

Formação de biofilme em amostras de *Staphylococcus epidermidis* isoladas de sepse relacionada a cateter vascular central em neonatos críticos

Biofilm production in Staphylococcus epidermidis samples isolated from sepsis associated with central vascular catheter (CVC) in critical neonates

Denise von D. Brito¹; Elias J.O. Von Dolinger²; Fabiana L. Machado³; Vânia O.S. Abdallah⁴; Paulo P. Gontijo Filho⁴

¹Bióloga*; ²Enfermeiro*; ³Bióloga - Universidade Luterana do Brasil; ⁴Médico*

*Universidade Federal de Uberlândia

Resumo Esta pesquisa teve como objetivo verificar a presença de biofilme em amostras de *S. epidermidis* isoladas de sangue em casos de sepse relacionados ao uso de CVC em neonatos críticos. O estudo foi realizado na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, no período de Jan/02 a Dez/06. Adicionalmente, foi realizado inquéritos de prevalência pontual de colonização por este microrganismo, através da coleta de espécimes da narina e axila com auxílio de swabs, entre Janeiro de 2004 e Junho de 2005. A avaliação de formação de biofilme foi realizada por densidade ótica em placas de poliestireno, após coloração com safranina, utilizando espectrofotômetro (570nm). O teste de suscetibilidade à oxacilina foi realizado pelo método de diluição de acordo com o “Clinical and Laboratory Standards Institute”. Foram analisadas 109 amostras de *S. epidermidis* de episódios de sepse, sendo 83 (76,1%) relacionadas ao uso de CVC. Em relação à presença de biofilme, 67/83 (80,7%) das amostras isoladas de neonatos com sepse relacionadas a CVC, apresentaram produção intensa, enquanto que entre as 26 não relacionadas ao uso de CVC apenas seis (23,1%) demonstraram produção de biofilme, assim como, 10 (12,3%) entre as associadas à colonização. Cerca de 73% das amostras foram resistentes à oxacilina (concentração inibitória mínima ³ 0,5mg/ml), incluindo 56 (83,6%) correspondentes a casos de infecção relacionados à CVC, seis (100%) amostras não relacionadas ao uso de CVC e em quatro (40%) de amostras de colonização. Conclui-se que a maioria das amostras de *S. epidermidis* isoladas de sepse relacionadas à CVC foram biofilme positivas e resistente à oxacilina.

Palavras-chave Recém-Nascido; Unidades de Terapia Intensiva Neonatal; Sepse; Staphylococcus Epidermidis; Biofilmes; Cateterismo Venoso Central.

Abstract This research aimed to observe the biofilm production by *Staphylococcus epidermidis* isolated associated with central vascular catheter (CVC) related bacteremia in critical neonates. The study it was carried out in Neonatal Intensive Care Unit of the Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, in the period of Jan/02 to Dez/06. Additionally, it was carried out inquiries of prevalence, through the specimen collection of the nostril and armpit with aid of swabs, between Jan/04 and Jun/05. The evaluation of biofilm production was by optical density in polystyrene plates, stained with safranin and measured with ELISA reader at 570nm. The oxacilin susceptibility test was carried out through to the dilution method in accordance with the “Clinical and Laboratory Standards Institute”. It was analyzed 109 *S. epidermidis* samples, being 83 (76.1%) related to the use of CVC. In relation to the biofilm presence, 80.7% of the neonates isolated samples with sepsis related the CVC, had presented intense production, whereas of the 26 unrelated ones to the use of CVC, only six (23.1%) had demonstrated biofilm production as well as 10 (12.3%) of the samples associated to the colonization. About 73% of the samples were oxacilin resistant (minimum inhibitory concentration ³ 0.5mg/ml) . In conclusion, the *S. epidermidis* samples isolated of CVC related sepsis were biofilm positive and pertaining to oxacilin resistant phenotype.

Keywords Infant; Neonatal Intensive Care Units; Sepsis; Staphylococcus Epidermidis; Biofilms; Central Venous Catheterization.

Introdução

Algumas espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa (SCoN) destacam-se como principais agentes de sepse hospitalar neonatal¹, sendo *Staphylococcus epidermidis* a espécie mais prevalente nesta infecção². Infecção neonatal por SCoN é raramente fatal, mas causa morbidade significativa, especialmente entre neonatos de muito baixo peso (< 1500 g)³. Há uma necessidade constante de acesso venoso de longa duração no tratamento de neonatos críticos. Como o cateter venoso periférico é indicado somente por um curto período de tempo, o cateter venoso central (CVC) é usado preferencialmente em Unidades de Terapia Intensiva Neonatais (UTINs)⁴. A prevalência de uso de CVC em UTINs varia de 2 a 62,4%⁵. Suas vantagens estão associadas com a possibilidade de fornecer suporte nutricional através de via parenteral, administração de fluidos, realizar monitoramento hemodinâmico, facilidade de permanência no lugar desejado além de evitar o “stress” e desconforto causados por punções repetidas⁶.

Os agentes de bacteremias/candidemias primárias usualmente formam biofilmes na superfície do CVC⁷. Para a formação do biofilme, os microrganismos aderem à superfície do polímero ou à receptores em proteínas séricas, como fibronectina e fibrinogênio. A seguir, formam microcolônias que após uma fase de maturação podem eliminar inóculos metastáticos e dão origem a um fenótipo característico onde destaca-se a maior resistência aos antimicrobianos. A aderência inicial é resultante principalmente da hidrofobicidade da superfície celular que está associada à algumas proteínas. Duas proteínas de superfície estafilocócica já descritas, SSP-1 e SSP-2 (proteína associada ao “slime”), possuem afinidade pelo polímero e contribuem para a aderência do *S. epidermidis* ao poliestireno. A fase seguinte da formação do biofilme envolve a produção de adesão polissacarídica promovida pela adesina intercelular polissacarídica (PIA) codificada pelo gene *ica*⁸.

Staphylococcus epidermidis é o principal agente de infecção de corrente sanguínea neonatal associada a cateter^{9,10}, representando cerca de 70% dos casos. A capacidade de formar biofilme na superfície do cateter é considerada como seu principal fator de virulência¹¹, secundado pela resistência à oxacilina¹².

Objetivo

O objetivo da pesquisa foi verificar a capacidade da produção de biofilme entre amostras de *S. epidermidis* isoladas de sangue em casos de sepse relacionados ao uso de CVC em neonatos críticos.

Metodologia

Desenho do estudo:

O estudo foi realizado na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, no período de Jan/02 a Dez/06. A vigilância epidemiológica foi realizada pelo sistema “National Nosocomial Infection Surveillance”¹³ e, a definição de sepse por *Staphylococcus epidermidis* incluiu critérios clínicos, como febre >38°C ou hipotermia ou bradicardia ou letargia sendo

confirmada pelo laboratório com o isolamento de patógeno à partir da cultura de sangue, o qual não estava relacionado a outro sítio de infecção¹⁴. Para evitar a contaminação da cultura, uma enfermeira do setor, especializada, realizava as coletas após uma meticolosa limpeza da pele usando gaze estéril embebida em clorexedine alcoólica a 0,5% . Os neonatos foram monitorizados diariamente em busca de infecção de corrente sanguínea por SCoN. Foi preenchida uma ficha individual com dados pessoais, demográficos, fatores de risco e diagnóstico. Coleta das amostras:

As amostras recuperadas de sangue foram obtidas junto ao laboratório de microbiologia do hospital, onde as garrafas de hemocultura foram incubadas até cinco dias com leitura automática a cada dez minutos no sistema BACTEC 9240 (Becton Dickinson). Uma alíquota de sangue proveniente de hemocultura positiva foi subcultivada de acordo com os procedimentos laboratoriais padronizados. Adicionalmente, nos neonatos em uso de CVC, foi realizado inquérito de prevalência pontual de colonização por *S. epidermidis* à partir do sétimo dia de internação, através da coleta de espécimes da narina e axila com auxílio de swab, entre Janeiro de 2004 e Junho de 2005. Os neonatos somente foram incluídos na pesquisa mediante a autorização das respectivas mães através do termo de consentimento. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia.

Identificação bacteriana:

A espécie *Staphylococcus epidermidis* foi identificada por testes bioquímicos clássicos como: produção de hemólise, produção da enzima pirrolidonil arilamidase, susceptibilidade à novobiocina, produção da enzima urease, produção da enzima ornitina descarboxilase, fermentação dos carboidratos manitol, manose e trealose. A identificação foi confirmada pelo sistema API STAPH ID32 (Biomerieux).

Avaliação da produção de biofilme:

Logo após a identificação, todas as amostras foram avaliadas quanto à produção de biofilme através do método descrito por Christensen *et al.* (1985)¹⁵. As amostras foram inicialmente cultivadas em meio agar sangue à 37°C por 48h e em seguida transferidas para caldo tripticase de soja (TSB) e cultivadas à 37°C por 24h. Uma alíquota de 200µl de suspensão bacteriana (@ 10⁵ UFC/ml) em TSB foi dispensada em poço de uma placa de microtitulação de poliestireno de 96 poços (cada amostra foi inoculada em oito poços paralelos). As placas foram incubadas a 37°C por 24h e em seguida lavadas duas vezes com 200µl em tampão salina fosfato (PBS) e posteriormente corados com 100 µl de safranina a 0,1% por 1 minuto. Após a remoção da solução de coloração, 100µl de etanol a 97% foi adicionado a cada poço juntamente com 100µl de PBS, e em seguida retirado. A avaliação de formação de biofilme foi realizada através da leitura de cada poço utilizando espectrofotômetro (570nm) e o valor médio dos oito poços foi calculado, após três repetições do teste. Foi utilizado como controle positivo amostras de *S. epidermidis* ATCC 35984 e controle negativo *S. epidermidis* ATCC 35982. As amostras com leituras de OD₅₇₀ < 0,20, 0,20 £ - £ 1,0 e > 1,0 foram consideradas negativas, produtoras moderadas e intensas de biofilme, respectivamente.

Determinação da susceptibilidade a oxacilina

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de diluição em agar usando concentrações de 0,25mg/mL a 1024mg/mL de oxacilina de acordo com o "Clinical and Laboratory Standards Institute"¹⁶. Valores de CMI e " 0,5mg/mL e " 0,25mg/mL Foram consideradas resistentes e sensíveis a oxacilina, respectivamente.

Análise estatística

Foi verificado se houve diferença estatística entre as amostras com produção intensa de biofilme em dois momentos: primeiro, entre aquelas provenientes de infecção, comparando as relacionadas ao uso de CVC versus não relacionada ao uso de CVC; segundo, entre aquelas provenientes de infecção relacionadas ao uso de CVC versus com aquelas de colonização. Foi utilizado o teste do χ^2 para as comparações.

Resultados

Foram isoladas 109 amostras de *S. epidermidis* de episódios de sepse, sendo 83 (76,1%) relacionadas à CVC entre as quais 67(80,7%) apresentaram produção intensa de biofilme. Entre as 26 amostras não relacionadas à presença de CVC no neonato, apenas seis (23,1%) demonstraram esta característica. No que se refere às 81 amostras de *S. epidermidis* associadas à colonização, 10 (12,3%) foram produtoras intensas e 49,4% mantiveram-se produtoras moderadas de biofilme (Tabela 1).

Tabela 1. Formação de biofilme em amostras de *Staphylococcus epidermidis* isoladas de infecção e colonização em neonatos críticos

| Produção de biofilme | Infecção | | Colonização (n=81) | |
|---|---------------------------|------------------------------|--------------------|------|
| | Relacionado a CVC* (n=83) | Não relacionado a CVC (n=26) | N | % |
| Intensa (OD ₅₇₀ > 1,0) | 67 | 6 | 10 | 12,3 |
| Moderada (0,20 ? OD ₅₇₀ ? 1,0) | 10 | 2 | 40 | 49,4 |
| Negativa (OD ₅₇₀ < 0,20) | 6 | 18 | 31 | 38,3 |

*OD = Densidade Óptica

*CVC = Cateter Vascular Central

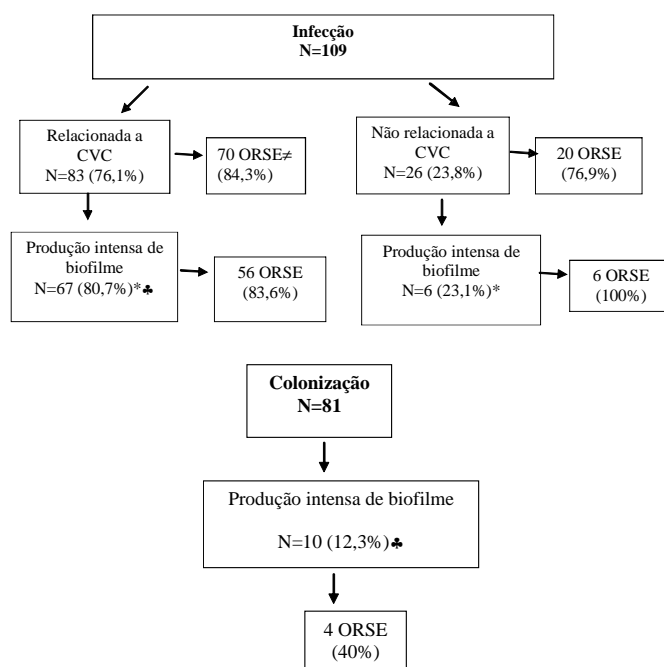
As amostras provenientes de infecção com produção intensa de biofilme relacionadas com a utilização de CVC foram estatisticamente significantes quando comparadas com as amostras recuperadas de pacientes sem este procedimento invasivo ($p < 0,0001$), assim como as provenientes de infecção com CVC comparadas com as de colonização ($p < 0,00001$).

No total, 90 (82,6%) das 109 amostras de infecção e 48 (59,3%) das 81 de colonização foram resistentes a oxacilina (CMI \geq 0,5mg/ml). A resistência a oxacilina foi observada em 56 (83,6%) amostras produtoras de biofilme provenientes de casos de infecção relacionadas à CVC, em todas as seis amostras não relacionadas a CVC e em quatro (40%) relacionadas à colonização de neonatos (Diagrama 1).

Discussão

Entre os principais agentes de infecção em neonatos prematuros incluem-se os SCoN, considerados comensais até vinte anos atrás¹⁷. No período imediatamente após o nascimento, ocorre a

Diagrama 1. Distribuição dos isolados de *Staphylococcus epidermidis* de acordo com os neonatos e a produção de biofilme



* Diferença estatisticamente significante $p < 0,0001$

♣ Diferença estatisticamente significante $p < 0,00001$

≠ ORSE = *S. epidermidis* resistente à oxacilina

colonização microbiana da mucosa da orofaringe seguida pela pele com estes microrganismos. Eles são responsáveis por cerca de 60% dos casos de sepse nas UTINs, com *S. epidermidis* respondendo por 70% destas infecções¹⁸.

A utilização de CVC é rotina nos dias atuais nos cuidados de pacientes mantidos em unidades críticas⁸. Um dos grandes desafios da medicina moderna é o aumento do uso de CVC em UTI neonatal. A aderência dos *S. epidermidis* à biomateriais ou superfícies inertes é um passo crítico no desenvolvimento de infecção em pacientes com implantes¹⁹.

A produção de biofilme está ligada à virulência de microrganismos. Isolados de *S. epidermidis* relacionados a cateter normalmente demonstram forte produção de biofilme²⁰. Em nosso estudo, a produção intensa de biofilme em *S. epidermidis* foi maior nos isolados relacionados à CVC do que naqueles de casos não relacionados à CVC ($p < 0,0001$). Adicionalmente, similar a outras investigações^{21,22}, a produção intensa de biofilme foi maior ($p < 0,00001$) nos isolados de infecção por *S. epidermidis* relacionados à cateter do que naqueles correspondentes a casos de colonização.

Nos nossos isolados, foi detectado uma alta frequência de resistência bacteriana (72,6%) à oxacilina, com uma alta frequência entre os isolados produtores de biofilme (47,8%), assim como relatado por Klingenberg et al (2005)²³. Esta taxa de resistência encontrada reflete a natureza tardia dos episódios de sepse e a natureza hospitalar destes microrganismos.

A aderência de estafilococos à biomateriais é um importante passo inicial no desenvolvimento de infecção em pacientes com

uso de CVC, dificultando o tratamento daqueles que necessitam desse procedimento. Inclusive, a formação do biofilme torna mais difícil à penetração do antibiótico, contribuindo para a persistência da infecção²⁴. Por isto, a escolha de métodos confiáveis para análise das propriedades da superfície celular é altamente relevante podendo fundamentar a recomendação da remoção do CVC.

Apesar de ser uma técnica laboriosa, a vantagem de se verificar a produção de biofilme pelo método quantitativo (microtitulação) é a possibilidade de se analisar a intensidade da produção em nível alto, moderado ou ausente²⁵.

Conclusão

Das amostras de *S. epidermidis* isoladas de sepse relacionadas à CVC, 80,7% foram biofilme positivas com 83,6% resistente à oxacilina. Neste caso, a produção de biofilme mostrou-se um forte indicador de amostras de *S. epidermidis* como agente da infecção (sepse).

Referências bibliográficas:

1. Krediet TG, Mascini EM, Rooij E, Vlooswijk J, Paauw A, Gerards LJ et al. Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococci causing sepsis in a neonatal intensive care unit over an 11 year period. *J Clin Microbiol* 2004;42(3):992-5.
2. Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, et al. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics* 2002;110(2 Pt 1):285-91.
3. Isaacs D. A ten year, multicentre study of coagulase negative staphylococcal infections in Australasian neonatal units. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 2003;88(2):F89-93.
4. Lee SK, McMillan DD, Ohlsson A, Pendrav M, Sunnes A, Whyte R, et al. Variations in practice and outcomes in the Canadian NICU network: 1996-1997. *Pediatrics* 2000;106(5):1070-9.
5. Chien LY, Macnab Y, Aziz K, Andrews W, McMillan DD, Lee SK. Variations in central venous catheter-related infection risks among Canadian neonatal intensive care units. *Pediatr Infect Dis J* 2002;21(6):505-11.
6. D'Elia C, Correia MS, Oliveira SD, Barbosa NM. Bronchovascular fistula: complication of percutaneous central venous catheter in a neonate. *J Pediatr (Rio J)* 2002;78(4):347-50.
7. Garland JS, Alex CP, Henrickson KJ, McAuliffe TL, Maki DG. A vancomycin-heparin lock solution for prevention of nosocomial bloodstream infection in critically ill neonates with peripherally inserted central venous catheters: a prospective, randomized trial. *Pediatrics* 2005;116(2):e198-205.
8. Peters G, Locci R, Pulverer G. Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. *J Infect Dis* 1982;146(4):479-82.
9. Kloos WE, Bannerman TL. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 1994;7:117-40.
10. Sohn AH, Garrett DO, Sinkowitz-Cochran RL, Grohskopf LA, Levine GL, Stover BH, et al. Prevalence of nosocomial

infections in neonatal intensive care unit patients: results from the first national point-prevalence survey. *J Pediatr* 2001;139(6):821-7.

11. Otto M. Virulence factors of the coagulase-negative staphylococci. *Front Biosci* 2004;9:841-63.
12. Nunes APF, Teixeira LM, Bastos CCR, Silva MG, Ferreira RBR, Fonseca LS, et al. Genomic characterization of oxacillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* isolated from Brazilian medical centres. *J Hosp Infect* 2005;59(1):19-26.
13. Emori TG, Culover DH, Horan TC, Jarvis WR, White JW, Olson DR, et al. National nosocomial infections surveillance system (NNIS); description of surveillance methods. *Am J Infect Control* 1991;19(1):19-35.
14. Bang AT, Bang RA, Stoll BJ, Baitule SB, Reddy HM, Deshmukh MD. Is home-based diagnosis and treatment of neonatal sepsis feasible and effective? Seven years of intervention in the Gadchiroli field trial (1996 to 2003). *J Perinatol* 2005;25 Suppl 1:S62-S71.
15. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 1985;22(6):996-1006.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 6th ed. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2006. v.21. [NCCLS document M7-A5].
17. Raimundo O, Heussler H, Bruhn JB, Suntrarachun S, Kelly N, Deighton MA et al. Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococcal bacteraemia in a newborn intensive care unit. *J Hosp Infect* 2002;51(1):33-42.
18. Healy CM, Palazzi DL, Edwards MS, Campbell JR, Baker CJ. Features of invasive staphylococcal disease in neonates. *Pediatrics* 2004;114(4):953-61.
19. Krepsky N, Ferreira RBR, Nunes APF, Lins UGC, Costa e Silva Filho F, Mattos-Guaraldi AL, et al. Cell surface hydrophobicity and slime production of *Staphylococcus epidermidis* Brazilian isolates. *Curr Microbiol* 2003;46(4):280-6.
20. Vogel L, Sloos JH, Spaargaren J, Suiker I, Dijkshoorn L. Biofilm production by *Staphylococcus epidermidis* isolates associated with catheter related bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;36(2):139-41.
21. Ishak MA, Gröschel DH, Mandell GL, Wenzel RP. Association of slime with pathogenicity of coagulase-negative staphylococci causing nosocomial septicaemia. *J Clin Microbiol* 1985;22(6):1025-9.
22. Jones JW, Scott RJD, Morgan J, Pether JVS. A study of coagulase-negative staphylococci with reference to slime production, adherence, antibiotic resistance patterns and clinical significance. *J Hosp Infect* 1992;22(3):217-27.
23. Klingenberg C, Aarag E, Ronnestad A, Sollid JE, Abrahamsen TG, Kjeldsen G, et al. Coagulase-negative staphylococcal sepsis in neonates. Association between antibiotic resistance, biofilm formation and the host inflammatory response. *Pediatr Infect Dis J* 2005;24(9):817-22.

24. Ehrlich GD, Stoodley P, Kathju S, Zhao Y, McLeod BR, Balaban N, et al. Engineering approaches for the detection and control of orthopaedic biofilm infections. *Clin Orthop Relat Res* 2005;(437):59-66.

25. Silva GDI, Kantzanou M, Justice A, Massey RC, Wilkinson AR, Day NPJ, et al. The ica operon and biofilm production in coagulase-negative Staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* 2002;40(2):382-8.

Correspondência:

Denise Von Dolinger de Brito
Av. Floriano Peixoto, 5322, bl 9, ap. 302
Residencial Buritis – Custódio Pereira
38405-184 – Uberlândia-MG
Tel: (34)3232-2280 Fax: (34)3218-2333
e-mail: denisebrito@terra.com.br
