departamento de Clínica Médica Dr. Francisco H. Aoki, Dra. Raquel B. Stucchi, Dr. Rogério J. Pedro, Dra. Mariângela R. Resende, Dr. Marcelo C. Ramos e Dr. Plínio Trabasso.

Às amigas técnicas do Laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Infecciosas Márcia Maria Pedroso e Érivan Olinda Ribeiro.

À Airton César de Oliveira pelo incentivo nos momentos difíceis, no período de conclusão da tese.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Clínica do Hospital das Clínicas da UNICAMP Dra. Angélica, Dra. Ana Lúcia, Dra. Angela von Nowakowski, Shirley, Rosa, Cidinha, Sérgio, Marcel, Sílvio, Denise, Eliane, Marizete, Luzia, Dalva e Maria Rita, que além do auxílio na obtenção das amostras clínicas, carinhosamente me receberam no laboratório.

Aos estatísticos Helymar e Priscilla pela análise dos dados.

Aos secretários e amigos Leonilda Veiga (Nida), Regina Palmeira Martins, Luiz Eduardo Odoni, Ademir, Emília Helena e Renata Maia, por todo o apoio na resolução dos problemas burocráticos.



Aos amigos do Laboratório de Citomegalovírus e Fabrício do Laboratório de Neuroimagem da FCM da UNICAMP pelo agradável convívio e amizade e aos amigos Rodrigo Gabas e Raquel Branchini, alunos de iniciação científica que em algum momento participaram deste trabalho.

e finalmente a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o andamento deste trabalho.

*Uma geração passa, outra vem; mas a terra sempre subsiste.  
O sol se levanta, o sol se põe; apressa-se a voltar a seu lugar;  
em seguida, novamente se levanta.*

*O vento vai em direção ao sul, vai em direção ao norte,  
gira nos mesmos circuitos.*

*Todos os rios se dirigem para o mar, e o mar não transborda.  
Em direção ao mar, para onde correm os rios,  
Eles continuam a correr.*

*O que foi é o que será:  
O que acontece é o que há de acontecer.  
Não há nada de novo debaixo do sol.*

*Se é encontrada alguma coisa da qual se diz:  
“Veja: isto é novo”,  
ela já existia nos tempos passados.*

***Ecle 1, 4-7;9-10***

	<i>Pág</i>
<b>RESUMO</b> .....	xxxix
<b>ABSTRACT</b> .....	xliii
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	47
<b>1.1-Histórico</b> .....	49
<b>1.2- Características biológicas de <i>Staphylococcus epidermidis</i></b> .....	50
1.2.1- Classificação.....	50
1.2.2- Morfologia e Metabolismo.....	50
1.2.3- Diferenciação bioquímica das demais espécies estafilocócicas.....	51
<b>1.3- Epidemiologia</b> .....	51
<b>1.4- Possíveis rotas de migração e colonização de <i>S. epidermidis</i> EM CVC</b> .....	52
<b>1.5- Patogênese</b> .....	53
<b>1.6- Variação da expressão de biofilme</b> .....	56
<b>1.7- Diagnóstico laboratorial de biofilme</b> .....	57
<b>1.8- Diagnóstico de infecção de CVC e infecção sistêmica relacionada a cateter</b> .....	58
<b>1.9- Análise da correlação entre cepas de <i>S. epidermidis</i> provenientes de microbiota e de isolados clínicos</b> .....	58
1.9.1-Métodos moleculares.....	59
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	61
<b>2.1- Objetivo principal</b> .....	63

<b>2.2- Objetivo secundário.....</b>	63
<b>3- CASUÍSTICA E MÉTODOS.....</b>	65
<b>3.1- Casuística.....</b>	67
3.1.1- Descrição do HC da UNICAMP.....	67
3.1.2- Normas para inserção de CVC não tunelizado.....	67
3.1.3- Critérios para consideração de infecção em CVC.....	67
3.1.4- Critérios para consideração de IS-RC.....	68
3.1.5- Desenho do Estudo.....	69
3.1.6- Protocolo de acompanhamento para a realização das coletas.....	69
3.1.5.1- Aspectos éticos e consentimento livre e esclarecimento.....	69
3.1.7- Tamanho amostral e seleção de sujeitos.....	70
3.1.8- Levantamento dos dados clínicos dos pacientes envolvidos.....	70
<b>3.2- Métodos.....</b>	71
3.2.1- Coleta de material.....	71
3.2.2- Identificação bioquímica dos isolados de <i>S. epidermidis</i> .....	71
3.2.3- Teste de sensibilidade a antimicrobianos.....	72
3.2.4- Análise da expressão de produção de biofilme.....	72
3.2.5- Padronização da técnica de PFGE a ser utilizada.....	73
3.2.6- Comparação do perfil genotípico por PFGE.....	74
3.2.6.1- Variáveis e conceitos para genotipagem.....	75
3.2.7- Detecção da presença do gene <i>icaA</i> .....	76
<b>4- RESULTADOS.....</b>	81
<b>4.1- Estudo microbiológico.....</b>	83

4.1.1- Cepas estudadas.....	83
<b>4.2- Características dos pacientes incluídos no estudo.....</b>	<b>83</b>
<b>4.3- Análise do perfil genotípico de cepas de <i>S. Epidermidis</i> isoladas de amostras Clínicas e de microbiota.....</b>	<b>86</b>
4.3.1- Diversidade de perfis genotípicos de cepas de <i>S. epidermidis</i> encontrados na microbiota dos pacientes.....	92
4.3.2- Dinâmica de colonização de cepas hospitalares de <i>S. epidermidis</i> e subseqüentes infecções relacionadas a cateter.....	93
<b>4.4- Análise da presença do gene <i>icaA</i> em cepas clínicas e de microbiota.....</b>	<b>95</b>
<b>4.5- Análise da expressão de biofilme em cepas clínicas e provenientes de microbiota.....</b>	<b>96</b>
<b>4.6- Análise do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das cepas de <i>S. epidermidis</i>.....</b>	<b>96</b>
<b>4.7- Análise de procedimentos hospitalares intervencionais e a relação com a microbiota por <i>S. epidermidis</i> genotipicamente oligoclonal.....</b>	<b>97</b>
<b>4.8- Análise da expressão de biofilme relacionada a sinais e sintomas clínicos.....</b>	<b>99</b>
<b>4.9- Análise global das cepas de <i>S. epidermidis</i>.....</b>	<b>99</b>
<b>4.10- Expressão de biofilme em cepas clínicas não classificadas pela CCIH como responsáveis por infecção.....</b>	<b>100</b>
<b>4.11- Concomitante ou pós-infecção por BGN.....</b>	<b>100</b>
<b>4.12- Evolução dos pacientes.....</b>	<b>101</b>
<b>5- DISCUSSÃO.....</b>	<b>103</b>
<b>5.1- Alteração da microbiota no curso da hospitalização.....</b>	<b>105</b>

5.2- Análise de procedimentos hospitalares intervencionais e a relação com a microbiota.....	105
5.3- Ciprofloxacina e aumento da adesãobacteriana em biomateriais.....	106
5.4- Gene <i>icaA</i> como marcador de cepa infecciosa.....	107
5.5- variação na expressão de biofilme.....	108
5.6- susceptibilidade a antimicrobianos.....	109
5.7- Microbiota e patogênese das IS-RC.....	110
5.8- Associação entre <i>S. epidermidis</i> E BGN.....	111
6- CONCLUSÕES.....	113
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117
8- ANEXO.....	129
ANEXO A.....	131
9- APÊNDICE.....	135
APÊNDICE A.....	137
10- TRABALHO RELACIONADO A ESTE ESTUDO E SUBMETIDO A PUBLICAÇÃO.....	141
Dynamic of hospital acquired colonization of <i>Staphylococcus epidermidis</i> and subsequent catheter-related infections.....	143

## *LISTA DE ABREVIATURAS*

---

°C	Grau Celcius
µL	Microlitro
µM	Micromolar
5' 3'	Sentido de transcrição
A	Base nucleotídica adenina
ATCC	The American Type Culture Collection
BaSO <sub>4</sub>	Sulfato de bário
BGN	Bacilo Gram Negativo
BHI	Infusão de cérebro e coração (brain heart infusion)
C	Base nucleotídica citosina
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CCIH	Comissão de controle de infecção hospitalar
CRA	Ágar vermelho congo (congo red agar)
CVC	Cateter venoso central
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico ou ADN
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EUA	Estados Unidos da América
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
G	Base nucleotídica guanina
g	Gramma
g/L	Gramma por litro

HC	Hospital das Clínicas
h	Hora
ica	Operon denominado intercellular adhesion
IS256	Seqüência de inserção 256 (insertion sequence - IS256)
IS-RC	Infecção sistêmica relacionada a cateter
Kb	Kilobase
mcg	Micrograma
min	Minuto
mg	Miligrama
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MRSA	<i>S. aureus</i> meticilina resistente. (meticillin resistant <i>S. aureus</i> – MRSA)
MRSE	<i>S. epidermidis</i> meticilina resistente (meticillin resistant <i>S. epidermidis</i> – MRSE)
NaCl	Cloreto de sódio
NCCLS	The National Commmittee for Clinical Laboratory Standards
pb	Par de base
PCR	Reação em cadeia de polimerase (Polimerase chain reaction)
PFGE	Gel de eletroforese em campo pulsado (Pulsed Field Gel Electrophoresis)
pH	Potencial hidrogeniônico
PIA	Matriz extracelular denominada polysaccharide intercellular adhesin
pmol	Picomol
s	Segundo



SAME	Serviço de Apoio Médico e Estatístico
SDS	Duodecil sulfato de sódio
rpm	Rotação por minuto
T	Base nucleotídica timina
U	Unidade
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UI	Unidade Internacional
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UPGMA	Unweighted Paired Group Method using Arithmetic averages
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
V/cm	Volts por centímetro

## LISTA DE TABELAS

---

	<i>Pág</i>
<b>Tabela 1-</b> Seqüência de oligonucleotídeos utilizados na amplificação de fragmentos de <i>icaA</i> e 16S de <i>S. epidermidis</i> .....	79
<b>Tabela 2-</b> Total de perfis genotípicos de <i>S. epidermidis</i> encontrados em amostras clínicas e de microbiota em cada paciente.....	90
<b>Tabela 3-</b> Relação dos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos e os perfis genotípicos encontrados nas cepas de <i>S. epidermidis</i> estudadas.....	97
<b>Tabela 4-</b> Análise de fatores hospitalares intervencionais predisponentes a formação de microbiota por <i>S. epidermidis</i> genotipicamente oligoclonal.....	98
<b>Tabela 5-</b> Relação global de cepas clínicas e provenientes de microbiota de <i>S. epidermidis</i> quanto a susceptibilidade a oxacilina, presença do gene <i>icaA</i> e produção de biofilme.....	100

## LISTA DE FIGURAS

---

	<i>Pág</i>
<b>Figura 1-</b> Fontes de infecção relacionadas a cateter.....	53
<b>Figura 2-</b> Microscopia eletrônica de biofilme de <i>S. epidermidis</i> .....	54
<b>Figura 3-</b> Modelo de formação de biofilme de <i>S. epidermidis</i> , em fases sequenciais.....	56
<b>Figura 4-</b> <i>Operon ica</i> e as possíveis regiões de inserção de IS256.....	57
<b>Figura 5-</b> Padronização da extração do DNA para PFGE, baseado em possíveis variáveis do método de <b>GOERING e DUENSING</b> .....	73
<b>Figura 6-</b> <i>Operon</i> codificante da adesina intercelular PIA de <i>S. epidermidis</i> .....	78
<b>Figura 7-</b> Perfis genotípicos de cepas de <i>S. epidermidis</i> provenientes do Paciente 7, isoladas de hemocultura e microbiota.....	88
<b>Figura 8-</b> Perfis genotípicos de cepas de <i>S. epidermidis</i> provenientes do Paciente 1, em isolados clínicos e microbiota.....	94
<b>Figura 9-</b> Detecção da presença do gene <i>icaA</i> através da amplificação por PCR do fragmento referente.....	95

## LISTA DE GRÁFICOS

---

	<i>Pág</i>
<b>Gráfico 1-</b> Doenças de base referentes aos pacientes incluídos neste estudo.....	84
<b>Gráfico 2-</b> Período, em dias, entre a admissão hospitalar e a ocorrência do primeiro isolamento clínico de <i>S. epidermidis</i> em cultura de ponta de CVC e/ou hemocultura.....	85
<b>Gráfico 3-</b> Distribuição do período de permanência dos cateteres venosos centrais não tunelados.....	86
<b>Gráfico 4-</b> Dendrograma representando o grupamento de perfis de cepas de <i>S. epidermidis</i> provenientes de cepas clínicas e de microbiota dos pacientes deste estudo.....	87
<b>Gráfico 5-</b> Análise estatística da prevalência de perfis genotípicos predominantes de <i>S. epidermidis</i> .....	91
<b>Gráfico 6-</b> Relação percentual da diversidade de perfis genotípicos de <i>S. epidermidis</i> encontrada na microbiota dos pacientes, no respectivo dia de internação que houve o primeiro episódio de isolamento clínico de <i>S. epidermidis</i> .....	92

*RESUMO*



A inserção de cateter venoso central (CVC) representa um importante risco para as infecções sistêmicas nosocomiais, e para estas infecções, *Staphylococcus epidermidis* é o patógeno mais importante. Com o objetivo de analisar os perfis de DNA genômico, detectar a presença e expressão de gene responsável pela produção de biofilme e estudar a dinâmica da colonização, cepas de *S. epidermidis* obtidas de episódios de isolamento deste microrganismo em culturas microbiológicas de ponta de CVC e/ou hemoculturas foram comparadas com cepas coletadas da microbiota do paciente hospitalizado no Hospital das Clínicas da UNICAMP. Este estudo também objetivou analisar os procedimentos médico-hospitalares intervencionais destes pacientes. Pacientes com culturas microbiológicas de ponta de CVC (>15 UFC) e/ou hemoculturas positivas para *S. epidermidis* foram selecionados para a coleta de microbiota presente na pele e mucosa nasal, através de coleta local com zaragoas umedecidas. As cepas de *S. epidermidis* foram analisadas através do método de PFGE; teste de sensibilidade a antimicrobianos; detecção da presença do gene *ica*, através da técnica de PCR e detecção de biofilme, através do método CRA. Fizeram parte deste estudo 247 cepas obtidas de 12 pacientes selecionados em 18 episódios estudados. Foram encontrados 26 distintos perfis genotípicos e 4 perfis fortemente relacionados. Em 10 episódios o mesmo perfil genotípico de DNA foi detectado simultaneamente em cepas clínicas e de microbiota, onde 6 destes episódios ocorreram quando o período de implantação da CVC foi superior a 15 dias. Nos 7 episódios em que não houve concordância entre os perfis genotípico de DNA em cepas clínicas e de microbiota, 5 destes episódios ocorreram igualmente em período inferior a 15 dias, não havendo diferença estatística entre os grupos. Por PFGE foram identificados 6 perfis genotípicos predominantes nas cepas de microbiota. Estes perfis representaram 68% (132/193) das cepas de microbiota, e um destes perfis se mostrou prevalente (77/193) nas cepas de microbiota. Em 10 episódios (8 pacientes), o perfil genotípico prevalente foi identificado compondo a microbiota. Foi comprovado, por comparação da diversidade dos perfis genotípicos, que durante o período de hospitalização o perfil geral da microbiota sofre mudanças de um perfil de diversidade genotípica policlonal para um perfil de diversidade oligoclonal, com predominância de um perfil genotípico. A mudança de diversidade genotípica foi relacionando a administração prévia de ciprofloxacina. As cepas com perfis genotípicos predominantes não apresentaram maior prevalência da presença do

gene *ica*, em relação às cepas não predominantes, o que não foi justificado que cepas potencialmente produtoras de biofilme se sobrepusessem em relação às cepas desprovidas deste gene. Oito dos 12 pacientes apresentaram concomitante ou posterior infecção por bacilos Gram negativos, destes 2 foram a óbito por septicemia. De acordo com os resultados, nós concluimos que pacientes submetidos a longos períodos de hospitalização são colonizados por microbiota de diversidade oligoclinal de *S. epidermidis* e a colonização ou infecção de CVC por destas cepas, potencialmente produtoras de biofilme em contato com a corrente sanguínea, pode ser uma oportunidade para infecções posteriores por outros microrganismos devido a potencial produção de biofilme inerente a *S. epidermidis*.

***ABSTRACT***





Central vascular catheters (CVC) represent an important risk for nosocomial bloodstream infections and *Staphylococcus epidermidis* is the most important pathogen of these systemic infections. To analyze the genomic DNA profiles, to detect the presence and expression of the responsible gene for biofilm production and to study the colonization dynamic, *S. epidermidis* strains isolated from tip CVC and blood positive cultures were compared with the strains isolated from skin and nasal swab in patients hospitalized in a tertiary care university hospital, the Hospital das Clínicas of UNICAMP. It was analyzed the previous medical care proceedings that the same patients underwent. Patients with microbiologic cultures for *S. epidermidis* from blood and/or catheter tip (>15 CFU) were selected to have swabs from skin and nasal. *S. epidermidis* were typed using PFGE, antibiotic susceptibility testing, presence of *ica* gene detection, by PCR, and biofilm detection, by Congo red method, were performed. Twelve patients with 18 episodes of colonization or catheter-related infection were included in this study and 247 strains were analyzed. It was found 26 distinct genotypic profiles and 4 strongly related genotypic profiles. In 10 episodes, the same DNA profile was detected in clinical and in microbiota strains, 6 of them occurred when the period of catheter implantation were higher than 15 days. In 7 episodes, there was not concordance among genotypic profiles from clinical and microbiota strain, and 5 of them occurred when the period of catheter implantation were lower than 15 days, too. It was not found statistic difference between the groups. PFGE identified six predominant genotypic profiles that were present in 68 % (132/193) of microbiota strain, and one of them was prevalently present (77/193). The prevalent genotypic profile was found compounding the microbiota in 10 episodes (8 patients). It was proofed, by comparison of the diversity of genotypic profiles, that during the hospitalization period the microbiota general profile changes from the diversified genotypic profile (polyclonal) to a poorly diversified genotypic profile (oligoclonal), with a predominant genotypic profile. It found was related with the previous ciprofloxacin administration. The predominant DNA profiles strains did not presented higher prevalence according to the presence of *ica* gene when comparing to non predominant strains, what it was not justified that potentially biofilm producers can superpose over non *ica* strains. Eight of 12 patients presented concomitant or posterior infection by negative Gram rots, whose 2 were to obit by sepsis. According to the results, we concluded that patients with

long-term hospitalization were previously colonized by oligoclonal-diversified microbiota *S. epidermidis* and CVC colonization or infection by this agent, potentially biofilm producer present at bloodstream can be an opportunity to other microorganism posterior infections, due to potential biofilm production inherent to *S. epidermidis*.

## *1- INTRODUÇÃO*

## 1.1-Histórico

*Staphylococcus epidermidis*, o principal agente bacteriano colonizante do ecossistema cutâneo De seres humanos, é responsável por 50 % da microbiota estafilocócica residente da pele, colonizando principalmente as regiões superiores do corpo, em relação simbiótica com seu hospedeiro (ROTH e JAMES, 1988).

Em 1972, BAYSTON e PENNY publicaram o primeiro trabalho relacionando a produção de material mucóide a cepas potencialmente patogênicas de *S. epidermidis*, como um possível fator de colonização de materiais prostéticos, instalados para intervenção médico-cirúrgica, em pacientes hospitalizados. Este material mucóide, que apresenta composição polissacarídica foi denominado *slime* (BAYSTON e PENNY, 1972). A formação de *slime* associada ao acúmulo de células bacterianas foi posteriormente denominada biofilme (CHRISTENSEN *et al*, 1982, FRANSON *et al*, 1984, MACK *et al*, 1994).

Diferentemente de *Staphylococcus aureus*, cujos mecanismos de virulência são bem compreendidos no contexto das infecções nosocomiais (RUZIN *et al*, 2001; CHEUNG *et al*, 2002; DYKE *et al*, 2003), comprometendo vários órgãos e tecidos, as infecções relacionadas a *S. epidermidis* emergiram apenas nas últimas duas décadas. A importância crescente deste agente como patógeno nosocomial contemporiza com os avanços da terapia intravenosa e dos dispositivos prostéticos a ela associados, e conseqüentemente seu maior uso. Alguns autores correlacionam o crescente uso dos dispositivos médico-invasivos nas últimas décadas à emergência das infecções estafilocócicas (GOLDMANN e PIER, 1993; KLOOS e BANNERMAN, 1994; ZIEBURN *et al*, 1997).

Em estudo retrospectivo na Inglaterra, no período de 1996 a 2001, observou-se, através de busca ativa pré-operatória de microbiota, que apenas 1,8% das culturas foram positivas para *S. aureus*, e destas apenas 0,9 % eram resistentes a meticilina (*meticillin resistant S. aureus* - MRSA), enquanto 43,3 % das culturas foram positivas para *S. epidermidis*, sendo 55,1 %, das amostras avaliadas, resistentes ao mesmo antimicrobiano (*meticillin resistant S. epidermidis* - MRSE) (MOHANTY e KAY, 2004).

Estes dados salientaram a importância da colonização prévia por MRSE, muito além da importante colonização por MRSA, comumente enfatizada. Muitos MRSE são também resistentes a outros agentes antimicrobianos, sendo considerados reservatórios de genes de resistência, podendo estes genes ser transferidos para outras espécies, como já descrito na literatura (ARCHER *et al*, 1994; WIELDERS *et al*, 2001).

## 1.2- Características biológicas de *Staphylococcus epidermidis*

### 1.2.1- Classificação

A espécie *S. epidermidis* está locada ascendentemente no gênero *Staphylococcus*, família *Staphylococcaceae*; ordem Bacillales; classe Bacilli; filo Firmicutes, super-reino Bacteria ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), em maio de 2005).

Atualmente são descritas 41 espécies de *Staphylococcus*, sendo a espécie representante *S. aureus*, espécie esta que se caracteriza por apresentar reação positiva ao teste de coagulase. Dentre as espécies estafilococos coagulase negativa, *S. epidermidis* é a principal representante, , [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), em maio de 2005).

### 1.2.2- Morfologia e Metabolismo

*S. epidermidis*, como as demais espécies de estafilococos, são células esféricas, apresentando de 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro, ocorrendo isoladamente, aos pares ou em grupamentos irregulares, quanto ao número e a disposição das células. São Gram positivas, imóveis e não esporulantes. Quanto ao metabolismo, são anaeróbios facultativos, quimio-organotróficas, com metabolismo respiratório e fermentativo (BERGEY'S MANUAL, 9<sup>o</sup> ed.).

### 1.2.3-Diferenciação bioquímica das demais espécies estafilocócicas

*S. epidermidis* diferencia-se bioquimicamente das demais espécies estafilocócicas por apresentar reação positiva para as provas de catalase, urease, e fosfatase alcalina e reação negativa para as provas de oxidase pirrolidonil arilamidase, coagulase e fator *clumping*. Seu crescimento é resistente frente a polimixina B e sensível à presença de novobiocina. Quanto à utilização aeróbica de açúcares, metaboliza sacarose, manose e maltose, o que não ocorre com a trealose e o manitol (**KLOOS e BANNERMAN, 1994**).

## 1.3-Epidemiologia

Dados do *Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance* (SCOPE), dos Estados Unidos, salientaram a importância das infecções sistêmicas nosocomiais relacionadas a cateter (IS-RC), apresentando estas a taxa de mortalidade de 27 % (**EDMOND et al, 1999**). Estimativas da mesma entidade correlacionam as IS-RC com o uso de cateter venoso central (CVC), dispositivos estes utilizados para infusão endovenosa, uma vez que 70 % dos pacientes acometidos por este tipo de infecção fazem ou fizeram uso destes dispositivos vasculares com uma média de 5,3 por 1000 cateteres/dia em unidades de terapia intensiva (UTIs) (**WENZEL e EDMOND, 2001**).

Os CVCs são distinguidos em 4 tipos, de acordo com o local de inserção, tamanho e riscos de complicação: a) venoso central de inserção periférica; b) venoso central não tunelizado; c) venoso central tunelizado e d) venoso central totalmente implantado. Estima-se que 90 % das IS-RC ocorram em pacientes com cateteres CVC não tunelizado, ou seja, de inserção percutânea.

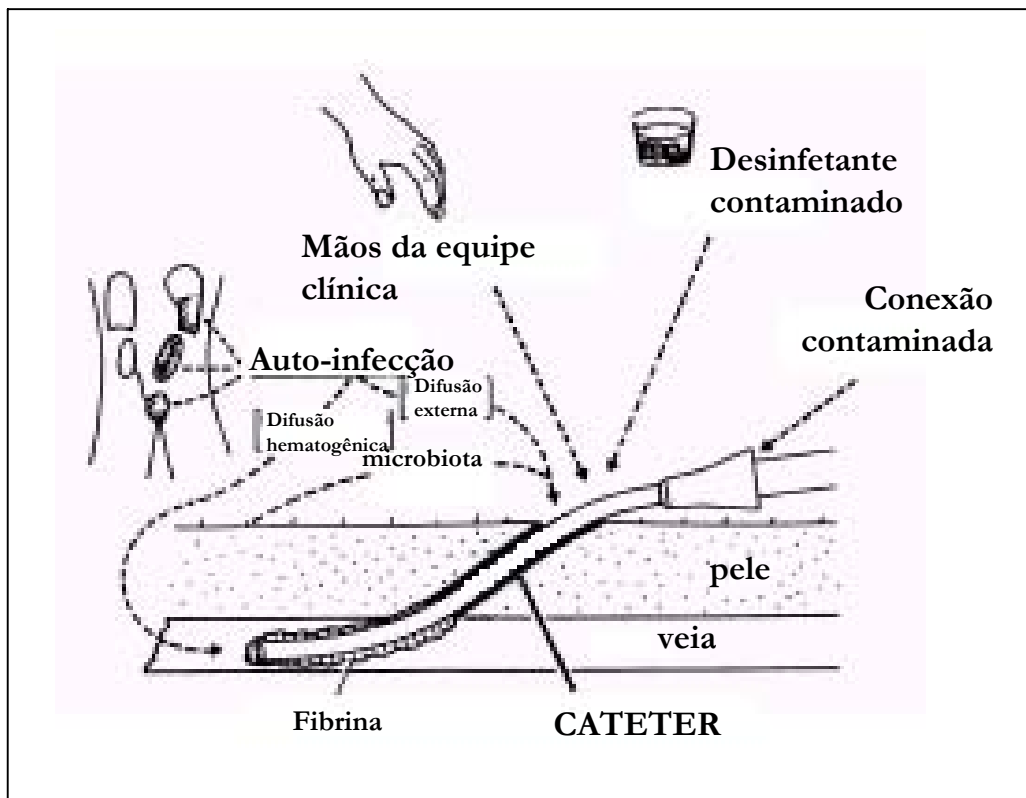
Além da maior morbidade e mortalidade associada à infecção, o quadro sistêmico acarreta o aumento da estada hospitalar, em média uma semana, gerando um excedente no custo do paciente em 6000 a 29000 dólares, em estimativa norte-americana (**PITTET et al (1994), BURKE et al, 1998**).

Atualmente, as espécies *S. epidermidis* e *S. aureus* são descritas como as responsáveis por mais da metade das infecções associadas ao uso de dispositivos prostéticos (FLUCKIGER, 2005).

#### **1.4-possíveis rotas de migração e colonização de *S. epidermidis* em CVC**

A contaminação no sítio de inserção do cateter; o ponto de conexão do cateter; a migração hematogênica de microrganismos; os produtos de infusão - incluindo produtos hematológicos; e as mãos da equipe clínica são fontes de acesso que potencialmente permitem a contaminação e colonização do cateter (BJORNSON *et al*, 1982; DE CICCIO *et al*, 1989; GOLDMANN e PIER 1993) (Figura 1).

É preconizado que a possível colonização de CVCs implantados por longos períodos (>30 dias), seja resultado de contaminação durante a manipulação dos mesmos, quando microrganismos são introduzidos diretamente no lúmen do dispositivo. Esta hipótese dista da possível rota preconizada para CVCs implantados por períodos curtos (<10 dias), onde se considera que, a infecção seja resultado da migração de microrganismos presentes no sítio de inserção dos cateteres, posterior colonização ao longo de sua superfície externa, conseguinte colonização da ponta intravascular distal e finalmente infecção, com possível dispersão sistêmica (PEARSON, 1996; RAAD, 1998; MURGA *et al*, 2001; O'GRADY *et al*, 2002).



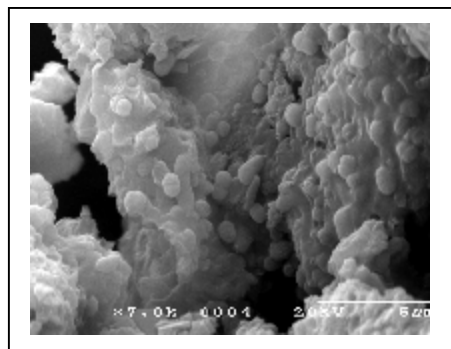
**Figura 1**-Fontes de infecção relacionadas a cateter.

Figura adaptada para a língua portuguesa de **GOLDMANN e PIER (1993)**.

### 1.5-Patogênese

Algumas cepas de *S. epidermidis* formam biofilmes que são descritos como aglomerações de células embebidas em matriz heterogênea extracelular (**Figura 2**), resultando em estruturas tridimensionais com características fisiológicas específicas (**COSTERTON, 1999**). A formação de biofilmes é atualmente o fator de patogenicidade associado às infecções relacionadas a cateteres de longa duração, uma vez que a formação destas estruturas promove a agregação célula-célula, além da adesão celular em biomateriais (**HEILMANN et al, 1996; GERKE et al, 1998; MACK et al, 1999; MACK et al, 2000**).





**Figura 2-**Microscopia eletrônica de biofilme de *S. epidermidis*

[www.math.utah.edu/.../quorum\\_talk.html](http://www.math.utah.edu/.../quorum_talk.html)

No curso das infecções relacionadas aos dispositivos prostéticos, dois distintos estágios ocorrem sucessivamente: a) a aderência primária da bactéria às proteínas séricas do paciente, que previamente recobrem o biomaterial inserido (VEESTRAS *et al*, 1996); b) a formação de agrupamento bacteriano em multicamadas, mediado pela produção do polissacarídeo extracelular (Figura 3).

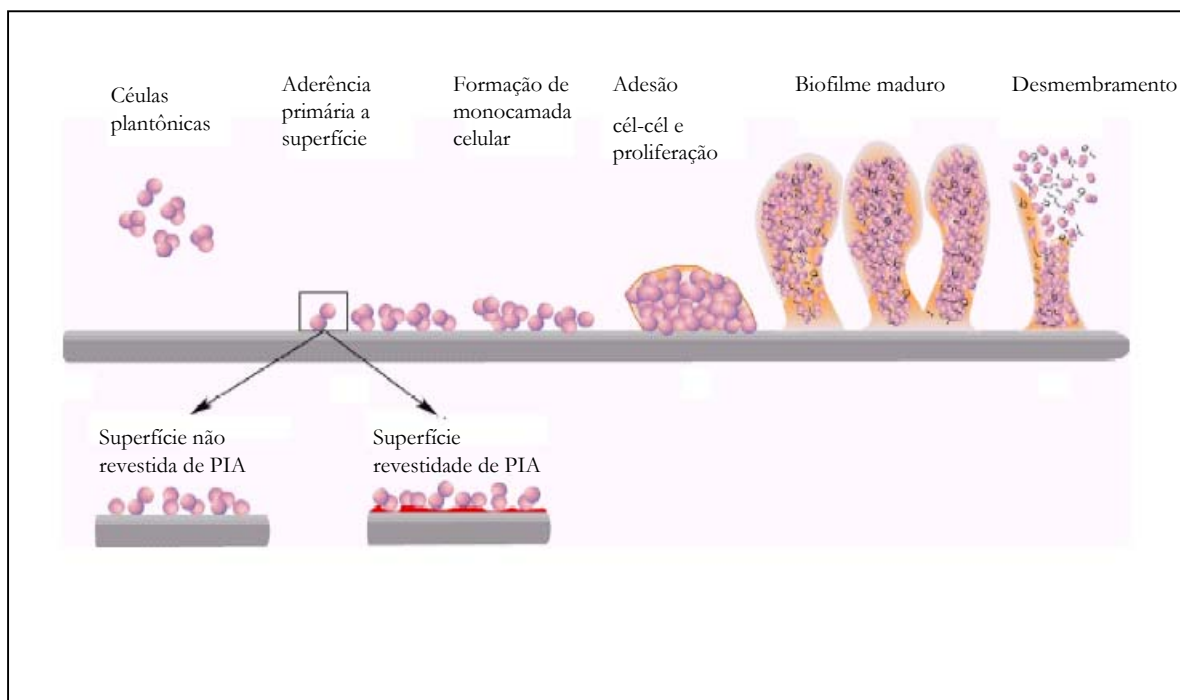
A matriz extracelular produzida pelas próprias células estafilocócicas é denominada *polysaccharide intercellular adhesin* (PIA), produzida pela enzima *N-acetilglucosaminiltransferase* (MACK *et al*, 1999), que é codificada por um *operon* denominado *intercellular adhesion* (*ica*), composto de quatro genes *icaA*, *icaD*, *icaB*, *icaC*, e uma região promotora denominada *icaR* (HEILMANN *et al*, 1996; GERKE *et al*, 1998; CRAMTON *et al*, 1999; CRAMTON *et al*, 2001). Esta seqüência de genes é freqüentemente ausente nas cepas comensais (ZHANG *et al*, 2003). O gene *icaA* é a chave enzimática da síntese de PIA (MACK *et al*, 2000), embora a co-expressão dos quatro genes seja absolutamente necessária para esta síntese (GERKE *et al*, 1998). Recentemente GILL *et al* (2005), realizando a análise genômica de cepas de *S. epidermidis* comparando cepas produtoras e não produtoras de biofilme, revelaram que além do *operon ADBC*, as cepas produtoras de biofilme apresentam uma proteína de parede celular associada a biofilme

(Bap), que previamente havia sido identificada em cepas de *S. aureus* relacionadas à mastite bovina, e está associada a aderência de superfícies de poliestireno.

A infecção causada por *S. epidermidis* é geralmente persistente, recorrente e de difícil erradicação (O’GARA e HUMPHREYS, 2001). Até recentemente, preconizava-se que o fenótipo mais resistente apresentado pelas células em biofilme, em relação às células plantônicas, era devido à disposição das células em multicamadas, além da própria presença polissacarídica, formando uma barreira mecânica para a penetração de antimicrobianos em sítios alvo (HOYLE e COSTERTON, 1991; SCHWANK *et al*, 1998). A barreira mecânica também é relacionada ao mecanismo de escape, principalmente contra a penetração de citocinas (COSTERTON *et al*, 1999) e sua presença é apresentada como fator de virulência *in vivo* (RUPP *et al*, 1999a, b, 2001).

Em trabalho recente, YAO *et al* (2005), comparando os genes expressos em células plantônicas e em biofilmes, utilizando a técnica de *microarrays*, demonstraram mudanças fisiológicas significativas entre as células nos distintos estágios. As células em biofilmes sofrem supressão do metabolismo aeróbico favorecendo a obtenção energética por fermentação; e diminuição geral dos níveis de transcrição e tradução, diminuindo portanto o metabolismo celular. Porém há o aumento da transcrição de genes envolvidos em mecanismos de resistência e defesa bacterianos (YAO *et al*, 2005).

Evidências experimentais (FLUCKIGER *et al*, 2005) e epidemiológicas (ZIEBUHR *et al*, 1997; FREBOURG *et al*, 2000; GALDBART *et al*, 2000; DE SILVA *et al*, 2002) tem demonstrado clara correlação entre patogenicidade e a presença dos genes *ica* na virulência das cepas de *S. epidermidis*. Dois estudos tem sugerido que devido à alta prevalência destes genes nos isolados clínicos, a presença do gene *icaA* pode ser usada como um dado relevante na classificação de isolados considerados contaminantes ou agentes clinicamente significativos relacionados a infecções sistêmicas (ZIEBUHR *et al*, 1997; FREBOURG *et al*, 2000).



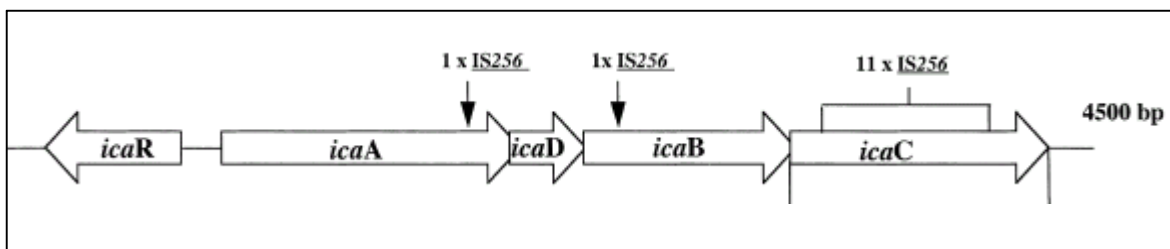
**Figura 3-** Modelo de formação de biofilme de *S. epidermidis*, em fases sequenciais.

Figura adaptada para a língua portuguesa de **VUONG e OTTO (2002)**.

### 1.6-Variação da expressão de biofilme

Nem sempre a presença do *operon ica* remete à sua expressão fenotípica. Cepas de *S. epidermidis* provenientes de um mesmo clone sofrem mudanças quanto à: produção de biofilme, morfologia da colônia, taxa de crescimento e susceptibilidade a antimicrobianos (**CHRISTENSEN et al, 1987; ZIEBURN et al, 1997**). A alteração quanto à produção de biofilme e demais características fenotípicas a ela relacionadas se deve a inserção e excisão alternada e reversivelmente do um elemento genético móvel, a seqüência de inserção 256 (*insertion sequence* - IS256), em diferentes locais do *operon ica*, (**Figura 4**), principalmente em *icaC*, interrompendo ou diminuindo a síntese de PIA (**ZIEBURN et al, 1999; HANDKE et al, 2004**). Especula-se que este mecanismo de alternância na produção do polissacarídeo, portanto alternância da produção de biofilme, facilite a dispersão das células não aderentes provenientes do nicho nativo, e sua

colonização em outros sítios, resultando em bacteremia e doença metastática, além de facilitar a evasão frente à resposta imunológica (HANDKE *et al*, 2004), embora até o presente não sejam conhecidos dispositivos genéticos ou metabólicos que induzam a entrada e a saída de IS256 no *operon*.



**Figura 4-** *Operon ica* e as possíveis regiões de inserção de IS256.

Figura parcial da originalmente apresentada em ZIEBUHR *et al* (1999).

### 1.7-Diagnóstico laboratorial de biofilme

Na literatura são descritos alguns métodos laboratoriais para a observação da produção de biofilme de *S. epidermidis*. O método pioneiro é o método semiquantitativo de CHRISTENSEN (1982), utilizando o crescimento estático das culturas em meio líquido. O método qualitativo de FREEMAN *et al*, (1989), apresentado em trabalhos recentes (ZIEBURN *et al*, 1997; ARCIOLA *et al*, 2001a,b; ARCIOLA *et al*, 2002) utiliza o crescimento das colônias em meio ágar vermelho congo (congo red agar - CRA) enriquecido com alta concentração de sacarose, para favorecer a produção do polissacarídeo.

Devido à variação da expressão de biofilme, os métodos fenotípicos devem ser associados aos métodos genotípicos, quando estudados os fatores de virulência destes microrganismos.

### **1.8-Diagnóstico de infecção de CVC e infecção sistêmica relacionada a cateter.**

Devido à colonização epidérmica, o isolamento de cepas de *S. epidermidis* a partir de culturas de ponta de CVC, ou mesmo de hemocultura, pode representar o responsável pela infecção apresentada ou apenas o agente colonizante do local de inserção do cateter. (VON EIFF *et al*, 2002; VANDECASTEELE *et al*, 2003).

### **1.9-Análise da correlação entre cepas de *S. epidermidis* provenientes de microbiota e de isolados clínicos**

A característica intrínseca de *S. epidermidis* ser o principal agente colonizador da pele, aliada a sua capacidade de adesão e colonização de biomateriais, faz com que este agente seja potencialmente um agente de risco para IS-RC. Por outro lado, as características fenotípicas de cepas de *S. epidermidis* colonizadoras de pele de portadores sadios apresentam-se distintas das cepas infecciosas presentes em ponta de CVC e hemoculturas. Qual seria, portanto a importância da microbiota de pacientes hospitalizados submetidos à implantação de CVC?

Com a disponibilidade dos métodos de tipagem molecular, atualmente é possível comparar cepas de *S. epidermidis*, provenientes de isolados clínicos e microbiota de um mesmo paciente. Com estas comparações, aliadas às demais características genotípicas, como, a presença dos genes responsáveis pela codificação de biofilme, e características fenotípicas, como expressão de biofilme e susceptibilidade a antimicrobianos, é possível obter dados que auxiliem na compreensão da importância das cepas de *S. epidermidis* presentes na microbiota para as infecções relacionadas a CVC por estes mesmos agentes, a fim de obter melhores informações quanto às formas de aquisição das cepas de *S. epidermidis* formadoras de biofilme.

### 1.9.1-Métodos moleculares

Atualmente vários métodos de tipagem descritos são empregados para correlacionar cepas bacterianas, relacionando-as a surtos ou distinguindo-as, epidemiologicamente, de cepas endêmicas ou esporádicas, auxiliando em análises do significado clínico dos achados microbiológicos.

Métodos moleculares de tipagem apresentam vantagens sobre os métodos fenotípicos tradicionais, principalmente devido à possibilidade de aplicação em diversas espécies bacterianas, alto poder discriminatório e rapidez na conclusão dos resultados. A aplicação dos principais métodos moleculares, como ferramenta auxiliar na discriminação de episódios envolvendo *S. epidermidis*, apresentou bons resultados, sendo citados estes métodos: a) perfil plasmidial (**SLOOS *et al*, 1996**); b) reação em cadeia da polimerase a partir de oligonucleotídeos arbitrários (*arbitrarily primed polymerase chain reaction* – AP-PCR); c) polimorfismo de DNA amplificado aleatoriamente (*randomly amplified polymorphic DNA* - RAPD) (**MARQUET-van der MEE *et al*, 1995**); d) polimorfismo de grandes fragmentos de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP); e) análise de grandes fragmentos cromossomais por eletroforese em campo pulsado (*pulsed field gel electrophoresis* – PFGE) (**GOERING e DUENSING, 1990**).

As interpretações dos resultados gerados, através de análises do perfil plasmidial, AP-PCR e RFLP, são empíricas, ou seja, os parâmetros que distinguem cepas idênticas de cepas distintas entre si são muitos distantes, havendo dificuldades para mensurar os graus intermediários (**TENOVER *et al*, 1997**). Dos métodos de tipagem molecular, PFGE tem demonstrado alto poder de reprodutibilidade e discriminação, e é hoje o método de escolha para tipagem molecular para a maioria dos microrganismos, incluindo *S. epidermidis* (**TENOVER *et al*, 1997**; **SLOOS *et al*, 1998**; **MIRAGAIA *et al*, 2002**; **NUNES *et al*, 2005**).

Ao analisar o perfil genotípico a partir de cepas isoladas de culturas de ponta de CVC e bacteremia, e concomitantemente comparar com o perfil de cepas de *S. epidermidis* colonizadoras de pele e mucosas do paciente portador destas infecções, é possível diagnosticar se a procedência deste agente está na microbiota presente do paciente.

Ao investigar a presença dos genes responsáveis pela adesão intercelular nas cepas de *S. epidermidis* a partir de cepas isoladas de culturas de ponta de CVC e hemocultura, e concomitantemente em cepas colonizadoras de pele e mucosas do paciente destas infecções, é possível avaliar a importância destes genes como marcadores de virulência em cepas de *S. epidermidis*.

É conhecido que a inserção de CVC trás associados o risco de infecção e o aumento na mortalidade e morbidade dos pacientes. Deste modo, frente ao risco aumentado de infecções graves por *S. epidermidis* relacionadas a CVC, e a necessidade de se estudar a relação entre as cepas de microbiota e cepas clínicas deste agente nos pacientes com IS-RC, foi desenhado o presente estudo.

## ***2- OBJETIVOS***



## **2.1- Objetivo principal**

O presente trabalho teve como objetivo principal o estudo de cepas de *S. epidermidis* em relação a:

1. Análise do o perfil genotípico;
2. Detecção da presença dos genes responsáveis pela adesão intercelular (*ica*) e produção fenotípica de biofilme;
3. Estudo da sensibilidade a antimicrobianos;
4. Estudo da dinâmica de colonização.

## **2.2- Objetivo secundário**

Analisar a relação os procedimentos médico-hospitalares intervencionais em relação à mudança de microbiota.

### *3- CASUÍSTICA E MÉTODOS*

## 3.1-Casuística

### 3.1.1-Descrição do HC da UNICAMP

O HC da UNICAMP é um hospital universitário terciário que atende uma população de 5 milhões de habitantes pertencente a Campinas e região, no estado de São Paulo.

Na ocasião da realização do estudo, o HC da UNICAMP contava com a capacidade física para 450 leitos e área construída de 65.000 metros quadrados, distribuídos em 6 blocos interligados: Bloco A – Ambulatório; Bloco B – Pronto Socorro, radiologia, centro cirúrgico ambulatorial e procedimentos; Bloco C – Enfermarias; Bloco D – Caixa d'água e elevadores, interligação entre os blocos A e C; Bloco E – Áreas de apoio técnico e administrativo, enfermarias, centro cirúrgico, UTI e central de material; Bloco F – Laboratórios.

### 3.1.2- Normas para inserção de CVC não tunelizado

As inserções de CVCs não tunelizados foram realizadas em salas de procedimento ou no leito do paciente com técnica de sala operatória. A conduta para inserção de CVC não tunelizados, seguiu a técnica recomendada pela CCIH do HC da UNICAMP (ANEXO A):

### 3.1.3-Critérios para consideração de infecção em CVC

Atualmente a infecção em CVC é considerada a partir dos critérios normalizados no **Guidelines for the Prevention of Intravascular Device-Related Infections**, em 1996 (PEARSON, 1996), sendo estes:

- Sinais inflamatórios no sítio de inserção do CVC:

- Eritema, inchaço, endurecimento ou purulência em diâmetro de 2 cm na pele, próxima a inserção do cateter;
- Para o isolamento semiquantitativo:
  - Haver uma contagem de UFC igual ou acima de 15.

#### 3.1.4-Critérios para consideração de IS-RC

É considerada IS-RC de acordo com os critérios normalizados no **Guidelines for the Prevention of Intravascular Catheter-Related Infections**, em 2002, pelo CDC de Atlanta, EUA (O'GRADY, 2002), sendo estes:

- Bacteremia em paciente com CVC, apresentando pelo menos uma hemocultura positiva obtida de veia periférica;
- Manifestações clínicas de infecção, como febre, calafrios e/ou hipotensão;
- Se o paciente, manifestando a infecção sistêmica, estiver sob uso de CVC a não menos que 48 h;
- Nenhuma fonte de infecção aparente, exceto o cateter.

Quanto aos dados microbiológicos, um dos critérios abaixo deve estar presente:

- Para o isolamento semiquantitativo:
  - Haver uma contagem de UFC igual ou superior a 15;
- Isolamento do mesmo agente microbiano, a partir da cultura de ponta de CVC e hemocultura de sangue periférico, apresentando mesmo perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, com período de coleta distante em 2 horas entre a coleta de material para cultura de ponta de e para hemocultura.

### 3.1.5-Critérios para consideração de cepas clínicas e de microbiota

As cepas de *S. epidermidis* isoladas de ponta de CVC e/ou hemocultura, consideradas ou não cepas infecciosas pela CCIH do HC da UNICAMP, foram descritas neste estudo como cepas clínicas. Enquanto que as cepas de *S. epidermidis*, isoladas de região palmar, axilar, proximal de sítio de inserção do CVC e mucosa nasal dos pacientes, obtidas em busca ativa, foram consideradas cepas colonizantes, ou seja, cepas de microbiota.

### 3.1.6-Desenho do Estudo

Foram utilizados os seguintes critérios de inclusão dos pacientes no estudo:

- Pacientes adultos internados no HC da UNICAMP, durante o período da realização do estudo, no período de setembro de 2001 a abril de 2003;
- Pacientes que apresentaram resultado positivo para *S. epidermidis* em cultura de ponta de CVC (maior ou igual a 15 UFC) e/ou duas ou mais hemoculturas positivas, para o mesmo agente, e que foram coletadas de locais distintos de venóclise, na mesma ocasião da retirada do CVC;

#### 3.1.6.1-Aspectos éticos e consentimento livre e esclarecimento

Por se tratar de pesquisa realizada com seres humanos, esta pesquisa cumpriu os princípios enunciados na Declaração de Helsinque, emendada em Hong-Kong, em 1989.

O paciente que atendeu aos aspectos deste projeto, de acordo com os critérios acima relacionados (item 3.1.4), foi informado do interesse em se realizar esta pesquisa (**APÊNDICE A**). Na ocasião, o paciente ou seu representante legal foi informado que esta pesquisa seria de caráter investigativo, não havendo nenhuma relação direta com o tratamento e procedimento médico de rotina, cabendo ao paciente ou seu representante legal a decisão de aceitá-la ou não, uma que não haveria prejuízo ao mesmo, independente de sua decisão.

### 3.1.7-Protocolo de acompanhamento para a realização das coletas

Foram considerados episódios distintos de culturas microbiológicas positivas para *S. epidermidis* quando o intervalo excedeu 10 dias entre os mesmos.

Até dois dias do resultado microbiológico positivo para *S. epidermidis* em hemocultura e/ou ponta de CVC, foi realizada visita ao paciente, pela responsável pelo estudo, para esclarecimento do teor e objetivos do estudo e subsequente livre consentimento do paciente, ou seu responsável.

### 3.1.8-Tamanho amostral e seleção de sujeitos

As cepas de *S. epidermidis* utilizadas neste estudo foram coletadas de 12 pacientes internados no Hospital das Clínicas (HC) da UNICAMP, contabilizando 18 episódios distintos de isolamento da bactéria pesquisada em culturas de ponta de CVC e/ou hemocultura. (**APÊNDICE B**).

### 3.1.9-Levantamento dos dados clínicos dos pacientes envolvidos

Os dados clínicos dos pacientes incluídos neste trabalho foram obtidos através dos prontuários médicos.

Os procedimentos ou estados clínicos previamente sofridos ou apresentados pelos pacientes, em período inferior a 2 meses ao episódio, foram analisados como possível associação com os episódios estudados. Sob esta perspectiva, foram avaliados: a) cirurgia; b) radioterapia; c) ventilação mecânica; d) sonda vesical de demora; e) nutrição parenteral; f) quimioterapia; g) corticóides; h) hemodiálise; i) transfusão de hemoderivados; j) neutropenia; k) antibioticoterapia. Para este último item foram avaliadas as seguintes classes antimicrobianas: aminoglicosídeos; carbapenens; penicilinas; cefalosporinas de primeira, terceira e quarta gerações; quinolonas e glicopeptídeos, além do uso prévio de antifúngicos.

## 3.2-Métodos

### 3.2.1-Coleta de material

O processamento das hemoculturas foi realizado pelo sistema automatizado BactAlert® (BioMérieux Inc, Hazelwood, MO, EUA), e as culturas de ponta de CVC foram processadas através de método semiquantitativo, segundo **MAKI *et al* (1977)**. Os exames microbiológicos de hemoculturas e culturas de ponta de CVC foram realizados pelo Laboratório de Microbiologia Clínica do HC da UNICAMP.

A busca ativa de microbiota do paciente foi realizada em região palmar, axilar, proximal do sítio de inserção e mucosa nasal dos pacientes. Este procedimento de coleta foi realizado com zaragoas, embebidas em meio *Brain Heart Infusion* (BHI) ou solução fisiológica. O material coletado foi semeado individualmente em meio manitol *salt* agar (Difco laboratories, Detroit, MI, EUA). Individualmente, a partir de cada placa de manitol correspondente a uma região específica, foram selecionadas, em média, 3 UFC não fermentadoras de manitol, com o intuito de buscar possíveis isolados de *S. epidermidis* presentes em cada sítio do paciente. Posteriormente foram realizados os testes bioquímicos de identificação, teste de susceptibilidade a antimicrobianos, genotipagem por PFGE, e detecção genotípica e fenotípica de biofilme.

As culturas positivas para *S. epidermidis*, de hemoculturas e/ou ponta de CVC realizadas no Laboratório de Microbiologia do HC da UNICAMP, foram repicadas, individualmente, em placas de ágar sangue. De cada placa foram coletadas até 5 colônias e estas colônias foram armazenadas em meio BHI, com adição de 15 % de glicerol e mantidas a 80° C negativos, para posterior estudo de genotipagem e fenotipagem.

### 3.2.2. Identificação bioquímica dos isolados de *S. epidermidis*

A identificação dos isolados de *S. epidermidis*, obtidos a partir de microbiota dos pacientes, foi realizada com reconhecimento de cocos Gram positivo; provas bioquímicas de *catalase* e *urease* positivas, *coagulase* e *oxidase* negativas, susceptibilidade a novobiocina e resistência a polimixina B, e produção de ácido a partir de maltose e sacarose, mas não a partir de trealose (**KLOOS e BANNERMAN, 1994**).

Os isolados provenientes de hemocultura e cultura de ponta de CVC processados no Laboratório de Microbiologia Clínica foram identificados por método automatizado, utilizando Vitek ® System (BioMérieux Vitek, Inc, Hazelwood, MO, EUA), conforme rotina daquele laboratório, complementado pela prova da *catalase*. Todos os isolados foram semeados em solução aquosa de leite em pó desnatado 10 %, previamente esterilizada e conservada a temperatura negativa de 80° C.

### 3.2.3-Teste de sensibilidade a antimicrobianos

Os isolados foram testados quanto ao perfil de sensibilidade através do método de difusão em disco, normalizado pelo **NCCLS M100-S11**, para os seguintes antimicrobianos: amicacina (30 mcg), ciprofloxacina (5 mcg), cloranfenicol (30 mcg), gentamicina (10 mcg), penicilina G (10 UI), rifampicina (5 mcg) teicoplanina (30 mcg), tetraciclina (30 mcg), vancomicina (30 mcg), oxacilina (1 mcg). Os discos utilizados foram procedentes da Cecon (São Paulo, Brasil). A sensibilidade a oxacilina foi confirmada por teste de sensibilidade a oxacilina em Müller Hinton Agar (MHA), acrescido de 4 % de cloreto de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha) e 6 mg/mL de oxacilina.

### 3.2.4. Análise da expressão de produção de biofilme

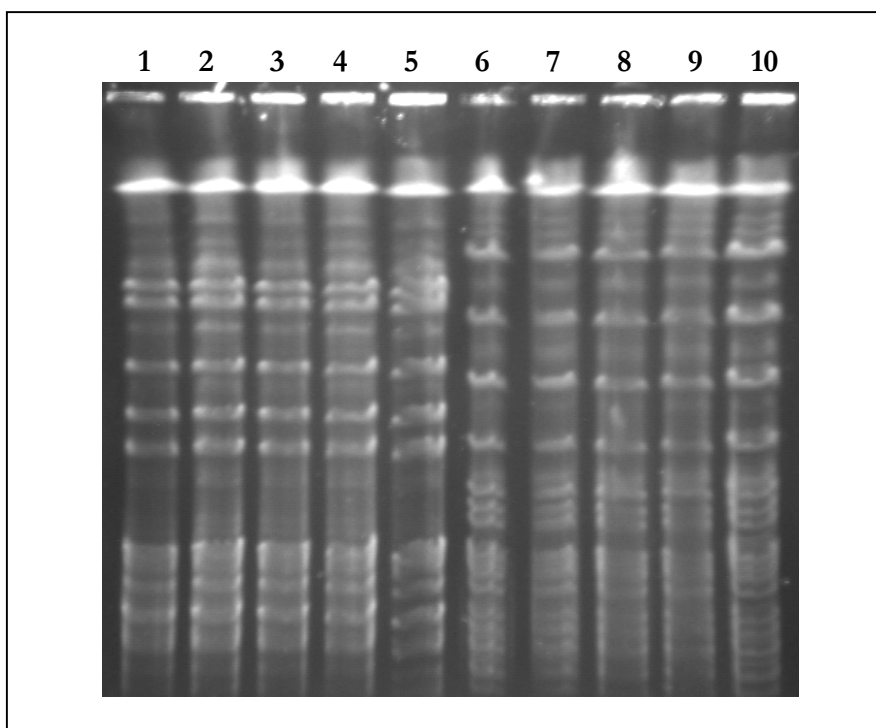
A expressão da produção de biofilme foi avaliada através do método vermelho congo agar (CRA), segundo **FREEMAN *et al* (1989)**. Os isolados foram semeados em MHA acrescido de 36 g/L de sacarose e 0,8 % de vermelho congo e incubado por 24 h a 37° C e posteriormente por 24 h a 30° C.



### 3.2.5-Padronização da técnica de PFGE a ser utilizada

Para analisar as possíveis variáveis da técnica de extração de DNA para PFGE aplicada a *S. epidermidis*, primeiramente foram testadas diferentes condições quanto ao uso de lisostafina, lisozima e proteinase K. Este processo de padronização da técnica foi realizado conjuntamente com o doutorando, na época, Orlando José Bratfich.

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que a utilização das enzimas lisozima e proteinase K, previamente descritas na técnica original de **GOERING & DUENSING (1990)**, não apresentou melhor resolução para a análise dos perfis genotípicos das cepas de *S. epidermidis*, quando estas enzimas não foram utilizadas (**Figura 5**). Portanto optou-se por padronizar a técnica sem a utilização destas enzimas, para minimizar o custo da aplicação da técnica.



**Figura 5-** Padronização da extração do DNA para PFGE, baseado em possíveis variáveis do método de **GOERING e DUENSING (1990)**.

As colunas 1 a 5 representam diferentes extrações de DNA para PFGE referentes a cepa de *S. epidermidis* ATCC 12225; as colunas 6 a 10 representam diferentes extrações referentes a cepa clínica (Perfil genotípico Q) de *S. epidermidis*. Colunas 1 e 6: extrações realizadas, utilizando lisostafina a 37° C e posteriormente proteinase K a 50° C e lisosafina a 37° C; Colunas 2 e 7: extrações realizadas sem a utilização da proteinase K, apenas incubando as amostras a 50° C; Colunas 3 e 8: extrações realizadas, incubando-se lisostafina e lisozima a 37° C e posteriormente proteinase K a 50° C; Colunas 4 e 9: extrações realizadas, utilizando lisostafina e lisozima a 37° C e posteriormente incubando-se as amostras a 50° C sem proteinase K; Colunas 5 e 10: extrações realizadas, utilizando lisostafina e lisozima incubando-se o material a 4° C e posteriormente incubando-se proteinase K a 50° C.

### 3.2.6- Comparação do perfil genotípico por PFGE

Foram comparados os perfis genotípicos por PFGE, segundo **GOERING e DUENSING (1990)**, com modificações. As cepas foram semeadas em ágar sangue e incubadas a 37°C por 24 horas. Posteriormente 10 UFC foram semeadas em 20 mL de BHI e incubadas, sob agitação, por 24 horas a 37° C. As amostras foram lavadas e centrifugadas 2 vezes por 5 minutos a 5000 rpm, re-suspendendo-se o material primeiramente em 5 mL e posteriormente em 1 mL de salina. Transferiu-se 30 µL do lavado celular em microtubo estéril, adicionando-se 400 µL de EC *buffer* (0,006 M Tris pH 7,5; 1 M NaCl; 1 M EDTA pH 7,5; polioxietileno-20-cetil Brij 58 (Sigma, St Louis, MO, EUA), 0,2 % de deoxicolato de sódio; 0,5 % de sal sódico de n-lauroilsarcosina (Sigma), 3,5 µL de solução 10 mg/mL de lisostafina e 450 µL de agarose *Low Melt* (BioAgency, São Paulo, SP) a 2 % em solução aquosa, previamente aquecida. O material foi dispensado em moldes, e os blocos resultantes, após resfriados, foram lavados 3 vezes em Tris-EDTA (TE) *High molarity* (100 mM Tris, 100 mM EDTA). Para digestão protéica os blocos foram incubados por 24 h a 50° C em ES (0,625 M EDTA pH 9,3 – 1% sal sódico de n-lauroilsarcosina (Sigma). Após a incubação os moldes foram lavados 4 vezes com TE *High molarity*. Para a digestão com endonuclease de restrição, os blocos foram previamente tratados com *Dummy no salt* (0,05 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM Tris pH 8,0), para reposição de magnésio, e posteriormente

digeridos com endonuclease de restrição *SmaI* (Invitrogen, Carsbad, CA, EUA), por 24 h a 30° C, clivando o DNA nas regiões CCCGGG.

Para eletroforese foi utilizado CHEF DR® III *System* (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA), com a seguinte programação: tempo inicial 5 s; tempo final 35 s; tempo total de corrida 20 h. Condições de corrida: temperatura 14° C, 6 volts/cm, 120 V. O material foi revelado em brometo de etídio e analisado com o programa computacional Biogene (Vilbert-Loumart, Marle-la-Valle, França).

### 3.2.6.1-Variáveis e conceitos para genotipagem

A similaridade do perfil de bandas foi estimada pelo coeficiente de similaridade (CS) de Dice, e os grupamentos foram determinados por *Unweighted Paired group Method using Arithmetic averages* (UPGMA).

$$CS_{(Dice)} = 2n_{xy}/(n_x+n_y)$$

onde,

$n_x$  = número de bandas na coluna “x”

$n_y$  = número de bandas na coluna “y”

$n_{xy}$  = número de bandas compartilhadas entre as colunas “x” e “y”

### Fórmula do coeficiente de similaridade de Dice

Cepas com coeficiente de similaridade de valor 1,0 foram considerados de genótipos idênticos; cepas que apresentaram coeficiente de similaridade diferente de 1,0, porém igual ou acima de 0,9 foram consideradas de genótipos estritamente relacionados; finalmente, cepas com coeficiente de similaridade abaixo de 0,9 foram consideradas diferentes entre si.

Os genótipos foram agrupados em ordem alfabética, a partir do genótipo predominante definido pela letra A.

### 3.2.7- Detecção da presença do gene *icaA*

A detecção da presença do gene *icaA* foi realizada através de amplificação por PCR. A obtenção do material cromossomal para amplificação foi realizada segundo **MARTINEAU *et al* (1996)**. Todas as amostras foram semeadas em BHI, e incubadas sob agitação a 37° C por 16 h. A suspensão bacteriana resultante foi visualmente ajustada ao padrão 0,5 da escala de diluição de BaSO<sub>4</sub> de McFarland, correspondente a uma concentração aproximada de 1,5 X 10<sup>8</sup> bactérias/mL. Ajustada a concentração da suspensão, 2 µL foram transferidos diretamente a solução de PCR. A reação da PCR foi ajustada a um volume final de 50 µL, contendo: 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Gibco); 0,1 % Triton X-100 (Nuclear, São Paulo, Brasil); 2,5 mM dNTP (Wako Nippon Gene, Tóquio, Japão); 50 pmol de cada oligonucleotídeo específico *icaA* e 5 pmol de cada oligonucleotídeo 16S, para controle da reação; e 2,5 U *Taq polimerase* (Gibco) (**Tabela 1**). Os oligonucleotídeos para amplificação de fragmento correspondente ao gene *icaA* foram desenhados com o programa DNA MAN para Windows, versão 2.2 (Lynnon Biop Soft), sobre dados do operon *ica* (**Figura 5**) depositado no banco de genes americano (GenBank: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), sob o número U43366. Os oligonucleotídeos referentes a região 16S, foram reproduzidos, de acordo com citação de **MARTINEAU *et al* (1996)**.

Os ciclos foram realizados automaticamente em termociclador TaKaRa PCR Thermal Cycler MP (TaKaRa Biomedicals, Shiga, Japão), iniciando-se a amplificação do material cromossomal através de desnaturação inicial de todas as amostras, sob temperatura

de 92° C, por 1 min. Foram complementados 30 ciclos de amplificação para cada amostra e cada ciclo foi constituído de 3 etapas: a) desnaturação do DNA por aquecimento a 94° C, por 1 min; b) anelamento dos oligonucleotídeos e a fita de DNA molde, em temperatura de 58° C, por 1 min; e c) síntese da nova fita de DNA pela *Taq polimerase*, em temperatura de 72° C, por 1 min. O ciclo de amplificação foi finalizado sob temperatura de 72° C, por 3 min, para extensão final.

O produto da PCR foi submetido à eletroforese em 1,5 % de gel de agarose Multi Uso (BioAgency, São Paulo, Brasil) e analisado visualmente em luz ultravioleta após ser banhado em brometo de etídio.

```

1 tttgaaatct cgaatttggt acatactagt tacaaaaatt atttttttaa aaatacattt
61 aacagtgaat atacttggtc tttaaaacgg tttttactgt cctcaataat ccogaatttt
121 tgtgaaaagg aggcctctaaa ataccgaatgc tcaagaaaaa gaagaattaa gttttataag
181 tcctctttat ccaaagcgat gtgcgttagga tcataaactc ttatcaattc atcatgtaag
241 tctagtattaa tttcttgaag atgggtgttt atttctgaat tcagtgcttc tggagcacta
301 gataattgaa catataattt aatatatctc tcataacgtc cgaatataaa tttgaaataa
361 aactggtaaa gtcogtcaat ggaataatta tcatactggt tcoataagcaa aaatctata
421 aagtaattga aacaattctc aacacttttt cgatatatgt cttccttatt atcgtaatga
481 taatatagac tagccttttt tatatttaca cttttagaaa tatcatcaag tgtagtacca
541 tcgtaccctt tttcggaaaa taaggttatt gogttatcaa taatcttacc tttcaattct
601 aaaatctccc ccttattcaa ttttctaaaa atatatata gaaaaattaa gttaaaaatta
661 caaatattac tgtttcagta taacaacatt ctattgcaaa ttgaaatctc ttcogattagc
721 atatgcttta caacctaac aacgaaaggt aggtgaaaaa atgcatgtat ttaacttttt
781 acttttctat ccaattttta tgtcaattta ctggatagta ggatcgattt actatttttt
841 tattaagaag aaacccttta atcgatcatt gttagtaaaa tctgaaatc aacaagttga
901 aggcactctc tttttattag cttgctacaa tgaaagtgaa acagttcaag acacgcttcc
961 tagtgtttta tctctagaat atcctgaaaa agaaatatac attatcaatg atggaagttc
1021 tgataaactc gctgaaatca tctatgactt caagaaaaat catgatttta aatttgttga
1081 cctcgaagtc aatagaggta aagctaatgc actcaatgag ggaatcaaac aagcatctta
1141 cgaatattgt atgtgtttag atgctgacac tgtcattgat gacgatgccc ctttttatat
1201 gattgaagac tttaaaaaga atccaaaatt aggcgcagtt acaggtaatc cacgtattcg
1261 taataaaaag tctattttag gaaaaataca gaccattgaa tatgcaagta ttattggttg
1321 tatcaagoga agtcaatctc ttgcaggagc aatcaatact atttcaggtg ttttcacact
1381 atttaaaaaa agtgaactca aagatgtagg ttattgggat actgacatga tttactgagga
1441 tattgctggt tcatggaaac tccatctttt tgattacgaa attaagtacg aaccacgtgc
1501 tctatgctgg atgttagtgc ctgaaactat aggtggttta tggaaaacaaa ggggttcgatg
1561 ggctcaaggg gggcatgaag tacttttaag agacttttgg acacttttgg ccaacaatta aaactaagaa
1621 attatcacta tatattttta tgtttgaaca aatcgcactc attacatggg tctacatcgt
1681 actatgttat ttactttttt tagtaatcac agccaacatc tttagattaca catattttaa
1741 atatagtttt tcaacttttt tcttttoatc ctttaacgat acctttatca atatcatcca
1801 atttacagtt gccttattta ttgacagtcg ctacgaaaag aaaaatatag ttggcctgat
1861 atttttaagt ttggtatccaa cgttatactg ggttatcaat gccgcagttg tcattatggc
1921 atttcctaaa gcattaaaaa gaaagaaagg tggctatgct acatggtcaa gccagacag
1981 aggcaatata caacggtaac ctcttattta aatatagtta gggagagctt attttact
2041 atatccggag tattttggat gtattgtatc gttgtgatga ttgtttatat aggaaactct
2101 atcaattctc aaatggaaag tgttataaca atacgtattg cattaaatgt tgaaaacacg
2161 gaaatttaca aattatccgg atggatgagt ttgtttgtac ttattatatt tatctttttt
2221 acatttagtc tcgcgtttca aaaatataag aaaggtcgtg acatagaaa cctttcaaat
2281 taactctttt tagcgcattg atgatataa taatgacgaa tgcaaacaca atatcacacc
2341 tgaatgctca agctaatgaa gaaaaacaaga agttaaagta cgaaaaaaat agcgcactcg
2401 cgttaaactc tcacagagta gaaaaaaagg atccttgaa tgactttata tctactacta
2461 ctgggagtaa ggaaatataa aattatagtg tcaactgatc agaattttaa tcacaaatc
2521 aatggcttaa agcacacgac gcaaaagttt taactttgaa agaatttatt aaatataaag
2581 aaaaaggtaa atttcctaaa gaaagtgttt ggattaaact tgatgatatg gatcaaacga
2641 tttatgacaa tgcctttcct gttttgaaaa aatatcatat tccagcaaca ggttttctta
2701 ttacgaaacca cattggttct accaattttc ataattttaa tttactttca aaaaagcaat
2761 tagatgaaat gtatgaaaca ggcttatggg gcttactact cactactact gatttacacg
2821 ctcttaagaa aggcaataaa tcgaagtttt tagattcgtc tcaatctggt gctagttaag
2881 atttaaaaaa aagcgaacac tatttaataa aaaactacc aaaaaatgaa cgcgcaactg
2941 cttaccctca cggattaatt aatgacgaca aaataaaagc tatgaaaaaa aatggaatc
3001 aatatgggtt tacacttcag gaaaaagctg tcacaccaga tgccgataac tatagaatc
3061 acgatttttt agtaagtaat gatgcatttg aaacgcta atagggaatgg gaocggattc
3121 atgaaagaaa ataaaacttga attagtgtat ttacgtgctt ttatttgtgt cataatcac
3181 gtgacacact tactaacgca aatcacttta gaaaatgaac agatgtctga tagttcactc
3241 atattgcaat attatatacg caatattttt attttcggca cccctagttt tataatattg
3301 tctcaattat taacaacatt aaattacgaa tcagtaacta taaattatct tttttcaaga
3361 tttaaagtata tttttattcc atacttttta atcggcttgt tctatagtta tagtgaatca
3421 ctatcacccg cttctctttt taaaaagcag tttatcgaaa atgttgtttt aggcacatgg
3481 tatggctatt tcatatcat aattatgcag ttctttgttc tatcttatat catttacaaa
3541 attaattttt atgtgttcaa tagtaaaatt ttgctgcttt tagcatttat agtccaacaa
3601 tcttatctac gatttttttt gaataatgac acttttcatc aattcatgac tcattattat
3661 ccattaagcg aaaatacaat gatatttaga tggatattct actttttctt aggtggttac
3721 atttgctata attatgaaaa aatatatctt ttcttagaaa aatatttaat tatagttatt
3781 atgttaactt taggcgcata tgttttattt atcgtgcttt ccggtagtga ttattggaat
3841 gtcacaagct ttacttatac gttaacatta tataatagtg tcatgttctt cttattacta
3901 ggagctgtga tgcactttaa aactatgtta ttaaaacta ttaaagctat tagtgcaatt
3961 tccttttttca tttatttggtt gcaccaat atcttagatt ctctttttgc ttacaccaac
4021 atatttgaag ataatacaat tgtttctctg gogatttcac ttttaatgat tctaggaatt
4081 tgataggcg tcggaatgat gttaagagag ttttatatat tcagatttgt aattggaaaa
4141 caaccgtaca agttcaat tgaaccaatac cagcctaact ggaattaata aaaaaagtc
4201 cttatccaag ctatggctta tgtatgtgct tgaataaggg attttactt actatagttt
4261 cacattatga gaataaattt tttaatattc tgtataaaga gcctaataat tgaagaaat
4321 cacctgtcat gtatctcact cctatctata taagattacg ttaggtttat accctatctc
4381 attttattta tttgttgatg ttaattgttc actttgtact aatcatcag caagaccatg
4441 ccaaaactgt tgcaattcat ctctagtacg ttttgtatct gtactgtctt gtctacaaa

```

*icaR*

*icaA*

*icaD*

*icaB*

*icaC*

**Figura 6-** Operon codificante da adesina intercelular PIA de *S. epidermidis*

Regiões nucleotídicas correspondentes aos respectivos: região reguladora *icaR* e genes *icaA*, D, B, C; Sequência demarcada em amarelo: região molde para desenho dos oligonucleotídeos *icaA forward* e *icaA reverse*. Fonte: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), número de acesso: U43366.

**Tabela 1-** Sequência de oligonucleotídeos utilizados na amplificação de fragmentos de *icaA* e 16S de *S. epidermidis*

Oligonucleotídeos	Sequência (5' → 3')	Localização do fragmento amplificado no gene *
<i>icaA Forward</i>	CTC AAG GCG GGC ATG AAG	1563-1580
<i>icaA Reverse</i>	CCT CTG TCT GGG CTT GAC	1983-1961
16S <i>Forward</i> **	GGA GGA AGG TGG GGA TGA	60-77
16S <i>Reverse</i> **	GGT GTG ACG GGC GGT GTG	298-281

\* Expresso como número de nucleotídeos. Os nucleotídeos são numerados sequencialmente dentro de cada gene.

\*\* Oligonucleotídeos descritos por MARTINEAU *et al* (1996).

## ***4- RESULTADOS***



## **4.1-Estudo microbiológico**

### **4.1.1 Cepas estudadas**

O presente estudo avaliou 247 cepas de *S. epidermidis* provenientes de isolados clínicos e de microbiota, obtidas de 12 pacientes em 18 episódios de cultura positiva para ponta de CVC não tunelizado (mono ou duplo lúmen) e/ou hemocultura, definidos ou não como infecção pela CCIH do HC da UNICAMP. Todos os CVCs envolvidos neste estudo eram compostos de silicone.

Dos pacientes analisados no estudo, um paciente apresentou 4 episódios, três pacientes apresentaram dois episódios e 8 pacientes apresentaram único episódio, no período do estudo. Em um dos 4 episódios apresentados por um dos pacientes, não foram coletadas amostras de microbiota do paciente, referentes ao episódio, sendo analisados apenas os dados clínicos do paciente referente ao período. Portanto, a avaliação das cepas provenientes de microbiota foi realizada em 17 episódios.

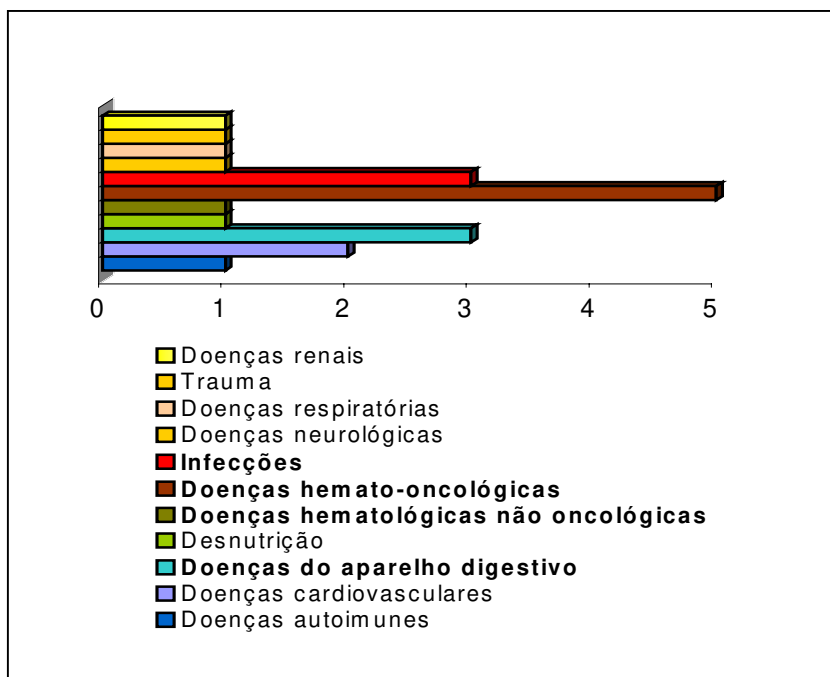
As médias de cepas clínicas e provenientes da microbiota, estudadas para cada paciente, foi de 4,5 (variação 3 a 6 cepas) e 16,08 (variação de 8 a 31 cepas) e medianas de 4,5 e 14,5, respectivamente. Enquanto as médias do número de cepas clínicas e provenientes da microbiota, para cada episódio, foi de 3,12 (variação de 1 a 6 cepas) e 11,41 (variação de 3 a 23 cepas) e mediana de 3 e 13, respectivamente.

## **4.2-Características dos pacientes incluídos no estudo**

Quanto a casuística dos pacientes avaliados, a faixa etária variou de 19 à 65 anos, sendo que 55 % deles compreenderam a faixa etária de 29 a 49. Dez dos doze pacientes eram do sexo masculino.

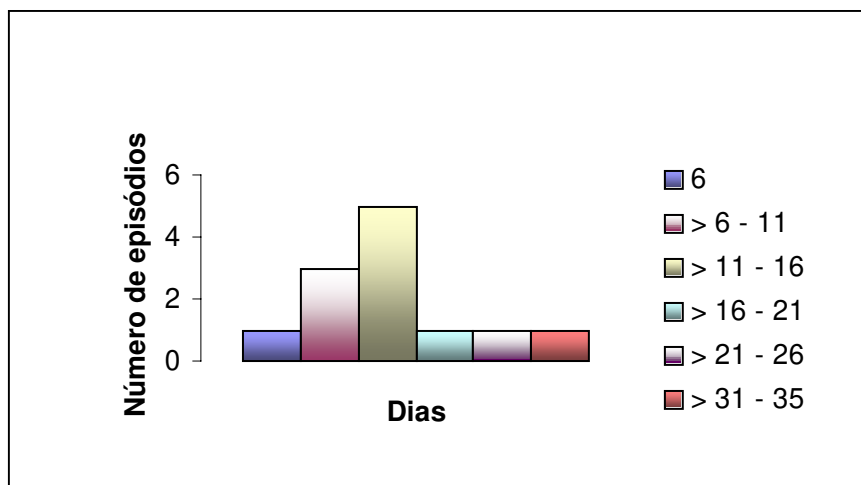
As doenças foram agrupadas em 11 segmentos compreendendo: desnutrição (1); doenças do aparelho digestivo (3); doenças auto-imunes (1); doenças cardiovasculares (1); doenças hematológicas não-oncológicas (2); doenças hemato-oncológicas (5); doenças neurológicas (1); doenças renais (1); doenças respiratórias (1); infecção (3); e trauma (1).

Alguns pacientes foram acometidos por mais de um grupo de doença de base  
(Gráfico 1).



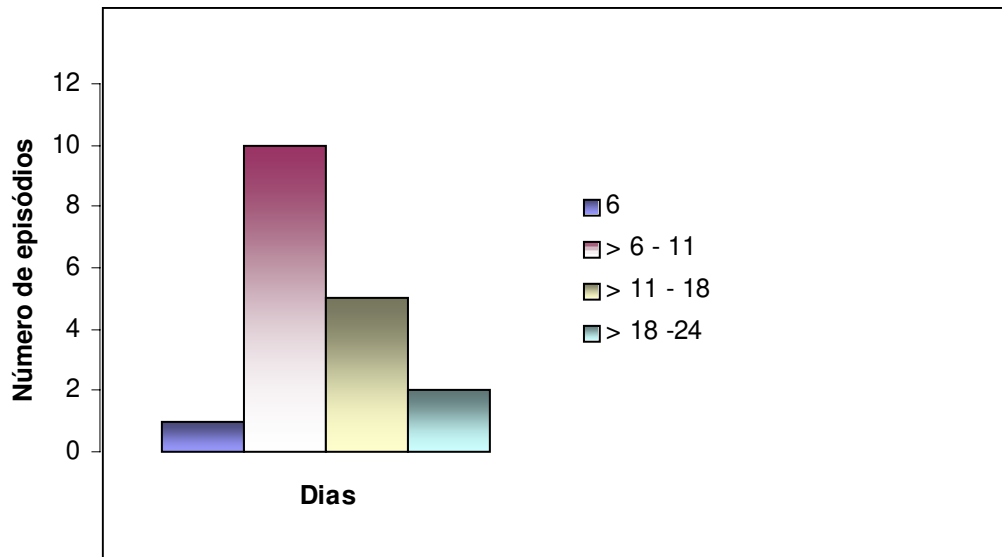
**Gráfico 1-** Principais doenças relacionadas aos pacientes incluídos neste estudo

O tempo entre a admissão hospitalar e o primeiro episódio de cultura positiva para infecção relacionada a cateter variou de 6 a 35 dias, dos quais 8 episódios ocorreram entre 6 e 16 dias (Gráfico 2).



**Gráfico 2-** Período, em dias, entre a admissão hospitalar e a ocorrência do primeiro isolamento clínico de *S. epidermidis* em cultura de ponta de CVC e/ou hemocultura.

Quanto ao período de permanência do CVC (o tempo entre a implantação até sua retirada) variou de 6 a 24 dias, com média de 12,5 e mediana de 11 (desvio padrão: 5) (**Gráfico 3**). O local da implantação ocorreu predominantemente em veia jugular 83,3% (15/18) e os demais (3/18) em veia subclávia.. Os motivos da retirada do cateter foram: a) Sinais e sintomas sistêmicos, como febre persistente, em 5 episódios; b) Sinais e sintomas locais, como dor e inflamação local, em 6 episódios e c) Fim de uso em 7 episódios.

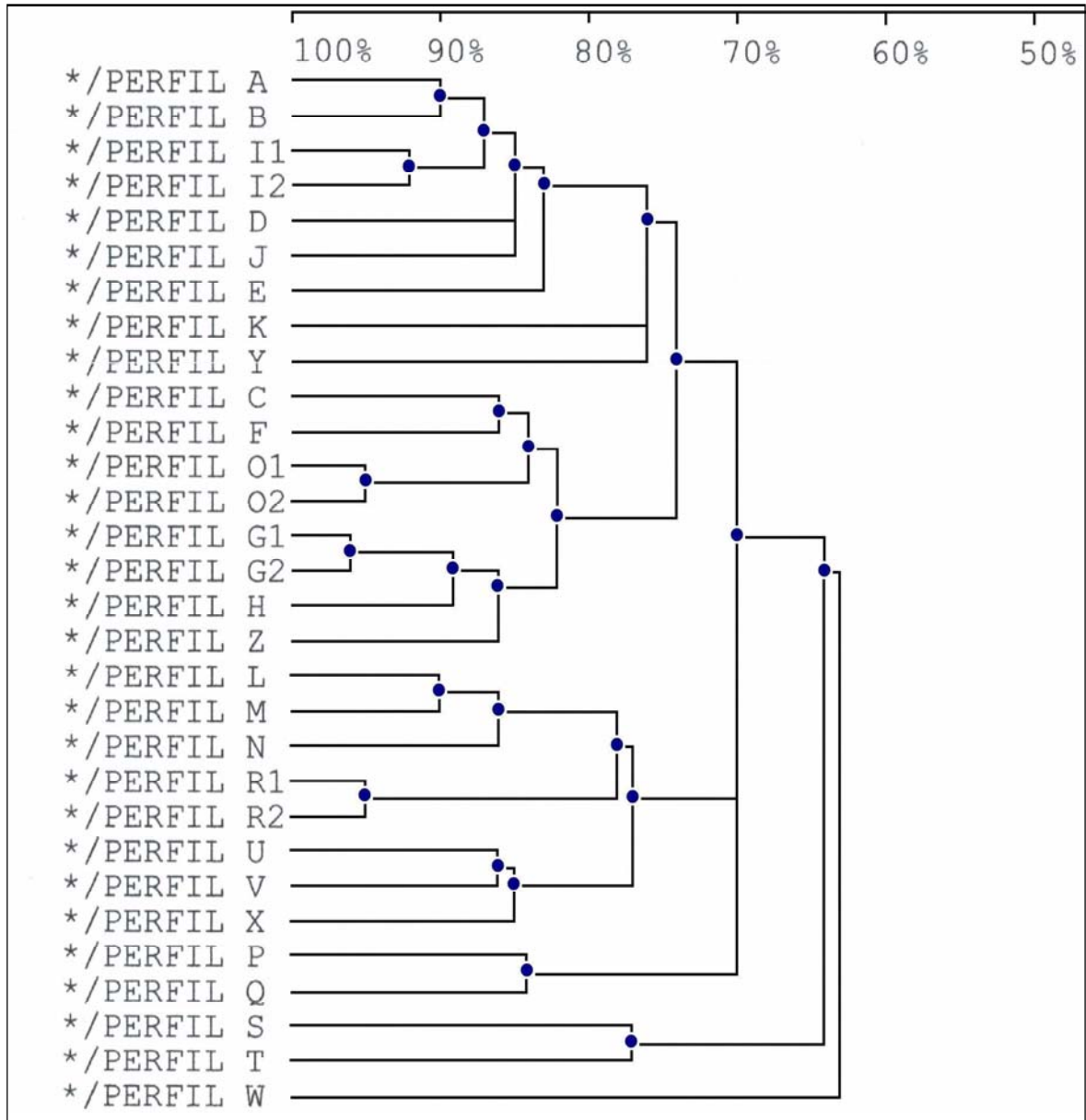


**Gráfico 3-** Distribuição do período de permanência dos cateteres venosos centrais não tunelizados.

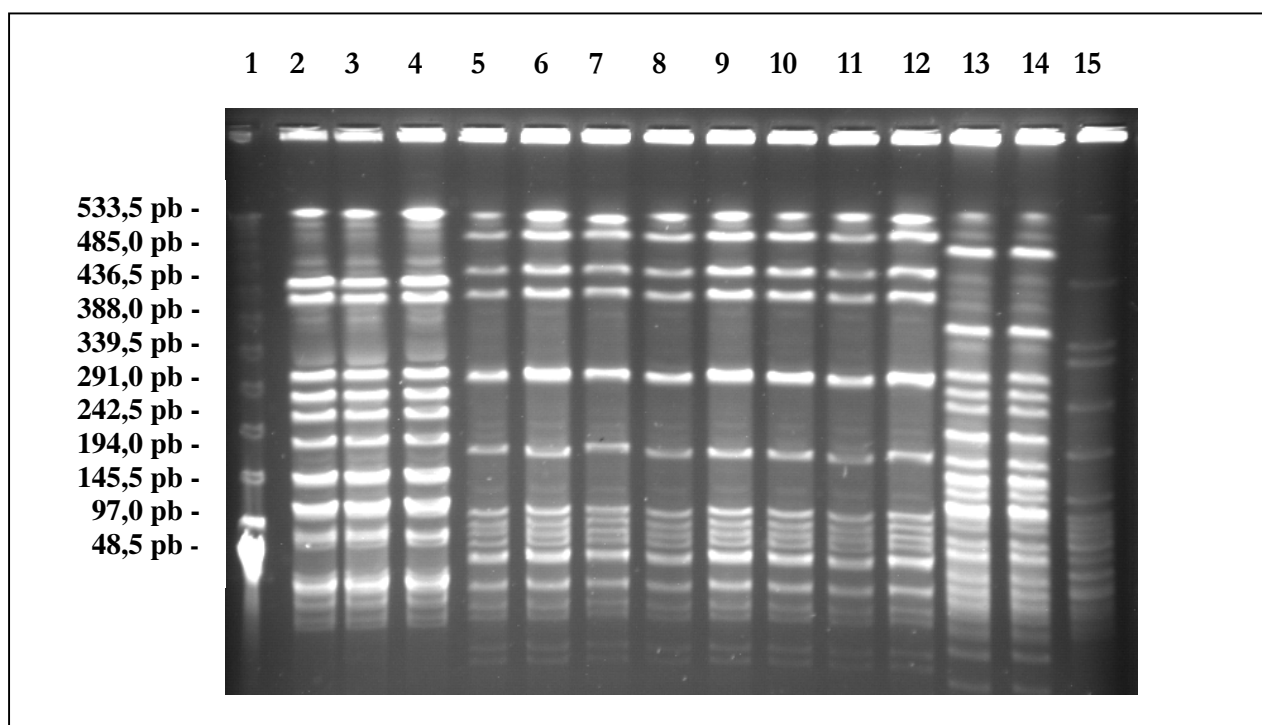
#### **4.3-Análise do perfil genotípico de cepas de *S. epidermidis* isoladas de amostras clínicas e de microbiota**

Foram encontrados 26 perfis genotípicos de *S. epidermidis*, denominados de A a W (**Gráfico 4**), diferenciados entre si por coeficiente de similaridade abaixo de 0,9 ou 90 %, e 4 perfis estritamente relacionados a outros perfis, cujos quais apresentaram coeficiente de similaridade igual ou superior a 0,9, porém diferente de 1,0 ou 100 %.

A análise dos perfis genotípicos mostrou que dos 17 episódios estudados, o clone isolado na cultura de ponta de CVC foi encontrado simultaneamente presente na microbiota do paciente em 10 (59 %) episódios (**Tabela 2**). Destes, 60 % (6/10) ocorreram quando o tempo de duração do cateter foi menor que 15 dias, enquanto que em 4 episódios, com períodos de implantação do cateter igual ou superior a 15 dias, houve totalidade (4/4) na simultânea presença de um mesmo clone em cepas clínicas e de microbiota. Para 7 episódios em que a cepa clínica não correspondeu às encontradas na microbiota, exemplo demonstrado na **Figura 7**, 71% (5/7) foram correspondentes a episódios com tempo de implantação do cateter menor que 15 dias.



**Gráfico 4-**Dendrograma representando o grupamento de perfis de 247 cepas de *S. epidermidis* provenientes de cepas clínicas e de microbiota dos pacientes deste estudo. O DNA genômico foi clivado com enzima de restrição *Sma*I e a percentagem de similaridade está baseada no padrão de grupamento UPGMA, sob coeficiente de Dice gerado pelo programa BioGene.



**Figura 7-** Perfis genotípicos de cepas de *S. epidermidis* provenientes do Paciente 7, isoladas de hemocultura e microbiota. Coluna 1: Padrão molecular *lambda* ladder; Colunas 2 a 4: Cepas isoladas de hemocultura: **Perfil Y**; Colunas 5 a 15: Cepas isoladas em microbiota; Colunas 5 a 12: **Perfil U**; Colunas 13 e 14: **Perfil H**; Colunas 15: **Perfil A**.

Os perfis genotípicos A (77 cepas), D (11 cepas), Q (9 cepas), P (16 cepas), U (11 cepas), V (8 cepas) predominaram na diversidade encontrada na microbiota dos pacientes. Estes perfis somados corresponderam a 68 % (132/193) das cepas isoladas da microbiota (**Tabela 2**). O perfil genotípico A foi prevalente entre os perfis predominantes: D, Q, U e V ( $P$ -Valor = 0,00373, análise de variância) (**Gráfico 5**). Este perfil foi encontrado em 40 % (77/193) das cepas de microbiota e em 9 % (5/54) das cepas clínicas. Em 10 episódios (8 pacientes) o perfil A foi encontrado compondo a microbiota dos pacientes, e em 5 episódios era este o perfil predominante na diversidade de cepas de *S. epidermidis* provenientes de microbiota.

Os perfis genotípicos A, D, G1, I2, K, P, R2, V, Y foram encontrados compondo a microbiota de diferentes pacientes, enquanto os perfis genotípicos A, I1, O2, P, Q, e V foram isolados em cepas clínicas e em cepas de microbiota correspondentes aos respectivos episódios (**Tabela 2**). Os demais resultados referentes aos perfis genotípicos estão ilustrados na Tabela 2.

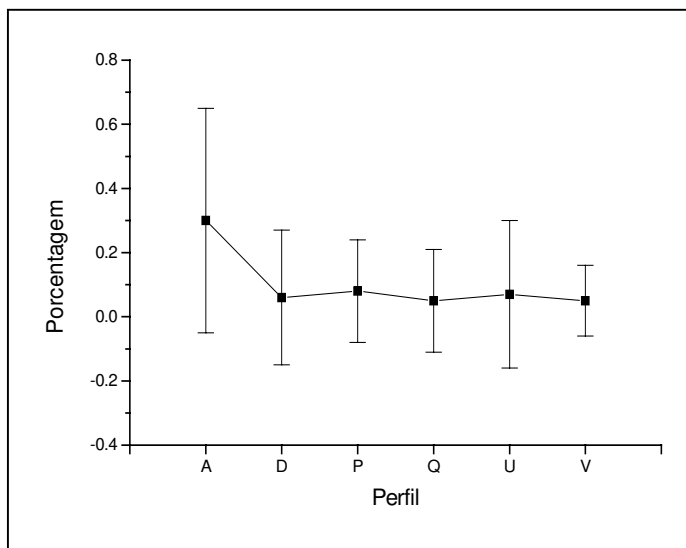
**Tabela 2-**Total de perfis genotípicos encontrados em amostras clínicas e de microbiota em cada paciente por episódio.

Pacientes	Episódios	Quantidade total de cepas clínicas	Amostras clínicas analisadas	Genótipos de cepas clínicas	Quantidade total de cepas de microbiota	Genótipo de cepas de microbiota
1	1	1	Hemocultura	S	4	B (1); O1 (2); X (1)
	2	2	CVC	A	18	A (16); O1 (2)
	3	3	CVC	A	9	A (8); Y (1)
	4	1	CVC	A	0	-
2	2	1/1	CVC/ hemocultura	Q/Q	5	Q (3); Y (2)
	2	1/2	CVC/ hemocultura	Y/Y	12	A (1); F (1); R2 (1); Q (6); Y (3)
3	1	1	CVC	P	3	A (2); K (1)
	2	3	CVC	P	19	A (14); P (3); Y (1)
4	1	1/1	CVC/ hemocultura	O2/C	4	L (2); O2 (2)
	2	1	CVC	C	4	C (2); N (1); O2 (1)
5	1	5	CVC	O1	13	A (6); M (3); V (4)
6	1	3	Hemocultura	E	12	D (8); F (2); I2 (2)
7	1	3	Hemocultura	Y	13	A (1); H (2); U (11)
8	1	4	CVC	Y	23	A (22); D (1)
9	1	5	CVC	E	15	J (2); K (2); P (1); R1 (2); R2 (1); T (3); W (2); Z (2)
10	1	5	CVC	I2	14	A (5); G2 (1); I1 (4); I2 (4)
11	1	6	CVC	V	15	E (1); G1 (1); P (8); V (4); Y (1)
12	1	4	CVC	E (1); P (2); Y (1)	10	A (3); G1 (2); P (4); S (1)



Variável	P-Valor
Perfil	<b>0.0373</b>

Teste de perfil para contrastes:		
Comparações		P-Valor
Perfil A vs:	Perfil D	<b>0.0441</b>
	Perfil P	0.1832
	Perfil Q	<b>0.0293</b>
	Perfil U	<b>0.0143</b>
	Perfil V	<b>0.0416</b>
Perfil D vs:	Perfil P	0.4714
	Perfil Q	0.6626
	Perfil U	0.7183
	Perfil V	1.0000
Perfil P vs:	Perfil Q	0.2480
	Perfil U	0.2848
	Perfil V	0.3535
Perfil Q vs:	Perfil U	0.9486
	Perfil V	0.6597
Perfil U vs:	Perfil V	0.7160



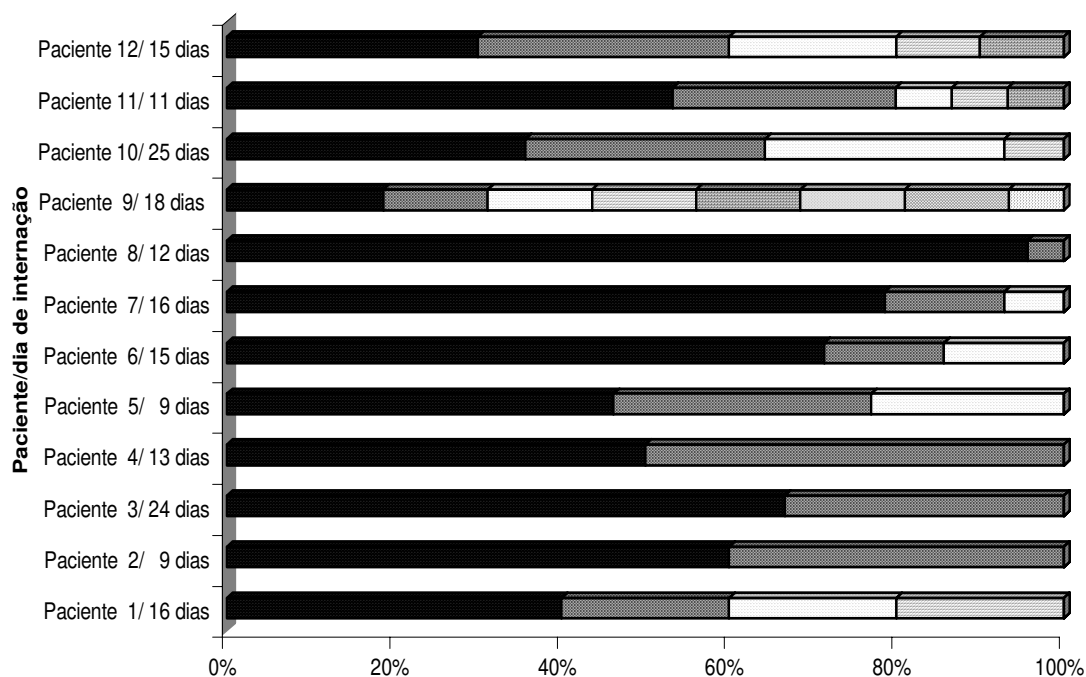
Obs: Para a ANOVA foram utilizados os perfis com maiores médias.

**Gráfico 5-** Análise estatística da prevalência de perfis genotípicos predominantes de *S. epidermidis*.

#### 4.3.1-Diversidade de perfis genotípicos de cepas de *S. epidermidis* encontrados na microbiota dos pacientes

Foram relacionados: o tempo, em dias, de hospitalização e a percentagem de perfis genotípicos encontrados em cada paciente no período do 1º episódio para cada paciente (**Gráfico 6**).

Todos os pacientes apresentaram, pelo menos, dois perfis genotípicos nas cepas da microbiota no primeiro episódio. Os pacientes 2, 3, 4, 7, 8 e 11 apresentaram um perfil de microbiota para *S. epidermidis* oligoclonal definido como a predominância de um perfil genotípico compondo mais de 50 % das cepas estudadas no episódio. Os demais pacientes apresentavam a microbiota composta de cepas de *S. epidermidis* de diversidade policlonal (igual ou superior a 3 perfis genotípicos e ausência de perfil predominante). O **Gráfico 6** representa a diversidade genotípica de cepas de *S. epidermidis*, no período do primeiro episódio, independente dos perfis genotípicos relacionados.



**Gráfico 6-** Relação percentual da diversidade de perfis genotípicos de *S. epidermidis* encontrada na microbiota dos pacientes, no respectivo dia de internação que houve o primeiro episódio de isolamento clínico de *S. epidermidis*.

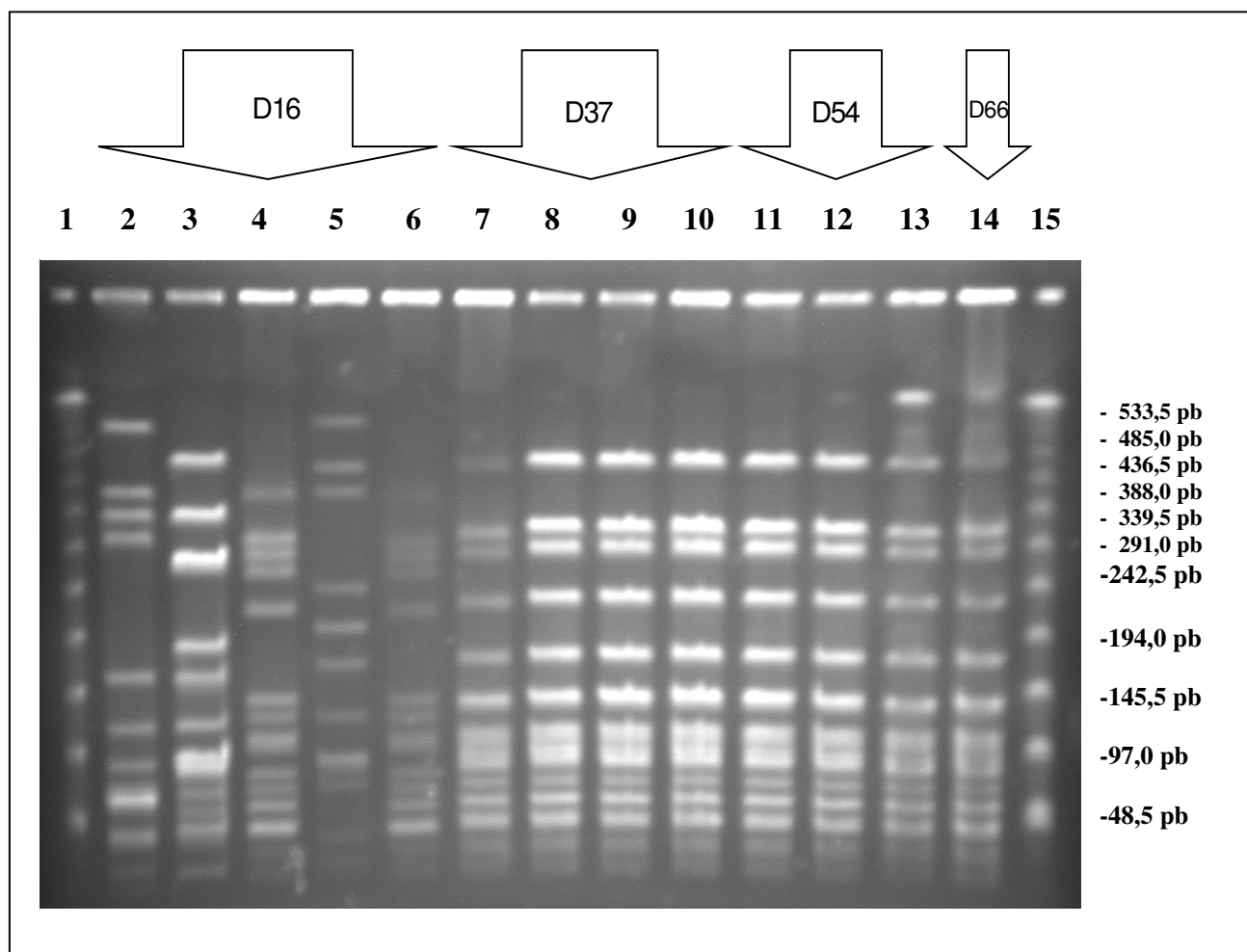
Referindo-se apenas aos dados obtidos no primeiro episódio estudado de cada paciente, observou-se que não houve diferenças entre perfis genotípicos policlonais *versus* oligoclonais de acordo com o tempo de internação hospitalar dos pacientes, menor ou igual e menor que 15 dias, sendo encontrado 4 e 3 episódios dos 6 episódios de cada um dos grupos de perfis oligoclonal e policlonal, em período igual ou inferior a 15 dias de hospitalização. Porém 2 pacientes (Pacientes 2 e 8), que apresentaram perfis oligoclonais em tempo inferior a 15 dias, possuíam histórico de internações prévias em outras unidades hospitalares, por estarem em tratamento de doenças hemato-oncológicas. Portanto, para estes pacientes o envolvimento hospitalar excede ao período de estudo, representando um viés na análise dos resultados referentes a estes pacientes. Para os 5 episódios referentes a subseqüentes 2º e 3º episódios, apresentados por 4 pacientes, sempre superiores a 15 dias de internação, o perfil de microbiota apresentado demonstrou um perfil predominante.

Comparando o tempo de implantação do CVC com a coincidência ou não de perfis genotípicos de cepas clínicas e de microbiota, no período de cada episódio, observou-se que em episódios em que o CVC permaneceu implantado por tempo maior ou igual a 10 dias, em 70 % (7/10) destes episódios o mesmo clone fora encontrado em cepas clínicas e de microbiota; enquanto que para episódios em que o período de permanência do CVC foi < 10 dias, em 43 % (3/7) o mesmo clone da cepa clínica foi encontrado na microbiota do paciente, não havendo diferenças significativas entre os grupos ( $P$ -Valor = 0,3499, teste exato de Fisher).

#### 4.3.2-Dinâmica de colonização de cepas hospitalares de *S. epidermidis* e subseqüentes infecções relacionadas a cateter

Um dos pacientes estudados (Paciente 1) foi acometido por 4 episódios de isolamento de *S. epidermidis* em cultura de ponta de CVC e/ou hemocultura. O primeiro episódio ocorreu com dezesseis dias de internação hospitalar. Os demais episódios ocorreram nos dias 37, 54 e 66, sucessivamente. Ao acompanhar o paciente durante a

ocorrência dos episódios, foi possível verificar a mudança de microbiota por *S. epidermidis*, durante sua hospitalização (**Figura 8**).



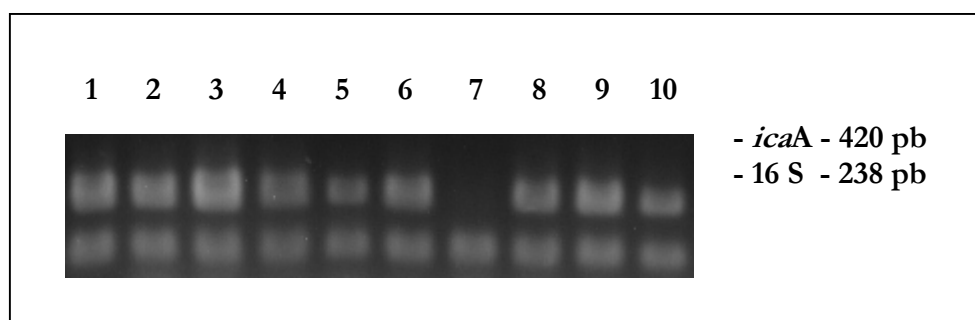
**Figura 8-** Perfis genotípicos de cepas de *S. epidermidis* provenientes do Paciente 1 em isolados clínicos e microbiota. Coluna 1 e 15: Padrão molecular *lambda* ladder; Colunas 2, 7, 11 e 14: Cepas clínicas referentes ao respectivo episódio indicado pelas setas (o número inserido nas setas indicam o dia de internação em que o episódio ocorreu); Colunas 3 a 6, 8 a 10, 12 e 13: Cepas isoladas em microbiota; Coluna 2: **Perfil S**; Coluna 3: **Perfil B**; Coluna 4 e 6: **Perfil O1**; Coluna 5: **Perfil X**; Colunas 7 a 14: **Perfil A**.

#### 4.4-Análise da presença do gene *icaA* em cepas clínicas e de microbiota

A percentagem da presença do gene *icaA* foi significativamente maior nas cepas clínicas (49/54 - 91 %) em relação a presença do gene nas cepas provenientes de microbiota (138/193 - 71 %) ( $P$ -Valor = 0,0068; teste de Wilcoxon).

Analizando a relação entre a presença do gene *icaA* nas cepas de microbiota e os perfis genotípicos predominantes, encontrados na microbiota dos pacientes (A, D, Q, P, U e V), não houve diferença entre os grupos. O grupo de cepas com perfis predominantes e o grupo das demais cepas apresentaram o gene *icaA* em 71 % (96/135) e 72 % (42/58), respectivamente.

A figura 9 demonstra a análise da presença do gene *icaA*, nas cepas de *S. epidermidis* através da amplificação ou não do fragmento correspondente.



**Figura 9-** Detecção da presença do gene *icaA* através da amplificação por PCR do fragmento referente.

A coluna 7 representa ausência de amplificação para *icaA*, pois apenas é observado o fragmento de 238 pb, referente a amplificação da região 16S

#### **4.5-Análise da expressão de biofilme em cepas clínicas e provenientes de microbiota**

Analisando a relação entre a presença do gene *icaA* nas cepas clínicas e de microbiota e a expressão de biofilme, 55 % (27/49) e 66 % (91/138) das cepas clínicas e de microbiota, respectivamente, expressaram biofilme ( $P$ -Valor = 0,7002; teste de Wilcoxon).

Quando o mesmo clone genotípico foi encontrado em cepas clínicas e de microbiota no mesmo episódio foi significativamente associado à presença de cepas produtoras de biofilme ( $P$ -Valor = 0.019). Estes dados foram realizados em análise univariada para 1º, 2º e 3º episódios.

#### **4.6-Análise do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das cepas de *S. epidermidis***

Pelo teste de susceptibilidade a antimicrobianos através do método de difusão em disco, todas as cepas estudadas foram resistentes a penicilina G, e sensíveis aos glicopeptídeos teicoplanina e vancomicina.

As cepas foram agrupadas em 7 perfis de resistência a antimicrobianos. Apenas 2 perfis (B e S), encontrados na microbiota de um paciente (Paciente 1), 16 dias após sua internação, sem histórico de internações hospitalares prévias, demonstraram perfil multi-sensível aos antimicrobianos, excetuando a resistência a penicilina G. Este dado sugere que o paciente permaneceu com sua microbiota comunitária.

Como demonstrado na **Tabela 3**, a relação entre os perfis genotípicos e de susceptibilidade a antimicrobianos não mostrou haver padrões fixos entre ambos.

**Tabela 3-**Relação dos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos e os perfis genotípicos encontrados nas cepas de *S. epidermidis* estudadas.

Perfis susceptibilidade	Antimicrobianos										Perfis genotípicos
	PEN	OXA	AMI	GEN	CIP	RIF	TET	CLO	TEI	VAN	
I	<b>R</b>	<b>R</b>	V	V	<b>R</b>	V	V	V	S	S	A; O2; J
II	<b>R</b>	<b>R</b>	V	<b>R</b>	<b>R</b>	V	V	S	S	S	C; F; G; L; N
III	<b>R</b>	<b>R</b>	S	S	S	S	<b>R</b>	S	S	S	M; W
IV	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	V	V	V	S	S	D; H; R1; R2; T; U; Y
V	<b>R</b>	<b>R</b>	V	<b>R</b>	V	V	V	<b>R</b>	S	S	P; Q
VI	<b>R</b>	V	V	V	V	V	V	V	S	S	E; I1; I2; K; O1; V
VII	<b>R</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	B; S

S: sensível; R: resistente; V: variável (**R or S**); PEN: penicilina G; OXA: oxacilina; AMK: amicacina; GEN: gentamicina; CIP: ciprofloxacina; RIF: rifampicina; TET: tetraciclina, CLO: cloranfenicol, TEI: teicoplanina; VAN: vancomicina

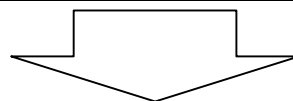
#### **4.7-Análise de procedimentos hospitalares intervencionais e a relação com a microbiota por *S. epidermidis* genotipicamente oligoclinal**

A análise dos procedimentos médico-hospitalares, cujos quais os pacientes foram submetidos, previamente ao período de cada episódio, demonstrou que o uso prévio de quinolonas contribuiu significativamente para a formação do perfil oligoclinal de microbiota ( $P$ -Valor = 0,034: Teste exato de Fisher). Os demais parâmetros analisados não apresentaram implicações significativas no perfil da microbiota (**Tabela 4**).

**Tabela 4-** Análise de fatores hospitalares intervencionais e a relação da formação de microbiota por *S. epidermidis* genotipicamente oligoclonal.

**A**

MICROBIOTA	PROCEDIMENTOS PRÉVIOS																			
	Cirurgia		Corticóide		Hemo derivado		Hemo diálise		Antimicrobiano		Quimio terapia		Radio terapia		Sonda Vesical		Ventilação Mecânica		Nutrição Parenteral	
	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não
<b>POLICLONAL</b>	2	9	5	6	5	6	2	9	11	0	4	7	0	11	4	7	2	9	2	9
<b>OLIGOCLONAL</b>	4	2	3	3	3	3	0	6	5	1	0	6	1	5	3	3	3	3	3	3
<b>Teste exato de Fisher</b>	0,109		1,00		1,00		0,515		0,353		0,237		0,353		0,644		0,280		0,280	



**B**

MICROBIOTA	CLASSES DE ANTIMICROBIANOS PRÉVIOS															
	Aminoglicosídeo		Antifúngico		Carbapenem		Cefalosporina de 1 <sup>a</sup> geração		Cefalosporina de 3 <sup>a</sup> geração		Cefalosporina de 4 <sup>a</sup> geração		Glicopeptídeo		<b>Quinolona</b>	
	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não
<b>POLICLONAL</b>	11	0	5	6	10	1	1	10	9	2	6	5	9	2	<b>2</b>	<b>9</b>
<b>OLIGOCLONAL</b>	3	3	5	1	5	1	0	6	5	1	3	3	3	3	<b>5</b>	<b>1</b>
<b>Teste exato de Fisher</b>	0,029		0,304		1,00		1,00		1,00		1,00		0,280		<b>0,034</b>	

**A** Procedimentos previamente sofridos pelos pacientes a cada episódio; **B** Estratificação das classes de antimicrobianos previamente ministrados aos pacientes, em cada episódio



#### **4.8-Análise da expressão de biofilme relacionada a sinais e sintomas clínicos**

Em 10 episódios onde o paciente apresentou sinais e sintomas clínicos, locais ou sistêmicos, a produção de biofilme ocorreu em 8 episódios, ou 80 %. Para os 7 episódios, em que o motivo da retirada foi o fim do tratamento, 5 deles demonstraram a expressão de biofilme, não havendo diferença significativa entre os grupos ( $P$ -Valor = 0,321, teste não paramétrico de Mann-Whitney).

#### **4.9- Análise global das cepas de *S. epidermidis***

Dentre as cepas analisadas, 237 apresentaram resistência a oxacilina, destas 185 foram isoladas de microbiota. Das cepas resistentes a oxacilina, em 76 % (180/237) foi demonstrada a presença do gene *icaA*, em 132 cepas de microbiota e 48 cepas clínicas. Dentre as cepas que apresentaram este gene, 64 % (115/180) demonstraram produção de biofilme através do teste de CRA. Para as cepas oxacilina sensíveis estudadas, 60 % apresentaram o gene *icaA*, e destes 50,0 % (3/6) expressaram o fenótipo positivo no teste de CRA (**Tabela 5**).

Quanto as cepas clínicas, em 16 dos 18 episódios foi detectada a presença do gene *icaA* em pelo menos uma das cepas clínicas, e destes, em 12 episódios foi detectada a expressão do biofilme *in vitro*.

**Tabela 5-** Relação global de cepas clínicas e provenientes de microbiota de *S. epidermidis* quanto a susceptibilidade a oxacilina, presença do gene *icaA* e produção de biofilme.

<b>Oxacilina</b>			
Resistente		Sensível	
237		10	
Microbiota	Infecção	Microbiota	Infecção
185	52	8	2
<b>Presença do gene <i>icaA</i></b>			
132 (71 %)	48 (92 %)	5 (63 %)	1 (50 %)
<b>Produção de biofilme através de vermelho congo ágar</b>			
88 (67 %)	27 (56 %)	3 (60 %)	0

#### **4.10- Expressão de biofilme em cepas clínicas não classificadas pela CCIH como responsáveis por infecção**

A avaliação prévia dos episódios pela CCIH classificou 6 destes episódios como não infecção ou infecção não relacionada a cateter. Em 5 episódios a produção de biofilme foi detectada nos isolados de *S. epidermidis* relacionados. Três destes cinco episódios onde *S. epidermidis* fora encontrado, houve uma concomitante ou pós-infecção sistêmica por bacilos Gram negativo (BGN).

#### **4.11- Concomitante ou pós-infecção por BGN**

Oito dos doze pacientes estudados apresentaram concomitante ou pós-infecção por BGN durante o período de hospitalização; 7 pacientes apresentaram infecção sistêmica por estes agentes: dois pacientes apresentaram infecção sistêmica causada por *Acinetobacter baumannii*; quatro outros pacientes desenvolveram a mesma infecção por

*Klebsiella pneumoniae*; *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*; *Enterobacter cloacae* e *Citrobacter freundii*. Para este último agente além da infecção sistêmica o agente foi considerado co-agente da infecção de CVC. Um oitavo paciente apresentou secreção nefro-peritoneal por *P aeruginosa* no período da infecção por *S. epidermidis*. Nestes casos a infecção prévia de CVC por *S. epidermidis* que apresentavam o gene *icaA* foi de 100 %, embora em 2 destes 8 pacientes a expressão do biofilme não foi demonstrada. A evolução incorreu para óbito em 2 pacientes infectados, concomitante ou posteriormente por BGN.

#### **4.12- Evolução dos pacientes**

Referente a internação relacionada aos episódios estudados, 3 dos 12 pacientes evoluíram a óbito, todos relacionados a septicemia. Como descrito no item anterior, 2 pacientes apresentaram co-infecção de *S. epidermidis* e BGN, e o quadro séptico referente ao terceiro paciente não foi esclarecido.

## *5- DISCUSSÃO*

## 5.1 Alteração da microbiota no curso da hospitalização

Indivíduos saudáveis, sem histórico de passagem hospitalar são colonizados por cepas de *S. epidermidis* com espectro de sensibilidade diversificado frente à penicilina, aminoglicosídeos, tetraciclina e quinolonas e que coletivamente apresentam um perfil policlonal. Supõe-se que a mudança deste perfil de microbiota policlonal, variavelmente sensível e localmente persistente para um perfil oligoclonal, mais resistente e tipicamente de colonização hospitalar preceda as infecções manifestas nos pacientes hospitalares (RATH *et al*, 2001). Cepas responsáveis por IS-RCs são resistentes a diferentes classes antimicrobianas e fazem parte de um grupo restrito de genótipos (VERMONT *et al*, 1998; FREBOURG *et al*, 1999). Em análise global deste estudo, observa-se que, de acordo com as expectativas, durante o curso de hospitalização houve mudanças na microbiota dos pacientes quanto à diversidade de genótipos de *S. epidermidis*, tendendo a composição da microbiota ser oligoclonal, composta de cepas melhor adaptadas a seleção competitiva, imposta no ambiente hospitalar.

## 5.2- Análise de procedimentos hospitalares intervencionais e a relação com a microbiota

Em análise dos procedimentos médico-hospitalares prévios de cada episódio, constatou-se que o uso da quinolona ciprofloxacina contribuiu significativamente para o perfil oligoclonal de microbiota. A resistência frente a quinolona apresentou-se em maior proporção nas cepas colonizadoras, porém a característica oligoclonal do perfil das cepas colonizadoras após o uso de ciprofloxacina leva-nos a inferir que a resistência das cepas colonizadoras não foi devido à aquisição de mecanismos de resistência a esta classe antimicrobiana, mas à seleção da microbiota, imposta pela antibioticoterapia. Esta conclusão está de acordo com os dados apresentados por FERREIRA *et al* (2004), em trabalho desenvolvido com cepas de *Acinetobacter* spp e *Pseudomonas aeruginosa* pós antibioticoterapia por ciprofloxacina, que quando foram comparados os perfis genotípicos de cepas sensíveis e resistentes, frente a este antimicrobiano, das espécies estudadas, foi observado que os perfis genotípicos eram distintos entre os grupos. De acordo com ROTH

e **JAMES (1988)**, em geral, a contínua pressão seletiva da terapia antimicrobiana é o fator externo que mais rapidamente favorece a alteração da microbiota, pois suprime a microbiota residente e favorece a colonização de microrganismos mais resistentes.

No caso particular da resistência a ciprofloxacina, há relatos na literatura que apontam para a rápida aquisição de resistência de estafilococos coagulase negativa (ECN), em pacientes sob terapia profilática, principalmente contra infecções por BGN **MULDER et al (1997)**. Em trabalho apresentado por **HØIBY et al (1997)**, foi demonstrado que cepas de *S. epidermidis* isoladas de axila desenvolveram resistência a ciprofloxacina e drogas correlatas, em média, 3 dias após o curso terapêutico, enquanto que para mucosa nasal a mesma resistência ocorreu, em média 11 dias. De acordo com os autores, a resistência a esta classe de antimicrobianos é devido à alta excreção da droga pelas glândulas sudoríparas (**HØIBY et al, 1997**). Portanto aliando-se a característica de colonização epidérmica de *S. epidermidis* com a particularidade de excreção epitelial da droga, torna-se compreensível a forte pressão seletiva que culmina na alteração do perfil de microbiota.

### **5.3- Ciprofloxacina e aumento da adesão bacteriana em biomateriais**

Embora classicamente não se relacione resistência antimicrobiana à virulência, estudos mais recentes com *S. aureus* demonstraram que doses abaixo da concentração inibitória mínima (sub-CIM) de fluoroquinolonas aumentam a expressão das proteínas ligadoras de fibronectina (PLF) (**BISOGNANO et al, 1997**).

As PLFs são importantes na adesão primária de células estafilocócicas a biomateriais. Imediatamente após a inserção intravascular de cateteres, estes são revestidos com proteínas séricas como fibrina, fibrinogênio e fibronectina, num processo de “humanização” do biomaterial inserido (**VAUDAUX et al., 1989, HEILMANN et al., 1997**). Na dinâmica da colonização bacteriana aos materiais prostéticos, as PLFs permitem aos estafilococos interagirem especificamente com as proteínas plasmáticas aderidas previamente a estes biomateriais, como CVCs, considerado este o primeiro passo na adesão bacteriana aos materiais prostéticos (**VALDAUX et al., 1989**). Recentemente foi demonstrada a presença das PLFs em *S. epidermidis* (**WILLIAMS et al., 2002**).

Dentre as cepas de microbiota estudadas, apenas 3 % (6/193) das cepas, referentes aos perfis genotípicos B, M e W apresentaram sensibilidade a ciprofloxacina, e uma cepa, representando 2 % (1/54) das cepas clínicas, perfil genotípico S, apresentou sensibilidade ao mesmo antimicrobiano. Apenas um episódio dentre os 18 episódios estudados, o paciente não havia recebido antibioticoterapia prévia. Neste episódio, a cepa clínica de *S. epidermidis* apresentou multi-sensibilidade a antimicrobianos, ausência do gene *icaA*, e não produção de biofilme. Este mesmo paciente, após antibioticoterapia com ciprofloxacina, apresentou dois seguintes episódios de cultura de ponta de CVC com cepas distintas da isolada no primeiro episódio, sendo estas cepas produtoras de biofilme e resistentes a oxacilina e ciprofloxacina, inclusive sendo este o perfil prevalente deste estudo.

**BURKE et al (1998)** em considerações terapêuticas sugere que após a retirada do CVC suspeito de infecção, seja iniciada terapia empírica contra os microrganismos mais comumente relacionados a IS-RC, ou seja, ECN, *S. aureus*, *Enterobacter*, *Serratia*, e o grupo de pseudomonas não aeruginosa. Para a terapia empírica é sugerida a administração de vancomicina em conjunção a antimicrobianos que atuem contra BGN, sugerindo para este propósito cefepime, levofloxacina, aztreonam, tazobactam, meropenem, ou gentamicina (**BURKE et al., 1998**). No caso específico da quinolona levofloxacina, a terapêutica empírica deve ser considerada dentro da relação risco-benefício, tendo em vista o impacto que esta conduta pode ter sobre a microbiota de pacientes necessariamente submetidos a cateterizações posteriores, uma vez que atualmente, observa-se a ascensão de *S. epidermidis* na importância das infecções hospitalares.

#### **5.4- Gene *icaA* como marcador de cepa infecciosa**

Dados apresentados na literatura demonstraram que significativamente cepas infecciosas apresentam maior positividade para a detecção de genes *ica* em relação às cepas colonizantes (**FREBOURG et al., 2000, GALDBART et al., 2000, ARCIOLA et al, 2001, DE SILVA et al., 2002**). Os dados deste estudo, comparando a detecção do gene *icaA* em cepas clínicas - independentes de serem classificadas ou não como agentes

infecciosos - e cepas colonizantes concordam com a literatura, demonstrando que, há uma predominância significativa ( $P$ -Valor=0,0068) deste gene nas cepas clínicas. Estes dados também reforçam a hipótese do gene *icaA* como discriminador entre infecção e colonização. Os trabalhos de **FREBOURG et al (2000)** e **GALDBART et al (2000)** sugerem que este gene poderia ser um marcador das cepas de *S. epidermidis* causadoras de infecção e colaborar na diferenciação entre cepas responsáveis por infecção ou meramente contaminantes.

Por outro lado, em nosso estudo, 71 % (137/193) das cepas colonizadoras apresentaram o gene *icaA*, podendo sugerir que nossos pacientes tenham sido colonizados previamente por cepas hospitalares de *S. epidermidis*. Em recente trabalho, **FLUCKIGER et al (2005)** demonstraram em estudos *in vivo* de processo infeccioso com cepas de *S. epidermidis* 1457 (*ica*<sup>+</sup>) e seu mutante, previamente gene *ica* nocauteado, *S. epidermidis* 1457 (*ica*<sup>-</sup>), foram inoculados simultaneamente, houve menor taxa de crescimento das cepas nocauteadas quando comparadas a estas mesmas cepas em processo infeccioso sem a presença competitiva das cepas de *S. epidermidis ica*<sup>+</sup>. Estes dados demonstram que em situações de crescimento competitivo, as cepas de *S. epidermidis* ausentes do gene *ica* são inibidas pela presença de cepas *ica*<sup>+</sup>, o que seria um fator a mais na alteração de microbiota dos pacientes hospitalizados.

### 5.5- Variação na expressão de biofilme

Não foram encontradas diferenças significativas entre cepas clínicas e provenientes de microbiota na expressão fenotípica de biofilme ( $P$ -Valor = 0,7002). Vários estudos demonstraram que a expressão de biofilme difere entre isolados da mesma cepa (**CHRISTENSEN et al, 1987, 1990, DEIGHTON et al, 1992, ZIEBUHR et al, 1997, 1999**). Esta variação fenotípica da expressão de biofilme foi atribuída a um processo reversível de inativação do gene *icaC* pela inserção e excisão do transposon IS256 (**ZIEBUHR et al, 1999**). A variação fenotípica é um fenômeno de regulação gênica, comumente encontrada em espécies bacterianas. Recentemente, dois outros mecanismos de alteração na expressão de biofilme foram demonstrados em isolados que não apresentavam



o transposon IS256: a) baixos níveis de expressão do gene *icaA*; b) mutações no gene *icaD* e na região terminal do gene *icaA* (HANDKE *et al*, 2004). Este fenômeno possivelmente facilita a dispersão natural de células não aderentes de *S. epidermidis* propiciando a colonização de outras áreas não comprometidas, resultando em bacteremia e doença metastática (HANDKE *et al*, 2004).

Em nosso estudo, também foi analisado se a presença de biofilme em cepas clínicas acarretaria em exacerbação dos sinais e sintomas clínicos locais ou sistêmicos apresentados pelos pacientes. A comparação entre cepas clínicas produtoras de biofilme e presença ou ausência de sinais clínicos demonstrou que não houve diferença entre os grupos. Estes dados são condizentes quando se considera composição polissacarídica do biofilme, que como preconizado na formação de glicocálice, não é facilmente reconhecida pelo sistema imunológico, comprometendo a segunda linha de defesa imunológica, ou seja, a fagocitose, processo inflamatório e febre (TORTORA *et al*, 2000).

## 5.6- Susceptibilidade a antimicrobianos

Cepas de *S. epidermidis* apresentam resistência a diferentes classes de antimicrobianos, e a mesma cepa pode apresentar variação frente a algumas classes de antimicrobianos. Nossos resultados demonstraram que o mesmo perfil genotípico apresentou variação de susceptibilidade frente aos aminoglicosídeos, cloranfenicol e tetraciclina.

Em trabalho apresentado por ADAM *et al* (2002) foi demonstrado que cepas de *S. epidermidis* constituindo organizações em biofilme, são mais resistentes a antimicrobianos quando comparadas com as mesmas cepas em formação plantônica, e que esta resistência pode ser aumentada pela presença de outros microrganismos, inclusive agentes fúngicos. Porém o mecanismo de resistência de cepas organizadas em biofilme não está associado aos mecanismos de resistência usualmente descritos para células plantônicas como: mutações alvo, baixa permeabilidade celular, *efflux pump*, superexpressão ou modificação de proteínas sítio alvo (STEWART *et al.*, 2002). Em recentes pesquisas foi

demonstrado que mecanismos de repressão e superexpressão de genes essenciais à fisiologia celular estão diretamente relacionados à resistência em biofilme (YAO *et al.*, 2005). Como a expressão de biofilme é uma condição variável, a susceptibilidade a antimicrobianos agregada a este mecanismo também se faz instável.

### 5.7- Microbiota e patogênese das IS-RC

A patogênese das IS-RC é multifatorial e complexa. É preconizado que, em infecções de cateteres de curta duração (< 10 dias), a fonte de infecção são os microrganismos presentes no sítio de inserção do cateter, enquanto os cateteres de longa duração (> 10 dias) tem como fonte de infecção microrganismos presentes nas mãos da equipe clínica, e que contaminam a conexão do cateter quando este é manipulado (MAKI *et al.*, 1988, SITGES-SERRA *et al.*, 1997, DAROUICHE *et al.*, 1999). Utilizando a microscopia eletrônica RAAD *et al.* (1993) demonstraram que a contaminação da conexão do cateter na manipulação era o mecanismo mais comum em infecção de cateter de longa duração. Enquanto para cateteres de curta duração, < 10 dias, a colonização por microrganismos da microbiota era a via mais comum. Esta conclusão foi feita a partir da observação de acúmulo de material polissacarídico, hoje denominado biofilme, depositado na superfície externa do cateter, em episódios em que o tempo de implantação do cateter foi, em sua maioria, menos de 10 dias, diferente do que foi observado na maioria dos cateteres implantados em períodos acima de 10 dias, onde a formação de biofilme foi observada intraluminalmente no cateter, indicando que as células bacterianas não eram provenientes da microbiota.

Extrapolando esta conclusão para a análise por genotipagem de cepas isoladas em cateteres e provenientes de microbiota, seria esperado que, concordando as observações de microscopia eletrônica, os episódios com menor tempo de implantação de cateter apresentarem coincidências nos perfis genotípicos de cepas clínicas e de microbiota, indicando a procedência das cepas presentes no cateter. Nesta mesma seqüência conclusiva, em episódios com maior tempo de implantação de cateter, seria esperado não ser encontrado coincidência entre os perfis genotípicos de cepas clínicas e de microbiota,

já que a fonte infecciosa seria exógena. De acordo com os dados do presente estudo, relacionando tempo de implantação do cateter e coincidência dos perfis genotípicos de cepas clínicas e de microbiota, não houve diferença significativa entre a coincidência ou não de perfis relacionando-se o tempo ( $P$ -Valor = 0,3499).

Os nossos dados demonstraram que em 10 dos 17 episódios em que foram comparados os perfis genotípicos das cepas clínicas com as cepas colonizadoras houve uma colonização prévia do mesmo clone. Em um dos episódios, o clone isolado da cultura de ponta de CVC foi posteriormente encontrado nas cepas colonizadoras do paciente. Este achado foi possível devido a observação do seguinte episódio de infecção de CVC. Esta observação aponta para uma possível pré-colonização não detectada entre os isolados estudados a partir da microbiota.

#### **5.8- Associação entre *S. epidermidis* e BGN**

*S. epidermidis* é o mais importante patógeno entre as IS-RC, porém diferentemente de outros patógenos hospitalares, quadros instalados de bacteremia e septicemia são associados a uma taxa de 5,5 %. A frequência de síndromes sépticas de decurso fatal associada a *S. epidermidis* eleva-se quando este agente é encontrado associado a outros agentes virulentos (VON EIFF *et al*, 2002).

Em nossa casuística, foi observado que 8 dos 12 pacientes estudados foram acometidos concomitantemente ou pós-infecção por BGN, dos quais dois pacientes evoluíram para óbito.

Dados apresentados por SKILLMANN *et al* (1999) demonstraram que as interações de diferentes polímeros polissacarídeos, formando o biofilme, levam ao aumento de resistência frente a alguns antibióticos, como uma relação simbiótica entre diferentes espécies.

Outra consideração a ser feita foi que 3 dos 6 episódios que o dado microbiológico do isolamento de *S. epidermidis* na ponta de CVC não concluiu o quadro de IS-RC pela CCIH, houve a ocorrência concomitante de infecção por BGN. Um dos critérios atuais para se definir IS-RC é o fator excludente em que no momento do episódio não deve haver nenhuma outra fonte de infecção aparente, exceto o cateter (**O'GRADY, 2002**), porém os dados apresentados neste estudo reforçam a constatação que além de *S. epidermidis* ser propriamente um agente potencialmente patogênico, infecções prévias por este agente podem ser fator de risco para infecções por BGN, desta forma o isolamento concomitante de *S. epidermidis* e outro agente potencialmente patogênico pode ser um fator confundidor para o diagnóstico de IS-RC. Esta observação pode ser reforçada pela característica de “sociedade” inter-espécie que a formação de biofilmes apresenta (**ADAM et al, 2002**), sendo um reservatório de microrganismos, ocultados do ataque imunológico e terapêutico.

## ***6- CONCLUSÕES***

Diante dos resultados apresentados no presente estudo, concluímos que:

- Cepas de *S. epidermidis*, predominantes no ambiente hospitalar do HC da Unicamp, colonizaram pele e mucosa de diferentes pacientes e foram responsáveis por colonização/infecção de CVC;
- Os pacientes hospitalizados por longos períodos apresentaram tendência para o perfil de colonização oligoclonal de cepas de *S. epidermidis*;
- O uso de ciprofloxacina foi associado com a mudança de cepas de *S. epidermidis* de microbiota de perfil policlonal para perfis oligoclonais, produtoras de biofilme;
- O gene *icaA* foi um marcador de distinção entre cepa infecciosa e contaminante de *S. epidermidis*, tendo em vista a predominância significativa;
- Cepas de um mesmo perfil genotípico apresentaram variação de susceptibilidade frente a aminoglicosídeos, ciprofloxacina, rifampicina, tetraciclina e cloranfenicol;
- Não foi observada diferença significativa na importância da microbiota como fonte de *S. epidermidis* em episódios em que CVCs estiveram implantados por curtos ou por maiores períodos.

## *7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ADAM, B., BAILLIE, G. S., DOUGLAS, J. Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 51, 344-9, 2002.

ARCHER, G. L., NIEMEYER, D. M., THANASSI, J. A., PUCCI, M. J. Dissemination among staphylococci of DNA sequences associated with methicillin resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 38, 447-54, 1994.

ARCIOLA, C. R., BALDASSARRI, L., MONTANARO, L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcus strains from catheter-associated infections. **Journal of Clinical Microbiology**, 39(6), 2151-6, 2001.

ARCIOLA, C. R., CAMPOCCIA, D., GAMBERINI, S., CERVELLATI, M., DONATI, E., MONTANARO, L. Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus. **Biomaterials**, 23, 4233-9, 2002.

ARCIOLA, C. R., COLLAMATI, S., DONATI, E., MONTANARO, L. A rapid PCR method for the detection of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus* in periprostheses infections. **Diagnostic Molecular Pathology**, 10(2), 130-7, 2001.

BAYSTON, R. e PENNY, S.R. Excessive production of mucoid substance in *Staphylococcus* SIIA: a possible factor in colonization of Holter shunts. **Developmental Medicine and Child Neurology**, 14(suppl), 25-8, 1972.

BERGEY, D. H. Gram-positive cocci. In: Holt, J. G., Krieg, N. R. Sneath, P. H. A., Staley, J. T., Williams, S. T. **Bergey's Manual of determinative bacteriology**. 9 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p. 527-58.

BISOGNANO, C., VAUDAUX, P. E., LEW, D. P., NG, E. Y. W., HOOPER, D. C. Increase expression of fibronectin-binding proteins by fluoroquinolone-resistant *Staphylococcus aureus* exposed to subinhibitory levels of ciprofloxacin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41 (5), 906-13, 1997.



BJORNSON, H. S., COLLEY, R. N., BOWER, R. H., DUTY, V. P., SCHWARTZ-FUTON, J. T., FISCHER, J. E. Association between microorganism growth of the catheter in patients receiving total parenteral nutrition. **Surgery**, v. 92 (4), 720-7, 1982.

BURKE, A. C. Intravenous line infections. **Critical Care Clinics**, v. 14 (2), 339-46, 1998.

CHEUNG, A. L., PROJAN, S. J., GRESHAM, H. The genomic aspects of virulence, sepsis, and resistance to killing mechanisms in *Staphylococcus aureus*. **Current Infectious Disease Reports**, 4: 400-10, 2002.

CHRISTENSEN, D. G., SIMPSON, W. A., BISNO, A. L. BEACHEY, E. H. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. **Infection and Immunity**, 37, 318-26, 1982.

CHRISTENSEN, G. D., BADDOUR, L. M., SIMPSON, W. A. Phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* slime production in vitro and in vivo. **Infection and Immunity**, 55, 2870-7, 1987.

COSTERTON, J. W., STEWART, P. S., GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, 284, 1318-22, 1999.

CRAMTON, S. E., GERKE, C., SCHNELL, N. F., NICHOLS, W. W., GÖTZ, F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. **Infection and Immunity**, 67, 5427-33, 1999.

CRAMTON, S. E., ULRICH, M., GÖTZ, F., DÖRING, G. Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Infection and Immunity**, 69, 4079-85, 2001.

DAROUICHE, R. O. Prevention of vascular catheter-related infections. **The Netherlands Journal of Medicine**, v. 55, 92-9, 1999.

DEIGHTON, M., PEARSON, S., CAPSTICK, J., SPELMAN, D., BORLAND, R. Phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* isolated from a patient with native valve endocarditis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, 2385-90, 1992.

DE SILVA, G. D. I., KANTZANO, M., JUSTICE, A., MASSEY, R. C., WILKINSON, A. R., DAY, N. P. J. *et al.* The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative *Staphylococci* associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. **Journal of Clinical Microbiology**, 40(2), 382-8, 2002.

DE CICCO, M., CHIARADIA, V., VERONESI, A., SANTINI, G., PANARELO, G., FRACASO, A. Source and route of microbial colonisation of parenteral nutrition catheters. **The Lancet**, 25 de novembro, 1989.

DUKE, K. G. H. *Staphylococcus* research. **Microbiology**, 149: 2697-99, 2003.

EDMOND, M. B., WALLACE, S. E., McCLISH, D. K., PFALLER, M. A., JONES, R. N., WENZEL, R. P. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. **Clinical Infections Disease**, 29(2): 239-44, 1999.

FLUCKIGER, U., ULRICH, M., STEINHUBER, A., DÖRING, G., MACK, D., LANDMANN, R. *et al.* Biofilm formation, *icaADBC* transcription, and polysaccharide intercellular adhesin synthesis by *Staphylococci* in a device-related infection model. **Infection and Immunity**, 73(3), 1811-9, 2005.

FRANSON, T.R., SHETH, N.K., ROSE, H.D., SOHNLE, P.G. Scanning electron microscopy of bacteria adherent to intravascular catheters. **Journal of Clinical Microbiology**, 20, 500-5, 1984.

FREBOURG, N. B., LEFEBVRE, S., BAERT, S., LEMELAND, J.-F., PCR-Based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, 877-80, 2000.

FREEMAN, D. J., FALKNER, F. R., KEANE, C. T. New method for detection slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal Clinical Pathology**, 42, 872-4, 1989.

GALDBART, J. O., ALLIGNET, J., TUNG, H. S., RYDEN, C., EL SOLH, N. Screening for *Staphylococcus epidermidis* markers discriminating between skin-flora strains and those responsible for infections of joint prostheses. **Journal of Infections Diseases**, 182, 351-5, 2000.

GERKE, C., KRAFT, A, SÜßMUTH, R., SCHWEITZER, GÖTZ, F. Characterization of the *N-Acetylglucosaminyltransferase* activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. **The Journal of Biological Chemistry**, 273(29), 18586-93, 1998.

GILL, S. R., FOUTS, D. E., ARCHER, G. L., MONGODIN, E. F., DEBOY, R. T., RAVEL, J. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. **Journal of Bacteriology**, v. 187 (7), 2426-48, 2005.

GOERING, R. V. e DUENSING, T. D. Rapid field inversion gel electrophoresis in combination with an rRNA gene probe in the epidemiological evaluation of *Staphylococci*, **Journal of Clinical Microbiology**, 28(3), 426-9, 1990.

GOLDMANN, D. A., e PIER, G. B. Pathogenesis of infections related to intravascular catheterization. **Clinical Microbiology Reviews**, 6(2), 176-92, 1993.

HANDKE, L. D., CONLON, K. M., SLATER, S. R., ELBARUNI, S., FITZPATRICK, F., HUMPHREYS, H., *et al.* Genetic and phenotypic analysis of biofilm phenotypic variation in multiple *Staphylococcus epidermidis* isolates, **Journal of Medical Microbiology**, 53, 367-74, 2004.

HEILMANN, C., HUSSAIN, M., PETERS, G., GOTZ, F. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. **Molecular Microbiology**, v. 24, 1013-24, 1997.

HEILMANN, C., SCHWEITZER, O., GERKE, C., VANITTANAKON, N., MACK, D., GOTZ, F. Molecular basis of intercellular adhesin in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. **Molecular Microbiology**, 20(5), 1081-1091, 1996.

HOYLE, B. D. e COSTERTON, J. W. Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. **Progress in Drug Research**, 37, 91-105, 1991.

HØIBY, N., JARLØV, J. O., KEMP, M., TVEDE, M., BANGSBORG, J. M., KJERULF, A., *et al.*, Excretion of ciprofloxacin in sweat and multiresistant *Staphylococcus epidermidis*, **The Lancet**, 349, 167-9, 1997.

KLOOS, W. E. e BANNERMAN, T. L. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. **Clinical Microbiological Review**, 7(1), 117-40, 1990.

MACK, D., NEDELMANN, M., KROKOTSCH, A., SCHWARZKOPF, A., HEESEMANN, J., LAUFS, R. Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm production; genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin. **Infection and Immunity**, 62, 3244-53, 1994.

MACK, D., RIEDEWALD, J., ROHDE, H., MAGNUS, T., FEUCHT, H. H., ELSNER, H. A., *et al.* Essential functional role of the polysaccharide intercellular adhesin of *Staphylococcus epidermidis* in hemagglutination. **Infection and Immunity**, 67, 1004-1008, 1999.

MACK, D., ROHDE, H., DOBINSKY, S., RIEDEWALD, J., NEDELMANN, M., KNOBLOCH, J. K.-M. *et al.* Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation, **Infection and Immunity**, 68, 3799-807, 2000.

MAKI, D. G., COBB, L., GARMAN, J. K., SHAPIRO, J. M., RINGER, M., HELGERSON, R. B. An attachable silver-impregnated cuff for prevention of infection with central venous catheters: a prospective randomized multicenter trial. **American Journal of Medicine**, 85, 307-14, 1988.

MAKI, D.G., WEISE, C.E., SARAFIN, H.W. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection **The New England Journal of Medicine**, 296, 23, 1305-9, 1977.

MARQUET-VAN DER MEE, N., MALLET, S., LOULERGE, J., AUDURIER, A. Typing of *Staphylococcus epidermidis* strains by random amplification of polymorphic DNA. **FEMS Microbiology Letters**, 128, 39-44, 1995.

MARTINEAU, F., PICARD, F. J., ROY, P. H., OUELLETTE, M., BERGERSON, M. G. Species-specific and ubiquitous DNA-Based assays for rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*, **Journal of Clinical Microbiology**, 36(3), 2888-93, 1996.

MIRAGAYA M., COUTO, I, PEREIRA, S. F. F., KRISTINSSON, K. G., WESTH, H., JARLÓV, J. O. *et al.* Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones: evidence of geographic dissemination. **Journal of Clinical Microbiology**, 40(2), 430-8, 2002.

MOHANTY, S. S. e KAY, P. R. Infection in total joint replacements. Why we screen MRSA when MRSE is the problem? **Journal of Bone Joint Surgery**, 86-B, 266-8, 2004.

MULDER, J. G., KOSTERINK, J. G. W., DEGENER, J. E. The relationship between the use of flucloxacillin, vancomycin, aminoglycosides and ciprofloxacin and the susceptibility patterns of coagulase-negative staphylococci recovered from blood cultures. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 40, 701-6, 1997.

MURGA, R., MILLER, J. M., DONLAN, R. M. Biofilm formation by Gram-negative bacteria on central venous catheter connectors: effect of conditioning films in a laboratory model. **Journal of Clinical Microbiology**, 39(6), 2294-7, 2001.

NCCLS Approved standard M100-S11. National Committee for Clinical Laboratory Standard: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eleventh informational supplement. Villanova, PA (2001).

NUNES, A. P. F., TEIXEIRA, L. M., BASTOS, C. C. R., SILVA, M. G., FERREIRA, R. B. R., FONSECA, L. S. *et al.* Genomic characterization of oxacillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* isolated from Brazilian medical centres. **Journal of Hospital Infection**, 59, 19-26, 2005.

O'GARA, J. P. e HUMPHREYS, H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. **Journal of Medical Microbiology**, 50, 582-7, 2001.

O'GRADY, N. P., ALEXANDER, M., DELLINGER, E. P., GERBERDING, J. I., HEARD, S. O. Guidelines for the prevention of intravascular device -related infections. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. 51 (RR-10), 2002.

PEARSON, M. L. Guidelines for the prevention of intravascular device -related infections. Part I. Intravascular device-related infections: an overview. The Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. **American Journal of Infection Control**. 24(4), 262-77, 1996

PITTET, D., TARARA, D., WENZEL, R. P. Nosocomial bloodstream infection in critically ill patients: excess length of stay, extra costs, and attributable mortality. **The Journal of the American Medical Association**, v. 271: 1598-601, 1994.

RAAD, I., ALRAHWAN, A., ROLSTON, K. *Staphylococcus epidermidis* emerging resistance and need for alternative agents. **Clinical Infections Disease**, 26, 1182-7, 1998.

RAAD, I., COSTERTON, W., SABHARWAL, U., SACILOWSKI, M., ANAISSIE, W., BODEY, G. Ultrastructural analysis of indwelling vascular catheters: a quantitative relationship between luminal colonization and duration of placement. **The Journal of Infection Disease**, v. 168, 400-7, 1993.

RATH, P-M, KNIPPSCHILD, M, ANSORG, R: Diversity and persistence of *Staphylococcus epidermidis* strains that colonize the shin of healthy individuals. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 20 (7), 517-9, 2001.

ROTH, R. R. e JAMES, W. D. Microbial ecology of the skin. **Annual Review of Microbiology**, 42, 441-64, 1988.

RUPP, M. E., FEY, P. D., HEILMANN, C., GÖTZ, F. Characterization of the importance of *Staphylococcus epidermidis* autolysin and polysaccharide intercellular adhesin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. **Journal of Infection Disease**, 183, 1038-1042, 2001.

RUPP, M. E., ULPHANI, J. S., FEY, P. D., BARTSCHT, K., MACK, D. Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesion/hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model. **Infection and Immunity**, 67(5), 2627-32, 1999.

RUPP, M. E., ULPHANI, J. S., FEY, P. D., MACK, D. Characterization of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. **Infection and Immunity**, 67, 2656-9, 1999.

RUZIN, A., LINDSAY, J., NOVICK, R. P. Molecular genetics of SaPI1- a mobile pathogenicity island in *Staphylococcus aureus*. **Molecular Microbiology**, 41, 365-77, 2001.

SCHWANK S., RAJACIC, Z., ZIMMERLI W., and BLASER, J. Impact of bacterial biofilm formation on *in vitro* and *in vitro* activities of antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 42, 895-8, 1998.

SITGES-SERRA, A., HERNANDEZ,, R., MAESTRO, S., PI-SUNER, T., GARCES, J. M., SEGURA, M. Prevention of catheter sepsis: the hub. **Nutrition**, 13 (Suppl): 30S-5S, 1997.

SKILLMAN, L. C., SUTHERLAND, I. W., JONES, M. V. The role of exopolysaccharides in dual species biofilm development. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, 13S-8S, 1999.

SLOOS, J. H., DIJKSHOORN, L., TRIENEKENS T. A. A. van HARSSELAAR, B., van DIJK, Y., van BOVEN, C. P. Multiresistant *Staphylococcus epidermidis* in a neonatal care unit. **Clinical Microbiology & Infection**, 1, 24-9, 1996.

SLOOS, J. H., HORREVORTS, A. M., VAN BOVEN, C. P. A., DIJKSHOORN, L. Identification of multiresistant *Staphylococcus epidermis* in neonates of a secondary care hospital using pulsed field gel electrophoresis and quantitative antibiogram typing. **Journal Clinical Pathology**, 51, 62-7, 1997.

STEWART, P. S. mechanisms of antibiotic resistance in bacteria biofilms. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 292, 107-13, 2002.

TENOVER, F. C., ARBEIT, R. D., GOERING, R. V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, 18(6), 426-39, 1997.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. Defesas Inespecíficas do Hospedeiro. In: TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. **Microbiologia**. 6 ed. Porto Alegre ARTMED, 2000: p. 440-60.

VANDECASTEELE, S. J., PEETERMANS, W. E., MERCKX, R. R., RIJNDERS, B. J. A., VAN ELDERE, J. Reliability of the *ica*, *aap* and *atlE* genes in the discrimination between invasive, colonizing and contaminant *Staphylococcus epidermidis* isolates in the diagnosis of catheter-related infections. **Clinical Microbiology and Infection**, 9, 114-9, 2003.

VAUDAUX, P., PITTET, D., HAEBERLI, A., HUGGLER, E., NYDEGGER, U. E., LEW, D. P. et al. Host factors selectivity increase staphylococcal adherence on inserted catheters: a role for fibronectin and fibrinogen or fibrin. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 160 (5), 865-75, 1989.

VEENSTRA, G. J. C., CREMERS, F. F. M., van DIJK, H., FLEER, A. Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Bacteriology**, 178(2), 537-41, 1996.

VON EIFF, C., PETERS, G., HEILMANN, C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. **The Lancet Infectious Diseases**, 2. 677-85, 2002.



WENZEL R. P. e EDMOND M. B. The impact of hospital-acquired bloodstream infections. **Emerging Infections Disease**, 7(2), 174-7, 2001.

WIELDERS, C. L. C., VRIENS, M. R., BRISSE, S., de GRAAF-MILTENBURG, L. A. M., TROELSTRA, A., FLEER, A. et al. Evidence for in vivo transfer of *mecA* DNA between strains of *Staphylococcus aureus*. **The Lancet**, 357, 1674-5, 2001.

YAO, Y., STURDEVANT, D. E., OTTO, M. Genomewide analysis of gene expression in *Staphylococcus epidermidis* biofilms: insights into the pathophysiology of *S. epidermidis* biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms. **Journal of Infection Disease**, 191, 289-98, 2005.

WILLIAMS, R. J., HENDERSON, B., SHARP, L. J., NAIR, S. P. Identification of a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. **Infection and Immunity**, v. 70 (12), 6805-10, 2002.

ZHANG, Y. Q., REN, S. X., LI, H. L., WANG, Y. X., FU, G., YANG, J., et al. Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). **Molecular Microbiology**, v. 49, 1577-1593.

ZIEBUHR, W., HEILMANN, C., GÖTZ, F., MEYER, P., WILMS, K., STRAUBE, E. *et al.* Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. **Infection and Immunity**, 65(3), 890-6. 1997.

ZIEBUHR, W., KRIMMER, V., RACHID, S., LÖßNER, I., GÖTZ, F, HACKER, J. A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element *IS256*. **Molecular Microbiology**, 32(2), 345-56, 1999.

*8- ANEXOS*

**RECOMENDAÇÕES TÉCNICAS PARA INSERÇÃO E  
MANIPULAÇÃO DE CATETERES VENOSOS  
CENTRAIS (CVC)**

**COMISSÃO DE CONTROLE DE INFECÇÃO HOSPITALAR  
HC-UNICAMP**

Os CVC são os dispositivos vasculares de maior risco para o desenvolvimento de infecção primária da corrente sanguínea (BSI). Os procedimentos de inserção e manipulação destes cateteres são comprovadamente os fatores de maior risco para BSI.

Os princípios gerais para prevenção das infecções relacionadas ao CVC são:

1. Estabelecer critérios rígidos de indicação do acesso vascular central.
2. Escolher o cateter de acordo com o tempo previsto de duração e finalidade de uso, levando-se em consideração os riscos de infecção:
  - Os cateteres centrais de inserção periférica (PICC) são de menor risco de infecção quando comparados cateteres inseridos em jugular ou subclávia.
  - Dar preferência a cateteres de um único lúmen.

- Considerar que a inserção do CVC na veia jugular interna aumenta os riscos de colonização e infecção quando comparados com a inserção em subclávia.
3. Não há recomendações de substituição rotineira de CVC com fio guia, exceto nos casos de complicações mecânicas.
  4. CVC devem ser removidos na presença de sinais inflamatórios no local de inserção ou na suspeita de infecção sistêmica relacionada a cateter.
  5. Remover o CVC assim que as condições clínicas o paciente permitirem.
  6. Os cateteres e condutor de artéria pulmonar devem permanecer no máximo 5 dias, devido ao elevado risco de infecção.
  7. Evitar inserção por procedimento de dissecação vascular devido ao risco aumentado de infecção quando comparado aos demais.
  8. Não é recomendado o uso de sonda nasogástrica para realização de flebotomias. Utilizar o cateter de PICC para esta finalidade.
  9. Normas para inserção de CVC:
    - Degermação das mãos e ante-braços do operador com solução de clorexidina ou PVPi degermantes por 3 minutos.
    - Degermação do local de inserção do cateter com PVPi alcoólico (remoção do excesso com álcool 70% se necessário).
    - Paramentação com luvas, aventais e campos estéreis.
    - Utilizar óculos, máscaras e gorro.
    - Após a anti-sepsia, palpar o local de inserção do cateter somente com luvas estéreis.

- Fixar adequadamente o cateter para evitar tração.

10. Curativos de CVC:

- Utilizar técnica asséptica para realização do curativo.
- Realizar a anti-sepsia do local de inserção do cateter com solução aquosa de PVPi a cada troca de curativo.
- Não tracionar o cateter.
- Cobrir o local de inserção com gaze seca ou curativo de filme transparente.
- Curativos com gaze devem ser trocados diariamente e protegidos de água durante o banho.
- Curativos de filme transparente são impermeáveis à água, devem ser observados diariamente e a troca pode ser efetuada a cada 7 dias se não existir exsudato ou sinais inflamatórios locais.

Prof. Dr. PLÍNIO TRABASSO

Presidente da CCIH-HC-UNICAMP

ENFa. Sônia R.P.E. Dantas

Responsável pela Vigilância de  
Infecções Hospitalares da UTI-Ped

*9- APÊNDICES*



Procedimentos: A coleta do material para pesquisa deverá proceder, coletando-se amostras de cultura de mãos, mucosa nasal e região cutânea. A coleta será realizada com cotonetes embebidos com meio de cultura indicados para o crescimento de microrganismos, e passados pela superfície da pele ou mucosa a ser pesquisada e semeados em meios de crescimento bacteriano.

Observações:

- O meio de cultura utilizado para embeber o cotonete não apresenta características tóxicas ou alergênicas.
- A coleta da amostra na região nasal poderá levar a um desconforto momentâneo, característico de coletas procedidas nesta região.

Esclarecimentos

O paciente ou responsável legal poderão receber informações quanto a qualquer dúvida acerca de assuntos relacionados com a pesquisa.

- O paciente poderá deixar de participar da pesquisa a qualquer tempo, sem prejuízo do atendimento, cuidado ou tratamento pela equipe de especialidade do H.C.
- Serão mantidos sigilo e o caráter confidencial das informações pessoais, sendo zelado a privacidade do paciente.



**Telefone do Comitê de Ética em Pesquisa para reclamações do paciente:  
(19) 3788-8936.**

---

Assinatura do responsável pela pesquisa

---

Assinatura do paciente ou responsável legal

Nome \_\_\_\_\_

***10- TRABALHO RELACIONADO A ESTE  
ESTUDO E SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO***

**Dynamic of hospital acquired colonization of *Staphylococcus epidermidis* and subsequent catheter-related infections**

D. Blum-Menezes, O.J. Bratfich, M.C. Padoveze, M.L. Moretti

**M.L. Moretti** (corresponding author), **D. Blum-Menezes, O.J. Bratfich, M.C. Padoveze**

Molecular Epidemiology and Infectious Diseases Laboratory; Infectious Diseases Division; Universidade Estadual de Campinas

Rua Vital Brasil, 251, Cidade Universitária Zeferino Vaz, CEP 13083-970, Campinas, São Paulo, Brazil. Phone Fax: 55-19-3788-7013

e-mail: [moretti@hc.unicamp.br](mailto:moretti@hc.unicamp.br)

Key words: *Staphylococcus epidermidis*; microbiota; biofilm; central venous catheter

## **Abstract**

We present a case of a patient under prolonged hospitalization due to chronic pancreatitis, who was submitted to multiple antibiotics, invasive procedures and abdominal surgery. We studied the dynamic of skin/mucous colonization by *S. epidermidis* related to the development of catheter-related infections. In the course of hospitalization, the normal *S. epidermidis* skin microbiota, exhibiting a polymorphic genomic DNA profiles, was replaced by a hospital-acquired biofilm-producer *S. epidermidis* strain that subsequently caused repetitive catheter-related infections.

## Introduction

*Staphylococcus epidermidis* colonizes the skin and mucous membranes and represents the main bacterium in the normal human microbiota [1]. Over the last 20 years, *S. epidermidis* has been increasingly reported as the causative agent of hospital infections, mainly, associated with prosthetic devices such as the central venous catheters (CVC)[ 2].

The pathogenesis of CVC colonization by *S. epidermidis* sequentially evolves: adherence, persistence and later dissemination of *S. epidermidis* to the bloodstream [3]. Biofilm formation is the main virulent factor and results of the biosynthesis of polysaccharides intercellular adhesion (PIA), promoting cellular aggregation, biofilm accumulation [5, 6, 7, 8] and offering a protective shield against the immunological system and antibiotic therapy [9].

Skin and mucous membranes of healthy subjects are colonized by strains of *S. epidermidis* showing a high diversity of genomic DNA polymorphisms. Prolonged hospitalization and invasive procedures promote changes in the microbiota with subsequent colonization by hospital strains that might express virulent factor such as biofilm.

This case report illustrated the importance of prolonged hospitalization, invasive procedures and the exposure to multiple antibiotics in the changes of the normal *S. epidermidis* skin/mucous microbiota, and the implication of the acquisition of a higher adapted hospital strain in the development of catheter-related infections.

## Case Report

Our patient was a 45 year-old male, hospitalized on October 21, 2001 due to chronic pancreatitis and pancreatic pseudocyst (Graphic 1). On the 4<sup>th</sup> day of hospitalization (D4), parenteral nutrition was introduced in peripheral vein during four days. On D8, an intracath was inserted in the right subclavian vein. On D16, the patient presented fever and nocturnal sweating and the CVC was removed. The catheter tip was cultured and simultaneously, two blood cultures were collected. The microbiological study of the catheter tip and blood cultures resulted positives for *S. epidermidis* susceptible to multiple antibiotics (Table 1). At this time, a rigorous search was conducted in the microbiota of the patient's palms, axillas, site of CVC insertion and nasal mucous for the presence of *S. epidermidis*. The *S. epidermidis* strains isolated from skin/mucous microbiota and from the catheter tip were genotyped using pulsed field gel electrophoresis (PFGE) [10] and tested for biofilm production by Congo Red agar technique [11]. The biochemical identification of all strains and their antibiotic susceptibility testing were performed by automated Vitek ® 2 system (bioMérieux Vitek, Inc, Hazelwood, Mo, USA). The genotyping of the microbiota strains showed *S. epidermidis* with polyclonal profiles that were susceptible to multiple antibiotics (figure 1; lanes 2 to 5). The DNA genomic profile of the *S. epidermidis* isolated from blood culture was genotypically different from the microbiota strains (Figure 1: lane 1). On D19, the patient had fever and ciprofloxacin was initiated. On D25, parenteral nutrition was initiated via an intracath inserted in the left jugular. On D33, the patient presented fever and inflammatory signs in the site of catheter implantation. The intracath was removed on D37 and replaced in the right jugular and parenteral nutrition continued. The catheter tip was cultured and blood cultures were performed. The microbiological results revealed positive blood cultures for *Enterobacter cloacae*, and the *S. epidermidis* was isolated in the CVC tip. Ceftazidime plus ciprofloxacin were introduced. At this time, a new *S. epidermidis* microbiota investigation was carried out. The genotyping showed *S. epidermidis* strains with oligoclonal profile and these strains were biofilm-producers and resistant to multiple antibiotics, including oxacillin (Figure 1; Lanes 7 to 9). The strain isolated from the catheter tip was genotypically and phenotypically identical to the microbiota strains (Figure 1; lane 6). The patient had persistent fever until D54 when another blood culture was collected, CVC was removed

and catheter tip was cultured. Vancomycin was added to therapy and a new intracath inserted in the left jugular vein. Blood cultures were positive for *E. cloacae* and catheter tip was positive for a biofilm-producer and resistant strain of *S. epidermidis*. Another diligent search was performed of the patient's microbiota. The microbiota (Figure 1; lanes 11 and 12) and catheter tip (Figure 1; lane 10) *S. epidermidis* strains had identical genomic DNA profile that was the same found in the previous episode. On D66 the CVC was removed for technical reasons and the tip was cultured and resulted positive for *S. epidermidis* genotypically identical to the ones of previous episodes (D37 and D54; Figure 1; lane 13). On D71, the patient received ceftazidime and underwent to surgical enucleation of the pancreas head and jejunal pancreatic derivation. After the surgery, the patient received levofloxacin. On D77, the patient had septic shock and the peritoneal liquid and surgical incision cultures were positive for *E. cloacae*. Vancomycin and imipenem were introduced. On D79, re-suturing of the enteric-enteric anastomosis and the laparoscopic trans-anastomotic jejunostomy was performed. The vancomycin and imipenem antibiotic therapy continued for 20 days. New episodes of CVC infection were not observed up to D145, when the patient was discharged.

## Discussion

Studies conducted on the dynamics of epidermal colonization by *S. epidermidis* prior to CVC-related-infection suggested that changes of the polyclonal, multiple susceptible antibiotics microbiota to an oligoclonal profile precede bloodstream infections caused by *S. epidermidis* in hospitalized patients [12]. In our patient, the replacement of the normal skin/mucous microbiota to a hospital acquired resistant strain of *S. epidermidis* was well documented using molecular typing.

The use of broad spectrum antibiotics is the most important factor to promote selective pressure on the normal microbiota. In our report, the patient was under prolonged and multiple antibiotic therapy during the hospitalization period. Some antibiotics are excreted by the sudoriferous glands, such as ciprofloxacin, and may alter the skin microbiota, including *S. epidermidis* strains [13].

*S. epidermidis* strains isolated from the 16<sup>th</sup> day of hospitalization were susceptible to the tested antibiotic (Table1), did not produce biofilm and had polymorphic genotype profiles. At that time, the patient had not received any antibiotic. However, the strains collected on day 37 of hospitalization were genotypically identical, being biofilm producers and exhibiting a multiresistant profile to antibiotic, except to vancomycin.

Although, the patient skin microbiota is frequently regarded as the main source of infection, the investigation of outbreaks associated with *S. epidermidis* has detected the presence of endemic strains within medical centers [14]. The selective pressure of antibiotics, on the *S. epidermidis* from normal microbiota, might have caused, in our patient, the colonization of skin/mucous with a predominant hospital-acquired *S. epidermidis* strain demonstrating more resistant antibiotic profile. This biofilm-producer strain was well adapted in our hospital conditions, and was found colonizing and causing bloodstream infections in other patients in our hospital (data not shown).

Biofilm-producers bacteria are highly resistant to antibiotics due to the biofilm environmental that promotes a mechanical barrier against antibiotics. The expression of



resistance mechanisms in biofilm-producers bacteria can be in the “special life style” present inside the biofilm, highly resistant to host defenses and to antibiotics [15].

The presence of prosthetic devices, such a CVC in our patient, represented an important risk factor for the development of the CVC bloodstream infections [16]. The multiple insertions of CVCs in our patient broke the integrity of the skin, therefore promoting the invasion of our endemic multiresistant biofilm-producer *S. epidermidis* that colonized the skin/mucous. Our patient also presented a systemic infection caused by *E. cloacae*. Recently, some reports in literature referred the association between *S. epidermidis* bloodstream infection and others microorganisms [17, 18]. The production of biofilm increases the resistance to antibiotics [19] and promotes a symbiotic relation among different microorganisms [18].

The present case report clearly demonstrated the hospital acquisition of an endemic resistant strain of *S. epidermidis* and the following steps of skin colonization directly related to the repetitive CVC infections by the same strain.

## **Acknowledgement**

This work was sponsored by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). We are grateful to the staff of the Clinical Microbiology Laboratory, Clinical Pathology Department, UNICAMP, Faculty of Medical Sciences, UNICAMP, for the collaboration.

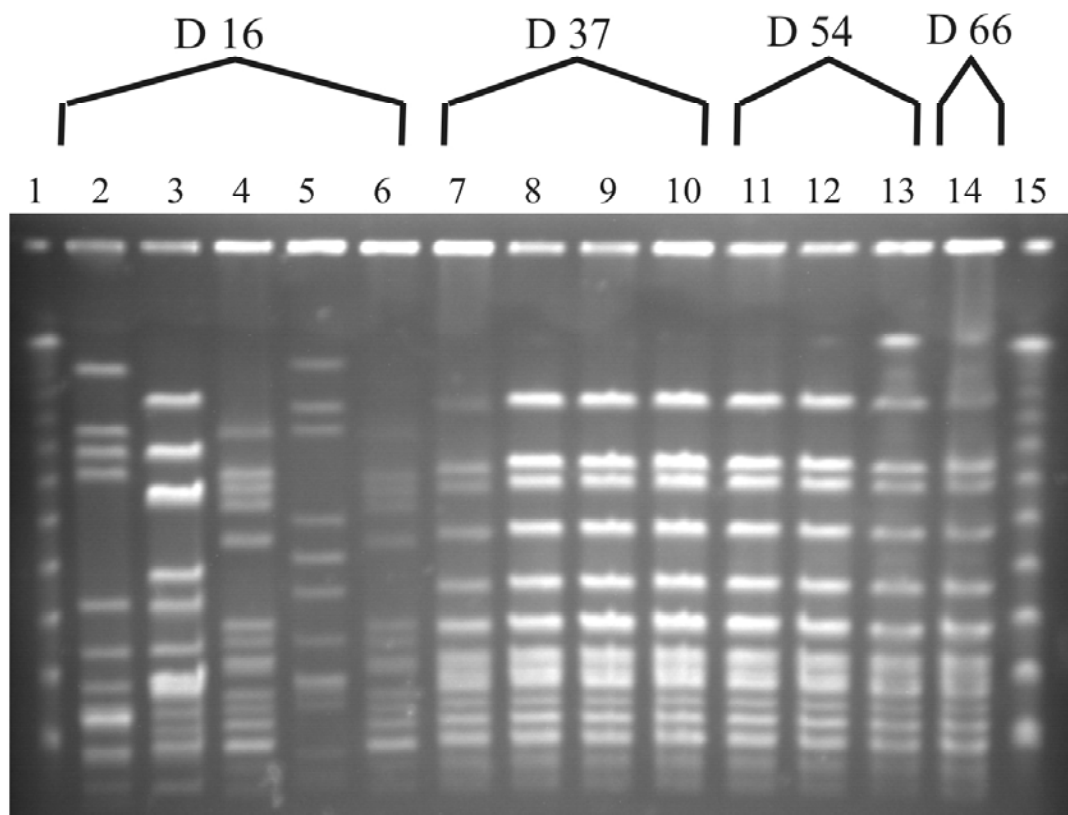
## References

1. Young C e Otto M: *Staphylococcus epidermidis* Infections. *Microbes Infect* 2002; 4: 481-489.
2. Raad I, Alrahwani A, Rolston K: *Staphylococcus epidermidis* emerging resistance and need for alternative agents. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 1182-7.
3. Goldmann DA & Pier GB: Pathogenesis of infections related to intravascular catheterization. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6: 176-192.
4. Vaudaux P, Pittet D, Haeberli A, Huggler E, Nydegger EU, Lew DP, Waldvogel FA: Host factors selectively increase staphylococcal adherence on inserted catheters: a role for fibronectin and fibrinogen or fibrin. *J Infect Dis* 1989; 160: 865-875.
5. Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, Vanittanakom N, Mack D, Götz F: Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol* 1996; 20: 1083-1091.
6. Gerke C, Kraft A, Süßmuth R, Schweitzer O, Götz, F: Characterization of the *N-Acetylglucosaminyltransferase* activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesion. *J Biol Chem* 1998, 273: 18586-18593.
7. Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols, WW, Götz, F: The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun* 1999; 67: 5427-5433.
8. Cramton SE, Ulrich M, Götz F, Döring G: Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesion in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 2001; 69: 4079-4085.

9. Donlan, RM: Biofilm and Device-Associated Infections. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 277-281.
10. Goering RV & Duensing TD: Rapid field inversion gel electrophoresis in combination with an rRNA gene probe in the epidemiological evaluation of staphylococci. *J Clin Microbiol* 1990, 28: 426-429.
11. Freeman DJ, Falkner FR, Keane CT: New method for detection slime production by coagulase negative staphylococci, *J Clin Pathol* 1989, 42: 872-874.
12. Rath P-M, Knippschild M, Ansorg R: Diversity and persistence of *Staphylococcus epidermidis* strains that colonize the skin healthy individuals. *Eur J Clin Microbiol Infec Dis* 2001, 20: 517-519.
13. Hoiby N, Jarlov JO, Kemp M, Tvede, M, Bangsborg JM, Kjerulf A, Pers C, Hansen H: Excretion of ciprofloxacin in sweat and multiresistant *Staphylococcus epidermidis*. *Lancet* 1997, 349: 167-169.
14. Nunes APF, Teixeira LM, Bastos CCR, Silva MG, Ferreira RBR, FONSECA LS, Silva KRN: Genomic characterization of oxacillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* isolated from Brazilian medical centres. *J Hosp Infect* 2005, 59: 19-26.
15. Stewart PS: Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol* 2002, 292: 107-113.
16. Wenzel RP & Edmond MB: The impact of hospital-acquired bloodstream infections. *Emerg Infect Dis* 2001, 7: 174-177.
17. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP: Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999, 284: 1318-1322.

18. Adam B, Baillie, GS, Douglas J: Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. J Med Microbiol 2002, 51: 344-349.
19. Schwank S, Rajacic, Z, Zimmerli W, Blaser J: Impact of bacterial biofilm formation on *in vitro* and *in vitro* activities of antibiotics. Antimicrob Agents Chem 1998, 42: 895-8.

**Figure 1** -Genomic DNA profiles of *S. epidermidis* strains obtained using *Sma*I restriction endonuclease enzyme followed by PFGE.



Lanes 1 and 15: lambda ladder marker; D16: Lane 2-isolate from blood culture; Lanes 3 to 6- microbiota. D37: Lane 7-isolate from catheter tip; Lanes 8 to 10-microbiota; D54: Lane 11-catheter tip; lanes 12 and 13- microbiota; D66: lane 14-isolate from catheter tip.

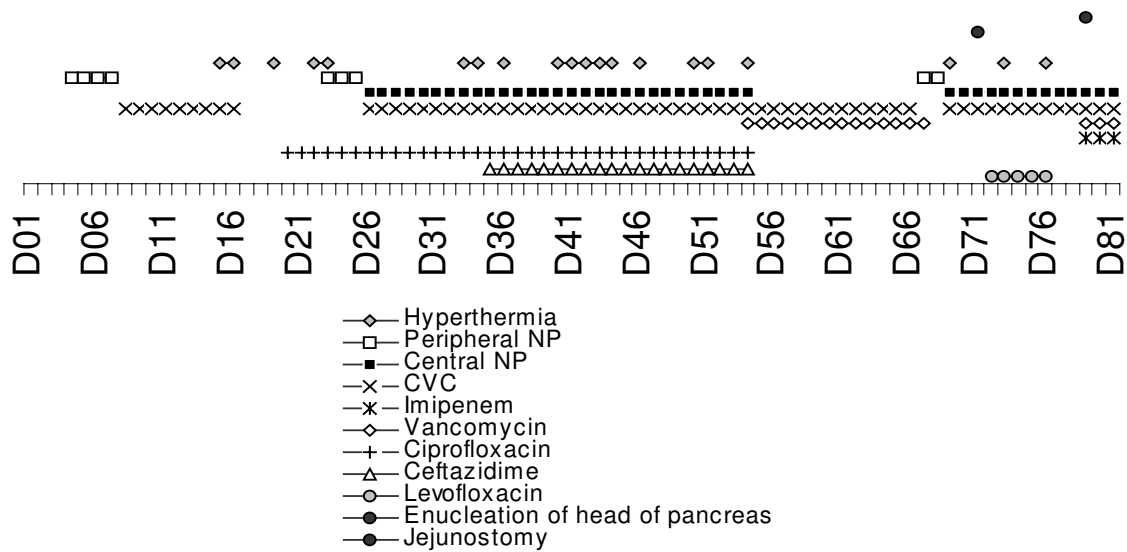
**Table 1-** Susceptibility profiles of clinical strains presented in this report *Staphylococcus epidermidis*

Period of hospitalization refers to clinical material's collection	Clinical material	Susceptibility profile
D16	Blood culture	Ampicillin-sulbactam; cefazolin; ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin, gentamicin, nitrofurantoin, ofloxacin, oxacillin, rifampin, tetracycline, trimethopim/sulfamethoxazole, vancomycin
D37	CVC	clindamycin, erythromycin, gentamicin, nitrofurantoin, rifampin, tetracycline, vancomycin.
D54	CVC	clindamycin, erythromycin, nitrofurantoin, rifampin, tetracycline, vancomycin.
D66	CVC	clindamycin, erythromycin, nitrofurantoin, rifampin, tetracycline, vancomycin.

B. b) *Enterobacter cloacae*

D37	Blood culture	aztreonam, cefepime, cefotaxime, ceftazidime, imipenem, piperacillin-tazobactam, ticarcillin,
D54	Blood culture	aztreonam, cefepime, cefotaxime, ceftazidime, imipenem, piperacillin-tazobactam, ticarcillin,
D78	Peritoneal liquid and surgical incision	aztreonam, cefepime, cefotaxime, ceftazidime, imipenem, piperacillin-tazobactam, ticarcillin,

**Graphic 1-** Invasive procedures and antibiotic therapy, during the time of hospitalization



NP – parenteral nutrition; CVC – central venous catheter