



## Presença de *Staphylococcus epidermidis* em recém-nascidos com infecção grave em UTI neonatal.

Presence of *Staphylococcus epidermidis* on newborns with aggravated infection on NICU.

Kelly Lopes de Araújo Appel<sup>1</sup>, Reynaldo Bueno Junqueira Reis<sup>2</sup>, Almir de Sousa Martins<sup>3</sup>, Anna Maria Duarte Miglioli<sup>4</sup>, Carmen Silvia Martimbianco de Figueiredo<sup>4</sup>, Paula Cristhina Niz Xavier<sup>2,4</sup>, Durval Batista Palhares<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região do Centro-Oeste, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Diagnóstico Molecular em Pediatria, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

<sup>4</sup>Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

<http://www.seer.ufms.br/index.php/pecibes/index>

\*Autor correspondente: Kelly Lopes de Araújo Appel, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. E-mail [kelly.appel@ufms.br](mailto:kelly.appel@ufms.br)

### Resumo

Estudos indicam o *Staphylococcus epidermidis* como um dos agentes infecciosos mais importantes na infecção hospitalar (IN), cuja incidência ainda é pouco conhecida. O presente estudo teve por objetivo identificar esta bactéria em sangue de recém nascidos (RNs) por meio da reação em cadeia da polimerase convencional (PCR) e em tempo real (qPCR) verificando sua frequência. Foram coletadas 45 amostras de sangue periférico para hemocultura, extração do DNA genômico e PCR. A hemocultura foi capaz de detectar *Staphylococcus epidermidis* em 13,3% das amostras investigadas, enquanto o PCR convencional detectou 17,8% e qPCR 100% de amplicons alvos de *Staphylococcus epidermidis* em DNA das amostras positivas pelo método da PCR convencional. Os resultados da qPCR mostraram maior sensibilidade para a detecção de *Staphylococcus epidermidis* no sangue e deverá ser uma ferramenta fundamental para futuras triagens em estudos epidemiológicos mais amplos na suspeita de sepse neonatal. Os fatores de risco, juntamente com observações clínicas e diagnóstico precoce advindo da PCR poderão contribuir de forma decisiva para o diagnóstico eficiente e terapia medicamentosa específica.

### Palavras-chave:

*Staphylococcus epidermidis*; diagnóstico; sepse neonatal; qPCR

**Key-words:** *Staphylococcus epidermidis*; Diagnosis; Neonatal Sepsis; qPCR.

### Abstract

Studies indicate *Staphylococcus epidermidis* as one of the most important infectious agents in nosocomial infection (IN). Since the incidence of *S. epidermidis* is still little known, this study aimed to identify this bacteria, in the blood of newborns, by conventional polymerase chain reaction (PCR) and real-time (qPCR). 45 blood samples were collected for hemoculture, genomic DNA extraction and PCR. The hemoculture detected *S. epidermidis* in 13.3% of the samples, whereas conventional PCR found 17.8%. The qPCR found 100% of amplicons of target *S. epidermidis* in samples that were considered positive by the conventional PCR method. The results of qPCR showed greater sensitivity for the detection of *S. epidermidis* than hemoculture and should be a fundamental tool for future trials in larger epidemiological studies for suspected neonatal sepsis. The risk factors along with clinical observations and arising early diagnosis of CRP may contribute decisively to the efficient diagnosis and specific drug therapy.

## 1. Introdução

A sepse neonatal é considerada importante causa de morbidade e mortalidade em recém-nascidos (RN), principalmente em prematuros de muito baixo peso, representando importante desafio dentro das Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) neonatais (Cunha et al., 2002; Silveira et al., 2010).

Dentre as manifestações clínicas apresentadas, muitas são inespecíficas, algumas quase imperceptíveis, outras, situações clínicas bem graves com hipotermia ou hipertermia, cianose, apnéia, gemido, desconforto respiratório, icterícia, hepatoesplenomegalia, distensão abdominal dentre outros (Zaidi et al., 2009; Silveira e Procianny, 2012).

A colonização do RN pode ocorrer devido a vários fatores tais como colonização materna por *Streptococcus* do grupo B; infecção urinária materna, ou ainda, pode ocorrer antes mesmo do nascimento, via transplacentária (hematogênica), ou por colonização do canal de parto devido à ruptura de membranas por períodos prolongados ( $\geq 18$  horas). Em todas essas circunstâncias, há grande risco do RN adquirir sepse neonatal. Também a imaturidade imunológica pode contribuir para o desenvolvimento das infecções neonatais (INs), principalmente no pré-termo. Além desses fatores, o uso de procedimentos invasivos associados ao tempo de hospitalização, à falta de cuidados de assepsia e antisepsia, podem predispor a criança à infecção neonatal (Tondella et al., 2002; Pereira e Cunha, 2013).

Entre as diversas bactérias que podem ocasionar infecção neonatal, destacam-se os estafilococos plasma coagulase negativos (SPCN) que tem o *Staphylococcus epidermidis* como seu principal representante. Essa bactéria é classificada como potencialmente não patogênica, comensal por natureza e está presente na pele e mucosas da maioria dos seres humanos. No entanto, ela é um dos principais agentes responsáveis pela etiologia das sepse neonatais, principalmente no pré-termo, em UTIs (Yadav et al., 2005; de Oliveira et al., 2011).

A detecção do DNA de *Staphylococcus epidermidis* pode ser feita por meio de diversos métodos de biologia molecular. No entanto, a reação em cadeia de polimerase (PCR) mostra-se um método sensível, específico e eficiente para agilizar o diagnóstico com possibilidade de manuseio de

pequenas quantidades de espécimes a serem processadas (Ikeda et al., 2004).

Em Mato Grosso do Sul, estudos sobre a existência e epidemiologia desse tipo de infecção em neonatos são escassos, despertando então o interesse da classe científica e médica. Assim, a presente pesquisa se propôs a identificar a prevalência de infecção por *Staphylococcus epidermidis* em sangue de recém-nascidos internados em UTI neonatal e com infecção grave.

## 2. Casuística e Métodos

Foram incluídos neste estudo RNs a termo e pré-termo, internados na UTI neonatal de um hospital público de ensino nos períodos de dezembro de 2011 a agosto de 2012.

### 2.1. Amostra

As amostras de sangue foram colhidas em caso de piora clínica e depois da troca da primeira associação de antibióticos instituída. Os resultados das hemoculturas, processadas dentro da rotina hospitalar, foram obtidos a partir dos prontuários dos pacientes.

### 2.2.1. Delineamento

A extração de DNA genômico de leucócito do sangue total foi realizada no Laboratório de Diagnóstico Molecular em Pesquisas Pediátricas da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), seguindo o protocolo de Grimberg et al. (1989). Os primers utilizados na pesquisa, bem como os fragmentos específicos, estão dispostos na Tabela 1. Por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional, obteve-se um fragmento alvo específico da região do gene *SdrH* (*serine-aspartate repeat protein family*). A identificação do *Staphylococcus epidermidis* seguiu o protocolo de McCreary et al. (2000) e como controle positivo para *Staphylococcus epidermidis*, utilizou-se a ATCC 12228. A comparação entre os grupos de recém-nascidos avaliados em relação ao sangue (PCR e qPCR) foi realizada utilizando a tabela de contingência do qui-quadrado não paramétrico com 2x2 células com valor superior a cinco. Para a análise estatística utilizou-se o SigmaStat versão 2.0 ( $p < 0,05$ ).

Tabela 1. Oligonucleotídeos usados para a detecção do *Staphylococcus epidermidis*.

Oligonucleotídeo	Sequência nucleotídica 5' – 3'	Produto amplificado (pb)
SEPIKFOR	5'- TGT GCG ACT AGT GTC ATT CAC TCG -3'	119
SEPIKREV	5'- GTC ACC AAG CAC ATG CTG AAG GTA -3'	
SEPIOFOR	5'- CAC TGA GTC CAA GGA AAC TAC AG -3'	96
SEPIOREV	5'- GTG AGT TGT TGA GCC ATC CCA AC -3'	
HFORBACT	5'-TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A-3'	295
HREVBACT	5'-CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G-3'	

## 3. Resultados

Os resultados das amostras referentes aos 45 pacientes analisados mostram hemocultura positiva para *Staphylococcus epidermidis* em 13,3% ( $n = 6$ ) e positividade em ambas as PCR em 17,8% ( $n = 8$ ). Em 4,4% ( $n = 2$ ) dos pacientes houve positividade para *Staphylococcus*

*epidermidis* nas duas modalidades da PCR. Porém, as mesmas são identificadas como microrganismos diferentes na hemocultura. Dos pacientes que tiveram seus quadros evoluídos de morbidez para óbito, 4,4% ( $n = 2$ ), um deles foi detectado pela hemocultura, enquanto que ambos foram detectados pelas duas técnicas de PCR (Tabela 2).

Tabela 2 – Relação entre resultados positivos obtidos a partir das hemoculturas, PCR convencional e PCR Quantitativo (em Tempo Real), de *Staphylococcus epidermidis* na corrente sanguínea e o número de óbitos.

Nº AMO	HEMOC	(%)	PCRc	(%)	qPCR	(%)	ÓBITO	(n)	(%)
4	<i>S. epidermidis</i>	2,21	---	---	---	---	---	1	---
7	<i>S. epidermidis</i>	2,21	<i>S. epidermidis</i>	2,22	<i>S. epidermidis</i>	2,22	---	1	---
9	<i>S. epidermidis</i>	2,21	<i>S. epidermidis</i>	2,22	<i>S. epidermidis</i>	2,22	Sim	1	2,2
16	---	---	<i>S. epidermidis</i>	2,22	<i>S. epidermidis</i>	2,22	---	1	---
18	---	---	<i>S. epidermidis</i>	2,22	<i>S. epidermidis</i>	2,22	---	1	---
27	<i>S. epidermidis</i>	2,21	---	---	---	---	---	1	---
29	<i>S. epidermidis</i>	2,21	---	---	---	---	---	1	---
30	<i>S. hominis</i>	---	<i>S. epidermidis</i>	2,22	<i>S. epidermidis</i>	2,22	---	1	---
34	<i>S. haemolyticus</i>	---	<i>S. epidermidis</i>	2,22	<i>S. epidermidis</i>	2,22	---	1	---
42	<i>S. epidermidis</i>	2,21	---	---	---	---	---	1	---
43	---	---	<i>S. epidermidis</i>	2,22	<i>S. epidermidis</i>	2,22	Sim	1	2,2
45	---	---	<i>S. epidermidis</i>	2,22	<i>S. epidermidis</i>	2,22	---	1	---
<b>TOTAL</b>	<b>6</b>	<b>13,3</b>	<b>8</b>	<b>17,8</b>	<b>8</b>	<b>17,8</b>	<b>2</b>	<b>12</b>	<b>4,4</b>

#### 4. Discussão

É importante ressaltar o papel dos SPCN, como patógenos causadores ou propiciando o agravamento de infecção já instalada em pacientes internados nas UTIs neonatais. Para tanto, obter o controle sobre alguns de seus fatores de risco ou sua detecção precoce por meio de métodos de biologia molecular, determina importantes caminhos para sua prevenção e tratamento específico (Cunha et al., 2002).

Por estas razões, a PCR foi requisitada em suas duas modalidades, sendo a qPCR mais vantajosa por utilizar um volume menor de amostra, se comparada à quantidade utilizada na hemocultura, além de ser mais sensível e com menores chances de falso negativos. Destaca-se ainda que essa técnica além de mais robusta/eficaz e sensível oferece resultados mais rápidos. Chama ainda atenção que essa técnica permite ainda uma detecção mais sensível e mais rápida se comparada também à PCR convencional (Yadav et al., 2005).

Os resultados positivos para *Staphylococcus epidermidis* observados na hemocultura e negativos nos outros dois métodos, são sugestivos de contaminação das amostras no momento da coleta de sangue (Silveira et al., 2010), por outro lado, quatro dos resultados, todos negativos para qualquer tipo de microrganismo nas hemoculturas e todos positivos para *Staphylococcus epidermidis* nas PCRs, deixaram claro e evidente a presença do referido microrganismo na corrente sanguínea dos pacientes avaliados. Assim, os resultados falso negativo podem ser

devido à utilização de volume insuficiente para a realização das hemoculturas bem como interferência do uso de antibióticos intraparto e mesmo dados aos recém-nascidos antes da amostragem.

Em relação às duas amostras positivas para *Staphylococcus hominis* e *Staphylococcus haemolyticus* nas hemoculturas, essas não foram confirmadas pelas avaliações por PCRs, ou seja, as formas de detecções mais sensíveis foram positivas, realmente, para *Staphylococcus epidermidis*. Assim, questiona-se uma possível contaminação das amostras, ou no momento da coleta (Tondella et al., 2002), ou durante alguma das etapas de execução das técnicas.

Quanto aos pacientes colonizados por *Staphylococcus epidermidis* (4,4%), que evoluíram para óbito, sugere-se a possibilidade de volume insatisfatório de sangue destinado a realização da hemocultura da segunda amostra ou possibilidade de contaminação da primeira amostra, o que levaria a um resultado falso positivo da mesma nas PCRs.

O estudo demonstra importantes vantagens das técnicas de biologia molecular em relação ao padrão ouro (hemocultura); mediante resultados mais seguros, rápidos e específicos. No entanto, o método precisa de adequada padronização principalmente para evitar a contaminação cruzada de amostras.

A aparente diferença entre os resultados das PCRs em relação às hemoculturas não deve ser aqui, vista como conclusiva já que em ambas as técnicas, os graus de especificidade são elevados. Ambas elevam o diagnóstico

laboratorial da sepse a um importante patamar, conferindo mais segurança aos médicos, fornecendo informações precisas e essenciais, para que esses possam ter a opção mais adequada ao direcionar o tratamento específico da antibiótico terapia, visando agilidade, segurança e especificidade de resultados.

É de fundamental importância que a equipe de saúde se preocupe com as normas de prevenção de colonização e volume mínimo necessário para as hemoculturas.

## Agradecimentos

FUNDECT, PROPP-UFMS, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e ao Laboratório de Fisiologia Molecular e Genômica funcional (NUFIGEN-ICB-UFMG) da Universidade Federal de Minas Gerais.

Editor Associado: Rodrigo Juliano Oliveira

**Declaração:** Os autores declaram estar cientes e terem atendido integralmente às normas preconizadas para as pesquisas em seres humanos, conforme resolução 466/2012. Os autores declaram ainda ausência de conflito de interesse.

## 5. Referências

- Cunha MLRS, Lopes CAM, Rugolo LMSS, Chalita LVAS. Significância clínica de estafilococos coagulase-negativa isolados de recém-nascidos. *Jornal de Pediatria*, 78, 279-288, 2002.
- Grimberg J, Nawoschik S, Belluscio L, Mckee R, Turck A, Eisenberg A. A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. *Nucleic Acids Research*, 25, 8390, 1989.
- Ikeda Y, Ohara-Nemoto Y, Kimura S, Ishibashi K, Kikuchi K. PCR-based identification of *Staphylococcus epidermidis* targeting *gseA* encoding the glutamic-acid-specific protease. *Canadian journal of microbiology*, 50, 493-498, 2004.
- McCrea KW, Hartford O, Davis S, Eihdin DN, Lina G, Speziale P, Foster TJ, Hook M. The serine-aspartate repeat (Sdr) protein family in *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology*, 146, 1535-1546, 2000.
- de Oliveira A, Sanches P, Lyra JC, Bentlin MR, Rugolo LM, de Lourdes RSCM. Risk factors for infection with coagulase-negative staphylococci in newborns from the neonatal unit of a brazilian university hospital. *Clinical medicine insights Pediatrics*, 15, 1-9, 2011.
- Pereira VC, Cunha MLRS. Coagulase-negative staphylococci strains resistant to oxacillin isolated from neonatal blood cultures. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108, 939-942, 2013.
- Silveira RC, Giacomini C, Procionoy RS. Neonatal sepsis and septic shock: concepts update and review. *Revista Brasileira de terapia intensiva*, 22, 280-290, 2010.
- Silveira RC, Procionoy RS. Uma revisão atual sobre sepse neonatal. *Boletim Científico de Pediatria*, 1, 29-35, 2012.
- Tondella MLC, Talkington DF, Holloway BP, Dowell SF, Cowley K, Soriano-Gabarro M, Elkind MS, Fields BS. Development and Evaluation of Real-Time PCR-Based Fluorescence Assays for Detection

of *Chlamydia pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 575-583, 2002.

Yadav AK, Wilson CG, Prasad PL, Menon PK. Polymerase chain reaction in rapid diagnosis of neonatal sepsis. *Indian Pediatrics*, 42, 681-685, 2005.

Zaidi AK, Thaver D, Ali SA, Khan TA. Pathogens associated with sepsis in newborns and young infants in developing countries. *Pediatric infectious disease journal*, 28, S10-18, 2009.