

EVIDÊNCIA DA PRESENÇA DO SISTEMA AGR, EXPRESSÃO DE TOXINAS E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM ESTAFILOCOCOS COAGULASE-NEGATIVA ISOLADOS DE HEMOCULTURAS

VALÉRIA CATANELI PEREIRA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em
Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração
Biologia de Parasitas e Microorganismos.

Profa Dra Maria de Lourdes Ribeiro Souza da Cunha



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**EVIDÊNCIA DA PRESENÇA DO SISTEMA AGR, EXPRESSÃO
DE TOXINAS E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM
ESTAFILOCOCOS COAGULASE-NEGATIVA ISOLADOS DE
HEMOCULTURAS**

VALÉRIA CATANELI PEREIRA

MARIA DE LOURDES RIBEIRO DE SOUZA DA CUNHA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em
Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração
Biologia de Parasitas e Microorganismos.

Profa Dra Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

**BOTUCATU – SP
2014**

Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-000 Cx Postal 510 Botucatu-SP Brasil
Tel (14) 3811-6148 Fax (14) 3811-6148 posgraduacao@ibb.unesp.br

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Pereira, Valéria Cataneli.

Evidência da presença do sistema agr, expressão de toxinas e resistência aos antimicrobianos em estafilococos coagulase-negativa isolados de hemoculturas / Valéria Cataneli Pereira. - Botucatu, 2014

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Capes: 21201021

1. Estafilococos. 2. Biofilme. 3. Agentes antiinfeciosos. 4. Sistema imune. 5. Células T.

Palavras-chave: Antimicrobianos; Biofilme; Estafilococos coagulase-negativa; Perfil clonal; Superantígenos.

*" Feliz o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire
conhecimento; porque melhor é o seu lucro do que o da
prata, e melhor a sua renda do que o ouro mais fino.*

*Mais preciosa é do que pérolas, e tudo o que podes desejar não
é comparável a ela "*

(Provérbios 3: 13-15)

Dedicatória

*Ao meu noivo **Fabiano Spadotti Dorini**, pelo carinho, compreensão, companheirismo e incentivo durante o período de desenvolvimento deste trabalho. Você acredita nos meus sonhos e participa de cada momento importante da minha vida. Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos!*

Amo você!

*Aos meus pais, **Oswaldo e Nadir**, pelo amor, dedicação, e por nunca medir esforços para me ajudar a chegar até aqui. Vocês foram essenciais para a minha formação, me ensinando a ter honestidade, competência e determinação. Obrigada por tudo o que me concederam com amor e carinho!*

Amo vocês!

Agradeço especialmente,

Á minha orientadora Profa Dra Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha, que acreditou no meu potencial no início da minha formação acadêmica, me dando a oportunidade de aprender mais e me ensinando com paciência e disponibilidade durante o longo período que se iniciou na minha graduação. Sou grata pelos ensinamentos, pela amizade e pela contribuição para a minha formação profissional.

Muito Obrigada!

Agradeço,

Primeiramente a Deus, que está sempre presente em minha vida e me concede sabedoria. "Até aqui nos ajudou o Senhor"(1Samuel7);

*Aos meus familiares, meu irmão **Edemilson** e sua família, meus tios e tias, meus primos e aos meus sogros **Abílio e Marisa**, pelo apoio durante o período deste trabalho.*

*Ao Dr. **Amaury José Dorini**, querido "**Tio Mau**", pelo carinho, atenção e disponibilidade de me ajudar em vários momentos. Sou muito grata pelo incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho.*

*Aos amigos **Adilson de Oliveira, Danilo Riboli, Katheryne Benini e Luíza Pinheiro**, pela amizade e contribuição para o desenvolvimento em várias fases deste trabalho. Aprendi muito com vocês e compartilhamos muitos momentos agradáveis e de descontração. Sou muito grata a vocês!*

À Carla Ivo Brito, que infelizmente não está mais entre nós, mas além da imensa colaboração no início deste trabalho, deixou grandes ensinamentos de vida. Mesmo enfrentando momentos muito difíceis, tinha sonhos e encarava as dificuldades sempre com bom humor. Saudades!

Às amigas Tâmara Prandini, Eliane Pereira e Juliana Giacobino pela amizade, companheirismo, colaborações e pelos agradáveis momentos proporcionados.

Aos companheiros de pesquisa, Ariane Rocha, Aydir Cecília, Camila Sena, Cláudia Witzel, Darlan Leme, Iara Batista, Lígia Abraão, Mariana Fávero, Patrícia Yoshida, Priscila Mello, Taísa Trevizani, Thaís Alves, pelas horas de trabalho, risadas e por sugestões que contribuíram para a realização deste trabalho.

À todos ex- integrantes do laboratório que além da amizade me deixaram ensinamentos importantes durante a minha formação.

*Aos **professores e funcionários** do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pela disponibilidade em todos os momentos que precisei e pelos ensinamentos.*

*Aos professores e funcionários da seção de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências de Botucatu, pela atenção sempre dispensada.
À FAPESP pela bolsa concedida (2011/23746-2).*

À CNPq pelo auxílio do projeto (470649/2011-9).

À todos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e para a minha formação profissional.

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

1.Introdução.....	11
2.Referências.....	22
3.Objetivos.....	28
3.1. Objetivo Geral.....	28
3.2. Objetivos Específicos.....	28
4. Apresentação da Tese.....	29
4.1. Artigo Científico 1:.....	30
4.2. Artigo Científico 2:.....	67
4.3. Artigo Científico 3:.....	98
5. Conclusões.....	132
6. Anexos.....	134

RESUMO

Os estafilococos coagulase-negativos (ECN) são integrantes da microbiota normal da pele humana e os microrganismos mais frequentemente isolados de materiais clínicos. No ambiente hospitalar são a maior causa de bacteremias, na maioria dos casos em pacientes mantidos em unidades de tratamento intensivo. A patogenia das infecções causadas por estas bactérias é complexa e multifatorial, sendo vários os fatores de virulência envolvidos nas infecções. O biofilme é o principal fator de virulência dos ECN, conferindo proteção contra o sistema imune do hospedeiro e a ação dos antimicrobianos. As toxinas estafilocócicas denominadas superantígenos são classificadas antígenicamente em toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) e em enterotoxinas. Desencadeiam uma série de efeitos tóxicos, pois funcionam como potentes toxinas gastrointestinais e estimulam de forma inespecífica a proliferação de células T. Os sistemas regulatórios estafilocócicos, tais como o sistema *agr*, podem afetar a produção das toxinas e do biofilme agindo como indutores ou repressores de genes específicos para a produção de fatores de virulência. Além dos fatores de virulência, o aumento da resistência antimicrobiana nos últimos anos tem fundamental significância nas infecções hospitalares. As amostras resistentes à oxacilina deixam poucas alternativas para o tratamento das infecções causadas por estes patógenos. Uma das drogas de escolha tem sido a vancomicina, porém já são relatados casos de susceptibilidade reduzida e de resistência a esta. Assim, este estudo objetivou caracterizar as espécies de ECN provenientes de hemoculturas de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu quanto à detecção e expressão dos fatores de virulência, ao sistema *agr* envolvido na regulação da virulência e à susceptibilidade aos antimicrobianos.

ABSTRACT

Coagulase–negative staphylococci (CNS) are normal resident microbes of human skin, often isolated from clinical specimens. They are the major cause of bacteremia in inpatients, especially intensive care patients. Pathogenesis of infection caused by these organisms is complex and multifactorial, with several virulence factors involved in infection processes. Biofilm is key for CNS virulence, since it provides protection against the host’s immune system and the action of antimicrobial agents. Staphylococcal toxins known as superantigens are antigenically classified as toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) and enterotoxins. They trigger a chain of toxic effects by acting as potent gastrointestinal toxins and nonspecifically stimulating T cell proliferation. Staphylococcal regulatory systems, such as *agr*, may affect toxin and biofilm production through induction or repression of genes coding for virulence factor production specifically. In addition to virulence factors, increasing resistance rates to antimicrobial agents is also highly significant in nosocomial infections. Oxacillin–resistant strains leave few treatment alternatives for infection caused by these pathogens. Vancomycin has shown to be one drug of choice, although decreased susceptibility, as well as resistance, to vancomycin have been reported lately. Therefore, the aim of this study has been to categorize CNS species in blood culture specimens from inpatients at the UNESP Hospital das Clínicas in Botucatu, Brazil, as per detection and expression of virulence factors, *agr* system involved in virulence regulation, and susceptibility to antimicrobial agents.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Staphylococcus* é o membro mais importante da Família *Staphylococcaceae*, que está compreendida no Filo *Firmicutes*, Classe *Bacilli* e Ordem *Bacilales*. O gênero *Staphylococcus* abrange 49 espécies e 26 subespécies, que se caracterizam por serem cocos gram-positivos que medem de 0,5 a 1,5µm de diâmetro e se apresentam isolados ou em arranjos irregulares, lembrando cachos de uva. São imóveis, não formadores de esporos, catalase-positivos e anaeróbios facultativos.¹⁻³

As espécies do gênero *Staphylococcus* são classificadas em grupos, de acordo com a capacidade de sintetizar a enzima coagulase. O grupo dos estafilococos coagulase-positivos tem como representantes: *S. aureus*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. intermedius*, *S. pseudointermedius*, *S. delphini*, *S. lutrae*, *S. hyicus* e *S. agnetis*. Já o segundo grupo, conhecido como estafilococos coagulase-negativos (ECN), é formado pelas demais espécies: *S. arlettae*, *S. auricularis*, *S. capitis* subsp. *capitis*, *S. capitis* subsp. *urealyticus*, *S. caprae*, *S. carnosus* subsp. *carnosus*, *S. carnosus* subsp. *utilis*, *S. caseolyticus*, *S. chromogenes*, *S. cohnii* subsp. *cohnii*, *S. cohnii* subsp. *urealyticus*, *S. condimenti*, *S. devriesei*, *S. epidermidis*, *S. equorum* subsp. *equorum*, *S. equorum* subsp. *linens*, *S. felis*, *S. fleurettii*, *S. gallinarum*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* subsp. *hominis*, *S. hominis* subsp. *novobiosepticus*, *S. jettensis*, *S. kloosii*, *S. lentus*, *S. lugdunensis*, *S. lutrae*, *S. massiliensis*, *S. microti*, *S. muscae*, *S. nepalensis*, *S. pasteurii*, *S. petrasii* subsp. *croceilyticus*, *S. petrasii* subsp. *petrassi*, *S. pettenkoferi*, *S. piscifermentan*, *S. pulvereri*, *S. rostri*, *S. saccharolyticus*, *S. saprophyticus* subsp. *bovis*, *S. saprophyticus* subsp. *carnaticus*, *S. sciuri* subsp. *lentus*, *S. sciuri* subsp. *rodentium*, *S. sciuri* subsp. *sciuri*, *S. simulans*, *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*, *S. stepanovicci*, *S. succinus* subsp. *casei*, *S. succinus* subsp. *succinus*, *S. vitulinus*, *S. warneri* e *S. xylosus*.³

Os ECN são os microrganismos mais abundantes na microbiota normal humana, sendo considerados colonizadores primários da pele. Ocupam um nicho aeróbio na pele, provavelmente utilizando a ureia presente no suor como fonte de nitrogênio.⁴ São considerados microrganismos oportunistas, pois podem se aproveitar de algumas situações, como rupturas da barreira cutânea por trauma ou pela presença de corpos estranhos, e com isso atingir outros tecidos, proliferar e desenvolver comportamento patogênico. São os microrganismos mais frequentemente isolados de materiais clínicos, e nas últimas décadas têm sido considerados importantes patógenos, principalmente em infecções que acometem pacientes imunossuprimidos, prematuros e pacientes com implantes de próteses.^{5,6}

No ambiente hospitalar os ECN são a maior causa de bacteremia, na maioria dos casos em pacientes mantidos em unidades de tratamento intensivo.⁷ A patogenia das infecções causadas por estas bactérias é complexa e multifatorial, sendo vários os fatores de virulência envolvidos nas infecções por *Staphylococcus*, como a produção de biofilme e toxinas. Além disso, a resistência aos antimicrobianos tem aumentado nos últimos anos, dificultando o tratamento das infecções causadas por esses microrganismos.⁸

O biofilme, considerado o principal fator de virulência dos ECN, é definido como uma interação complexa de microrganismos incorporados em uma matriz extracelular de polissacarídeo, proteínas e ácido nucleico,⁹ que confere proteção aos microrganismos envolvidos do sistema imune do hospedeiro durante a infecção.¹⁰ O mecanismo exato da formação do biofilme ainda é muito estudado, e sabe-se que quatro passos estão envolvidos nesses processos: a adesão, a acumulação, a maturação e o desprendimento. Na constituição do biofilme estafilocócico, alguns genes estão implicados na codificação das mais importantes substâncias e proteínas, em especial o operon *ica*, codificador de uma adesina polissacarídica. Esse operon

contém os genes *icaADBC*, mais o *icaR*, que tem função regulatória e é transcrito no sentido oposto ao operon *ica*. Com a ativação do operon *ica*, é sintetizado um polissacarídeo de adesão intercelular (PIA), sustentando os contatos célula–célula por meio de um biofilme de múltiplas camadas. O gene *icaA* codifica a enzima transferase de N-acetilglicosamina, que é utilizada na síntese do PIA. Quando ocorre apenas a transcrição do gene *icaA*, a atividade enzimática induzida é baixa, mas se o gene *icaD* for expresso conjuntamente, ocorre incremento significativo da transferase de N-acetilglicosamina, que atua formando oligômeros com aproximadamente 20 resíduos. O gene *icaC* quando expresso atua na síntese de oligômeros mais longos com 130 resíduos, que reagem com antissoros específicos para PIA e na exportação do PIA sintetizado. O gene *icaB* tem função de desacetilação com introdução de carga positiva no PIA, sendo crucial para a formação de biofilme e para função biológica. Assim, uma das funções mais importantes do PIA é a de contribuir para a formação do biofilme, o que leva a persistência das infecções e a não eficácia da atividade dos antimicrobianos.^{9,11,12}

Recentemente foi reconhecido que o PIA não é essencial para a formação de biofilmes em cepas de *S. epidermidis*, sendo descritas cepas com capacidade de sintetizar biofilmes e não carreadoras dos genes *ica*, isoladas de infecções relacionadas ao biofilme. Nos casos de formação de biofilme independente de PIA, o polissacarídeo pode ser substituído por proteínas adesivas, como a proteína associada ao acúmulo (Aap) e a proteína associada ao biofilme (Bhp em *S. epidermidis* e Bap em *S. aureus*).¹¹ Aap é uma proteína de 220 kDa que contém um N-terminal de domínio A e um de domínio B, que é processada por proteases bacterianas e do hospedeiro, e que tem por forma ativa uma proteína fibrilar, liberada das células em “tufos”. A acumulação de Aap é mediada pela dimerização Zn²⁺- dependente dos domínios B sobre as células vizinhas, enquanto o domínio A é responsável pela adesão aos corneócitos, implicando papel adicional na adesão à

pele.⁹ Já o Bhp é uma proteína de 284,4 kDa que induz a formação do biofilme e a acumulação na ausência do PIA. É uma proteína homóloga à Bap, detectada em *S. aureus*, e enquanto a Bap é encontrada em ilhas de patogenicidade, a Bhp não está associada a elementos móveis.⁹ Ainda não está estabelecido o mecanismo pelo qual Bap e eventualmente Bhp contribuem para a formação de biofilme.^{13,14}

Além do biofilme, encontram-se também nos ECN outros fatores de virulência, podendo contribuir para a degradação do tecido e para uma resposta imune inflamatória.¹⁰ As toxinas estafilocócicas denominadas superantígenos foram originalmente detectadas em *S. aureus* e abrangem as enterotoxinas estafilocócicas e a toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1).¹⁵ Podem desencadear uma série de efeitos tóxicos, pois funcionam como potentes toxinas gastrintestinais e também como superantígenos, estimulando de forma inespecífica a proliferação de células T. Essa ativação inespecífica se dá através da ligação direta à molécula da classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC II) e à cadeia $v\beta$ do receptor de antígeno da célula T (TCR), sem o processamento típico de antígenos normais, resultando na estimulação de muitas células T e conseqüentemente em produção excessiva de citocinas, tais como interleucina I (IL-1), IL-2, interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α).¹⁶

A purificação e a caracterização das enterotoxinas estafilocócicas tiveram início em 1959,¹⁷ e atualmente são 23 as enterotoxinas sorologicamente distintas e designadas pelas letras EEA a EELV.¹⁷⁻²¹ Todas as enterotoxinas apresentam atividade superantigênica, mas apenas algumas apresentam atividade emética (EEA a EEI, EER, EES e EET). O Comitê Internacional de Nomenclatura para Superantígenos Estafilocócicos propõe que se designem como enterotoxinas estafilocócicas-*like* (EEL) do tipo X as enterotoxinas que não apresentam propriedades eméticas em modelos de animais primatas ou que ainda não foram testadas.²²

Muitos autores questionam o potencial de produção de toxinas por ECN, sugerindo erros de identificação das espécies,²³ como linhagens de *S. aureus* produtoras de baixa (ou nenhuma) quantidade de coagulase.²⁴ No entanto, alguns relatos indicam a produção de TSST-1 e de enterotoxinas estafilocócicas também por ECN.²⁵⁻²⁹ Em estudo realizado em 2006 por Cunha *et al.*,³⁰ foi investigada a presença de genes toxigênicos em ECN isolados de alimentos. A técnica de PCR detectou 10% de amostras positivas, sendo que destas 25% apresentaram o gene *sec-1* e 75% apresentaram o gene *sea*. Em outro estudo, de 2007, Cunha *et al.* detectaram os genes responsáveis pela produção de enterotoxinas em amostras de *Staphylococcus* isoladas de recém-nascidos.²⁹ Das amostras estudadas, 46,6% dos *S. aureus* e 40% dos ECN foram positivos para a presença de genes de enterotoxinas estafilocócicas. Nos estudos realizados em 2011 por Calsolari *et al.* em amostras de ECN isoladas de recém nascidos,²² a técnica de reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa (RT-PCR) detectou a expressão do gene *sea* em 3 das 14 amostras que foram positivas para esse gene pela técnica de PCR, enquanto o gene *sec* foi detectado em 33 amostras e sua expressão detectada em 3 amostras.

Tanto a produção de toxinas como a formação do biofilme são mecanismos utilizados por estafilococos durante os processos da infecção. Permitem evitar as defesas do hospedeiro, a adesão às células e aos tecidos, o crescimento e dispersão no hospedeiro e a degradação das células e tecidos, tanto para nutrição quanto para proteção. Todas essas fases da infecção são coordenadas por um sistema complexo que envolve a comunicação entre as células bacterianas e a densidade desses microrganismos em determinado espaço.³¹ *Quorum sensing* é o mecanismo pelo qual a bactéria consegue “perceber” a densidade celular do meio em que se encontra através da comunicação entre as células presentes, permitindo uma reação fenotípica de acordo com a fase de crescimento bacteriana. Nos estafilococos a atividade *quorum sensing* é importante

porque certas proteínas, tais como os fatores de virulência, só devem ser expressas em determinada fase de crescimento.³²

Um dos sistemas com atividade *quorum sensing* que coordena a maioria dos fatores de virulência em estafilococos é o sistema *agr* (*accessory gene regulator*).³³ No locus *agr*, dois promotores com orientações opostas, P2 e P3, produzem dois transcritos, respectivamente RNAII e RNAIII. O RNAIII é formado por 510 nucleotídeos responsáveis pela transcrição de genes de muitos fatores de virulência, como toxinas extracelulares, enzimas e proteínas de superfície celular presentes em *S. aureus*.³⁴ O RNAII é formado por quatro genes, *agrA*, *agrB*, *agrC* e *agrD*, arrançados em um operon (*agr*), e trabalhando juntos para induzir a síntese do RNAIII. Os produtos dos genes *agrB* e *agrD*, respectivamente as proteínas AgrB e AgrD, se juntam formando um polipeptídeo autoindutor (AIP), que é liberado para o meio extracelular. A AgrC é uma proteína transmembrânica com receptores para AIP e quando o AIP se liga à proteína AgrC, este fosforila a proteína AgrA ativando-a. A proteína AgrA fosforilada age como um indutor dos promotores P2 e P3. A síntese do RNAIII é induzida quando a concentração do AIP, específico no meio, atinge determinados níveis que geralmente são detectados na passagem da fase exponencial de crescimento para a fase estacionária. O produto final da cascata do locus *agr* é o RNAIII, um RNAm que funciona como indutor ou repressor dos genes acessórios.³²

A expressão do sistema *agr* contribui para a patogênese estafilocócica em diferentes momentos da infecção. Considerando a curva de crescimento dos estafilococos, observa-se que todas as exoproteínas são secretadas na fase pós-exponencial, excetuando-se a enterotoxina A, que é produzida durante todas as fases de crescimento. Por outro lado, as proteínas associadas à membrana e as adesinas são produzidas durante a fase exponencial e não na fase pós-exponencial.³⁵

São descritos quatro polimorfismos do locus *agr* em *S. aureus* (*agr* I, II, III e IV) e três polimorfismos em *S. epidermidis* (*agr* I, II e III).³⁶ Nesses grupos há variação nos genes *agrB*, *agrC* e *AgrD*, e conseqüentemente no AIP e na proteína AgrC, sendo a ligação da AIP com seu receptor específico para cada grupo alélico. Quando ocorre ligação de um AIP de um grupo alélico ao receptor AgrC de um outro grupo, o AIP não produz fator intrínseco e não produz o sinal através da proteína AgrC, funcionando portanto, como um antagonista. Um AIP só é agonista para seu próprio grupo alélico, de forma que bactérias de grupo *agr* diferentes interferem na regulação de proteínas acessórias uma com a outra.³² Segundo Novick *et al.*,³¹ essas variantes dentro do locus *agr* podem ter sido selecionadas durante a evolução, representando um determinante fundamental na divergência das cepas, que está intimamente associada com a especiação estafilocócica. Além disso, os alelos alternativos e a capacidade de estimular diferentes grupos *agr* podem representar adaptações a diferentes microambientes em locais especializados de infecções.³⁷

Segundo Otto,³⁸ foram descritas regiões de homologia do locus *agr* de *S. aureus* em outras espécies de estafilococos, e as proteínas codificadas pelo locus *agr* nas diferentes espécies são muito semelhantes, com valores de identidade de aminoácidos no intervalo de 50%. A comparação do sistema *agr* de *S. epidermidis* com *S. aureus* apresenta semelhanças na estrutura e seqüências dos genes, com tamanho aproximado de 3,5kb e 68% de similaridade, podendo desempenhar um papel similar.³⁷ Em *S. lugdunensis* a identidade é de 63%, com uma organização genômica semelhante.³⁹ Já no estudo realizado em 2002 por Dufour *et al.*, compararam-se as seqüências de nucleotídeos na região do locus *agr* em várias espécies de *Staphylococcus*, detectando-se inúmeras variantes de seqüências que confirmam a variabilidade da região mesmo entre subpopulações de uma única espécie.⁴⁰

Além dos fatores de virulência descritos, é de fundamental significância nas infecções hospitalares o aumento da resistência antimicrobiana nos últimos anos. A oxacilina é uma penicilina semissintética utilizada no Brasil como teste de sensibilidade e tratamento das infecções causadas por ECN, e segundo alguns autores 66–95% dos isolados clínicos de ECN são resistentes à oxacilina.^{41–43} A resistência dos estafilococos à oxacilina é determinada pelo gene *mecA*, que codifica a proteína ligadora de penicilina suplementar (PBP2a), apresentando assim baixa afinidade às penicilinas semissintéticas.⁴⁴ Esse gene é carregado em um elemento genético móvel específico identificado como cassete cromossômico estafilocócico *mec* (*staphylococcal cassette chromosome, SCCmec*) que é composto pelo complexo do gene *mec*, pelo complexo do gene *ccr* e pela região J. O complexo *mec* é composto do gene *mecA* e de seus genes regulatórios *mecI* e *mecRI*, e o complexo do gene *ccr* é responsável pela integração e excisão do *SCCmec* no cromossomo. Já a região J não é essencial ao cassete cromossômico, mas pode carrear genes que codificam resistência a agentes antimicrobianos não β -lactâmicos e metais pesados.⁴⁵

Até o momento foram descritos onze tipos de *SCCmec* (www.SCCmec.org), que são definidos pela combinação dos tipos de complexo do gene *ccr* e a classe do complexo do gene *mec*, sendo os subtipos definidos por polimorfismos da região J em uma mesma combinação dos complexos *mec* e *ccr*.⁴⁵ Os tipos de *SCCmec* I, II e III são os mais detectados em estafilococos isolados de ambiente hospitalar, e os demais tipos são mais frequentemente isolados de amostras de origem comunitária. O *SCCmec* III é o que apresenta maior tamanho, podendo carrear genes de resistência a vários antimicrobianos, e as bactérias que carregam esse elemento podendo causar sérias infecções.⁴⁶ Já o tipo IV tem um menor tamanho e custo metabólico, tornando este um elemento seletivamente favorecido para a transferência entre *Staphylococcus*. Além disso, esse

tipo de SCCmec não impõe um custo adaptativo ao seu hospedeiro, podendo se disseminar na ausência de pressão seletiva de antibióticos.⁴⁷

Em estudos realizados em um hospital de Porto Alegre, RS, foi descrita a distribuição dos SCCmec em ECN resistentes à oxacilina isolados de hemoculturas. O SCCmec III foi o mais frequente, sendo isolado em *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. capitis* e *S. sciuri*. O segundo mais detectado foi o SCCmec I, nas espécies *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. capitis*. Já o SCCmec IV foi caracterizado apenas em *S. epidermidis* e o tipo II em *S. haemolyticus*.⁴⁸

O aumento de amostras resistentes a oxacilina deixa poucas alternativas para o tratamento das infecções causadas por estes patógenos. Uma das drogas de escolha tem sido a vancomicina, porém já são relatados casos de susceptibilidade reduzida e de resistência a esta. A vancomicina foi introduzida na clínica em 1958. A utilização desta droga aumentou nos últimos 20 anos, em decorrência do aumento na prevalência de *S. aureus* e ECN resistentes à oxacilina.⁴⁹ Entretanto, têm sido objeto de grande interesse científico por todo o mundo a emergência, em 1988, de enterococos resistentes à vancomicina e o potencial de transferência dessa resistência para outras bactérias.

Estudos têm mostrado que o gene *vanA*, mediador da resistência à vancomicina, pode ser transferido de enterococos para uma variedade de bactérias gram-positivas incluindo *S. aureus*.⁵⁰ Em seu estudo de 2003 numa UTI neonatal, Center *et al.* detectaram 3,9% de ECN com susceptibilidade reduzida à vancomicina, sendo que 75% foram identificados como *S. warneri*.⁵¹ No estudo realizado em 1990 por Veach *et al.*,⁵² foram isoladas linhagens de *S. haemolyticus* resistentes à vancomicina de pacientes submetidos à terapia prolongada com esse antimicrobiano. As linhagens de *S. haemolyticus* isoladas dos pacientes que estavam em tratamento com vancomicina mostraram diminuição da susceptibilidade a essa droga em comparação com as

linhagens isoladas antes da antibioticoterapia. No Brasil, foi relatado em 2005 por Palazzo *et al.* o isolamento de 4 amostras de ECN de indivíduos saudáveis com altos valores de concentração inibitória mínima para a vancomicina (16 µg/mL, 32 µg/mL e >256 µg/mL), sendo três dessas amostras *mecA* positivas.⁵³

Embora na maioria dos estudos realizados os estafilococos resistentes à vancomicina (VRS) também apresentem resistência à oxacilina, alguns trabalhos relatam que os VRS podem apresentar diferentes padrões de resistência, não sendo obrigatoriamente resistentes à oxacilina, visto serem diferentes os mecanismos de resistência a essas drogas. A susceptibilidade reduzida à vancomicina pode envolver alterações metabólicas com espessamento da parede bacteriana, devido a aceleração da síntese de peptidoglicano. Estão assim disponíveis mais sítios D-alanil-D-alanina para a ligação da vancomicina, que acaba se esgotando, não inibe a síntese do peptidoglicano, e leva ao espessamento da parede.^{53 54} No estudo de Palazzo *et al.*,⁵³ o gene *van* não foi o mecanismo responsável pela resistência de suas amostras, pois não foram detectados os genes *vanA*, *vanB* e *vanC*, sugerindo que a espessura da parede bacteriana pode ter contribuído para a resistência à vancomicina.

Além da resistência à oxacilina e dos casos de resistência e susceptibilidade reduzida à vancomicina, tem sido relatada resistência de *S. epidermidis* a vários outros antibióticos, como a rifampicina, as fluoroquinolonas, a gentamicina, a tetraciclina, o cloranfenicol, a eritromicina, a clindamicina e as sulfonamidas. Já a resistência a estreptograminas, linezolida e tigeciclina ocorre raramente nessas bactérias. Os genes de resistência a esses antimicrobianos são mediados por plasmídeos e encontram-se com maior frequência em cepas resistentes à meticilina, sendo comum sua ocorrência em cepas hospitalares que sofrem maior pressão seletiva.⁵⁵

Com o crescimento das infecções causadas por ECN, é de extrema importância a determinação dos fatores de virulência e da susceptibilidade aos antimicrobianos para melhor conhecimento do potencial patogênico desses microrganismos. Assim, este estudo objetivou caracterizar as espécies de ECN provenientes de hemoculturas de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu quanto à detecção e expressão dos fatores de virulência, o sistema *agr* envolvido na regulação da virulência e a susceptibilidade aos antimicrobianos.

2. REFERÊNCIAS

1. Kloos WE, Bannerman TL. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. American Society Microbiology, Washington 1995;p.282-298.
2. Garrity GM, Winters M, Searles DB. Taxonomic outline of the procaryotic genera. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilson. Release 1.0, Apr 2001. <http://www.cme.msu.edu/bergeys>.
3. Euzéby JP. List of prokaryotic names with standing in nomenclature – Genus *Staphylococcus*. <http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>.
4. Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol* 2011;**9**:244-53.
5. Kloos WE, Bannerman TL. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. Washington: American Society Microbiology 1999; p. 264–82.
6. Rowlinson MC *et al.* Isolation of a strictly anaerobic strain of *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Microbiol* 2006;**44**(3):857–60.
7. Kloos WE, Bannerman TL. Update on clinical significance of coagulase–negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 1994;**7**:117–40.
8. Kein LS. Mapeamento dos estafilococos coagulase–negativos no hospital universitário Antonio Pedro da Universidade Federal Fluminense, no período de 1998 a 2002 [Dissertação]. Niterói, RJ. Universidade Federal Fluminense; 2005.
9. Fey PD, Olson ME. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future Microbiol* 2010;**5**(6):917–33.

10. Otto M. Virulence factors of the coagulase–negative staphylococci. *Front Biosci* 2004;**9**:841–63.
11. Hussain M, Hastings JGM, White PJ. Isolation and composition of the extracellular slime made by coagulase–negative staphylococci in a chemically defined medium. *Infect Dis* 1991;**163**:534–41.
12. Otto M. Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008;**322**:207–28.
13. Cucarella C *et al.* Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* 2001;**183**:2888–96.
14. Gill SR *et al.* Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm–producing methicillin–resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J Bacteriol* 2005;**187**(7):2426–38.
15. Dinges MM, Orwin PM, Schleivert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 2000;**13**(1):16–34.
16. Marrack P, Kappler J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 1990;**248**:705–17.
17. Bergdoll MS, Surgalla MJ, Dack GM. Staphylococcal enterotoxin: identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin neutralizing property. *J Immunol* 1959;**83**:334–8.
18. Casman EP. Further serological studies of staphylococcal enterotoxin. *J Bacteriol* 1960;**79**:849–56.
19. Jarraud S *et al.* Involvement of enterotoxins G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlet fever. *J Clin Microbiol* 1999;**37**:2446–49.

20. Thomas DY *et al.* Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. *Infect Immun.* 2006;**74**(8):4724–34.
21. Ono HK *et al.* Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. *Infect Immun* 2008;**76**(11):4999–5005.
22. Calsolari RAO *et al.* Determination of toxigenic capacity by RT-PCR in coagulase–negative staphylococci and *Staphylococcus aureus* isolated from newborns in Brazil. *Microbiol Immunol* 2011;**55**:394–407.
23. Lotter LP, Genigeorgis CA. Deoxyribonucleic acid base composition and biochemical properties of certain coagulase–negative enterotoxigenic cocci. *Appl Microbiol* 1975;**29**:152–8.
24. Fox LK, Besser TE, Jackson SM. Evaluation of a coagulase–negative variant of *Staphylococcus aureus* as a cause of intramammary infections in a herd of dairy cattle. *J Vet Med Assoc* 1996;**209**:1143–6.
25. Vernozy-Rozand *et al.* Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk and cheese. *Int J Food Microbiol* 1996;**30**:271–80.
26. Crass BA, Bergdoll MS. Involvement of coagulase–negative staphylococci in toxic shock syndrome. *J Clin Microbiol* 1986;**23**:43–5.
27. Valle J *et al.* Toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) production by staphylococci isolated from goats and presence of specific antibodies to TSST-1 in serum and milk. *Appl Environ Microbiol* 1991;**57**:889–91.
28. Cunha MLRS. Significância etiológica e características de estafilococos coagulase–negativa isolados de processos infecciosos em recém-nascidos. [tese]. Botucatu (SP): Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 1998.

29. Cunha MLRS, Calsolari RAO, Araújo Jr, JP. Detection of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin 1 genes in *Staphylococcus*, with emphasis on coagulase–negative staphylococci. *Microbiol Immunol* 2007;**51**:381–90.
30. Cunha MLRS *et al.* Detection of enterotoxins genes on coagulase–negative staphylococci isolated from foods. *Brazilian J Microbiol* 2006;**37**(1):70–74.
31. Novick R, Geisinger E. Quorum sensing in staphylococci. *Annu Rev Genet* 2008;**42**:541–64.
32. McCulloch JA. Avaliação da funcionalidade do locus *accessory gene regulator (agr)* em cepas de *Staphylococcus aureus* brasileiras com susceptibilidade reduzida aos glicopeptídeos [tese]. São Paulo (SP): Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2006.
33. Novick RP, Jiang D. The staphylococcal *saeRS* system coordinates environmental signals with *agr* quorum sensing. *Microbiol* 2003;**149**:2709–17.
34. Huy YH. Foodborne disease handbook-diseases caused by bacteria. New York: Marcel Dekker. 1994.
35. Bohach *et al.* Exotoxins. In: Crossley KB, Archer GL, editors. The Staphylococci in Human Disease. New York: Churchill Livingstone; 1997.p. 83–111.
36. Ji G, Beavis R, Novick RP. Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science* 1997; **276**:2027–30.
37. Li M *et al.* Genetic polymorphism of the accessory gene regulator (*agr*) locus in *Staphylococcus epidermidis* and its association with pathogenicity. *J Med Microbiol* 2004;**53**:545–9.
38. Otto M. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* peptide pheromones produced by the accessory gene regulator *agr* system. *Peptides* 2001;**22**:1603–8.

39. Frank KL, Del Pozo JL, Patel R. From clinical microbiology to infection pathogenesis: how daring to be different works for *Staphylococcus lugdunensis*. *Clin Microbiol Rev* 2008;**21**:111–33.
40. Dufour P *et al.* High genetic variability of the *agr* locus in *Staphylococcus* species. *J Bacteriol* 2002;**184**(4):1180–86.
41. Cuevas O *et al.* Grupo Español para el Estudio de Estafilococo. *Staphylococcus* spp. en España: situación actual y evolución de la resistencia a antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008;**26**:269–77.
42. Natoli S *et al.* Characterization of coagulase–negative staphylococcal isolates from blood with reduced susceptibility to glycopeptides and therapeutic options. *BMC Infect Dis* 2009;**9**:83.
43. Bouchami O *et al.* Antibiotic resistance and molecular characterization of clinical isolates of methicillin–resistant coagulase–negative staphylococci isolated from bacteremic patients in oncohematology. *Folia Microbiol* 2011;**56**:122–30.
44. Archer G, Niemeyer DM. Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci. *Trends Microbiol* 1994;**2**:343–7.
45. International Working Group on The Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): Guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;**53**:4961–67.
46. Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;**43**:1449–14.

47. Ito T et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;**45**:1323–6.
48. Machado ABMP et al. Distribution of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) types I, II, III and IV in coagulase-negative staphylococci from patients attending a tertiary hospital in southern Brazil. *J Med Microb* 2007;**56**:1328–33.
49. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin – United States, 2002. *MMWR* 2002;**51**:565–67.
50. Noble WC, Virani Z, Cree R. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 1992;**93**:195–8.
51. Center KJ et al. Decreased vancomycin susceptibility of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: evidence of spread of *Staphylococcus warneri*. *J Clin Microbiol* 2003;**41**:4660–65.
52. Veach LA et al. Vancomycin resistance in *Staphylococcus haemolyticus* causing colonization and bloodstream infection. *J Clin Microbiol* 1990;**28**:2064–8.
53. Palazzo ICV, Araújo MLC, Darini ALC. First report of vancomycin-resistant staphylococci isolated from healthy carriers in Brazil. *J Clin Microbiol* 2005;**43**(1):179–85.
54. Appelbaum PC. The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2006;**12**(1):16–23.
55. Otto M. *Staphylococcus epidermidis* – the ‘accidental’ pathogen. *Nature Rev Microbiol* 2009;**7**:556–7.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Caracterizar as espécies de ECN provenientes de hemoculturas de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu quanto à detecção e expressão dos fatores de virulência, ao sistema *agr* envolvido na regulação da virulência e à susceptibilidade aos antimicrobianos.

3.2. Objetivos Específicos

- Isolamento e identificação fenotípica de 300 amostras de ECN provenientes de hemoculturas de pacientes internados no HC da FMB no período de 1990 a 2009;
- Identificação fenotípica e genotípica dos ECN incluídos no estudo;
- Detecção dos genes de superantígenos: *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* e *tst*.
- Detecção dos genes relacionados ao biofilme: *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD*, *bhp* e *aap*.
- Determinação da expressão de mRNA nas amostras de ECN positivas para os genes de superantígenos e genes relacionados ao biofilme pela técnica de RT-PCR;
- Sequenciamento dos genes de superantígenos positivos pela técnica de RT-PCR;
- Detecção do locus *agr* nas amostras positivas para a expressão dos genes de superantígenos e genes relacionados ao biofilme;
- Detecção do gene *mecA* e tipagem do SCC*mec*;
- Determinação da concentração inibitória mínima para oxacilina, vancomicina, daptomicina, linezolida, quinupristina/dalfopristina e tigeciclina por *E-test*;
- Detecção da susceptibilidade reduzida à vancomicina pela técnica de triagem.
- Caracterização do perfil clonal das amostras que expressarem os genes de superantígenos e/ou biofilme pela técnica PFGE.

4. APRESENTAÇÃO DA TESE

Os resultados e a discussão dos dados obtidos encontram-se apresentados na forma de artigos científicos.

4.1. Artigo Científico I: Expressão de superantígenos e do sistema *agr* em *Staphylococcus epidermidis*

4.2. Artigo Científico II: Estafilococos coagulase-negativa: estudo de 20 anos do perfil de resistência aos antimicrobianos em isolados de hemocultuta de um hospital universitário

4.3. Artigo Científico III: Detecção do sistema *agr* e resistência aos antimicrobianos em *S. epidermidis* produtores de biofilme

ARTIGO I - BMC Microbiology

EXPRESSÃO DE SUPERANTÍGENOS E DO SISTEMA *agr* EM *Staphylococcus epidermidis*

Valéria Cataneli Pereira*, Luíza Pinheiro, Carla Ivo Brito, Adilson de Oliveira, Katheryne Benini Martins, Danilo Flávio Moraes Riboli, Patrícia Yoshida Faccioli Martins, Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Departamento de Microbiologia and Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP –Univ Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brazil.

*** Autor Correspondente:**

Valéria Cataneli Pereira

Departamento de Microbiologia and Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP –Univ Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brazil.

Caixa Postal 510, CEP 18618-970

valeriacataneli@gmail.com

RESUMO

Introdução

Os estafilococos coagulase–negativos (ECN) são integrantes da microbiota normal humana e considerados microrganismos oportunistas, sendo os mais isolados de materiais clínicos e a principal etiologia das bacteremias hospitalares. As infecções causadas por ECN são complexas, podendo envolver a produção de toxinas, como os superantígenos, que contribuem para a degradação do tecido e para uma resposta imune inflamatória. Um dos sistemas com atividade *quorum sensing* que coordena a expressão da maioria dos fatores de virulência em *S. aureus* é o sistema *agr* (*accessory gene regulator*); pouco se conhece entretanto sobre a presença do sistema *agr* e a expressão de superantígenos em espécies de ECN. Dessa forma o trabalho objetivou a detecção dos genes *sea*, *seb*, *sec-1*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *tst*, a expressão desses superantígenos e a pesquisa do locus *agr* em ECN isolados de hemoculturas.

Resultados

Entre as 300 amostras de ECN estudadas, a detecção dos genes revelou a presença do gene *sea* em 57,3% das amostras, 23,3% *seb*, 35,0% *sec-1*, 2,3% *sed*, 2,7% *see*, 62,7% *seg*, 13,0% *seh*, 66,7% *sei* e 5,0% *tst*. Foi comprovada a expressão em *S. epidermidis* do gene *sea* em uma amostra, do gene *sec-1* em duas, dos genes *seg* e *sei* concomitantemente e do gene *sei* em outra. A comparação da sequência dos genes expressos em *S. epidermidis* revelou 98 a 100% de identidade com os genes de enterotoxinas de *S. aureus*. O grupo *agrI* foi detectado em *S. epidermidis* que expressaram os genes *sea*, *seg* e *sei* e o grupo *agrII* nas amostras que expressaram o gene *sec-1*. A expressão dos grupos *agr* só foi observada nas amostras que expressaram o gene *sec-1*.

Conclusões

Os resultados apresentaram alta frequência de genes de enterotoxinas em ECN e confirmaram a capacidade da produção dessas toxinas em amostras clínicas com alta similaridade às enterotoxinas produzidas por *S. aureus*. O grupo *agrII* pode estar relacionado a produção da enterotoxina C em *S. epidermidis*, determinando maior virulência dessas cepas isoladas de hemoculturas, que podem agravar a sepse causada por esses microrganismos.

PALAVRAS-CHAVES: Estafilococos coagulase–negativos, enterotoxinas estafilocócicas, sistema *agr*.

ABSTRACT

Introduction

Coagulase–negative staphylococci (CNS) are normal resident microbes of human skin, recognized as opportunistic organisms. They are the most frequently isolated organisms from clinical materials, and the main cause of nosocomial bacteremia. CNS infections are complex, and may involve production of toxins, such as superantigens, which contribute for tissue decay and inflammatory immune response. Systems with quorum sensing activity coordinating expression of most *S. aureus* virulence factors include *agr* (accessory gene regulator); however, little is known about *agr* presence and superantigen expression in CNSs. Therefore, the aim of this study has been to detect *sea*, *seb*, *sec-1*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, and *tst* genes and the expression of such superantigens, as well as to investigate the presence of the *agr* locus in CNS specimens from blood culture.

Results

Gene detection has shown the *sea* gene to be present in 57.3% of specimens, *seb* in 23.3%, *sec-1* in 35.0%, *sed* in 2.3%, *see* in 2.7%, *seg* in 62.7%, *seh* in 13.0%, *sei* in 66.7%, and *tst* in 5.0% of specimens. Expression of the *sea* gene was shown in one *S. epidermidis* specimen, *sec-1* in two, *seg* and *sei* concomitantly and *sei* in another one. Comparison of expressed gene sequence for *S. epidermidis* has shown 98–100% identity with *S. aureus* enterotoxin genes. The *agrI* group was detected in *S. epidermidis* expressing *sea*, *seg* and *sei* genes, whereas the *agrII* group was detected in specimens expressing *sec-1* gene. Expression of *agr* groups was solely seen in specimens expressing *sec-1* gene.

Conclusion

Results show enterotoxin genes to be highly frequent in CNSs from clinical specimens, and confirm CNS ability to produce such toxins showing high similarity to *S. aureus*-produced enterotoxins. The *agrII* group may be associated with enterotoxin C production by *S. epidermidis*, increasing the virulence of these strains from blood culture specimens, which results in higher severity of sepsis caused by these organisms.

KEY WORDS: Coagulase-negative staphylococci, staphylococcal enterotoxins, *agr* systems.

INTRODUÇÃO

Os estafilococos coagulase–negativos (ECN) pertencem ao gênero *Staphylococcus*, representando a maioria das espécies e caracterizando-se pela incapacidade de produzir a enzima coagulase. São integrantes da microbiota normal humana, considerados microrganismos oportunistas, pois podem aproveitar-se de algumas situações, como rupturas da barreira cutânea por trauma ou pela presença de corpos estranhos, e com isso atingir outros tecidos, proliferar e desenvolver comportamento patogênico [1]. São os microrganismos mais isolados de materiais clínicos e nas últimas décadas têm sido considerados importantes patógenos, principalmente em infecções que acometem imunossuprimidos, prematuros e pacientes com implantes de próteses [2,3]. São a maior causa de bacteremia no ambiente hospitalar, e a patogenia relacionada a essas infecções é complexa, podendo envolver vários fatores de virulência, como a produção de toxinas.

As toxinas estafilocócicas podem contribuir para a degradação do tecido e para uma resposta imune inflamatória [4]. As enterotoxinas estafilocócicas e a toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1), com ação de superantígenos, podem desencadear uma série de efeitos tóxicos, estimulando de forma inespecífica a proliferação de células T. Essa ativação inespecífica se dá através da ligação direta à molécula da classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC II) e à cadeia $v\beta$ do receptor de antígeno da célula T (TCR), sem o processamento típico de antígenos normais, resultando em uma estimulação de muitas células T e conseqüentemente uma produção excessiva de citocinas, tais como a interleucina I (IL-1), IL-2, interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) [5].

A produção de toxinas por estafilococos durante os processos da infecção envolvem fases que são coordenadas por um sistema complexo de comunicação entre as células bacterianas. Esse

mecanismo, denominado *quorum sensing*, permite a detecção da densidade celular entre as bactérias, determinando uma reação fenotípica de acordo com a fase de crescimento em que a cultura se encontra [6,7]. Um dos sistemas com atividade *quorum sensing* que coordena a maioria dos fatores de virulência em *Staphylococcus* é o sistema *agr* (*accessory gene regulator*)[8]. O funcionamento do locus *agr* depende de dois promotores com orientações opostas, P2 e P3, que produzem dois transcritos, RNAII e RNAIII, respectivamente. O RNAIII é responsável pela transcrição de genes de muitos fatores de virulência, como toxinas extracelulares, enzimas e proteínas de superfície celular [9]. O sistema *agr* é formado por quatro genes (*agrA*, *agrB*, *agrC* e *agrD*) arranjados em um operon. Os produtos desses genes, as proteínas *agrA*, *agrB*, *agrC* e *agrD*, trabalham em conjunto para o funcionamento desse sistema. A proteína *agrB* e *agrD* se juntam formando um polipeptídeo autoindutor (AIP), que é liberado para o meio extracelular. Quando os níveis de AIP do meio externo são detectados pela proteína *AgrC*, que é transmembrânica, esta fosforila a proteína *agrA*, que age como indutor dos promotores P2 e P3. O produto final da cascata do locus *agr* é o RNAIII, um RNAm que funciona como indutor ou repressor dos genes de toxinas [7].

São descritos três polimorfismos do locus *agr* em *S. epidermidis* (*agr* I, II e III) [10]. Nesses grupos há variação nos genes *agrB*, *agrC* e *agrD*, e conseqüentemente no AIP e na proteína *AgrC*, sendo a ligação do AIP com seu receptor específico para cada grupo alélico. Quando ocorre ligação de um AIP de um grupo alélico no receptor *AgrC* de um outro grupo, o AIP não produz fator intrínseco e não produz o sinal através da proteína *AgrC*, funcionando portanto, como um antagonista. Um AIP só é agonista para seu próprio grupo alélico, de forma que bactérias de grupo *agr* diferentes interferem na regulação de proteínas acessórias uma com a outra [7].

Com o crescimento das infecções causadas por ECN, é de extrema importância o estudo dos fatores de virulência para melhor conhecimento do potencial toxigênico desses microrganismos. Assim, este estudo teve como objetivo caracterizar as espécies de ECN provenientes de hemoculturas de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu quanto à detecção e expressão dos superantígenos e ao sistema *agr* envolvido na produção desses fatores de virulência.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

Foram estudadas 300 amostras de ECN provenientes de hemoculturas isoladas de pacientes internados no Hospital das Clínicas de Botucatu – Universidade Estadual Paulista (UNESP). As amostras estudadas foram do período de 1990 a 2009 e estavam mantidas na Coleção de Cultura do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP. O critério de seleção das amostras por espécies considerou uma prevalência média de 35% de ocorrência, com uma margem de erro de 5% e intervalo de confiança de 95%.

O isolamento das linhagens foi realizado conforme as normas descritas por Koneman *et al.* [11]. As amostras foram isoladas em Agar sangue e realizou-se a coloração de Gram, para observação da morfologia das colônias, e a prova de catalase para confirmação do gênero *Staphylococcus*. Logo após, as amostras de estafilococos foram submetidas à prova de coagulase para a diferenciação entre os grupos de estafilococos coagulase-positivos e coagulase-negativos. As amostras pertencentes ao grupo dos coagulase-negativos foram submetidas a provas bioquímicas propostas por Cunha *et al.* [12] para identificação fenotípica das espécies. A

identificação genotípica foi realizada usando *primers* de sequências conservadas adjacentes aos genes 16S e 23S pela técnica ITS-PCR (*internal transcribed spacer–polymerase chain reaction*) descrita por Barry *et al.* [13] e Couto *et al.* [14], usando os *primers* *G1* e *L1* descritos na Tabela 1. A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese em agarose metaphor 3% e corado com Saber Safe. Para controle dos resultados, foram utilizadas as seguintes linhagens de referência internacional: *S. auricularis* (ATCC 33753), *S. capitis* subsp. *capitis* (ATCC 27843), *S. capitis* subsp. *urealyticus* (ATCC 49325), *S. caprae* (ATCC 35538), *S. cohnii* (ATCC 49330), *S. cohnii* subsp. *cohnii* (ATCC 29974), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *S. epidermidis* (ATCC 35983), *S. haemolyticus* (ATCC 29970), *S. hominis* (ATCC 27844), *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* (ATCC 700237), *S. lentus* (ATCC 700403), *S. lugdunensis* (ATCC 700328), *S. saprophyticus* (ATCC 15305), *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* (ATCC 43808), *S. sciuri* subsp. *sciuri* (ATCC 29062), *S. simulans* (ATCC 27851), *S. xylosus* (ATCC 29979) e *S. warneri* (ATCC 10209).

Extração de DNA

Para a extração do DNA foi utilizado o Kit Illustra (GE Healthcare) que consistiu na digestão inicial das células de estafilococos com lisozima (10 mg/mL) e proteinase K (20 mg/mL). Adicionaram-se a seguir 500 µL da solução de extração à mistura, que foi centrifugada a 10.000 x g por 4 minutos. O sobrenadante foi transferido para a coluna e centrifugado a 5.000 x g por 1 minuto. O líquido coletado foi descartado, e novamente se adicionaram 500 µL de solução de extração à coluna. Após a centrifugação e descarte do líquido coletado, adicionaram-se 500 µL da solução de lavagem à coluna, que foi submetida à centrifugação a 20.000 x g por 3

minutos. A seguir, a coluna foi transferida para um tubo de 1,5 mL e utilizaram-se para a eluição 200 µL de água Milli Q aquecida a 70°C.

Detecção de genes de enterotoxinas e TSST-1

As reações de PCR para a detecção dos genes das enterotoxinas e da TSST-1 foram realizadas conforme os parâmetros descritos por Johnson *et al.* [15] e Cunha *et al.* [16]. As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 mL em volumes totais de 25 µL contendo 10 pmol de cada *primer* (Tabela1), 2,5 U de Taq DNA polimerase, 200 µM de desoxirribonucleotídeos trifosfatados, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 0,75 mM de MgCl₂ e 3 µL de DNA. A incubação foi realizada em termociclador PTC-100 MJ Research empregando seguintes parâmetros: um primeiro ciclo a 94°C por quatro minutos, desnaturação a 94°C por 2 minutos, anelamento dos *primers* a 55°C e extensão a 72°C por um minuto e 30 segundos. Posteriormente procedeu-se a um segundo ciclo de desnaturação a 94°C por 2 minutos, anelamento dos *primers* a 53°C e extensão a 72°C por um minuto e 30 segundos. No terceiro ciclo a temperatura de anelamento foi reduzida para 51°C, e seguiu-se com mais 37 ciclos com estes últimos parâmetros. Após completar os 40 ciclos, os tubos foram incubados a 72°C por sete minutos antes de resfriar a 4°C. A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese em gel de agarose 2% e corado com Saber Safe.

Linhagens de *S. aureus* toxigênicas de referência internacional foram utilizadas como controle positivo, incluindo ATCC 51650 (*tst*), ATCC 13565 (*sea*), ATCC 14458 (*seb*), ATCC 19095 (*sec*), ATCC 23235 (*sed*), ATCC 27664 (*see*, *seg* e *sei*) e ATCC 51811 (*seh*). Para controle negativo foi utilizada a linhagem *S. xyloso* ATCC 29971.

Extração de RNA

A extração de RNA foi efetuada utilizando o *kit* Illustra RNAspin Mini (GE Healthcare), e consistiu na digestão inicial das células de estafilococos com tampão TE (10mM de Tris, 1mM EDTA [pH 8,0]) contendo 2 mg/mL de lisozima. Adicionaram-se a seguir 350 μ L de Buffer RA1 e 3,5 μ L de β -mercaptoetanol. A amostra foi filtrada em filtros RNAspin Mini Filter units e em seguida adicionaram-se 350 μ L de etanol 70%. Nesta etapa, a amostra foi transferida para os filtros RNAspin Mini Column para ajustar as condições de ligação no filtro, e logo em seguida adicionaram-se 350 μ L de MDB (*membrane desalting buffer*) para ocorrer a ligação do RNAm na membrana do filtro. Na sequência realizaram-se duas etapas de lavagem com 600 μ L e 250 μ L de Buffer RA3 e em seguida o RNAm foi eluído em 45 μ L de H₂O RNA-*free* acrescido de 5 μ L de RNA guard.

Logo em seguida realizou-se o tratamento do RNAm com DNase para eliminar qualquer contaminação com DNA. O tratamento de 8 μ L de RNAm se iniciou adicionando 2 μ L de DNase Buffer e 2 μ L de DNase e incubando a 37°C por 60 minutos. Logo a seguir adicionaram-se 2 μ L de Stop DNase, incubando-se a 65°C por 10 minutos.

Obtenção do cDNA

Após o tratamento com DNase, a amostra de RNAm foi convertida a cDNA. Adicionaram-se a amostra de RNAm tratada com DNase (12 μ L), 1 μ L de *random primer* a 75 ng/ μ L, juntamente com 6 μ L de água nuclease-*free* e 1 μ L de dNTP (200 μ M de desoxirribonucleotídeos trifosfatados). Em seguida, a mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos para desnaturação do RNA e ligação do *primer*. Posteriormente adicionaram-se à mistura 4 μ L do tampão para a transcriptase reversa (5X First-Strand Buffer), 1 μ L de dietiltreitol (DTT) e 1 μ L

de SuperScript™ III (200 U/μL) e levou-se a mistura ao termociclador PTC-100 MJ Research. Para obtenção do cDNA, foram utilizados ciclos de 25°C por 5 minutos, 50°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos, resfriando-se em seguida a 4°C. Para o controle interno da extração de RNA foi realizada a pesquisa de RNA ribossômico 16S com os *primers* 16S1 e 16S2 (Tabela 1), que corresponde a regiões do gene RNAr que são conservadas entre os estafilococos e específicas do gênero. O cDNA obtido foi submetido à amplificação pela técnica de PCR e eletroforese para visualização dos produtos amplificados.

Detecção do gene *rpob*

As amostras positivas na pesquisa do RNAm dos genes de superantígenos foram submetidas a detecção do gene *rpob* que codifica a subunidade β da RNA polimerase para a confirmação da espécie de ECN através do sequenciamento da região amplificada. As reações foram realizadas utilizando os primers *rpob1418f* e *rpob3554r* (Tabela 1) e consistiram em 25 μL contendo 10 pmol de cada *primer*, 2,5 U de Taq DNA polimerase, 200 μM de desoxirribonucleotídeos trifosfatados, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 0,75 mM de MgCl₂ e 3 μL de DNA. A incubação foi realizada em termociclador PTC-100 MJ Research empregando-se os seguintes parâmetros: um primeiro ciclo a 94°C por cinco minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento dos *primers* a 52°C por um minuto e extensão a 72°C por um minuto e 30 segundos; o final dos 35 ciclos foi seguido de uma extensão a 72°C por dez minutos. A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 2% e corado com Saber Safe.

Determinação do grupo *agr*

Submeteram-se ao método de tipagem do grupo *agr* por reações de PCR, descrito por Li *et al.* [10], as amostras de ECN positivas na pesquisa do RNAm dos genes de superantígenos pela técnica de *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR). Foram realizadas reações com os primers *agrA*, *agrB* e *agrC* (Tabela 1), consistindo em 25 µL contendo 10 pmol de cada *primer*, 2,5 U de Taq DNA polimerase, 200 µM de desoxirribonucleotídeos trifosfatados, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 0,75 mM de MgCl₂ e 3 µL de DNA. A incubação foi realizada em termociclador PTC-100 MJ Research empregando-se os seguintes parâmetros: um primeiro ciclo a 94°C por cinco minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos *primers* a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por um minuto; o final dos 35 ciclos foi seguido de uma extensão a 72°C por sete minutos. A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 2% e corada com Saber Safe.

O *primer agrA* corresponde a uma região conservada comum aos grupos *agrI*, *agrII* e *agrIII*. O *primer agrB* amplifica uma região hipervariável com sequência comum aos grupos *agrII* e *agrIII* e o *primer agrC* é específico apenas para a região correspondente ao grupo *agrII*.

Sequenciamento

Os amplicons de cada gene que confirmaram a expressão de toxinas pela técnica RT-PCR, juntamente com o amplicom da região *rpob* da respectiva espécie de ECN, foram submetidos à purificação utilizando o kit GFX PCR e Gel Band Purification (GE Healthcare) para posterior sequenciamento em sequenciador de DNA ABI (Applied Biosystems) Prism model 377. O programa Mega 5.2 foi utilizado para alinhar as sequências de nucleotídeos, que foram analisadas

no GenBank usando a ferramenta Blast para comparar as sequências de enterotoxinas obtidas nesse estudo com as sequências publicadas de *S. aureus*.

Análise por PFGE

As amostras de ECN positivas pela técnica de RT-PCR foram submetidas à análise do perfil clonal pela técnica de Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), segundo o protocolo modificado de McDougal *et al.* [17]. As amostras foram cultivadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion) e incubadas a 37°C por 24h. Centrifugaram-se em microtubo, a 12.000 rpm por um minuto, 200 µL da amostra de ECN. Depois de desprezado o sobrenadante, foram adicionados 150 µL de solução TE (10 mM de Tris, 1 mM EDTA [pH 8,0]) com agitação em vórtex até a completa dissolução do *pellet* formado. As amostras foram mantidas em banho-maria por 10 minutos a 37°C. Foram acrescidas de 2,5 µL de lisostafina (1 mg/mL) por amostra e agitadas em vórtex. Após a adição de lisostafina, acrescentaram-se 150 µL de agarose *low melting*, e as amostras foram imediatamente adaptadas nos moldes para plugues até solidificarem, quando então foram colocadas em 2 mL de solução EC (6 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 100 mM EDTA, 0,5% Brij-58, 0,2% desoxicolato de sódio, 0,5% laurilsarcosila sódica) e incubadas a 37°C por um mínimo de 4 horas. O EC foi retirado e os plugues foram lavados quatro vezes com 2 mL de TE à temperatura ambiente por meia hora. Para a restrição do DNA genômico utilizaram-se 2 µL da enzima *SmaI* (Fast Digest *SmaI*, Fermentas Life Science, Canadá) para *Staphylococcus*. A restrição foi realizada em placa de 96 poços adicionando-se primeiramente o tampão enzimático (45 µL de água milli Q e 5 µL do tampão enzimático por amostra) deixando a placa na geladeira por 30 minutos. Em seguida, retirou-se o tampão sem enzima e adicionou-se o tampão com a enzima (43 µL de água milli Q, 5 µL do tampão enzimático e 2 µL da enzima por amostra), deixando a

placa na estufa a 37°C por 6 minutos segundo especificações do fabricante. A eletroforese foi executada em aparelho CHEF-DR III System (BioRad Laboratories, EUA) em gel de agarose a 1% preparado com TBE 0,5 M (1 g em 100mL de água milli Q) (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad Laboratories, EUA) sob as seguintes condições: intervalos de tempo de pulso de 5 a 40 segundos por 21 horas; em rampa linear; 6 V/cm; ângulo de 120°; 14°C; 2,2 L de 0,5 M de TBE como tampão de corrida. Foi utilizado Lambda Ladder PFG Marker (New England BioLabs) como marcador molecular. Os géis foram corados com GelRed (400 mL de água destilada e 30 µL de GelRed 10.000 X em água, Biotium, EUA) por 1 hora, e fotografados sob transiluminação UV. Para análise de similaridade foi utilizado o software BioNumerics (versão 7.0; Applied Maths, Bélgica), cálculo dos coeficientes de correlação Dice e criação do dendrograma pelo método UPGMA (*unweighted pair group method using arithmetic averages*). A tolerância da posição das bandas e a otimização foram ajustadas para 1.25 e 1% respectivamente. Um coeficiente de similaridade de 80% foi escolhido para determinação dos *clusters*.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados nas técnicas de PCR para a detecção de genes de enterotoxinas estafilocócicas, *agr*, RNAr 16S, sequencias 16S e 23S e gene *rpoB*.

Primer	Sequencia de nucleotídeos 5'a 3'	Pb	Produto
<i>sea1</i>	TTGGAAACGGTTAAAACGAA	123	Enterotoxina A
<i>sea2</i>	GAACCTTCCCATCAAAAACA		
<i>seb1</i>	TCGCATCAAACCTGACAAACG	478	Enterotoxina B
<i>seb2</i>	GCAGGTA CTCTATAAGTGCC		
<i>sec-11</i>	GACATAAAAGCTAGGAATTT	257	Enterotoxina C
<i>sec-12</i>	AAATCGGATTAACATTATCC		
<i>sed1</i>	CTAGTTTGGTAATATCTCCT	317	Enterotoxina D
<i>sed2</i>	TAATGCTATATCTTATAGGG		
<i>see1</i>	CAAAGAAATGCTTTAAGCAATCTTAGGCCAC	482	Enterotoxina E
<i>see2</i>	CTTACCGCCAAAGCTG		
<i>seg1</i>	AATTATGTGAATGCTCAACCCGATC	642	Enterotoxina G
<i>seg2</i>	AAACTTATATGGAACAAAAGGTA CTAGTTC		
<i>seh1</i>	CAATCACATCATATGCGAAAGCAG	375	Enterotoxina H
<i>seh2</i>	CATCTACCCAAACATTAGCACC		
<i>sei1</i>	CTCAAGGTGATATTGGTGTAGG	576	Enterotoxina I
<i>sei2</i>	AAAAAACTTACAGGCAGTCCATCTC		
<i>tsst1</i>	ATGGCAGCATCAGCTTGATA	350	TSST-1
<i>tsst2</i>	TTTCCAATAACCACCCGTTT		
<i>agrA1</i>	GCTGCAACCAAGAAACAACC	1022	<i>agrI, II, III</i>
<i>agrA2</i>	CGTGTATTCATAATATGCTTCGATT		
<i>agrB1</i>	TATGCAAGCCAAGCACTTGT	453	<i>agrIII</i>
<i>agrB2</i>	GTGCGAAAGCCGATAACAAT		
<i>agrC1</i>	CCTTGGCTAGTACTACACCTTC	615	<i>agrII</i>
<i>agrC2</i>	GTGCTTGGCTTGATAAACA		
<i>RNAr16S 1</i>	CCTATAAGACTGGGATAACTTCGGG	791	RNAr 16S
<i>RNAr16S 2</i>	CTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCG		
<i>G1</i>	GAAGTCGTAACAAGG		16S
<i>L1</i>	CAAGGCATCCACCGT	-	23S
<i>rpoB1418f</i>	CAATTCATGGACCAAGC	899	RNA polimerase B
<i>rpoB1418f</i>	CCGTCCCAAGTCATGAAAC		

Fonte: Johnson *et al.*[15], Jarraud *et al.*[18], Li *et al.* [10]Mason *et al.*[19], Couto *et al.* [14], Mellmann *et al.*[20].

RESULTADOS

Identificação das Amostras

A identificação dos ECN pelo método bioquímico detectou 223 (74,3%) *S. epidermidis*, 27 (9,0%) *S. haemolyticus*, 22 (7,3%) *S. hominis*, 14 (4,7%) *S. warneri*, 9 (3,0%) *S. lugdunensis* e 5 (1,7%) *S. capitis*. Já a técnica genotípica (ITS-PCR) identificou 223 (74,3%) *S. epidermidis*, 29 (9,7%) *S. haemolyticus*, 23 (7,7%) *S. hominis*, 11 (3,7%) *S. warneri*, 9 (3,0%) *S. lugdunensis* e 5 (1,7%) *S. capitis*. Houve concordância de 98% entre os dois métodos utilizados para a identificação das espécies de ECN.

Deteccão dos genes de superantígenos

Os genes das enterotoxinas estafilocócicas e TSST-1 foram pesquisados nas 300 amostras de ECN em estudo, e 90,7% dos ECN foram positivos para pelo menos um gene pesquisado. Entre todos os ECN, o gene *sea* foi detectado em 172 (57,3%) amostras, o *seb* em 70 (23,3%), o *sec-1* em 105 (35,0%), o *sed* em 7 (2,3%), o *see* em 8 (2,7%), o *seg* em 188 (62,7%), o *seh* em 39 (13,0%), o *sei* em 200 (66,7%) e o *tst* em 15 (5,0%).

A distribuição dos genes das enterotoxinas estafilocócicas e TSST-1 entre as espécies de ECN estudadas está apresentada na Tabela 2. Também foi realizada a combinação entre os genes de superantígenos, para determinação da presença concomitante dos genes em amostras de ECN (Figura 1).

Tabela 2. Determinação dos genes das enterotoxinas e TSST-1 entre as espécies de estafilococos coagulase-negativa isoladas de hemocultura

Genes (N)	<i>S. epidermidis</i>		<i>S. haemolyticus</i>		<i>S. hominis</i>		<i>S. warneri</i>		<i>S. lugdunensis</i>		<i>S. capitis</i>	
	(223)	(29)	(23)	(11)	(9)	(5)	N	%	N	%	N	%
<i>sea</i> (172)	120	69,8	22	12,8	17	9,9	7	4,1	2	1,2	4	2,3
<i>seb</i> (70)	45	64,3	11	15,7	10	14,3	4	5,7	0	0	0	0
<i>sec-1</i> (105)	73	69,5	9	8,6	11	10,5	4	3,8	6	5,7	2	1,9
<i>sed</i> (7)	5	71,4	1	14,3	0	0	1	14,3	0	0	0	0
<i>see</i> (8)	4	50,0	2	25,0	1	12,5	1	12,5	0	0	0	0
<i>seg</i> (188)	131	69,7	22	11,7	19	10,1	7	3,7	4	2,1	5	2,7
<i>seh</i> (39)	24	61,5	7	17,9	5	12,8	1	2,6	2	5,1	0	0
<i>sei</i> (200)	144	72,0	18	9,0	20	10,0	7	3,5	7	3,5	4	2,0
<i>tst</i> (15)	11	73,3	1	6,7	1	6,7	0	0	1	6,7	1	6,7

N: número de amostras

<i>sea</i>	172									
<i>seb</i>	50	70								
<i>sec-1</i>	62	27	105							
<i>sed</i>	7	3	2	7						
<i>see</i>	7	2	2	0	8					
<i>seg</i>	134	59	69	6	6	188				
<i>seh</i>	28	11	13	0	0	24	39			
<i>sei</i>	134	54	71	6	6	122	32	200		
<i>tst</i>	5	0	10	0	0	2	2	9	15	
	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec-1</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>	<i>seg</i>	<i>seh</i>	<i>sei</i>	<i>tst</i>	

Figura 1. Combinações entre os genes de enterotoxinas estafilocócicas e TSST-1 detectados entre as amostras de ECN isoladas de hemocultura. As lacunas sombreadas representam o número total de genes detectados entre os ECN.

Deteccão do RNAm de genes de superantígenos em amostras de ECN

As amostras que eram positivas para os genes de superantígenos foram submetidas a técnica de RT-PCR para deteção do RNAm. Cinco amostras de *S. epidermidis* foram positivas para a deteção do RNAm transcritos de genes de enterotoxinas, sendo uma positiva para *sea*, duas para *sec-1*, uma para *sei*, e uma amostra que foi positiva para o RNAm dos genes *seg* e *sei* concomitantemente (Tabela 3).

Sequenciamento das amostras produtoras de enterotoxinas estafilocócicas

Os fragmentos amplificados referentes aos RNAm de enterotoxinas estafilocócicas detectados nas amostras de *S. epidermidis* apresentaram identidade de 98% a 100% com nucleotídeos de genes de enterotoxinas de *S. aureus* já publicadas no GenBank. A sequência do gene *sea* apresentou 100% de identidade com a sequência do gene da enterotoxina A de *S. aureus* e de *S. caprae*; as sequências do gene *sec-1* encontrados em *S. epidermidis* apresentaram 98% de identidade com *S. aureus*; as sequências dos genes *seg* e *sei* apresentaram 99% de identidade com *S. aureus*. Os genes *rpob* das cinco amostras que expressaram o RNAm foram amplificados e sequenciados para a confirmação da espécie *S. epidermidis* e a análise dessas sequências comprovou o valor de identidade de 98% e 99% com sequências de *S. epidermidis* já publicadas. Todas as sequências obtidas foram submetidas ao depósito no GenBank (Tabela 3).

Tabela 3. Amostras de *S. epidermidis* que expressaram RNAm para genes de enterotoxinas, comparação da similaridade com sequências no GenBank e número de submissão da sequência no GenBank.

Amostra	Gene	Identidade			N ^o de submissão no GenBank
		%	microrganismo		
H-1006/91	<i>seg</i>	99	<i>S. aureus</i>	[GenBank: AF064773.1]	[ID: 1693592]
H-1006/91	<i>sei</i>	99	<i>S. aureus</i>	[GenBank: AY920268.1]	[ID: 1693610]
H-1006/91	<i>rpob</i>	99	<i>S. epidermidis</i>	GenBank: KF113507.1]	[ID:1694087]
H-802/93	<i>sei</i>	99	<i>S. aureus</i>	[GenBank: AB060537.1]	[ID: 1693577]
H-802/93	<i>rpob</i>	99	<i>S. epidermidis</i>	[GenBank: KF113505.1]	[ID:1694082]
H-295/96	<i>sea</i>	100	<i>S. aureus</i>	[GenBank: L22566.1]	[ID:1685866]
		100	<i>S. caprae</i>	[GenBank:DQ641635.1]	
H-295/96	<i>rpob</i>	99	<i>S. epidermidis</i>	[GenBank: KF113507.1]	[ID: 1694083]
H-192/03	<i>sec-1</i>	98	<i>S. aureus</i>	[GenBank: X05815.1]	[ID:1694080]
H-192/03	<i>rpob</i>	99	<i>S. epidermidis</i>	[GenBank: KF113505.1]	[ID:1694088]
H-477/09	<i>sec-1</i>	98	<i>S. aureus</i>	[GenBank: GQ461752.1]	[ID:1694078]
H-477/09	<i>rpob</i>	99	<i>S. epidermidis</i>	[GenBank: KF113505.1]	[ID:1694089]

GenBank: National Center for Biotechnology Information; **ID:** Identidade.

Detecção do Sistema *agr* em amostras de *S. epidermidis* positivas para a pesquisa de RNAm de enterotoxinas

Os grupos *agr* I, II e III foram pesquisados em todas amostras de *S. epidermidis*, e a sua expressão foi pesquisada nas amostras produtoras de enterotoxinas (Figura 2). Dos 223 *S.*

epidermidis estudados, foram detectados em 143 (64,1%) o *agr* tipo I, em 53 (23,7%) o tipo II, e em 4 (1,8%) o tipo III. Em 23 (10,3%) *S. epidermidis* não se detectou o lócus *agr*.

As amostras de *S. epidermidis* positivas para expressão dos gene *sea*, *sec-1* e *sei* apresentaram *agr* tipo I. Já as que expressaram o gene *sec-1* apresentaram *agr* tipo II. Das 5 amostras, apenas as 2 que apresentaram *agr* tipo II expressaram este lócus.



Figura 2. Eletroforese em gel de agarose para pesquisa dos genes *agrA* (1022 pb), *agrB* (453 pb) e *agrC* (615pb) em amostras de *S. epidermidis* pela técnica de PCR. 1, 4 e 7: amostras positivas para *agrA*; 8: amostra positiva para *agrB*; 9: amostra positiva para *agrC*; 2,3,5 e 6: amostras negativas; 10: marcador de peso molecular (100 bp).

Determinação do Perfil Clonal em amostras de *S. epidermidis* produtoras de enterotoxinas

A tipagem das amostras de *S. epidermidis* que expressaram genes de enterotoxinas revelou taxas de similaridades muito abaixo do valor de coeficiente estabelecido (80%) para determinação de *clusters*, não sendo considerados *S. epidermidis* com o mesmo perfil clonal (Figura 3).

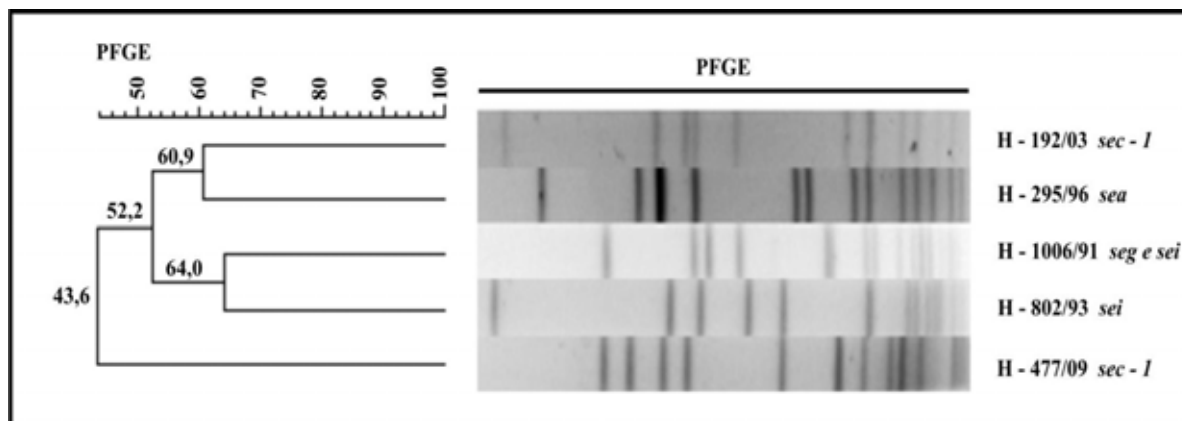


Figura 3. Determinação do perfil clonal de amostras de *S. epidermidis* produtoras de enterotoxinas isoladas de hemoculturas.

DISCUSSÃO

Os estafilococos coagulase–negativos são os microrganismos mais frequentemente isolados de materiais clínicos e os principais causadores de bacteremias hospitalares, especialmente em pacientes imunossuprimidos. Sua capacidade de colonizar a pele humana e disseminar-se no organismo durante uma infecção decorre de sua capacidade de produzir fatores de virulência, tais como as enterotoxinas estafilocócicas. Neste trabalho, foram estudadas 300 amostras de ECN isoladas de hemocultura provenientes de pacientes do Hospital das Clínicas de Botucatu em um período de 20 anos para a pesquisa de genes de superantígenos estafilocócicos e da expressão desses fatores de virulência, e para a detecção do locus *agr*.

Entre as espécies identificadas, *S. epidermidis* foi a mais frequentemente isolada, representando 74,3% das amostras. As demais espécies, embora isoladas em menor frequência, são de grande importância clínica, podendo causar sérias infecções. Alguns autores revelam que *S. epidermidis* é isolado em 74 a 92% dos pacientes com infecções adquiridas no ambiente hospitalar [21]. *S. epidermidis* é o microrganismo mais isolado em infecções, sendo o mais frequente em infecções relacionadas a procedimentos invasivos, como o implante de cateteres

periféricos e centrais [22]. Semelhantemente aos nossos dados, *S. haemolyticus* é considerada a segunda espécie de ECN mais frequentemente isolada em hemoculturas, podendo ser causa de várias infecções como sepse, peritonites, otites, e infecções do trato urinário [23]. Tem-se relatado *S. hominis* em casos de bacteremia [24], e *S. warneri*, *S. capitis* e *S. lugdunensis* como causa de sérias infecções, como a endocardite [25,26,27].

Detectaram-se os genes das enterotoxinas estafilocócicas (*sea* a *sei*) e da toxina 1 da síndrome do choque tóxico (*tst*), sendo que 90,7% dos ECN apresentaram pelo menos um dos genes pesquisados. A espécie *S. epidermidis* foi a que apresentou a maior porcentagem desses genes, seguida de *S. haemolyticus* e *S. hominis*. A maior frequência de genes de superantígenos em *S. epidermidis* revela a importância dessa espécie que pode estar implicada na etiologia de infecções graves. Além de ser a principal colonizadora da microbiota humana, a pressão seletiva dentro do ambiente hospitalar, com o uso de antimicrobianos e desinfetantes, pode favorecer a persistência das cepas mais resistentes e virulentas. Em estudo anterior realizado neste mesmo hospital, Cunha *et al.* [16] pesquisaram os genes das enterotoxinas A a D e TSST-1 em linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de amostras clínicas provenientes de recém nascidos, e a técnica de PCR detectou 40% de ECN positivos para pelo menos um gene das enterotoxinas pesquisadas. Posteriormente as mesmas amostras foram submetidas à detecção dos genes *see*, *seg*, *seh* e *sei* e 32,2% dos ECN foram positivos para pelo menos um dos genes [28].

Entre os genes das enterotoxinas clássicas (*sea* a *see*) o gene *sea* foi o mais detectado, e foi positivo na pesquisa do RNAm em uma amostra de *S. epidermidis*, apresentando 100% de identidade com sequências do gene da enterotoxina A de *S. aureus* [GenBank: L22566.1] e *S. caprae* [GenBank:DQ641635.1]. Nos estudos realizados por Calsolari *et al.* [29], encontraram-se genes das enterotoxinas clássicas em 49 das 90 amostras de ECN estudadas, sendo o gene *sea*

encontrado em 18,6% destas amostras. Neste trabalho esse gene foi encontrado concomitantemente com os outros genes em alto número de combinações. O gene *sea* é carregado em profago [30], podendo ser mais facilmente disseminado entre as linhagens de *Staphylococcus*. Seu produto, a enterotoxina A, é a mais relacionada a intoxicações alimentares por ser tóxica em baixas concentrações [31].

O gene *sec-1* foi o segundo mais detectado entre as enterotoxinas clássicas, positivo em duas amostras de *S. epidermidis* pela técnica de RT-PCR, que confirmaram 98% de identidade com os gene de *S. aureus* [GenBank: GQ461752.1] e [GenBank: X05815.1] na análise do sequenciamento. O gene *sec* é cromossômico, está localizado em ilhas de patogenicidade e apresenta três subtipos (*sec-1*, *sec-2* e *sec-3*), classificados com base nas diferenças antigênicas e no hospedeiro com o qual eles estão associados. Alguns estudos sugerem que a heterogeneidade da enterotoxina C está relacionada à seleção das sequências do gene *sec*, que facilitam a sobrevivência de estafilococos em seus respectivos hospedeiros [31, 32].

Os demais genes das enterotoxinas clássicas, *seb*, *sed* e *see* foram detectados em menores porcentagens, e não foi comprovada a expressão desses genes. O gene *seb* é cromossômico em isolados clínicos de *S. aureus* [33], e seu produto, a enterotoxina B, está relacionada à intoxicação alimentar, e por causar efeitos tóxicos em pequenas quantidades já foi estudada nos Estados Unidos durante a década de 1960 como possível incapacitante em programa de guerra biológica, causando febre, dificuldade respiratória grave, cefaléia, e por vezes náuseas e vômitos quando inalada [34]. O gene *sed* está localizado no plasmídio pIB485 [35] e a enterotoxina D é a segunda mais relacionada a intoxicação alimentar [31], sendo esta enterotoxina, em pequena quantidade, capaz de causar doença principalmente em crianças e idosos [36,37]. O gene *see* também foi detectado em baixa porcentagem, sendo pouco encontrado no trabalho realizado por Vasconcelos

et al. [28], que descreveram esse gene em 7,8% das amostras de ECN isoladas de materiais clínicos proveniente de crianças internadas em UTI neonatal. O gene *see* está localizado em profago e alguns estudos comprovam que os genes *see* e *sea* estão altamente relacionados, apresentando sequências de 81% de homologia [31,38]. Embora os genes *sea* e *see* sejam carregados em profagos e apresentem altas taxas de homologia entre as sequências, o gene *sea* foi o mais detectado no estudo entre as enterotoxinas estafilocócicas clássicas e foi comprovada a sua expressão em uma amostra, ao contrário do gene *see* que foi detectado apenas em cinco amostras de ECN, e não houve expressão desse gene.

Neste estudo, os genes das enterotoxinas estafilocócicas *seg* e *sei* foram os mais detectados, estando presentes em 62,7% e 66,7% dos ECN. Esses genes foram altamente correlacionados e coexistentes em grande número entre as combinações realizadas com outros genes. Vasconcelos *et al.* [28] detectaram os genes *seg* e *sei* em porcentagem menor (12,2% e 22,2%) nas amostras de ECN, mas descreveram a presença concomitante desses genes. Segundo Jarraud *et al.* [39], os genes *seg* e *sei* coexistem em um mesmo elemento genético (*cluster egc*), arranjados em uma orientação em tandem e são co-expressados, juntamente com os genes *sem*, *sen* e *seo*. Em um estudo realizado por Varshney *et al.* [40] os genes *seg* e *sei* apresentaram prevalência de 44% e 46% em amostras de *S. aureus* isolados de hemoculturas, e o *cluster egc* completo foi detectado em 10% destas amostras. Os RNAm dos genes *seg* e *sei* foram detectados concomitantemente em uma amostra de *S. epidermidis* e do RNAm do gene *sei* isolado em outra amostra de *S. epidermidis*. O sequenciamento desses genes revelou 99% de identidade com os genes de *S. aureus* ([GenBank: AF064773.1], [GenBank: AY920268.1] e [GenBank: AB060537.1])

Os genes *seh* e *tst* foram detectados respectivamente em 13% e 5% das amostras, porém não foram expressos. Segundo alguns autores, o produto do gene *seh*, a enterotoxina H, é capaz de causar intoxicação alimentar e sintomas similares aos da TSST-1, toxina codificada pelo gene *tst*. A TSST-1 é a principal causa da síndrome do choque tóxico e também responsável pela síndrome da morte súbita infantil e pela síndrome de Kawasaki [41,42].

O locus *agr* foi pesquisado nas amostras de *S. epidermidis* apresentando três grupos distintos. A maior porcentagem foi *agrI*, seguido dos grupos *agrII* e *agrIII*, e resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos [10,43]. Segundo Li *et al.*[10], os polimorfismos encontrados no locus *agr* estão associados à patogenicidade, sendo o *agrI* relacionado a *S. epidermidis* patogênicos, isolados de hemoculturas e cateteres e o *agrII* e *agrIII* relacionados à *S. epidermidis* isolados de indivíduos saudáveis. Segundo alguns autores, as variantes dentro do locus *agr* podem ter sido selecionadas durante a evolução, representando um determinante fundamental na divergência das cepas, e constituir adaptações a diferentes microambientes em locais especializados de infecções [6,10].

Entre as amostras que expressaram os genes de enterotoxinas, detectaram-se os genes do grupo *agrI* e do grupo *agrII*. A amostra que expressou o gene *sea* apresentou o *agr I*, mas não foi detectada a presença do RNAm desse locus. A enterotoxina A é produzida no início da fase exponencial e sua expressão não é regulada pelo gene regulador acessório, diferentemente das enterotoxinas B, C e D, que dependem do sistema *agr* para a máxima expressão [31, 44]. As amostras que expressaram os genes *seg* e *sei* também apresentaram o grupo *agrI*, mas o RNAm desse locus não foi detectado. Já nas duas amostras que expressaram o gene *sec-I*, foi detectado o grupo *agrII*, que foi positivo para a presença do RNAm, podendo esse locus estar relacionado a expressão da enterotoxina C em *S. epidermidis*. Em estudo realizado por Regassa *et al.* [45] o

locus *agr* foi um dos determinantes para a máxima expressão do gene *sec* em *S. aureus*, sendo o nível de RNAm diminuído em 2 ou 3 vezes quando a cepa era *agr* negativa. *S. epidermidis* é considerado um microrganismo versátil, que pode empregar sofisticados mecanismos de regulação gênica para uma rápida adaptação de seu metabolismo às mudanças externas, para escapar da resposta imune do hospedeiro e para a comunicação com outras células presentes num mesmo ambiente [46].

As amostras de *S. epidermidis* que expressaram os genes de enterotoxinas foram submetidas à técnica de PFGE para determinação do perfil clonal e não houve similaridades entre essas amostras, evidenciando uma diversidade entre cepas de *S. epidermidis* isoladas do mesmo hospital capazes de expressar genes de toxinas. É de grande importância o isolamento dessas cepas de *S. epidermidis* em hemoculturas, pois tais bactérias podem agravar as infecções causadas por esses microrganismos em decorrência de sua capacidade de expressar superantígenos similares aos produzidos por *S. aureus*. Alguns autores associaram o desenvolvimento da artrite séptica com a ação das enterotoxinas, sugerindo que a ativação da resposta inflamatória exagerada desencadeie grande liberação de citocinas, que ativam grande quantidade de células T e macrófagos, lesando o tecido [47,48]. A ação das enterotoxinas também é descrita em sepses, osteomielites e sinusites [49], ressaltando a importância das bactérias capazes de produzir essas toxinas, e principalmente a disseminação desses patógenos no ambiente hospitalar.

Neste estudo, foi de grande importância a comprovação da capacidade de produção de enterotoxinas por ECN isolados de materiais clínicos de humanos, pois além de existirem poucos trabalhos com este enfoque [16,28,29], alguns autores ainda questionam o potencial de produção de enterotoxinas por ECN, sugerindo que há erros durante a identificação das espécies ou na

detecção dessas toxinas [50,51]. O sequenciamento dos genes de enterotoxinas em *S. epidermidis* comprovou sequências muito similares às de *S. aureus* e o sequenciamento do gene *rpob* também confirmou a identificação de *S. epidermidis* realizadas pelo método bioquímico e pela técnica de ITS-PCR.

A similaridade entre os genes de enterotoxinas de *S. epidermidis* e *S. aureus* pode sugerir a transferência de genes entre diferentes espécies do gênero *Staphylococcus*. Segundo alguns autores, a transferência dos genes de enterotoxinas entre espécies de *Staphylococcus* está associada à presença de elementos genéticos móveis, como ilhas de patogenicidade, plasmídeos e presença de bacteriófagos [52,53], entretanto existe um custo metabólico para a expressão e manutenção desses genes. O pequeno número de amostras expressando as toxinas em relação à maior frequência de genes pode ser explicado pelo fato de *S. epidermidis* manter baixo nível de virulência devido ao processo adaptativo que mantém com o hospedeiro. Segundo Massey *et al.*[54], a evolução pode favorecer as espécies que oferecem pouco ou nenhum dano, para que ocorra uma infecção prolongada favorecendo o potencial de transmissão de um hospedeiro para outro.

CONCLUSÕES

Este trabalho comprovou que amostras clínicas de ECN são reservatórios de genes de enterotoxinas, estando esses genes mais associados à espécie *S. epidermidis*, que também mantém um sistema de regulação que permite a expressão desses genes.

Os resultados referentes à toxigenicidade e regulação gênica em *S. epidermidis* isolados de hemoculturas ressaltam a importância da correta identificação de ECN associados às bacteremias nosocomiais, para que haja maior cuidado na interpretação das hemoculturas positivas para esses

microrganismos e melhora das estratégias de tratamento e controle das infecções causadas por ECN.

LISTA DE ABREVIACÕES

ECN: Estafilococos coagulase–negativos

agr: accessory gene regulator

TSST-1: toxina 1 da síndrome do choque tóxico

MHC II: molécula da classe II do complexo principal de histocompatibilidade

TCR: receptor de antígeno da célula T

IL-1: interleucina I

IL-2: interleucina II

IFN- γ : interferon gama

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

P2: promotor 2

P3: promotor 3

AIP: polipeptídeo autoindutor

RNA_m: RNA mensageiro

UNESP: Universidade Estadual Paulista

ITS-PCR: *internal transcribed spacer–polymerase chain reaction*

ATCC: *American type culture collection*

PCR: *polymerase chain reaction*

MDB: *membrane desalting buffer*

dNTP: desoxirribonucleotídeos trifosfatados

DTT: dietiltreitol

RT-PCR: *reverse transcription polymerase chain reaction*

PFGE: *pulsed-field gel electrophoresis*

BHI: *brain heart infusion*

UTI: unidade de tratamento intensivo

CONFLITO DE INTERESSES

Não há conflito de interesses.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo (FAPESP – Processo: 2011/23742-2) e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq- Processo: 470649/2011-9) pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Kloos WE, Bannerman TL: ***Staphylococcus and Micrococcus***. In *Manual of Clinical Microbiology*. 6th edition. Edited by Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. Washington: American Society Microbiology; 1999:264-282.
2. Rowlinson MC, LeBourgeois P, Ward K, Song Y, Finegold SM, Bruckner DA: **Isolation of a Strictly Anaerobic Strain of *Staphylococcus epidermidis***. *J Clin Microbiol* 2006, **44**(3):857-860.
3. Grice EA, Segre JA: **The Skin Microbiome**. *Nat Rev* 2011,**9**:244-253.

4. Otto M: **Virulence factors of the coagulase-negative Staphylococci.** *Front Biosci* 2004, **9**:841-863.
5. Marrack P, Kappler J: **The staphylococcal enterotoxins and their relatives.** *Science* 1990, **248**:705-717.
6. Novick R, Geisinger E: **Quorum Sensing in Staphylococci.** *Annu Rev Genet* 2008, **42**:541-564.
7. McCulloch JA: **Avaliação da funcionalidade do locus *accessory gene regulator (agr)* em cepas de *Staphylococcus aureus* brasileiras com susceptibilidade reduzida aos glicopeptídeos.** *Tese.* Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmaceuticas; 2006.
8. Novick RP, Jiang D: **The staphylococcal *saeRS* system coordinates environmental signals with *agr* quorum sensing.** *Microbiol* 2003, **149**:2709-2717.
9. Huy YH: *Foodborne disease handbook-diseases caused by bacteria.* New York: Marcel Dekker; 1994.
10. Li M, Guan M, Jiang XF, Yuan FY, Xu M, Zhang WZ, Lu Y: **Genetic polymorphism of the accessory gene regulator (*agr*) locus in *Staphylococcus epidermidis* and its association with pathogenicity.** *J Med Microbiol* 2004, **53**:545–549.
11. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC: *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.* 5th edition. Philadelphia: Lippincott; 1997.
12. Cunha MLRS, Sinzato YK, Silveira LVA: **Comparision of methods for identification of Coagulase-negative Staphylococci.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004, **99**:855-860.

13. Barry T, Colleran G, Glennon M, Dunican LK, Gannon F: **The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria.** *PCR Methods Appl* 1991, **1**:51-56.
14. Couto I, Pereira S, Miragaia M, Sanches IS, Lencastre H: **Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by Internal Transcribed Spacer PCR.** *Clin Microbiol* 2001, **39**:3099–3103.
15. Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR, Rozee KR: **Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction.** *J Clin Microbiol* 1991, **29**:426-430.
16. Cunha MLRS, Calsolari RAO, Araújo Jr JP: **Detection of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin 1 genes in *Staphylococcus*, with emphasis on coagulase-negative staphylococci.** *Microbiol Immunol* 2007, **51**:381–390.
17. McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC: **Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the United States: Establishing a National Database.** *J Clin Microbiol* 2003; **41**:5113-20.
18. Jarraud S, Cozon G, Vandenesch F, Bes M, Etienne J, Lina G: **Involvement of enterotoxins G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlet fever.** *J Clin Microbiol* 1999, **37**:2446-2449.
19. Mason W, Blevins JS, Beenken K, Wibowo N, Ojha N, Smeltzer: **Multiplex PCR Protocol for the Diagnosis of Staphylococcal Infection.** *J Clin Microbiol* 2001, **39** (9):3332–3338.

20. Mellmann A, Becker K, von Eiff C, Keckevoet U, Schumann P, Harmsen D: **Sequencing and Staphylococci Identification.** *Emerg Infect Dis* 2006, **12**(2):333-336.
21. Hudome SM, Fisher MC: **Nosocomial infections in the neonatal intensive care.** *Curr Opin Infect Dis* 2001, **14**:303-307.
22. Rogers KL, Fey PD, Rupp ME: **Coagulase-negative staphylococcal infections.** *Infect Dis Clin North Am* 2009, **23**:73–98.
23. Takeuchi F, Watanabe S, Baba T, Yuzawa H, Ito T, Morimoto Y, Kuroda M, Cui L, Takahashi M, Ankai A, Baba S, Fukui S, Lee JC, Hiramatsu K: **Whole-Genome Sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* Uncovers the Extreme Plasticity of Its Genome and the Evolution of Human-Colonizing Staphylococcal Species.** *J Bacteriol* 2005, **187**(21):7292–7308.
24. Chaves F, Alvarez MG, Sanz F, Alba C, Otero JR: **Nosocomial Spread of a *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* Strain Causing Sepsis in a Neonatal Intensive Care Unit.** *J Clin Microbiol* 2005, **43**(9): 4877-4879.
25. Farrag N, Lee P, Gunney R, Viagappan GM: ***Staphylococcus lugdunensis* endocarditis.** *Postgrad Med J* 2001, **77**:259–260.
26. Paula TA, Silva PSL, Berriel LGS: **Endocardite infecciosa por *Staphylococcus capitis* em valva nativa.** *Rev Bras Clin Med* 2009, **7**:438-439
27. Kini GD, Patel K, Parris AR, Tang JS: **Unusual Presentation of Endocarditis Caused by *Staphylococcus warneri*.** *The Open Microbiol J* 2010, **4**:103-105.
28. Vasconcelos NG, Pereira VC, Araújo Jr JP, Cunha MLRS: **Molecular detection of enterotoxins E, G, H and I in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative**

- staphylococci isolated from clinical samples of newborns in Brazil. *J Appl Microbiol* 2011, **111**: 749-762.**
29. Calsolari RAO, Pereira VC, Araújo Jr. JP, Cunha MLRS: **Determination of Toxigenic capacity by reverse transcription polymerase chain reaction in coagulase-negative staphylococci and *Staphylococcus aureus* isolated from newborns in Brazil.** *Microbiol Immunol* 2011, **55**:394-407.
30. Borst DW, Betley MJ: **Phage-associated differences in staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expression correlate with sea allele class.** *Infect Immun* 1994, **62**:113–118.
31. Balaban N, Rasooly A: **Staphylococcal enterotoxins.** *Int J Food Microbiol* 2000, **61**:1–10.
32. Marr JC, Lyon JD, Roberson JR, Lupton M, Davis WC, Bohach GA: **Characterization of novel type C staphylococcal enterotoxins: biological and evolutionary implications.** *Infect Immun* 1993, **61**:4254–4262.
33. Shalita Z, Hertman I, Sand S: **Isolation and characterization of a plasmid involved with enterotoxin B production in *Staphylococcus aureus*.** *J Bacteriol* 1977, **129**:317–325.
34. Ulrich RG, Sidell S, Taylor TJ, Wilhelmsen CL, Franz DR: **Staphylococcal enterotoxin B and related pyrogenic toxins.** In *Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare*. Edited by Sidell FR, Takafugi ET, Franz DR. Washington, DC: TMM Publications; 1997:621-630.
35. Bayles KW, Iandolo JJ: **Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D.** *J Bacteriol* 1989, **171**:4799–4806.
36. Kokan NP, Bergdoll MS: **Detection of low-enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* strains.** *Appl Environ Microbiol* 1987, **53**:2675-2676.

37. Bergdoll MS: *Staphylococcus aureus*. In *Foodborne bacterial pathogens*. Edited by Michael Doyle. New York: Basel; 1989:463-523.
38. Van den Bussche RA, Lyon JD, Bohach GA: **Molecular evolution of the staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxin gene family**. *Mol Phylogenet* 1993, **2**:281–292.
39. Jarraud S, Peyrat MA, Lim A, Tristan A, Bes M, Mouget C, Etienne J, Vandenesch F, Bonneville M, Lina G: **A highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nurse of superantigens in *Staphylococcus aureus***. *J Immunol* 2001, **166**:669-677.
40. Varshney AK, Mediavilla JR, Robiou N, Guh A, Gialanella XWP, Levi MH, Kreiswirth BN, Fries BC: **Diverse Enterotoxin Gene Profiles among Clonal Complexes of *Staphylococcus aureus* Isolates from the Bronx, New York**. *Appl Environ Microbiol* 2009, **75**(21):6839–6849.
41. Vojtov N, Ross HF, Novick RP: **Global repression of exotoxin synthesis by staphylococcal superantigens**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, **99**(15):10102-10107.
42. Ruud HD: **The prevalence of the *Staphylococcus aureus* *tst* gene among community and hospital-acquired strains and isolates from Wegener's Granulomatosis patients**. *FEMS Microbiol Lett* 2005, **245**:185-189.
43. Dufour P, Jarraud S, Vandenesch F, Greenland T, Novick RP, Bes M, Etienne J, Lina G: **High genetic variability of the *agr* locus in *Staphylococcus* species**. *J Bacteriol* 2002, **184**(4):1180-1186.
44. Tremaine MT, Brockman DK, Betley MJ: **Staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expression is not affected by the accessory gene regulator (*agr*)**. *Infect Immun* 1993, **61**:356– 359.

45. Regassa LB, Couch JL, Betley MJ: **Steady-State Staphylococcal Enterotoxin Type C mRNA is Affected by a Product of the Accessory Gene Regulator (*agr*) and by Glucose.** *Infect Immun* 1991, **59**(3):955-962.
46. Schoenfelder SMK, Langea S, Eckart M, Hennig S, Kozytska S, Ziebuhr W: **Success through diversity – How *Staphylococcus epidermidis* establishes as a nosocomial pathogen.** *Int J Med Microbiol* 2010, **300**:380–386.
47. Bremell T, Tarkowski A: **Preferential induction of septic arthritis and mortality by superantigen-producing staphylococci.** *Infect Immun* 1995, **63**:4185-4187.
48. Tarkowski A, Wagner H: **Arthritis and sepsis caused by *Staphylococcus aureus*: can the tissue injury be reduced by modulating the host's immune system?** *Mol Med Today* 1998, **4**:15–18.
49. Michelin AF: **Interação das enterotoxinas estafilocócicas com o sistema imune do hospedeiro.** *Rev Ciênc Farm* 2003, **24**:83-95.
50. Lotter LP, Genigeorgis CA: **Deoxyribonucleic acid base composition and biochemical properties of certain coagulase-negative enterotoxigenic cocci.** *Appl Microbiol* 1975, **29**:152–158.
51. Fox LK, Besser TE, Jackson SM: **Evaluation of a coagulase-negative variant of *Staphylococcus aureus* as a cause of intramammary infections in a herd of dairy cattle.** *J Vet Med Assoc* 1996, **209**:1143–1146.
52. Ibrahim S: **Methicillin Resistance in Staphylococci: Horizontal Transfer of Mobile Genetic Element (*SCCmec*) between Staphylococcal Species.** *Academic dissertation.* National Institute for Health and Welfare, Faculty of Medicine, University of Helsinki, Finland; 2010.

53. Omoe K, Hu DL, Takahashi-Omoe H, Nakame A, Shinagawa K: **Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates.** *FEMS Microbiol Lett* 2005, **246**:191-198.
54. Massey RC, Horsburgh MJ, Lina G, Höök M, Recker M: **The evolution and maintenance of virulence in *Staphylococcus aureus*: a role for host-to-host transmission?** *Nat Rev Microbiol* 2006, **4**:953-958.

Artigo 2 - Microbial Drug Resistance

**ESTAFILOCOCOS COAGULASE-NEGATIVA: ESTUDO DE 20 ANOS DO PERFIL DE
RESISTENCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM ISOLADOS DE HEMOCULTURA DE
UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO**

**Valéria Cataneli Pereira*, Luíza Pinheiro, Carla Ivo Brito, Adilson de Oliveira, Katheryne
Benini Martins, Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha**

**UNESP- Univ Estadual Paulista, Laboratório de Bacteriologia do Departamento de
Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu-SP, Brasil**

*** Autor Correspondente:**

Valéria Cataneli Pereira

UNESP- Univ Estadual Paulista, Laboratório de Bacteriologia do Departamento de
Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu-SP. Brasil

Caixa Postal 510, CEP 18618-970

valeriacataneli@gmail.com

RESUMO

Com o crescimento das infecções hospitalares causadas por estafilococos coagulase–negativos (ECN) este estudo objetivou caracterizar as amostras resistentes à oxacilina e determinar a sensibilidade a outros antimicrobianos em isolados de hemoculturas provenientes de pacientes internados no Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), UNESP, no período de 20 anos. O gene *mecA* foi detectado em 222 (74%) dos ECN, sendo o cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) dos tipos I, II, III e IV caracterizado respectivamente em 19,4%, 3,6%, 54,5% e 14,4%. Os valores da concentração inibitória mínima (CIM) para inibir 50% (MIC50) e 90% (MIC90) das amostras foram respectivamente 2 µL/mL e >256 µL/mL para oxacilina, 1,5 µL/mL e 2 µL/mL para vancomicina, 0,25 µL/mL e 0,5 µL/mL para linezolida, 0,094 µL/mL e 0,19 µL/mL para daptomicina, 0,19 µL/mL e 0,5 µL/mL para quinupristina/dalfopristina e 0,125 µL/mL e 0,38 µL/mL para tigeciclina. Foram detectadas resistências à oxacilina e à tigeciclina, e resistência intermediária a quinupristina/dalfopristina. Do total de 300 amostras de ECN estudadas, 8 (2,7%) apresentaram susceptibilidade reduzida à vancomicina. Os resultados apresentados em nosso estudo revelam a alta frequência de resistência aos antimicrobianos nos ECN, refletindo a necessidade do uso criterioso dessas drogas e controle da disseminação desses microrganismos no ambiente hospitalar.

ABSTRACT

The increasing rates of nosocomial infection associated with coagulase–negative staphylococci (CNS) were the rationale for this study, aimed at categorizing oxacillin–resistant CNS species in blood culture specimens from inpatients at the UNESP Hospital das Clínicas in Botucatu, Brazil, along a 20–year period, and determining their sensitivity to other antimicrobial agents. The *mecA* gene was detected in 222 (74%) of CNS specimens, and the four types of staphylococcal chromosomal cassette *mec* (SCC*mec*) characterized in 19.4%, 3.6%, 54.5%, and 14.4% of specimens, respectively for type I, II, III, and IV. Minimal inhibitory concentration (MIC) values to inhibit 50% (MIC₅₀) and 90% (MIC₉₀) of specimens were respectively 2 µL/mL and > 256 µL/mL for oxacillin, 1.5 µL/mL and 2 µL/mL for vancomycin, 0.25 µL/mL and 0.5 µL/mL for linezolid, 0.094 µL/mL and 0.19 µL/mL for daptomycin, 0.19 µL/mL and 0.5 µL/mL for quinupristin/dalfopristin, and 0.125 µL/mL and 0.38 µL/mL for tigecycline. Resistance to oxacillin and tigecycline and intermediate resistance to quinupristin/dalfopristin were seen. Eight (2.7%) of all 300 CNS specimens studied have shown reduced susceptibility to vancomycin. Results from this study show high resistance rates of CNSs to antimicrobial agents, reflecting the necessity of using such drugs judiciously and controlling nosocomial dissemination of these pathogens.

INTRODUÇÃO

Os estafilococos coagulase–negativos (ECN) são membros do gênero *Staphylococcus*, caracterizados por serem cocos gram–positivos que se apresentam isolados ou em arranjos irregulares, são imóveis, não formadores de esporos, catalase–positivos, anaeróbios facultativos na maioria das espécies, e não sintetizam a enzima coagulase.²³ São integrantes da microbiota humana²⁵ e se apresentam como importantes patógenos devido à característica oportunista, causando infecções principalmente em prematuros, imunodeprimidos, e pacientes com implantes de próteses.⁴⁷

O aumento da resistência antimicrobiana nos últimos anos tem grande significância nas infecções hospitalares causadas por ECN. A oxacilina é uma penicilina semissintética utilizada no Brasil como teste de sensibilidade e no tratamento das infecções causadas por estafilococos, sendo 66% a 95% dos isolados clínicos de ECN resistentes a essa droga.^{6,13,41} A resistência à oxacilina é mediada pelo gene *mecA*, codificante de uma proteína ligadora de penicilina suplementar (PBP2a) que apresenta baixa afinidade às penicilinas semissintéticas.² O gene *mecA* está localizado em um elemento genético móvel identificado como cassete cromossômico estafilocócico *mec* (*staphylococcal cassette chromosome mec*, *SCCmec*), composto pelo complexo *mec*, que abrangem o gene *mecA* e seus reguladores *mecI* e *mecRI*, pelo complexo do gene *ccr*, responsável pela integração e excisão do *SCCmec*, e pela região J, que não é essencial para a formação do *SCCmec*, mas pode carrear genes que codificam resistência a outros antimicrobianos não-β–lactâmicos.²⁷ Identificaram-se até o momento 11 tipos de *SCCmec*, definidos pela combinação dos tipos de complexo do gene *ccr* e pela classe do complexo do gene *mec*, sendo os subtipos definidos por polimorfismos da região J em uma mesma combinação dos complexos *mec* e *ccr*.²⁷

Com o aumento de amostras resistentes à oxacilina, uma das alternativas ao tratamento de infecções causadas por ECN é a vancomicina, mas já há relatos de susceptibilidade reduzida e resistência à esta droga.^{8,46,49} A susceptibilidade reduzida à vancomicina pode estar ligada a alterações metabólicas que envolvem aceleração da síntese de peptidoglicano, resultando no espessamento da parede bacteriana. Com esse espessamento a vancomicina não inibe a síntese do peptidoglicano, pois acaba se esgotando devido à maior disponibilidade de sítios de D-alanil-D-alanina.^{4,46}

Dado o crescimento das infecções hospitalares causadas por ECN, este estudo tem por objetivo caracterizar as amostras resistentes à oxacilina e determinar-lhes a sensibilidade a outros antimicrobianos em amostras de ECN isoladas de hemoculturas provenientes de pacientes do HC da FMB, UNESP, no período de 20 anos.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram estudadas 300 amostras de ECN provenientes de hemoculturas isoladas de pacientes internados no Hospital das Clínicas de Botucatu – Universidade Estadual Paulista (UNESP). As amostras estudadas foram do período de 1990 a 2009 e estavam mantidas na Coleção de Cultura do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP. O critério de seleção das amostras por espécies considerou uma prevalência média de 35% de ocorrência, com uma margem de erro de 5% e intervalo de confiança de 95%.

O isolamento das linhagens foi realizado conforme as normas descritas por Koneman *et al.*³¹. As amostras foram isoladas em Agar sangue e realizou-se a coloração de Gram, para

observação da morfologia das colônias, e a prova de catalase para confirmação do gênero *Staphylococcus*. Logo após, as amostras de estafilococos foram submetidas à prova de coagulase para a diferenciação entre os grupos de estafilococos coagulase-positivos e coagulase-negativos. As amostras pertencentes ao grupo dos coagulase-negativos foram submetidas a provas bioquímicas propostas por Cunha *et al.*¹⁴ para identificação fenotípica das espécies. A identificação genotípica foi realizada usando *primers* de sequências conservadas adjacentes aos genes 16S e 23S pela técnica ITS-PCR (*internal transcribed spacer-polymerase chain reaction*) descrita por Barry *et al.*⁵ e Couto *et al.*¹¹, usando os *primers* *G1* e *L1* descritos na Tabela 1. A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese em agarose metaphor 3% e corado com Saber Safe. Para controle dos resultados, foram utilizadas as seguintes linhagens de referência internacional: *S. auricularis* (ATCC 33753), *S. capitis* subsp. *capitis* (ATCC 27843), *S. capitis* subsp. *urealyticus* (ATCC 49325), *S. caprae* (ATCC 35538), *S. cohnii* (ATCC 49330), *S. cohnii* subsp. *cohnii* (ATCC 29974), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *S. epidermidis* (ATCC 35983), *S. haemolyticus* (ATCC 29970), *S. hominis* (ATCC 27844), *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* (ATCC 700237), *S. lentus* (ATCC 700403), *S. lugdunensis* (ATCC 700328), *S. saprophyticus* (ATCC 15305), *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* (ATCC 43808), *S. sciuri* subsp. *sciuri* (ATCC 29062), *S. simulans* (ATCC 27851), *S. xylosus* (ATCC 29979) e *S. warneri* (ATCC 10209).

Extração de DNA

Para a extração do DNA foi utilizado o Kit Illustra (GE Healthcare) que consistiu na digestão inicial das células de estafilococos com lisozima (10 mg/mL) e proteinase K (20 mg/mL). Adicionaram-se a seguir 500 µL da solução de extração à mistura, que foi centrifugada

a 10.000 x g por 4 minutos. O sobrenadante foi transferido para a coluna e centrifugado a 5.000 x g por 1 minuto. O líquido coletado foi descartado, e novamente se adicionaram 500 µL de solução de extração à coluna. Após a centrifugação e descarte do líquido coletado, adicionaram-se 500 µL da solução de lavagem à coluna, que foi submetida à centrifugação a 20.000 x g por 3 minutos. A seguir, a coluna foi transferida para um tubo de 1,5 mL e utilizaram-se para a eluição 200 µL de água Milli Q aquecida a 70°C.

Detecção do gene *mecA*

As reações de PCR para a detecção do gene *mecA* foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 mL em volumes totais de 25 µL contendo 10 pmol de cada *primer* (Tabela1), 2,5 U de Taq DNA polimerase, 200 µM de desoxirribonucleotídeos trifosfatados, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 0,75 mM de MgCl₂ e 3 µL de DNA. A incubação foi realizada em termociclador PTC-100 MJ Research empregando os seguintes parâmetros: foram realizados 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos *primers* a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por um minuto. A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 2% e corado com Saber Safe.

Determinação do SCC*mec*

Determinou-se o tipo de SCC*mec* nas amostras positivas para o gene *mecA*. As reações foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 ml em volumes totais de 50 µl contendo 10 pmol dos primers CIF2 F2 e CIF2 R2, 6 pmol dos primers KDP F1 e KDP R1, 5 pmol dos primers DCS F2, DCS R1, RIF4 F3 e RIF4 R9 (Tabela 1), 1,25 U de Taq DNA polimerase, 200 µM de DNA. A incubação foi realizada em Termociclador PTC-100 MJ Research empregando os

seguintes parâmetros: início a 92°C por 3 minutos seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento dos *primers* a 56°C por 1 minuto e extensão a 72 °C por um minuto e 30 segundos. A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 2% e corado com Saber Safe. Para a caracterização dos tipos de SCC*mec* foi utilizado o protocolo descrito por Oliveira *et al.*⁴⁴ e modificado por Machado *et al.*³⁵

Determinação da Concentração Inibitória Mínima por E-test

A sensibilidade *in vitro* das amostras de ECN foram testadas para os antimicrobianos: Oxacilina, Vancomicina, Daptomicina, Linezolida, Quinupristina/Dalfopristina e Tigeciclina. Para tanto, foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dessas drogas, através do E-test. O procedimento utilizou tira de plástico inerte, na qual é incorporada um gradiente de concentração estabilizado do antimicrobiano a ser pesquisado. Primeiramente foi semeado um inóculo da amostra, seguindo a escala 0,5 de McFarland, em placa de Mueller-Hinton e em seguida as tiras de plásticos contendo cada um dos antimicrobianos foram aplicadas sobre o inóculo e incubadas a 35°C por 24 horas. Os critérios utilizados para determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos foram: Oxacilina < 0,5 µg/mL (sensível) para ECN, exceto *S. lugdunensis* (sensível ≤ 2 µg/mL e resistente ≥ 4 µg/mL); Vancomicina <4 µg/mL (sensível), 8-16 µg/mL (intermediário) e >32 µg/mL (resistente); Linezolida ≤4 µg/mL (sensível); Daptomicina ≤1 µg/mL; Quinupristina/Dalfopristina ≤1 µg/mL (sensível), 2 µg/mL (intermediário) e ≥4 µg/mL (resistente); Tigeciclina ≤0,5 µg/mL.^{10,17,18}

Teste de triagem para detecção de susceptibilidade reduzida à vancomicina

Para verificação da susceptibilidade reduzida à vancomicina foi utilizado o meio de triagem preparado com Agar BHI adicionado de 4 µg/mL, 6 µg/mL, 8 µg/mL e 16 µg/mL de vancomicina. A amostra *S. aureus* ATCC 29213, susceptível a vancomicina, foi utilizada como controle negativo, e a amostra *E. faecalis* ATCC 51299, resistente a vancomicina, foi utilizada como controle positivo. As amostras foram semeadas na forma de *spots* e incubadas a 35°C por 24 horas, sendo o crescimento de uma colônia considerado resultado positivo.

Verificação da espessura da parede bacteriana

As amostras de ECN com susceptibilidade reduzida a vancomicina foram submetidas à análise da parede bacteriana por microscopia eletrônica de transmissão para verificação da espessura da parede bacteriana. As amostras foram cultivadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion) e incubadas a 37°C por 24h. Centrifugaram-se por 1 minuto em microtubo 1000 µL da amostra de ECN a 12.000 rpm. Depois de desprezado o sobrenadante, as amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M [pH 7,3]) por 4 horas. As amostras foram retiradas do fixador e lavadas 3 vezes por 5 minutos em água destilada. Em seguida as amostras foram imersas em tetróxido de ósmio a 0,5% em água destilada por 40 minutos. Logo após, foram lavadas 3 vezes por 10 minutos em água destilada. As amostras foram desidratadas em séries crescentes de álcool: 2 vezes por 10 minutos em álcool 7,5%; 2 vezes por 10 minutos em álcool 15%; 2 vezes por 10 minutos em álcool 30%; 2 vezes por 10 minutos em álcool 50%; 3 vezes por 15 minutos em álcool 70%; 2 vezes por 15 minutos em álcool 90%; 2 vezes por 10 minutos em álcool 100%. Após a desidratação foram montados os *stubs* e as

amostras foram metalizadas. As observações foram realizadas em microscópio eletrônico Tecnai Spirit da Fei Company e as imagens foram obtidas em aumento de 30000 ×.

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados nas técnicas de PCR para identificação genotípica, gene *mecA* e tipo de SCC*mec*

Primer	Sequencias de nucleotídeos 5'a 3'	Pb	Produto
<i>L1</i>	GAAGTCGTAACAAGG	-	16S
<i>G1</i>	CAAGGCATCCACCGT	-	23S
<i>mecA1</i>	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG	533	PBP2a
<i>mecA2</i>	AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG		
DCS F2	CATCCTATGATAGCTTGGTC	342	SCC <i>mec</i> I, II e IV
DCS R1	CTAAATCATAGCCATGACCG		
CIF2 F2	TTCGAGTTGCTGGATGAAGAAGG	495	SCC <i>mec</i> I
CIF2 R2	ATTTACCACAAGGACTACCAGC		
KDP F1	AATCATCTGCCATTGGTGATGC	284	SCC <i>mec</i> II
KDP R1	CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG		
RIF4 F3	GTGATTGTTTCGAGATATGTGG	243	SCC <i>mec</i> III
RIF4 R9	CGCTTTATCTGTATCTATCGC		

Fonte: Murakami *et al.*⁴⁰, Couto *et al.*¹¹; Oliveira *et al.*⁴⁴; Machado *et al.*³⁵

RESULTADOS

Identificação das Amostras

A identificação dos ECN pelo método bioquímico detectou 223 (74,3%) *S. epidermidis*, 27 (9,0%) *S. haemolyticus*, 22 (7,3%) *S. hominis*, 14 (4,7%) *S. warneri*, 9 (3,0%) *S. lugdunensis* e

5 (1,7%) *S. capitis*. Já a técnica genotípica (ITS-PCR), identificou 223 (74,3%) *S. epidermidis*, 29 (9,7%) *S. haemolyticus*, 23 (7,7%) *S. hominis*, 11 (3,7%) *S. warneri*, 9 (3,0%) *S. lugdunensis* e 5 (1,7%) *S. capitis*. Houve concordância de 98% entre os dois métodos utilizados para a identificação das espécies de ECN.

Detecção do gene *mecA* e Caracterização do SCC*mec*

O gene *mecA* foi detectado em 222 (74%) amostras estudadas, sendo positivo entre 78,5% de *S. epidermidis*, 75,9% de *S. haemolyticus*, 69,6% de *S. hominis*, 27,3% de *S. warneri*, 80,0% de *S. capitis* e em 22,2% de *S. lugdunensis* (Figura 1).

Foi realizada a caracterização de SCC*mec* nas amostras positivas para o gene *mecA*: foram classificados 43 (19,4%) do tipo I, 8 (3,6%) do tipo II, 121 (54,5%) do tipo III, 32 (14,4%) do tipo IV, e 18 (8,1%) não foram tipadas. A relação entre o tipo de SCC*mec* entre as espécies de ECN resistentes à oxacilina está apresentado na Tabela 2.

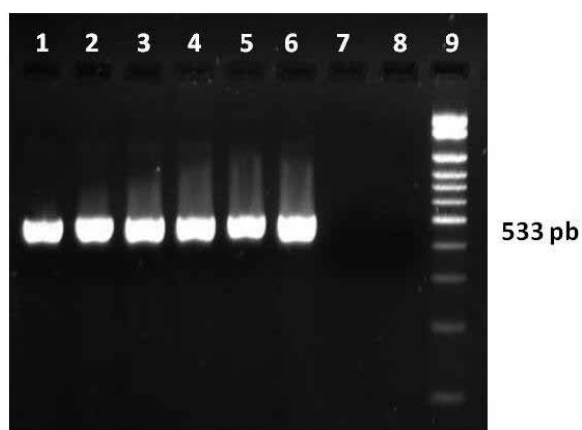


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose para pesquisa do gene *mecA* (533 bp) em amostras de ECN pela técnica de PCR. 1, 2, 3, 4, 5: amostras positivas; 6: *S. aureus* ATCC 33591; 7: *S. aureus* ATCC 25923; 8: água e 9 marcador de peso molecular (100 bp).

Tabela 2. Classificação dos tipos de SCCmec entre as espécies de ECN resistentes à oxacilina.

Espécies	mecA (+)		SCCmec									
			tipo I		tipo II		tipo III		tipo IV		Não tipadas	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>S. epidermidis</i> (223)	175	78,5	28	16,0	2	1,1	108	61,7	32	18,3	5	2,9
<i>S. haemolyticus</i> (29)	22	75,9	6	27,3	6	27,3	4	18,2	0	0,0	6	27,3
<i>S. hominis</i> (23)	16	69,6	8	50,0	0	0,0	5	31,3	0	0,0	3	18,8
<i>S. warneri</i> (11)	3	27,3	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	3	100
<i>S. capitis</i> (5)	4	80,0	1	25,0	0	0,0	2	50,0	0	0,0	1	25,0
<i>S. lugdunensis</i> (9)	2	22,2	0	0,0	0	0,0	2	100	0	0,0	0	0,0
N Total	223		43		8		121		32		18	

N: número de amostras

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Determinou-se pela técnica de *E-test* a concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos utilizados no tratamento das infecções causadas por ECN (Figura 2), detectando-se resistência à oxacilina em 206 (68,7%) das amostras de ECN, e à tigeciclina em 25 (8,3%). Detectou-se resistência à tigeciclina em 4,5% de *S. epidermidis*, 13,8% de *S. haemolyticus*, 13% de *S. hominis* e 11,1% de *S. lugdunensis*. Já com a utilização de quinupristina/dalfopristina, verificou-se resistência intermediária, com CIM de 2 µg/mL em 1 *S. epidermidis* e 3 µg/mL em 1 *S. epidermidis* e em 1 *S. haemolyticus*. A sensibilidade e especificidade da CIM de oxacilina pela técnica de *E-test* em relação a presença do gene *mecA* foram respectivamente de 87,4% e 82,3%. As demais drogas apresentaram valores de concentração inibitória mínima considerados indicadores de sensibilidade segundo as recomendações do CLSI.¹⁰

Avaliaram-se as concentrações mínimas de antimicrobianos para inibir 50% e 90% das amostras (respectivamente MIC50 e MIC90) sendo os valores respectivos de MIC50 e MIC90 de 2 µL/mL e > 256 µL/mL para oxacilina, 1,5 µL/mL e 2 µL/mL para vancomicina, 0,25 µL/mL e 0,5 µL/mL para linezolida, 0,094 µL/mL e 0,19 µL/mL para daptomicina, 0,19 µL/mL e 0,5 µL/mL para quinupristina/dalfopristina, e 0,125 µL/mL e 0,38 µL/mL para tigeciclina.

Em relação às espécies de ECN, a distribuição dos parâmetros de MIC50 e MIC90 revelou alta resistência dos isolados de *S. haemolyticus* à oxacilina. Esta foi a única espécie de ECN em que a concentração inibitória mínima para inibir 50% dos isolados foi > 256µg/mL, refletindo a alta taxa de resistência dessa espécie a esta droga (Tabela 3).

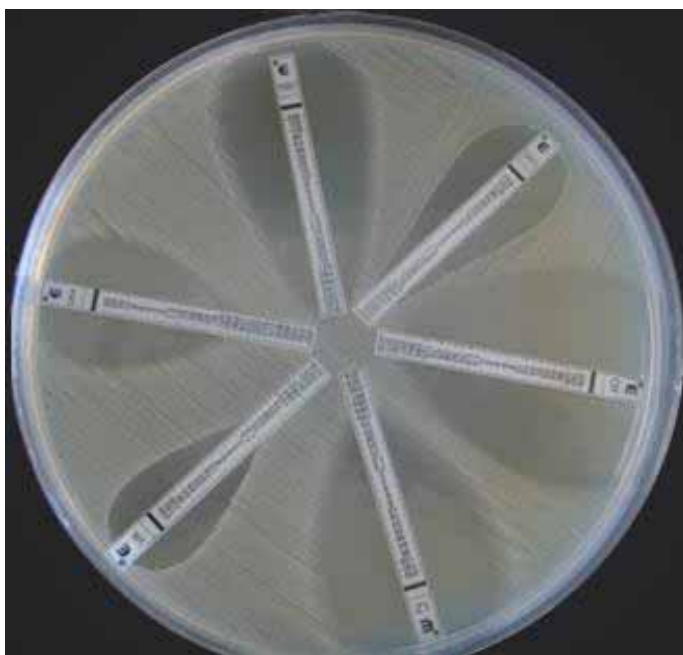


Figura 2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima dos antimicrobianos oxacilina, vancomicina, linezolida, daptomicina, quinupristina/dalfopristina e tigeciclina em amostras de ECN pela técnica de E-test.

Tabela 3. Determinação da MIC50, MIC90, variação de CIM ($\mu\text{g/ml}$) e de resistência aos antimicrobianos nas espécies de ECN.

Espécie	Antimicrobiano	MIC50	MIC90	Varição da CIM	% Resistência
<i>S. epidermidis</i> (223)	Oxacilina	2	>256	0,047 a >256	73,5
	Vancomicina	1,5	2	0,125 a 2	0
	Linezolida	0,25	0,5	0,047 a 2	0
	Daptomicina	0,094	0,19	0,016 a 0,75	0
	Quinupristina/Dalfopristina	0,19	0,38	0,064 a 3	0
	Tigeciclina	0,094	0,38	0,016 a 1,5	6,7
<i>S. haemolyticus</i> (29)	Oxacilina	>256	>256	0,064 a >256	79,3
	Vancomicina	1	1,5	0,19 a 2	0
	Linezolida	0,25	0,5	0,094 a 1	0
	Daptomicina	0,064	0,125	0,016 a 0,19	0
	Quinupristina/Dalfopristina	0,25	0,5	0,025 a 1	0
	Tigeciclina	0,25	0,5	0,016 a 2	17,2
<i>S. hominis</i> (23)	Oxacilina	0,75	>256	0,019 a >256	56,5
	Vancomicina	0,75	2	0,125 a 2	0
	Linezolida	0,25	0,5	0,064 a 0,75	0
	Daptomicina	0,047	0,064	0,023 a 0,094	0
	Quinupristina/Dalfopristina	0,25	0,38	0,125 a 0,38	0
	Tigeciclina	0,094	0,5	0,016 a 0,75	13
<i>S. warneri</i> (11)	Oxacilina	0,19	0,38	0,19 a 0,38	0
	Vancomicina	0,5	1,5	0,25 a 1,5	0
	Linezolida	0,25	0,5	0,125 a 0,75	0
	Daptomicina	0,125	0,25	0,047 a 0,32	0
	Quinupristina/Dalfopristina	0,25	0,38	0,125 a 0,38	0
	Tigeciclina	0,094	0,38	0,047 a 0,64	9
<i>S. lugdunensis</i> (9)	Oxacilina	0,38	>256	0,19 a >256	22,2
	Vancomicina	0,75	1,5	0,38 a 2	0
	Linezolida	0,25	0,5	0,19 a 2	0
	Daptomicina	0,064	0,064	0,023 a 0,094	0
	Quinupristina/Dalfopristina	0,19	0,25	0,125 a 1,5	0
	Tigeciclina	0,047	0,25	0,032 a 1	11,1
<i>S. capitis</i> (5)	Oxacilina	1	3	0,19 a 3	80
	Vancomicina	1,5	1,5	0,38 a 1,5	0
	Linezolida	0,38	0,5	0,25 a 0,5	0
	Daptomicina	0,25	0,38	0,016 a 0,38	0
	Quinupristina/Dalfopristina	0,5	1,5	0,19 a 1,5	0
	Tigeciclina	0,125	0,25	0,064 a 0,25	0

CIM: Concentração Inibitória mínima. **MIC50:** Concentração Inibitória mínima de antimicrobiano para inibir 50% do crescimento bacteriano. **MIC90:** Concentração Inibitória mínima de antimicrobiano para inibir 90% do crescimento bacteriano.

Determinou-se a variação da CIM de cada antimicrobiano segundo o tipo de SCCmec. As amostras tipadas com SCCmec I apresentaram maiores valores de CIM para a tigeciclina e as com SCCmec II foram as que apresentaram maiores valores de CIM para oxacilina. Já as amostras que carregam SCCmec IV foram as que apresentaram maiores valores de CIM para a vancomicina, linezolida, daptomicina e quinupristina/dalfopristina (Tabela 4).

Tabela 4. Determinação da variação da Concentração Inibitória Mínima em relação ao SCCmec

Antimicrobiano	Variação da CIM ($\mu\text{g/ml}$)			
	SCCmec I	SCCmec II	SCCmec III	SCCmec IV
Oxacilina	0,094 a > 256	6 a >256	0,125 a >256	0,125 a > 256
Vancomicina	0,25 a 2	0,38 a 2	0,125 a 2	0,75 a 2
Linezolida	0,064 a 1	0,19 a 0,5	0,047 a 0,75	0,064 a 1
Daptomicina	0,016 a 025	0,016 a 0,094	0,019 a 0,5	0,047 a 0,75
Quinupristina/ Dalfopristina	0,025 a 1,5	0,094 a 0,5	0,064 a 1	0,125 a 2
Tigeciclina	0,016 a 2	0,023 a 0,75	0,016 a 0,75	0,032 a 1

CIM: Concentração Inibitória Mínima

Realizou-se a análise da CIM para a oxacilina e vancomicina no período de 20 anos, analisando-se em três períodos diferentes intervalos de CIM de oxacilina e de vancomicina. Para a oxacilina, no primeiro período (1990 a 2001) observaram-se valores mais altos de CIM, considerados indicadores de sensibilidade. Já nos outros períodos (2002 a 2006 e 2007 a 2009) verificou-se decréscimo nos valores de CIM, considerados indicadores de sensibilidade, e

aumento da resistência dos ECN. Em relação à vancomicina, essa mesma análise revelou diferença significativa nos três períodos entre amostras com CIM de 0,047 µg/mL a 0,38 µg/mL e de 0,5 µg/mL a 2,0 µg/mL (Figura 3).

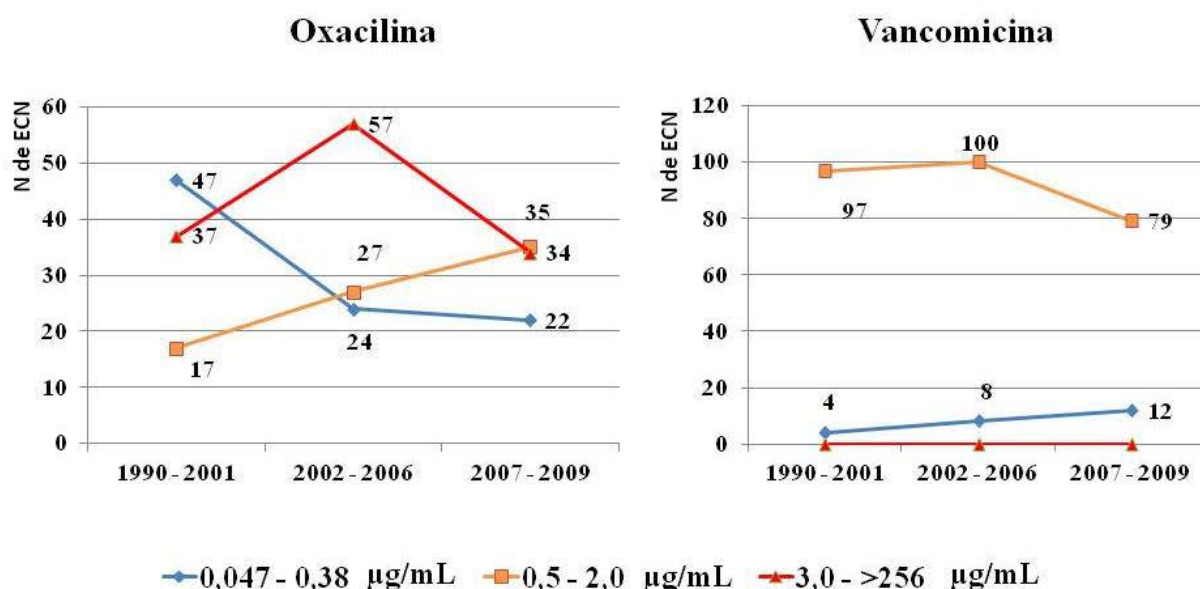


Figura 3. Determinação do número de ECN isolados de 1990 a 2009 e a determinação das Concentrações Mínimas Inibitórias à oxacilina e à vancomicina em três períodos.

Determinação da Susceptibilidade Reduzida a Vancomicina

Observou-se o crescimento de 214 (71,3%) amostras na placa de Agar BHI com 4 µg/mL de vancomicina, de 89 amostras (29,7%) na placa com 6 µg/mL de vancomicina e de 8 (2,6%) amostras na placa com 8 µg/mL de vancomicina (Figura 4). Nenhuma amostra cresceu na superfície do meio acrescido de 16µg/mL de vancomicina. Não houve diferença significativa de variação da CIM entre as amostras que não cresceram no meio complementado com vancomicina e as que cresceram no meio com 4 µg/mL de vancomicina. Entre as que cresceram no meio com 6 µg/mL de vancomicina a variação da CIM foi de 0,5 a 2 µg/mL e entre as que cresceram em 8 µg/mL de vancomicina a CIM foi de 0,75 a 24 µg/mL. As amostras que cresceram em 8 µg/mL de

vancomicina foram 4 de *S. epidermidis*, 1 de *S. haemolyticus*, 2 de *S. hominis* e 1 de *S. capitis*, todas resistentes à oxacilina, sendo *S. epidermidis* e *S. capitis* carreadores do SCCmec III, *S. hominis* do SCCmec I e *S. haemolyticus* com SCCmec não tipado.

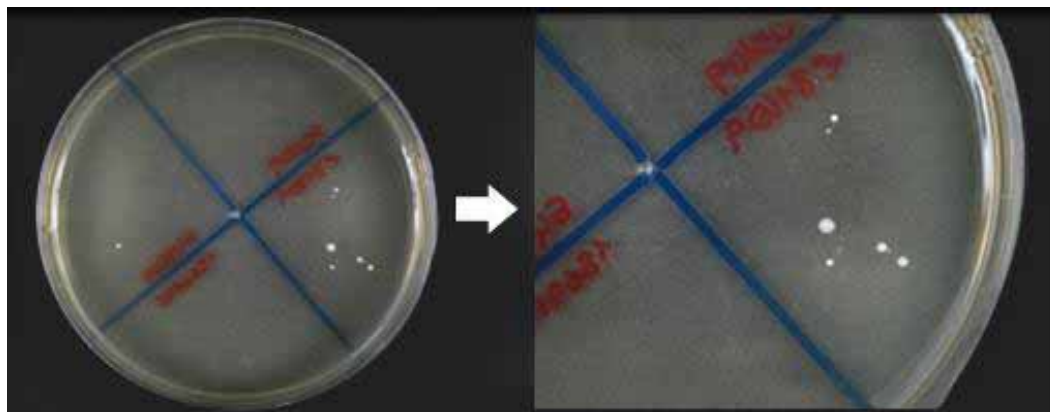


Figura 4. Teste de triagem em Agar BHI acrescentado de 8µg/mL de vancomicina.

Verificação da espessura da parede bacteriana em amostras com susceptibilidade reduzida à vancomicina

As amostras que cresceram em ágar BHI acrescido de 8µg/mL de vancomicina foram submetidas a análise por microscopia eletrônica de transmissão para observação da parede bacteriana (Figura 5). Mensurou-se a espessura da parede bacteriana de células em divisão nas 8 amostras (valores apresentados em nanômetros, média ± desvio-padrão). Nas 4 amostras de *S. epidermidis* os valores foram de $21,66 \pm 1,4$, $20,12 \pm 0,9$, $24,24 \pm 1,3$ e $14,20 \pm 1,3$. Na amostra de *S. haemolyticus* o valor foi de $24,88 \pm 1,7$. Na amostra de *S. capitis* foi de $19,33 \pm 1,8$, e nas 2 amostras de *S. hominis* os valores foram de $17,68 \pm 2,1$ e $24,92 \pm 1,5$. Utilizaram-se para comparação *S. epidermidis* ATCC 12228 e *S. haemolyticus* ATCC 29970, que apresentaram os valores respectivos de $14,61 \pm 1,2$ e $14,73 \pm 0,7$. A comparação das amostras analisadas comprovou valores maiores que os controles, entre 17 nm e 24,92 nm, com exceção de uma amostra de *S. epidermidis* que apresentou valor menor que os apresentados pelos controles (Figura 5).

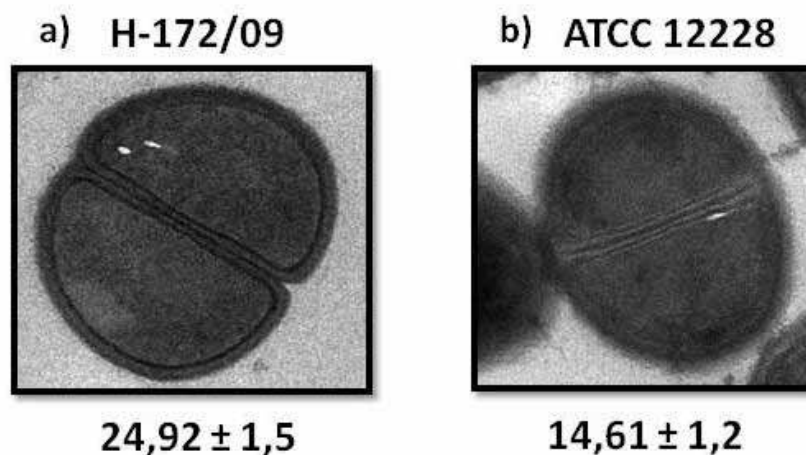


Figura 5. Imagens por Microscopia eletrônica de Transmissão em células de ECN em divisão para observação da espessura da parede bacteriana (em nanômetros). a) *S. hominis* b) *S. epidermidis* ATCC 12228.

DISCUSSÃO

Os estafilococos coagulase–negativos são os principais causadores de bacteremia e sua importância no ambiente hospitalar tem aumentado nos últimos anos devido à resistência aos antimicrobianos utilizados no tratamento dessas infecções. Em nosso estudo foram caracterizadas 300 amostras de ECN isoladas de hemoculturas de pacientes internados no HC da FMB no período de 20 anos, para verificação do perfil de susceptibilidade dessas amostras frente a diferentes antimicrobianos.

A pesquisa do gene *mecA* detectou a resistência à oxacilina em 78,5% dos ECN, sendo os valores de MIC50 (2 µg/mL) considerados indicativos de resistência a essa droga, determinando a baixa susceptibilidade das bactérias aos demais agentes β–lactâmicos e o aumento dessas taxas de resistência desde 1990. Estudos relatam que amostras de ECN isoladas na década de 70 já apresentavam maior taxa de resistência à oxacilina do que *S. aureus*, observação essa que

continua até os dias atuais,²⁹ sendo de 65% a 95% as taxas de resistência a β -lactâmicos em hospitais brasileiros e em outros países.^{6,15,38,41} As espécies que apresentaram mais resistência à oxacilina foram *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* e *S. capitis*. Resultados similares foram relatados em outros estudos que constatarem resistência à oxacilina em 97% de *S. epidermidis* entre 1999 e 2001 em uma UTI neonatal,³² em cerca de 96% de *S. haemolyticus* isolados no Brasil,¹⁹ e em 100% de *S. hominis* isoladas em uma UTIN da Espanha.⁹ Já em relação à espécie *S. capitis* foram encontrados resultados diferentes nos estudos realizados por Caierão *et al.*,⁷ que detectaram o gene *mecA* em 33,3% de *S. capitis*.

Embora em porcentagens mais baixas, a presença do gene *mecA* foi detectada em *S. warneri* e *S. lugdunensis*. *S. warneri* tem sido relatado em estudos com taxas de 33,3% de resistência à oxacilina em UTI neonatais,²⁴ e a primeira descrição do gene *mecA* em *S. lugdunensis* foi no trabalho desenvolvido por Kawaguchi *et al.*,³⁰ que detectaram esse gene em uma das duas amostras isoladas em uma unidade neonatal. Segundo Tee *et al.*,⁴⁸ é importante a determinação da susceptibilidade de *S. lugdunensis* à oxacilina não somente em virtude de suas implicações clínicas, por se tratar do mais agressivo dos ECN, mas também para um tratamento precoce com antibióticos adequados e garantia de um bom resultado clínico.

A caracterização do cassete cromossômico estafilocócico *mec* possibilitou a tipagem dos quatro tipos de SCC*mec*, sendo o SCC*mec* III o mais detectado nas espécies estudadas, principalmente em *S. epidermidis*, que também representou todas as amostras com SCC*mec* IV. O SCC*mec* III é o maior entre os demais tipos e codifica o maior número de genes de resistência, sendo mais prevalente entre os ECN no ambiente hospitalar. *S. epidermidis* é o mais abundante na microbiota humana e o mais isolado em infecções e a pressão seletiva dentro do ambiente hospitalar favorece a proliferação dessas cepas com SCC*mec* III sendo importantes patógenos e

causadores de sérias infecções.²⁸ Já o SCCmec IV é relacionado a *Staphylococcus* spp. de origem comunitária e foi descrito pela primeira vez em *S. epidermidis*, sugerindo a transferência do SCCmec IV de *S. epidermidis* para *S. aureus*. O seu menor tamanho em relação aos demais tipos de SCCmec provavelmente aumenta sua mobilidade e capacidade para se transferir entre as amostras,²⁶ sugerindo tendência a aumento da incidência de doenças causadas por clones que contêm o SCCmec IV.³⁵ O SCCmec II foi mais associado a *S. haemolyticus*, sendo esse resultado similar ao encontrado por Machado *et al*,³⁵ que caracterizaram o SCCmec II apenas em *S. haemolyticus*.

A alternativa utilizada no tratamento das infecções causadas por estafilococos resistentes à oxacilina é a vancomicina, glicopeptídeo utilizado desde 1958; já existem porém relatos de resistência e redução de susceptibilidade a essa droga.^{8 46 49} Nossos resultados comprovaram que, com exceção da oxacilina, foi a vancomicina que apresentou os maiores valores de MIC50 e MIC90, não se detectando resistência, mas verificando-se prevalência de maiores valores de CIM no período de 20 anos, e redução de susceptibilidade em amostras de *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* e *S. capitis*. Nos estudos realizados por Natoli *et al*.⁴¹, a susceptibilidade reduzida à vancomicina foi detectada com uma frequência de 5,4% em ECN, nas espécies *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*. Segundo esses autores já foi previamente comprovado que *Staphylococcus* capazes de crescer em Agar com vancomicina podem desenvolver heteroresistência à glicopeptídeos, que pode estar relacionada a falhas no tratamento e/ou ser um precursor da resistência a glicopeptídeos, devendo ser levado em consideração nas decisões terapêuticas.

O aumento das proporções de ECN resistentes à oxacilina e a redução de sua susceptibilidade à vancomicina ressaltam a importância do estudo de outros agentes

antimicrobianos. A tigeciclina, glicilciclina semissintética de amplo espectro frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas, é considerada uma droga com excelente atividade contra ECN suscetíveis e resistentes à oxacilina,^{29 42} mas nossos resultados revelaram 8,3% de resistência a esse antimicrobiano, mais frequente em *S. haemolyticus*, seguido de *S. hominis*, *S. lugdunensis* e *S. epidermidis*. Foram descritos em alguns estudos resultados semelhantes de MIC90 (0,5 µg/mL) para a tigeciclina, não havendo diferenças desses valores entre ECN sensíveis e resistentes à oxacilina.⁴² Nos trabalhos realizados por Natoli *et al*,⁴¹ a tigeciclina apresentou bons resultados; segundo esses autores essa droga não é recomendada para o tratamento de bacteremia e seu uso deve ser limitado a fim de se preservar sua atividade contra bactérias gram-negativas multirresistentes.

A quinupristina/dalfopristina é uma estreptogramina, pertencente ao grupo de antibióticos macrolídeos-lincosamida-estreptogramina, e a combinação de quinupristina e dalfopristina é sinérgica e geralmente bactericida quando esses agentes são comparados isoladamente, ou comparados a antibióticos semelhantes do grupo dos macrolídeos.³⁶ Nesse estudo, apesar de a quinupristina/dalfopristina apresentar excelentes resultados na maioria das amostras de ECN estudadas, detectou-se resistência intermediária a essa droga em dois *S. epidermidis* e em um *S. haemolyticus*. No estudo de Mendes *et al*,³⁹ a quinupristina/dalfopristina apresentou excelentes resultados para ECN, não se detectando resistência, e com valores de MIC90 de 0,38 µg/mL para as amostras sensíveis à oxacilina e de 0,75 µg/mL para as resistentes à oxacilina. Também Venkatesh *et al*⁵⁰ descreveram boa eficácia da combinação desses agentes antimicrobianos em ECN resistentes e sensíveis à oxacilina.

A daptomicina, antimicrobiano estudado há décadas, voltou a ser utilizado em 2006, sendo aprovada para tratamento de bacteremias e endocardites causadas por *Staphylococcus*.⁴³

Verificaram-se excelentes resultados em nosso estudo, com valores baixos de MIC50 nas espécies de ECN estudadas. Olivares *et al*⁴³ também verificaram a susceptibilidade de todos os ECN à daptomicina, com pouca variação dos valores de CIM. No estudo realizado em 1126 ECN por Critchley *et al*,¹² a daptomicina foi ativa numa faixa de CIM de 0,015–2,0 µg/mL, e MIC90 de 0,5 µg/mL. Segundo esses autores, os agentes mais ativos nesta análise foram a daptomicina e a quinupristina/dalfopristina, ressaltando a importância desses antimicrobianos no tratamento das infecções causadas por ECN.

Também foram observados bons resultados com a utilização da linezolida, oxazolidinona sintética potencialmente ativa contra várias bactérias, incluindo os ECN.³ A linezolida tornou-se importante para a terapêutica de infecções prolongadas causadas por ECN, mas há relatos de resistência a essa droga. No Brasil, o primeiro relato de resistência à linezolida foi em 2006, em um isolado clínico de MRSA,²² verificando-se resistência, entre os ECN, em *S. epidermidis*,³³ *S. hominis* e *S. haemolyticus*.³ Nos estudos realizados por Olivares *et al*,⁴³ apesar da detecção de 7 cepas resistentes à linezolida, esse antimicrobiano apresentou bons níveis de CIM em amostras de ECN.

S. haemolyticus foi a espécie que apresentou maiores valores de CIM para oxacilina, sendo necessário níveis superiores a 256 µg/mL para inibição de 50% dos isolados. Além da oxacilina, essa espécie apresentou maiores valores de CIM para a tigeciclina e a maioria dos outros antimicrobianos testados. Descrevem-se altas taxas de resistência aos antimicrobianos utilizados no tratamento das infecções causadas por *S. haemolyticus*, principalmente à meticilina e aos glicopeptídeos. Alguns autores relatam alta prevalência de genes que codificam resistência a antibióticos β-lactâmicos e aminoglicosídeos, bem como significativa proporção de isolados com a concentração inibitória mínima de vancomicina próxima ao ponto definido para a

resistência,^{20,21} o que ressalta a importância do *S. haemolyticus* como patógeno multirresistente e causador de infecções de difícil tratamento com a utilização dos antimicrobianos tradicionais.

A relação da variação da concentração inibitória mínima com os tipos de *SCCmec* mostrou maiores CIM para vancomicina, linezolid, daptomicina e quinupristina/dalfopristina em *S. epidermidis* com *SCCmec* IV. Os genes de resistência a esses antimicrobianos são mediados por plasmídeos e se encontram com maior frequência em cepas resistentes à metilina, ocorrendo frequentemente em cepas hospitalares que sofrem maior pressão seletiva.⁴⁵ O *SCCmec* IV é característico de amostras comunitárias, principalmente pelo seu tamanho que envolve baixo custo adaptativo aos ECN, e estudos sugerem que geralmente a aquisição de genes de resistência aos antimicrobianos através da transferência horizontal de genes tem origem ambiental não-clínica, pois é alta a diversidade de bactérias que carregam genes de resistência no ambiente natural.^{16,37} Além disso, O *SCCmec* IV só foi detectado em *S. epidermidis*, que por ser a espécie mais frequente na microbiota está mais sujeita a pressão seletiva. As maiores CIM para outros antimicrobianos também podem estar relacionados à pressão seletiva, já que o nível de exposição dessas bactérias no ambiente hospitalar pode influenciar a seleção de cepas com susceptibilidade reduzida a esses outros agentes bacterianos, e conseqüentemente possível resistência, pois são necessários vários eventos de mutações, recombinações genéticas e alterações na fisiologia microbiana para que haja mudanças que resultem em novo fenótipo.^{1,34,37}

As alterações metabólicas e fisiológicas relacionadas à pressão seletiva podem ser observadas nas amostras que cresceram em ágar com 8 µg/mL de vancomicina, pois na maioria dos ECN estudados pode-se observar maior espessura da parede bacteriana devido a aceleração da síntese de peptidoglicano. Esse mecanismo de susceptibilidade reduzida à vancomicina é mais vantajoso para os ECN do que a aquisição do operon *van*, que é mediador da resistência a

vancomicina. O operon *van* é adquirido por transferência horizontal de genes e a expressão desse operon só é estimulada na presença de glicopeptídeos. Esse estímulo resulta em custo adaptativo muito alto na presença da vancomicina, configurando desvantagem para os ECN na presença desta droga.^{1,34} Já em relação à aquisição de outros genes de resistência nos ECN, como o gene *mecA*, ocorre inicialmente um custo adaptativo, que é amenizado por mutações adicionais compensatórias que favorecem esses microrganismos em relação aos custos dessa resistência.

Os resultados de 20 anos apresentados em nosso estudo revelam alta frequência de resistência dos ECN aos antimicrobianos, refletindo o uso excessivo dessas drogas. Além das modificações metabólicas e fisiológicas que podem levar à susceptibilidade reduzida dos ECN aos antimicrobianos, a condição desses microrganismos como comensais humanos torna-os ideais como transportadores e reservatórios de genes de resistência, principalmente aqueles que não implicam custo adaptativo importante para a bactéria, como os elementos *SCCmec*.⁴⁵ Segundo esses autores, *S. epidermidis* fornece reservatório para a transferência de elementos genéticos para *S. aureus*, aumentando o potencial patogênico dessas bactérias e desempenhando papel importante nas doenças causadas por *S. aureus* em humanos. Os antimicrobianos que ofereceram melhores resultados devem ser utilizados de maneira a se preservar sua eficácia e a se evitarem as altas taxas de susceptibilidade reduzida e de resistência a essas drogas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo (FAPESP- Processo: 2011/23742-2) e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq- Processo: 470649/2011-9) pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Andersson, D.I., and D. Hughes. 2010. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat. Rev. Microbiol.* 8:261-271.
2. Archer, G., and D.M. Niemeyer. 1994. Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci. *Trends Microbiol.* 2:343-347.
3. Almeida, L.M. 2012. Caracterização molecular do mecanismos de resistência à linezolida em estafilococos coagulase-negativos e estudo da estabilidade do fenótipo resistente. Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, área de Análises Clínicas. (TESE).
4. Appelbaum, P.C. 2006. The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* 12(1):16–23.
5. Barry, T., G. Colleran, M. Glennon, L.K. Dunican, and F. Gannon. 1991. The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods Appl.* 1:51-56.
6. Bouchami, O., W. Achour, M.A. Mekni, J. Rolo, and A.B. Hassen. 2011. Antibiotic resistance and molecular characterization of clinical isolates of methicillin-resistant coagulase negative staphylococci isolated from bacteremic patients in oncohematology. *Folia Microbiol.* 56:122-130.
7. Caierão, J., S. Superti, C.A.G. Dias, and P.A. d'Azevedo. 2006. Automated systems in the identification and determination of methicillin resistance among coagulase negative staphylococci. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 10:277-279.

8. Center, K.J., A.C. Reboli, R. Hubler, G.L. Rodgers, and S.S. Long. 2003. Decreased Vancomycin Susceptibility of Coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: evidence of spread of *Staphylococcus warneri*. *J. Clin. Microbiol.* 41:4660-4665.
9. Chaves, F. 2005. Nosocomial spread of a *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* strain causing sepsis in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* 43(9):4877-4879.
10. CLSI.(2013). Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Approved Standard M100-S23. Wayne, PA, USA.
11. Couto, I., S. Pereira, M. Miragaia, I.S. Sanches, and H. Lencastre. 2001. Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by Internal Transcribed Spacer PCR. *Clin. Microbiol.* 39:3099–3103.
12. Critchley, I.A., R.S. Blosser-Middleton, and M.E. Jones. 2003. Baseline study to determine in vitro activities of daptomycin against Gram-positive pathogens isolated in the United States in 2000–2001. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:1689–1693.
13. Cuevas, O., E. Cercenado, M.J. Goyanes, A. Vindel, P. Trincado, T. Boquete, M. Marín, and E. Bouza. 2008. *Staphylococcus* spp. en España: situación actual y evolución de la resistencia a antimicrobianos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 26:269–277.
14. Cunha, M.L.R.S., Y.K. Sinzato, and L.V.A. Silveira. 2004. Comparison of methods for identification of Coagulase-negative Staphylococci. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 99:855-860.
15. Cunha, M.L.R.S., D. Justulin. 2011. Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus* spp. In A. Mendez-Vilas (ed.), *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. Formatex, Spanish, pp. 714-721.
16. Davies, J. E. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. 1997. *Ciba Found. Symp.* 207:15–35.

17. EUCAST. 2013. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.1. <http://www.eucast.org>.
18. FDA (Tygacil package insert [June 2005], Wyeth Pharmaceuticals Inc., Philadelphia, PA)
19. Ferreira, R.B.R., N.L.P. Iorio, K.L. Malvar, A.P.F. Nunes, L.S. Fonseca, C.C.R. Bastos, and K.R.N. Santos. 2003. Coagulase-negative staphylococci: comparison of phenotypic and genotypic oxacillin susceptibility tests and evaluation of the Agar screening test by using different concentrations of oxacillin. *J. Clin. Microbiol.* 41(8):3609-3614.
20. Fredheim, E.G.A., C. Klingenberg, H. Rohde, S. Frankenberger, P. Gaustad, T. Flaegstad, and J.E. Sollid. 2009. Biofilm formation by *Staphylococcus haemolyticus*. *J. Clin. Microbiol.* 47(4):1172–1180.
21. Froggatt, J.W., J.L. Johnston, D.W. Galetto, G.L. Archer. 1989. Antimicrobial Resistance in Nosocomial Isolates of *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33(4):460-466.
22. Gales, A.C. 2006. Emergence of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* during treatment of pulmonary infection in a patient with cystic fibrosis. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 24(4):300-302.
23. Garrity, G.M., M. Winters, and D.B. Searles. Taxonomic Outline of the Procaryotic Genera. 2001. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. Baltimore: Willians & Wilson. Available at www.cme.msu.edu/bergeys (Online).
24. Giusti, M., L. Pacifico, D. Tufi, A. Panero, A. Boccia, and C. Chiesa. 1999. Phenotypic detection of nosocomial *mecA*-positive coagulase-negative staphylococci from neonates. *J. Antimicrob. Chemother.* 44:351-358.

25. Grice, E.A., and J.A. Segre. 2011. The Skin Microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* 9:244-253.
26. Healy, C.M., K.G. Hulten, D.L. Palazzi, J.R. Campbell, C.J. Baker. 2004. Emergence of New Strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a Neonatal Intensive Care Unit. *Clin. Infect. Dis.* 39:1460-1466.
27. IWG-SCC. International Working Group on The Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements. 2009. Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*): Guidelines for Reporting Novel SCC*mec* Elements. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:4961–4967.
28. Ito, T., Y. Katayama, and K. Hiramatsu. 1999. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1449-1458.
29. John, J.F., and A.M. Harvin. 2007. History and evolution of antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci: Susceptibility profiles of new anti-staphylococcal agents. *Ther. Clin. Risk. Manag.* 3(6):1143–1152.
30. Kawaguchi, E., W. Minamide, H. Mori, and H. Igmi. 1996. The taxonomic distribution, characteristic and susceptibility against antimicrobial agents of methicillin-resistant staphylococci isolated from blood. *Kansenshogaku Zasshi.* 70:1147–1153.
31. Koneman, E.W., S.D. Allen, W.M. Janda, P.C. Schreckenberger, and W.C. Winn Jr. 1997. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.* 5th ed. Lippincott, Philadelphia.
32. Krediet, T.G., E.M. Mascini, E.V. Rooij, J. Vlooswijk, A. Paauw, L.J. Gerards, and A. Flier. 2004. Molecular Epidemiology of Coagulase-Negative Staphylococci Causing Sepsis in a Neonatal Intensive Care Unit over an 11-Year Period. *J. Clin. Microbiol.* 42(3): 992-995.

33. Lincopan, N. 2009. Linezolid resistance in *Staphylococcus epidermidis* associated with a G2603T mutation in the 23S rRNA gene. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 34(3):281-282.
34. Livermore, D. 2004. Can better prescribing turn the tide of resistance? *Nat. Rev. Microbiol.* 2:73-78.
35. Machado, A.B.M.P., K.C. Reiter, R.M. Paiva, and A.L. Barth. 2007. Distribution of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) types I, II, III and IV in coagulase-negative staphylococci from patients attending a tertiary hospital in southern Brazil. *J. Med. Microb.*56:1328-33.
36. Manzella, J.P. 2001. Quinupristin-Dalfopristin: A New Antibiotic for Severe Gram-Positive Infections. *Clin. Pharmacol.* 64(11):1863-1866.
37. Martínez, J.L., F. Baquero, and D.I. Andersson. 2007. Predicting antibiotic resistance. *Nature Rev. Microbiol.* 5:958-965.
38. Martins A., D.F.M. Riboli., C.H. Camargo, V.C. Pereira., R.A. Sampaio., M.L.R.S. Cunha. 2013. Antimicrobial resistance and persistence of *Staphylococcus epidermidis* clones in a Brazilian university hospital. *Diagn. Micr. Infect. Dis.* 77(2):164-168
39. Mendes, C., S.I. Sinto, A. Hsiung, C. Oplustil, L. Teixeira, A. Segura, D. Souza, A. Barth, and A.C. Nicodemo. 2002. Atividade antimicrobiana in vitro de quinupristina/dalfopristina para cocos gram-positivos isolados de cinco centros brasileiros: resultado do estudo de vigilância L-SMART. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 38(3):191-197.
40. Murakami, K., K. Minamide, K. Wada, E. Nakamura, H. Teraoka, and S. Watanabe.1991. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 29:2240-44.

41. Natoli, S., C. Fontana, M. Favaro, A. Bergamini, G.P. Testore, S. Minelli, and M.C. Bossa. 2009. Characterization of coagulase-negative staphylococcal isolates from blood with reduced susceptibility to glycopeptides and therapeutic options. *BMC Infect. Dis.* 9:83. doi:10.1186/1471-2334-9-83
42. Noskin, G.A. 2005. Tigecycline: A New Glycylcycline for Treatment of Serious Infections. *Clin. Infect. Dis.*41:S303–S314.
43. Olivares, M.F., R.H. Orozco, R.S. Garrido, F.F. Rodríguez-Vidigal, A.V. Tomé, and M.R. Marcos. 2011. Activity of vancomycin, ciprofloxacin, daptomycin and linezolid against coagulase negative staphylococci bacteremia. *Rev. Esp. Quimioter.*24(2):74-78
44. Oliveira, D.C., and H. Lencastre. 2002. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob.Agents Chemother.*46(7):2155-61.
45. Otto, M. 2009. *Staphylococcus epidermidis* - the ‘accidental’ pathogen. *Nature Rev.* 7:556-567.
46. Palazzo, I.C.V., M.L.C. Araújo, and A.L.C. Darini. 2005. First Report of Vancomycin-Resistant Staphylococci Isolated from Healthy Carriers in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 43(1):179–85.
47. Rowlinson, M.C., P. LeBourgeois, K. Ward, Y. Song, S.M. Finegold, and D.A. Bruckner. 2006. Isolation of a Strictly Anaerobic Strain of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Clin. Microbiol.* 44(3):857-60.
48. Tee, W.S.N., S.Y. Soh, R. Lin, and L.H. Loo. 2003. *Staphylococcus lugdunensis* Carrying the *mecA* Gene Causes Catheter-Associated Bloodstream Infection in Premature Neonate. *J.Clin. Microbiol.* 41(1):519–520.

49. Veach, L.A., M.A. Waller, M. Barrett, F.P. Koontz, and R.P. Wenzel. 1990. Vancomycin resistance in *Staphylococcus haemolyticus* causing colonization and bloodstream infection. *J. Clin. Microbiol.* 28:2064-2068.
50. Venkatesh, M.P., F. Placencia, and L.E. Weisman. 2006. Coagulase-Negative Staphylococcal Infections in the Neonate and Child: An Update. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* 17:120-127.

Artigo 3 - Journal of Applied Microbiology

**DETECÇÃO DO SISTEMA *agr* E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM
S. epidermidis PRODUTORES DE BIOFILME**

Valéria Cataneli Pereira*, Luíza Pinheiro, Carla Ivo Brito, Adilson de Oliveira; Katheryne Benini Martins, Danilo Flávio Moraes Riboli, Martins, Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

UNESP- Univ Estadual Paulista, Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu-SP, Brasil

***S. epidermidis*: Sistema *agr*, resistência e produção de biofilme**

*** Autor Correspondente:**

Valéria Cataneli Pereira

UNESP- Univ Estadual Paulista, Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu-SP. Brasil

Caixa Postal 510, CEP 18618-970

valeriacataneli@gmail.com

RESUMO

Objetivos

Determinar o locus *agr*, sensibilidade aos antimicrobianos em amostras de *S. epidermidis* produtoras de biofilme e analisar o perfil clonal de isolados de hemoculturas provenientes de pacientes internados no Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) em um período de 20 anos.

Métodos e Resultados

A pesquisa dos genes de biofilme (*icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD*, *bhp* e *aap*) realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR) e a expressão por transcriptase reversa-PCR (RT-PCR) revelaram em 61 *S. epidermidis*, 83,6% do operon *ica*, 11,5% do gene *bhp* e 32,8% do gene *aap*. Foram detectados o locus *agrI* em 77% e o *agrII* em 19,7%. A resistência à oxacilina foi verificada pela detecção do gene *mecA* em 90,1% e a determinação da concentração inibitória mínima (MIC) por E-test mostrou 83,6% de resistência à oxacilina, 4,9% à tigeciclina e resistência intermediária à quinupristina/dalfopristina em uma amostra. As amostras foram sensíveis à linezolida e daptomicina e apresentaram valores elevados de MIC₅₀ e MIC₉₀ à vancomicina. A determinação do perfil clonal revelou 11 clusters e o cluster majoritário foi tipado como ST2.

Conclusões

S. epidermidis apresentou capacidade de produção do biofilme, com predomínio do locus *agrI*, resistência à oxacilina e maior frequência de SCC_{mec} tipo III. Alguns isolados foram resistentes a novos antimicrobianos e a tipagem molecular revelou clones persistentes por até 17 anos. O clone invasivo *S. epidermidis* ST2 foi o majoritário, revelando a importância da valorização desses microrganismos como importantes agentes com potencial de causar sérias infecções em

pacientes internados e da disseminação desses clones patogênicos e resistentes dentro do ambiente hospitalar.

Significância e Impacto do Estudo

A caracterização da multirresistência e da capacidade de formação do biofilme com o locus *agrI* em *S. epidermidis* isolados de hemocultura foi de grande importância para melhor conhecimento dos clones que persistem em um hospital universitário em um período de 20 anos. Foi caracterizado um clone invasivo de *S. epidermidis* que pode estar associado a sérias complicações clínicas.

palavras-chave: biofilme; *mecA*; vancomicina, linezolida; daptomicina; quinupristina/dalfopristina; tigeciclina; PFGE; MLST.

ABSTRACT

Objectives

To establish the *agr* locus, the susceptibility of biofilm-producing *S. epidermidis* specimens to antimicrobial agents, and to analyze the clonal profile of blood culture specimens from inpatients at the UNESP Hospital das Clínicas in Botucatu, Brazil, along a 20-year period.

Methods and Results

Detection of biofilm-related genes (*icaA*, *icaB*, *icaC* and *icaD*, *bhp* and *aap*) by polymerase chain reaction (PCR) and expression by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) showed 83.6% of *ica* operon, 11.5% of *bhp* gene, and 32.8% of *aap* gene for 61 *S. epidermidis* specimens. The *agrI* and *agrII* loci were detected in 77% and 19.7%, respectively. Oxacillin-resistance was verified by detection of *mecA* gene in 90.1%, and the minimal inhibitory concentration (MIC) values assessed by E-test have shown 83.6% resistance to oxacillin, 4.9% resistance to tigecycline, and intermediate resistance to quinupristin/dalfopristin in one specimen. Specimens were shown to be sensitive to linezolid and daptomycin, with high MIC₅₀ and MIC₉₀ values to vancomycin. Clonal profile determination showed 11 clusters, and the ST2 type was determined to be the major cluster.

Conclusions

The ability of *S. epidermidis* to produce biofilm has been shown, with predominant *agrI* locus, oxacillin-resistance, and highest prevalence of SCC*mec* type III. Some isolates showed resistance to newer antimicrobial agents, and molecular type determination revealed clones persisting for up to 17 years. The major one was the *S. epidermidis* ST2 invasive clone, pointing to the relevance of considering such organisms as important pathogens with potential ability to cause serious

infection in inpatients, as well as taking into account the potential dissemination of such resistant pathogenic clones in hospital settings.

Study Significance and Impact

The identification of *S. epidermidis* isolated from blood culture as a multi-resistant organism with the ability to form biofilm with the *agrI* locus was highly important for a better understanding of clones persisting in a university hospital for a 20–year period. An invasive *S. epidermidis* clone was characterized, which may be associated with serious clinical complications.

KEY WORDS: biofilm; *mecA*; vancomycin; linezolid; daptomycin; quinupristin/dalfopristin; tigecycline; PFGE; MLST.

INTRODUÇÃO

Os Estafilococos coagulase-negativos (ECN) são membros do gênero *Staphylococcus*, e principais colonizadores da microbiota humana. São os microrganismos mais isolados em materiais clínicos e por serem oportunistas podem causar sérias infecções, principalmente em pacientes imunossuprimidos e que fazem uso de próteses (Kloos *et al.*, 1999; Rowlinson *et al.*, 2006). A capacidade de produzir fatores de virulência, como o biofilme, e a resistência aos antimicrobianos podem dificultar o tratamento das infecções causadas por ECN.

O biofilme, considerado o principal fator de virulência dos ECN, é definido como uma interação complexa de microrganismos incorporados em uma matrix extracelular de polissacarídeo, proteínas e ácido nucleico (Fey *et al.*, 2010), que confere proteção aos microrganismos envolvidos do sistema imune do hospedeiro durante a infecção (Otto 2004). O mecanismo exato para a formação do biofilme ainda está sendo esclarecido, mas sabe-se que quatro passos estão envolvidos nesse processo: a adesão, a acumulação, a maturação e o desprendimento. Na constituição do biofilme de *Staphylococcus* spp., alguns genes estão implicados na codificação das mais importantes substâncias e proteínas: o operon *ica*, que abrange os genes *icaA*, *icaC*, *icaD* e *icaB*, a proteína associada ao acúmulo (Aap) e a proteína associada ao biofilme (Bhp).

O operon *ica* sintetiza um polissacarídeo de adesão intercelular (PIA) que permite a ligação célula-célula e formação de multicamadas, sendo sua principal função a contribuição para a formação do biofilme (Hussain *et al.*, 1993; Fey *et al.*, 2010). Apesar de sua importância, foi reconhecido que a sintetização do PIA não é essencial para a formação do biofilme em cepas de *S. epidermidis* (Hussain *et al.*, 1993), pois a formação de biofilme independente de PIA está relacionada a proteínas que podem substituir esse polissacarídeo, como a Proteína associada ao

acúmulo (Aap) e a Proteína associada ao Biofilme (Bhp). Aap é uma proteína com um N-terminal de domínio A e um de domínio B, processada por proteases e sua forma ativa é uma proteína fibrilar, liberada em "tufos". A sua acumulação é através da dimerização de Zn²⁺-dependentes dos domínios B sobre as células vizinhas, enquanto o domínio A é responsável pela adesão aos corneócitos, auxiliando na adesão à pele (Fey *et al.*, 2010). Já a indução da formação do biofilme e da acumulação na ausência do PIA é induzida pela Bhp, proteína homóloga à Bap de *S. aureus*, e seu mecanismo para a contribuição da formação do Biofilme ainda não está esclarecido (Cucarella *et al.*, 2001; Gill *et al.*, 2005).

A formação do biofilme, assim como outros fatores de virulência em *Staphylococcus spp.*, é regulada por um sistema com atividade *quorum sensing*, que permite a comunicação entre as células bacterianas, a detecção da densidade celular e uma reação fenotípica de acordo com a fase de crescimento em que a cultura se encontra (Novick *et al.*, 2008; McCulloch 2006). O sistema *agr* (*accessory gene regulator*) é o principal sistema com atividade *quorum sensing*, sendo descritos três polimorfismos do locus *agr* em *S. epidermidis* (*agr* I, II e III) (Li *et al.*, 2004). O locus *agr* contribui para a regulação da virulência dos ECN em diferentes momentos da infecção, sendo as proteínas relacionadas à aderência produzida na fase exponencial da curva de crescimento bacteriano e algumas exoproteínas secretadas na fase pós-exponencial (Bohach *et al.*, 1997).

Além da capacidade da formação do biofilme em ECN, o aumento da resistência aos antimicrobianos dificulta o tratamento das infecções causadas por essas bactérias. As altas taxas de resistência à oxacilina ressaltam a importância dos estudos de ECN capazes de formar o biofilme, que está relacionado à persistência das infecções e a diminuição da eficácia da atividade dos antimicrobianos (Otto 2008; Fey *et al.*, 2010). Assim, este estudo objetivou determinar o

locus *agr*, sensibilidade aos antimicrobianos em amostras de *S. epidermidis* produtoras de biofilme e analisar o perfil clonal de isolados de hemoculturas provenientes de pacientes internados no HC da FMB, UNESP, Botucatu em um período de 20 anos.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram estudadas 300 amostras de ECN provenientes de hemoculturas isoladas de pacientes internados no Hospital das Clínicas de Botucatu – Universidade Estadual Paulista (UNESP). As amostras estudadas foram do período de 1990 a 2009 e estavam mantidas na Coleção de Cultura do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP. O critério de seleção das amostras por espécies considerou uma prevalência média de 35% de ocorrência, com uma margem de erro de 5% e intervalo de confiança de 95%.

O isolamento das linhagens foi realizado conforme as normas descritas por Koneman *et al.*, (1997). As amostras foram isoladas em Agar sangue e realizou-se a coloração de Gram, para observação da morfologia das colônias, e a prova de catalase para confirmação do gênero *Staphylococcus*. Logo após, as amostras de estafilococos foram submetidas à prova de coagulase para a diferenciação entre os grupos de estafilococos coagulase-positivos e coagulase-negativos. As amostras pertencentes ao grupo dos coagulase-negativos foram submetidas a provas bioquímicas propostas por Cunha *et al.*, (2004) para identificação fenotípica das espécies. A identificação genotípica foi realizada usando *primers* de sequências conservadas adjacentes aos genes 16S e 23S pela técnica ITS-PCR (*internal transcribed spacer-polymerase chain reaction*) descrita por Barry *et al.* (1991) e Couto *et al.* (2001), usando os *primers* *G1* e *L1* descritos na

Tabela 1. A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese em agarose metaphor 3% e corado com Saber Safe. Para controle dos resultados, foram utilizadas as seguintes linhagens de referência internacional: *S. auricularis* (ATCC 33753), *S. capitis* subsp. *capitis* (ATCC 27843), *S. capitis* subsp. *urealyticus* (ATCC 49325), *S. caprae* (ATCC 35538), *S. cohnii* (ATCC 49330), *S. cohnii* subsp. *cohnii* (ATCC 29974), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *S. epidermidis* (ATCC 35983), *S. haemolyticus* (ATCC 29970), *S. hominis* (ATCC 27844), *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* (ATCC 700237), *S. lentus* (ATCC 700403), *S. lugdunensis* (ATCC 700328), *S. saprophyticus* (ATCC 15305), *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* (ATCC 43808), *S. sciuri* subsp. *sciuri* (ATCC 29062), *S. simulans* (ATCC 27851), *S. xylosus* (ATCC 29979) e *S. warneri* (ATCC 10209).

Extração de DNA

Para a extração do DNA foi utilizado o Kit Illustra (GE Healthcare) que consistiu na digestão inicial das células de estafilococos com lisozima (10 mg/mL) e proteinase K (20 mg/mL). Adicionaram-se a seguir 500 µL da solução de extração à mistura, que foi centrifugada a 10.000 x g por 4 minutos. O sobrenadante foi transferido para a coluna e centrifugado a 5.000 x g por 1 minuto. O líquido coletado foi descartado, e novamente se adicionaram 500 µL de solução de extração à coluna. Após a centrifugação e descarte do líquido coletado, adicionaram-se 500 µL da solução de lavagem à coluna, que foi submetida à centrifugação a 20.000 x g por 3 minutos. A seguir, a coluna foi transferida para um tubo de 1,5 mL e utilizaram-se para a eluição 200 µL de água Milli Q aquecida a 70°C.

Deteção de genes relacionados à formação de biofilme e resistência à oxacilina (gene *mecA*)

As reações de PCR para a detecção dos genes relacionados à formação de biofilme (*icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD*, *aap* e *bhp*) e do gene *mecA* foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 ml em volumes totais de 25µl contendo 10pmol de cada *primer* (Tabela1), 2,5 U de Taq DNA polimerase, 200 µM de desoxiribonucleotídeos trifosfatados, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 0,75 mM de MgCl₂ e 3 µl de DNA. A incubação foi realizada em Termociclador PTC-100 MJ Research empregando diferentes parâmetros para cada gene. Para o gene *icaA* foram realizados 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento dos *primers* a 49°C por 45 segundos e extensão a 72°C por um minuto. Para os genes *icaB*, *icaC* e *icaD* a incubação iniciou-se a temperatura de 94°C por 5 minutos seguidos de 50 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos *primers* a 54°C por 30 segundos e extensão a 72°C por um minuto. Para os genes *aap* e *bhp* foram realizados 30 ciclos de 94°C por 45 segundos, anelamento dos *primers* a 54°C por 45 segundos e extensão a 72°C por um minuto e 30 segundos. Para o gene *mecA* foram realizados 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos *primers* a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por um minuto. A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 2% e corada com Saber Safe.

Extração de RNA

As amostras positivas para genes relacionados à formação do biofilme foram submetidas à extração de RNA com o kit Illustra RNAspin Mini (Ge Healthcare), que consistiu na digestão inicial das células de estafilococos com tampão TE (10mM de Tris, 1mM EDTA [pH 8,0]) contendo 2 mg/mL de lisozima. Adicionaram-se a seguir 350 µL de Buffer RA1 e 3,5 µL de β-

mercaptoetanol. A amostra foi filtrada em filtros RNAspin Mini Filter units e em seguida adicionaram-se 350 μL de etanol 70%. Nesta etapa, a amostra foi transferida para os filtros RNAspin Mini Column para ajustar as condições de ligação no filtro, e logo em seguida adicionaram-se 350 μL de MDB (*membrane desalting buffer*) para ocorrer a ligação do RNAm na membrana do filtro. Na sequência realizaram-se duas etapas de lavagem com 600 μL e 250 μL de Buffer RA3 e em seguida o RNAm foi eluído em 45 μL de H_2O RNA-*free* acrescido de 5 μL de RNA guard.

Logo em seguida realizou-se o tratamento do RNAm com DNase para eliminar qualquer contaminação com DNA. O tratamento de 8 μL de RNAm se iniciou adicionando 2 μL de DNase Buffer e 2 μL de DNase e incubando a 37°C por 60 minutos. Logo a seguir adicionaram-se 2 μL de Stop DNase, incubando-se a 65°C por 10 minutos.

Obtenção do cDNA

Após o tratamento com DNase, a amostra de RNAm foi convertida a cDNA. Adicionaram-se a amostra de RNAm tratada com DNase (12 μL), 1 μL de *random primer* a 75 ng/ μL , juntamente com 6 μL de água nuclease-*free* e 1 μL de dNTP (200 μM de desoxirribonucleotídeos trifosfatados). Em seguida, a mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos para desnaturação do RNA e ligação do *primer*. Posteriormente adicionaram-se à mistura 4 μL do tampão para a transcriptase reversa (5X First-Strand Buffer), 1 μL de dietiltreitol (DTT) e 1 μL de SuperScript™ III (200 U/ μL) e levou-se a mistura ao termociclador PTC-100 MJ Research. Para obtenção do cDNA, foram utilizados ciclos de 25°C por 5 minutos, 50°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos, resfriando-se em seguida a 4°C. Para o controle interno da extração de RNA foi realizada a pesquisa de RNA ribossômico 16S com os *primers* 16S1 e 16S2 (Tabela 1),

que corresponde a regiões do gene RNAr que são conservadas entre os estafilococos e específicas do gênero. O cDNA obtido foi submetido à amplificação pela técnica de PCR e eletroforese para visualização dos produtos amplificados.

Determinação de SCC mec

Determinou-se o tipo de SCC mec nas amostras positivas para o gene *mecA*. As reações foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 ml em volumes totais de 50 μ l contendo 10 pmol dos primers CIF2 F2 e CIF2 R2, 6 pmol dos primers KDP F1 e KDP R1, 5 pmol dos primers DCS F2, DCS R1, RIF4 F3 e RIF4 R9 (Tabela 1), 1,25 U de Taq DNA polimerase, 200 μ M de DNA. A incubação foi realizada em Termociclador PTC-100 MJ Research empregando os seguintes parâmetros: início a 92°C por 3 minutos seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento dos *primers* a 56°C por 1 minuto e extensão a 72 °C por um minuto e 30 segundos. A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 2% e corado com Saber Safe. Para a caracterização dos tipos de SCC mec foi utilizado o protocolo descrito por Oliveira *et al.* (2002) e modificado por Machado *et al.* (2007).

Determinação da Concentração Inibitória Mínima por E-test

A sensibilidade *in vitro* das amostras de ECN foram testadas para os antimicrobianos: Oxacilina, Vancomicina, Daptomicina, Linezolida, Quinupristina/Dalfopristina e Tigeciclina. Para tanto, foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dessas drogas, através do E-test. O procedimento utilizou tira de plástico inerte, na qual é incorporada um gradiente de concentração estabilizado do antimicrobiano a ser pesquisado. Primeiramente foi semeado um inóculo da amostra, seguindo a escala 0,5 de McFarland, em placa de Mueller-Hinton e em

seguida as tiras de plásticos contendo cada um dos antimicrobianos foram aplicadas sobre o inóculo e incubadas a 35°C por 24 horas. Os critérios utilizados para determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos foram: Oxacilina < 0,5 µg/mL (sensível) para ECN, exceto *S. lugdunensis* (sensível ≤ 2 µg/mL e resistente ≥ 4 µg/mL); Vancomicina <4 µg/mL (sensível), 8-16 µg/mL (intermediário) e >32 µg/mL (resistente); Linezolida ≤4 µg/mL (sensível); Daptomicina ≤1 µg/mL; Quinupristina/Dalfopristina ≤1 µg/mL (sensível), 2 µg/mL (intermediário) e ≥4 µg/mL (resistente); Tigeciclina ≤0,5 µg/mL (Sensível) (CLSI 2013; FDA 2005; Eucast 2013).

Determinação do grupo *agr*

As amostras de ECN positivas na técnica de *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) na pesquisa do RNAm dos genes de biofilme foram submetidas ao método de tipagem do grupo *agr* por reações de PCR descritas por Li *et al.*, (2004). Foram realizadas reações com os primers *agrA*, *agrB* e *agrC* (Tabela 1), consistindo em 25 µL contendo 10 pmol de cada *primer*, 2,5 U de Taq DNA polimerase, 200 µM de desoxirribonucleotídeos trifosfatados, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 0,75 mM de MgCl₂ e 3 µL de DNA. A incubação foi realizada em termociclador PTC-100 MJ Research empregando-se os seguintes parâmetros: um primeiro ciclo a 94°C por cinco minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos *primers* a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por um minuto; o final dos 35 ciclos foi seguido de uma extensão a 72°C por sete minutos. A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 2% e corada com Saber Safe.

O primer *agrA* corresponde a uma região conservada comum aos grupos *agrI*, *agrII* e *agrIII*. O primer *agrB* amplifica uma região hipervariável com sequência comum aos grupos *agrII* e *agrIII* e o primer *agrC* é específico apenas para a região correspondente ao grupo *agrII*.

Análise por PFGE

As amostras de ECN positivas pela técnica de RT-PCR foram submetidas à análise do perfil clonal pela técnica de Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), segundo o protocolo modificado de McDougal *et al.* (2003). As amostras foram cultivadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion) e incubadas a 37°C por 24h. Centrifugaram-se em microtubo, a 12.000 rpm por um minuto, 200 µL da amostra de ECN. Depois de desprezado o sobrenadante, foram adicionados 150 µL de solução TE (10 mM de Tris, 1 mM EDTA [pH 8,0]) com agitação em vórtex até a completa dissolução do *pellet* formado. As amostras foram mantidas em banho-maria por 10 minutos a 37°C. Foram acrescidas de 2,5 µL de lisostafina (1 mg/mL) por amostra e agitadas em vórtex. Após a adição de lisostafina, acrescentaram-se 150 µL de agarose *low melting*, e as amostras foram imediatamente adaptadas nos moldes para plugues até solidificarem, quando então foram colocadas em 2 mL de solução EC (6 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 100 mM EDTA, 0,5% Brij-58, 0,2% desoxicolato de sódio, 0,5% laurilsarcosila sódica) e incubadas a 37°C por um mínimo de 4 horas. O EC foi retirado e os plugues foram lavados quatro vezes com 2 mL de TE à temperatura ambiente por meia hora. Para a restrição do DNA genômico utilizaram-se 2 µL da enzima *SmaI* (Fast Digest *SmaI*, Fermentas Life Science, Canadá) para *Staphylococcus*. A restrição foi realizada em placa de 96 poços adicionando-se primeiramente o tampão enzimático (45 µL de água milli Q e 5 µL do tampão enzimático por amostra) deixando a placa na geladeira por 30 minutos. Em seguida, retirou-se o tampão sem enzima e adicionou-se o tampão com a

enzima (43 µL de água milli Q, 5 µL do tampão enzimático e 2 µL da enzima por amostra), deixando a placa na estufa a 37°C por 6 minutos segundo especificações do fabricante. A eletroforese foi executada em aparelho CHEF-DR III System (BioRad Laboratories, EUA) em gel de agarose a 1% preparado com TBE 0,5 M (1 g em 100mL de água milli Q) (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad Laboratories, EUA) sob as seguintes condições: intervalos de tempo de pulso de 5 a 40 segundos por 21 horas; em rampa linear; 6 V/cm; ângulo de 120°; 14°C; 2,2 L de 0,5 M de TBE como tampão de corrida. Foi utilizado Lambda Ladder PFG Marker (New England BioLabs) como marcador molecular. Os géis foram corados com GelRed (400 mL de água destilada e 30 µL de GelRed 10.000 X em água, Biotium, EUA) por 1 hora, e fotografados sob transiluminação UV. Para análise de similaridade foi utilizado o software BioNumerics (versão 7.0; Applied Maths, Bélgica), cálculo dos coeficientes de correlação Dice e criação do dendrograma pelo método UPGMA (*unweighted pair group method using arithmetic averages*). A tolerância da posição das bandas e a otimização foram ajustadas para 1.25 e 1% respectivamente. Um coeficiente de similaridade de 80% foi escolhido para determinação dos *clusters*.

Determinação do *Multilocus Sequence Typing* (MLST)

O MLST foi realizado segundo as normas descritas por Enright *et al.*, (2000). Cada par de primer amplifica um fragmento interno do gene *housekeeping* (cerca de 500 pb) (Tabela 4): carbamatoquinase (*arcC*) desidrogenase, do chiquimato (*aroE*), glicerol quinase (*glpF*), guanilatoquinase (*gmk*), acetiltransferase fosfato (*pta*), triosefosfatoisomerase (*tpi*), e acetil coenzima A acetiltransferase (*yqiL*).

A purificação foi realizada pelo *Kit HiYield™ Gel/PCR Fragments Extraction* e as reações foram realizadas em sequenciador ABI3500 de 8 capilares (de 50cm) usando como

polímero o POP7 (*Applied Biosystems*). A visualização das sequências (eletroforograma) foi realizada pelos programas Mega, Laser Gene e *Bionumerics* (versão 7.1; Applied Maths, Bélgica). A análise e comparação das sequências foram realizadas por banco de dados via internet (<http://www.mlst.net>).

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados nas técnicas de PCR para identificação genotípica, gene *mecA*, biofilme, tipo de SCC*mec* e MLST.

Primer	Sequencias de nucleotídeos 5'a 3'	Pb	Produto
<i>agrA1</i>	GCTGCAACCAAGAAACAACC	102	<i>agrI, II, III</i>
<i>agrA2</i>	CGTGTATTCATAATATGCTTCGATT	2	
<i>agrB1</i>	TATGCAAGCCAAGCACTTGT	453	<i>agrIII</i>
<i>agrB2</i>	GTGCGAAAGCCGATAACAAT		
<i>agrC1</i>	CCTTGCTAGTACTACACCTTC	615	<i>agrII</i>
<i>agrC2</i>	GTGCTTGGCTTGCATAAACA		
<i>L1</i>	GAAGTCGTAACAAGG	-	16S
<i>G1</i>	CAAGGCATCCACCGT	-	23S
<i>icaA1</i>	TCTCTTGCAGGAGCAATCAA	187	<i>icaA</i>
<i>icaA2</i>	TCAGGCACTAACATCCAGCA		
<i>icaB1</i>	CTGATCAAGAATTTAAATCACAAA	302	<i>icaB</i>
<i>icaB2</i>	AAAGTCCCATAAGCCTGTTT		
<i>icaC1</i>	TAAC TTTAGGCGCATATGTTT	400	<i>icaC</i>
<i>icaC2</i>	TTCCAGTTAGGCTGGTATTG		
<i>icaD1</i>	ATGGTCAAGCCCAGACAGAG	198	<i>icaD</i>
<i>icaD2</i>	CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA		
<i>bhp1</i>	ATGAAAATAAACAAGGATTTTC	130	<i>Bhp</i>
<i>bhp2</i>	GCCTAAGCTAGATAATGTTTG	0	
<i>aap1</i>	ATGGGCAAACGTAGACAAG	110	<i>Aap</i>
<i>aap2</i>	ACCGTAAAAATCGTAATTATCTC	0	
<i>mecA1</i>	AAAATCGATGGTAAAGGTTGG	533	PBP2a
<i>mecA2</i>	AGTTCTGCAGTACCGGATTTG		
DCS F2	CATCCTATGATAGCTTGGTC	342	SCC <i>mec</i> I, II e IV
DCS R1	CTAAATCATAGCCATGACCG		
CIF2 F2	TTCGAGTTGCTGGATGAAGAAGG	495	SCC <i>mec</i> I
CIF2 R2	ATTTACCACAAGGACTACCAGC		
KDP F1	AATCATCTGCCATTGGTGATGC	284	SCC <i>mec</i> II
KDP R1	CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG		
RIF4 F3	GTGATTGTTTCGAGATATGTGG	243	SCC <i>mec</i> III
RIF4 R9	CGCTTTATCTGTATCTATCGC		
<i>arcC-Up</i>	TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC	456	Carbamato quinase
<i>arcC-Dn</i>	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG		
<i>aroE-Up</i>	ATCGGAAATCCTATTTACATTC	456	Desidrogenase do chiquimato
<i>aroE-Dn</i>	GGTGTTGTATTAATAACGATATC		
<i>aroE-Up</i>	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC	465	Glicerol quinase
<i>aroE-Dn</i>	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC		
<i>gmk-Up</i>	ATCGTTTTATCGGGACCATC	429	Guanilato quinase
<i>gmk-Dn</i>	TCATTA ACTACAACGTAATCGTA		
<i>pta-Up</i>	GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG	474	Fosfato acetiltransferase
<i>pta-Dn</i>	GACCCTTTTGTGAAAAGCTTAA		
<i>tpi-Up</i>	TCGTTCACTTCTGAACGTCGTGAA	402	Triose-fosfato isomerase
<i>tpi-Dn</i>	TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC		
<i>yqiL-Up</i>	CAGCATACAGGACACCTATTGGC	516	Acetil coenzima A acetil transferase
<i>yqiL-Dn</i>	CGTTGAGGAATCGTACTGGAAC		

Fonte: Li *et al.* (2004), Couto *et al.* (2001); Arciola *et al.* (2001); Arciola *et al.* (2005) Qin *et al.* (2007); Murakami *et al.* (1991); Oliveira *et al.* (2002); Machado *et al.* (2007); Enright *et al.* (2000)

RESULTADOS

Identificação das Amostras

A identificação dos ECN pelo método bioquímico detectou 223 (74,3%) *S. epidermidis*, 27 (9,0%) *S. haemolyticus*, 22 (7,3%) *S. hominis*, 14 (4,7%) *S. warneri*, 9 (3,0%) *S. lugdunensis* e 5 (1,7%) *S. capitis*. Já a técnica genotípica (ITS-PCR), identificou 223 (74,3%) *S. epidermidis*, 29 (9,7%) *S. haemolyticus*, 23 (7,7%) *S. hominis*, 11 (3,7%) *S. warneri*, 9 (3,0%) *S. lugdunensis* e 5 (1,7%) *S. capitis*. Houve concordância de 98% entre os dois métodos utilizados para a identificação das espécies de ECN.

Detecção dos genes relacionados à formação do biofilme

Os genes relacionados à formação de biofilme foram pesquisados nas 300 amostras em estudo, sendo 163 (54,3%) positivas para a presença dos genes do operon *ica* e/ou genes *bhp* e *aap*. O gene *icaA* foi positivo em 124 (41,3%) ECN, o *icaB* em 165 (55,0%), o *icaC* em 222 (74,0%) e o *icaD* em 236 (78,7%). A presença dos genes *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD*, concomitantemente, foi detectada em 107 (35,7%) amostras. Os genes *bhp* e *aap*, foram detectados em 37 (12,3%) e 104 (34,7%) dos ECN, respectivamente. A distribuição desses genes em relação às espécies de ECN pode ser visualizada na Tabela 2.

Tabela 2. Distribuição dos genes envolvidos na formação do Biofilme em espécies de ECN

ESPÉCIES	<i>icaA</i>		<i>icaB</i>		<i>icaC</i>		<i>icaD</i>		Operon <i>ica</i>		<i>bhp</i>		<i>aap</i>	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>S. epidermidis</i>	119	96,8	144	87,3	181	81,5	179	75,8	105	98,1	34	91,9	103	99,0
<i>S. haemolyticus</i>	0	0,0	10	6,1	13	5,9	23	9,7	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>S. hominis</i>	3	2,4	7	4,2	17	7,7	17	7,2	1	0,9	1	2,7	1	1,0
<i>S. warneri</i>	1	0,8	3	1,8	7	3,2	6	2,5	1	0,9	0	0,0	0	0,0
<i>S. lugdunensis</i>	0	0,0	0	0,0	2	0,9	7	3,0	0	0,0	1	2,7	0	0,0
<i>S. capitis</i>	0	0,0	1	0,6	2	0,9	4	1,7	0	0,0	1	2,7	0	0,0
TOTAL	123		165		222		236		107		37		104	

N: número de amostras de ECN; **%:** percentagem de amostras de ECN; **Operon *ica*:** amostras de ECN positivas para os genes *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD*, concomitantemente.

Detecção do RNAm de genes de biofilme nas amostras de ECN

As 163 amostras que foram positivas para os genes do operon *ica*, *bhp* e *aap* foram submetidos à técnica de RT-PCR para detecção do RNAm, sendo a capacidade de produção do biofilme detectada em 61 (37,4%) *S. epidermidis*. Dessas 61 amostras, a detecção do operon *ica* completo foi comprovada em 51 (83,6%) de *S. epidermidis* e o RNAm dos genes *bhp* e *aap* foram detectados em 7 (11,5%) e 20 (32,8%), respectivamente. Houve expressão concomitante do operon *ica* e gene *bhp* em 3 *S. epidermidis* e do operon *ica* e gene *aap* em 12 *S. epidermidis* (Tabela 3). Não houve expressão de genes relacionados à formação do biofilme nas demais espécies estudadas.

Determinação do Locus *agr* em *S. epidermidis* produtores de Biofilme

Os locus *agr* I, II e III foram pesquisados nas 61 amostras de *S. epidermidis* que expressaram genes relacionados à produção de biofilme. O *agr* I foi detectado em 47 (77,1%),

sendo 45,9% nas que expressaram apenas o operon *ica*, 6,5% nas que expressaram apenas o gene *aap*, 4,9% nas que expressaram o gene *bhp* e o operon *ica* e 19,7% nas que expressaram o gene *aap* e o operon *ica*. O *agrII* foi detectado em 12 (19,7%) *S. epidermidis*, sendo detectado em todas amostras que expressaram apenas o gene *bhp*. O locus *agr* não foi detectado em 2 *S. epidermidis* que apresentaram a expressão do operon *ica*. Esses resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Relação dos genes relacionados a produção do biofilme e a detecção do locus *agr* em *S. epidermidis* positivos pela técnica de RT-PCR

Genes	N	Locus <i>agr</i>		
		I	II	Não detectado
Operon <i>ica</i>	34	28 (45,9%)	4 (6,5%)	2 (3,3%)
<i>bhp</i>	4	0 (0,0%)	4 (6,5%)	0 (0,0%)
<i>aap</i>	6	4 (6,5%)	2 (3,3%)	0 (0,0%)
Operon <i>ica</i> + <i>bhp</i>	3	3 (4,9%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Operon <i>ica</i> + <i>aap</i>	14	12 (19,7%)	2 (3,3%)	0 (0,0%)
TOTAL	61	47 (77,1%)	12 (19,7%)	2 (3,3%)

Operon *ica*: detecção dos genes *icaA* + *icaB* + *icaC* + *icaD* (*icaADCB*)

Detecção do gene *mecA* e do SCC*mec* em *S. epidermidis* produtores de biofilme

A pesquisa do gene *mecA* foi realizada nas 61 que confirmaram a capacidade de expressão dos genes do biofilme pela técnica de RT-PCR, sendo detectado em 55 (90,1%) *S. epidermidis*. A tipagem do SCC*mec* possibilitou a caracterização de 5 (8,1%) do tipo I, 37 (60,6%) do tipo III, 14 (23,9%) do tipo IV e 1 (1,6%) não tipada. A distribuição do gene *mecA* e dos tipos de SCC*mec* nas amostras de ECN estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Distribuição da detecção do, gene *mecA* e Cassete Cromossômico Estafilocócico *mec* em *S. epidermidis* positivos pela técnica de RT-PCR.

	<i>mecA</i>	SCC <i>mec</i>			
		I	III	IV	NT
Operon <i>ica</i> (n=34)	33 (54,0%)	3 (4,9%)	22 (36,0%)	8 (13,1%)	0 (0,0%)
<i>bhp</i> (4)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
<i>aap</i> (n=6)	6 (9,8%)	1 (1,6%)	3 (4,9%)	2 (3,3%)	1 (1,6%)
Operon <i>ica+bhp</i> (n=3)	3 (4,9%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	3 (4,9%)	0 (0,0%)
Operon <i>ica+aap</i> (n=14)	13 (21,3%)	1 (1,6%)	12 (19,7%)	1 (1,6%)	0 (0,0%)
61	55 (90,0%)	5 (8,1%)	37 (60,6%)	14 (23,9%)	1(1,6%)

Operon *ica*: detecção dos genes *icaA* + *icaB* + *icaC* + *icaD* (*icaADCB*)

Determinação da Concentração Inibitória Mínima aos antimicrobianos em *S. epidermidis* produtores de biofilme

A concentração inibitória mínima (CIM) aos antimicrobianos foi verificada nas amostras de *S. epidermidis* capazes de produzir o biofilme. A resistência à oxacilina foi verificada em 83,6% das amostras e à tigeciclina em 4,9%. Já a resistência intermediária a quinupristina/dalfopristina foi detectada em um *S. epidermidis* que apresentou CIM de 2µg/ml para essa droga. Os valores de CIM capazes de inibir 50% e 90% do crescimento bacteriano (MIC50 e MIC90) foram verificados, sendo esses valores considerados resistentes para a oxacilina. Com exceção da oxacilina, a vancomicina foi a droga que apresentou maiores valores de MIC50 e MIC90, não sendo detectada a resistência de *S. epidermidis* a esse antimicrobiano. As demais drogas apresentaram valores de CIM considerados sensíveis segundo os critérios do CLSI (2013) e os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Determinação da concentração Inibitória Mínima de antimicrobianos ($\mu\text{L}/\text{mL}$), MIC50, MIC90, intervalo de variação de CIM ($\mu\text{L}/\text{mL}$) e porcentagem de ECN resistentes.

Antimicrobiano	MIC50	MIC90	Variação	Resistência
Oxacilina	>256	>256	0,047 a >256	83,6%
Vancomicina	1,5	2	0,125 a 2	0
Linezolida	0,25	0,38	0,094 a 1	0
Daptomicina	0,125	0,19	0,019 a 0,5	0
Quinopristina/ Dalfopristina	0,19	0,5	0,094 a 2	0
Tigeciclina	0,125	0,25	0,016 a 0,75	4,9%

MIC50: Concentração Inibitória mínima de antimicrobiano para inibir 50% das amostras;
MIC90: Concentração Inibitória mínima de antimicrobiano para inibir 90% das amostras

Determinação do perfil clonal de *S. epidermidis* produtores de Biofilme

Foi realizada a determinação do perfil clonal das amostras produtoras de biofilme pela técnica de PFGE. A análise de macrorrestrrição do DNA cromossômico, utilizando um coeficiente estabelecido de 80% de similaridade, permitiu identificar a presença de 11 clusters, designados por letras alfabéticas de A-K. Foram verificados quatro clusters maiores com 6 a 10 isolados de *S. epidermidis*: A, G, H e J. O cluster A apresentou 6 *S. epidermidis*, sendo 4 idênticos (100% de similaridade), isolados em um intervalo de 17 anos, de 1993 a 2009, e todos apresentaram o operon *ica*, *SCCmec* III e *agrI*. O cluster G agrupou 8 amostras isoladas no período de 2000 a 2009, sendo todas com *SCCmec* IV, *agrI* e operon *ica*, e o *bhp* em três isolados. O cluster H foi o maior grupo, com 10 *S. epidermidis* isolados no período de 2001 a 2004, e todos apresentaram *SCCmec* III, *agrI* e operon *ica* e em 3 amostras o *aap*. O cluster J agrupou 6 amostras do período de 2000 a 2007, com operon *ica*, *SCCmec* III e *agrI*.

Os demais grupos, mesmo abrangendo um número menor de clones foram importantes, apresentando amostras isoladas em períodos longos. O cluster E apresentou uma amostra isolada em 1992 e novamente em 2000. Já o cluster F apresentou amostras isoladas em um intervalo de 12 anos, sendo o isolamento em 1996, 2004 e 2008 (Figura 1).

Foi realizada a caracterização pela técnica de MLST do cluster H, que agrupou maior número de isolados. Foi selecionada uma amostra que foi submetida à amplificação e sequenciamento dos sete genes *housekeeping*, para obtenção do tipo de sequência (ST), sendo caracterizada como ST2.

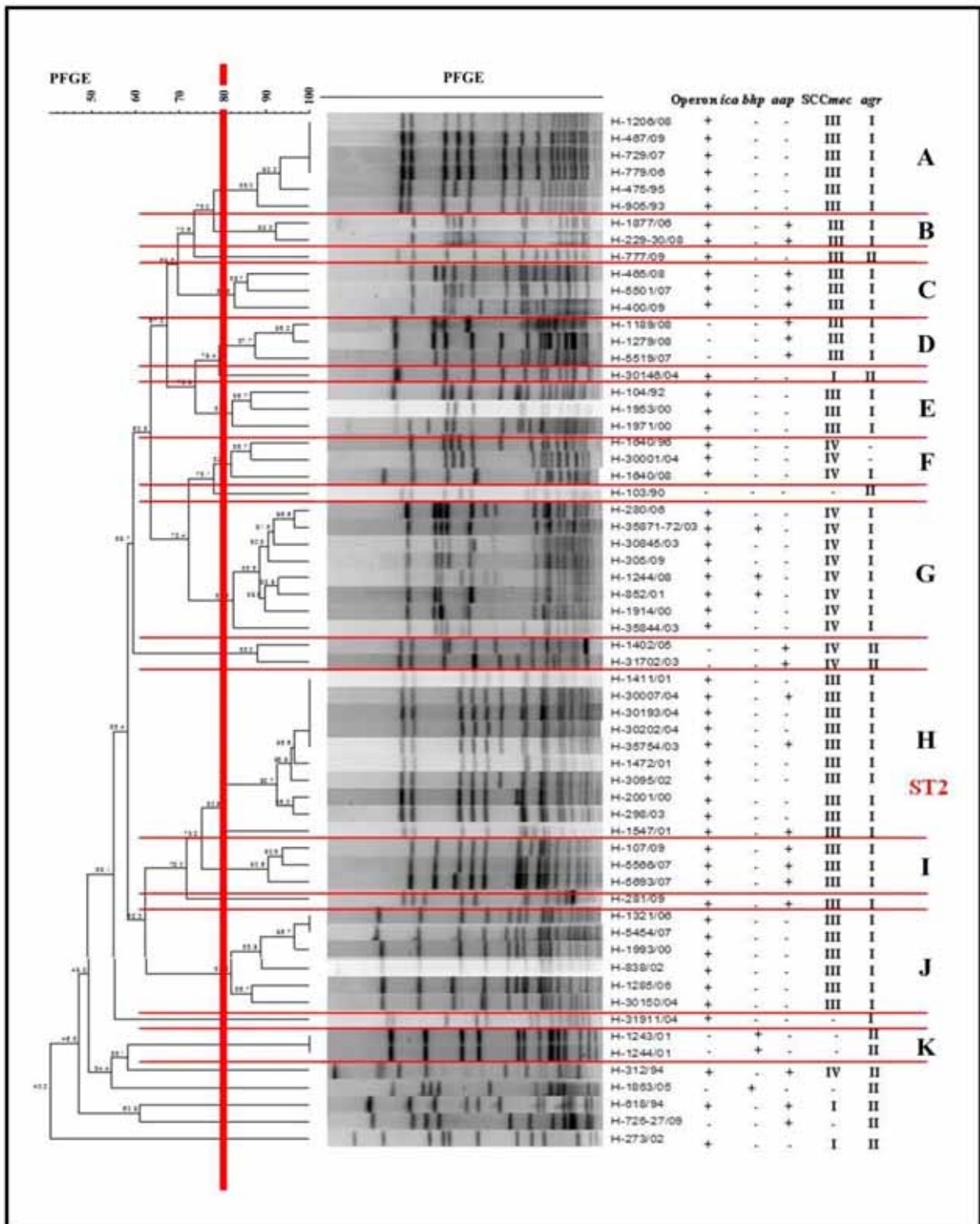


Figura 1. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (*Bionumerics Applied Maths*) de *S. epidermidis* produtores de biofilme isolados de 1990 a 2009, indicando a presença (+) ou ausência do (-) da expressão do operon *ica*, gene *bhp* e gene *aap* e carreamento do SCC*mec* e locus *agr*.

DISCUSSÃO

Os estafilococos coagulase negativa são microrganismos oportunistas capazes de causar sérias infecções, principalmente pela capacidade de sintetizar o biofilme, que confere proteção e aumenta a permanência dos ECN dentro do ambiente hospitalar. Em nosso trabalho a presença de genes relacionados à produção de biofilme foi analisada em 300 amostras de ECN isoladas de hemoculturas, sendo também investigados os possíveis mecanismos envolvidos e a susceptibilidade aos antimicrobianos utilizados no tratamento das infecções causadas por esses microrganismos.

A capacidade de aderir às superfícies e conseqüentemente a produção do biofilme são os principais fatores de virulência dos ECN, principalmente em *S. epidermidis* que é a espécie mais frequentemente isolada de materiais clínicos (Oliveira *et al.*, 2010). Os genes do operon *ica* foram detectados em todas as espécies estudadas, mas os genes do operon completo foram detectados em 35,7% isolados, sendo 98% destes pertencentes à espécie *S. epidermidis*. A capacidade de produção do PIA, através da presença do RNAm, foi detectada apenas na espécie *S. epidermidis*, sendo o operon *ica* expresso em 83,6% . Resultados similares foram encontrados por Qin *et al.* (2007), que detectaram os genes *ica* em 21,8% de *S. epidermidis* das 24 cepas produtoras do biofilme. Esses autores ressaltam que a frequência da produção de biofilme e presença do operon *ica* estão relacionadas às diferentes fontes de linhagens estudadas, sendo escarros, hemoculturas, cateteres e feridas. Segundo alguns estudos, os isolados clínicos de *S. epidermidis* são os que mais apresentam genes do operon *ica*, sendo esses genes menos frequentes em ECN isolados de indivíduos saudáveis, pois a síntese de PIA pode demandar muito custo adaptativo, não sendo vantajoso para essas bactérias (Fey *et al.*, 2010).

Recentemente foi reconhecido que o PIA não é essencial para a formação do biofilme em *S. epidermidis*, pois cepas que não possuíam os genes *ica* foram isolados de infecções

relacionadas ao biofilme. Em algumas cepas a formação do biofilme pode ser adicionalmente ou exclusivamente mediada por proteínas como a Bhp ou Aap (Otto 2009). A presença dos genes *bhp* e *aap* também foi detectada em nosso trabalho em 12,3% e 34,7% dos isolados. Embora em percentagens menores que as apresentadas pelo operon *ica*, esses genes foram positivos pela técnica de RT-PCR e apresentaram-se isolados ou concomitantemente com o operon *ica*, sendo a capacidade de expressão detectada em 11,5% para o gene *bhp* e 32,8% para o gene *aap*. Resultados similares foram encontrados por Bowden *et al.* (2005), que pesquisaram esses genes em amostras clínicas e não clínicas, determinando o gene *bhp* em 9% em isolados de bacteremia e 13% em colonizadores da pele e o gene *aap* em 27% de bacteremias, em 50% de contaminantes em hemoculturas e em 47% em *S. epidermidis* colonizadores da pele. A proteína Bhp é importante porque promove a fixação primária nas superfícies abióticas, assim como a adesão intercelular durante a formação do biofilme (Cucarella *et al.*, 2001). Já a proteína Aap é importante para a acumulação e o crescimento dos polímeros que formam o biofilme (Hussain *et al.*, 1997). A presença dos genes *bhp* e *aap* concomitantemente com os genes do operon *ica*, sugere uma associação das proteínas Bhp e Aap com o PIA, desempenhando um papel na adesão intercelular e na fase de acumulação (Bowden *et al.*, 2005).

O locus *agr* foi pesquisado em *S. epidermidis* capazes de produzir o biofilme, sendo o *agrI* o mais detectado e associado ao operon *ica* e ao gene *aap*. As cepas que foram positivas para a expressão do gene *bhp* apresentaram *agrII*. Como a regulação do sistema *agr* é associada à densidade celular, esses loci podem estar relacionados às fases de desprendimento das células do biofilme, sendo os loci *agrI* e *agrII* envolvidos nesse processo (Novick *et al.*, 2008; Schoenfelder *et al.*, 2010). *S. epidermidis* produz uma série de exoproteases estritamente reguladas pelo sistema *agr*, como δ -toxina e outras modulinas fenol solúveis. Essas exoproteases

agem como surfactantes, inibindo as ligações não covalentes das bactérias com a superfície do biofilme, resultando no desprendimento das células (Fey *et al.*, 2010). Estudos comprovaram que em *S. epidermidis* com *agr* mutante, onde o locus *agr* foi substituído por um cassete de resistência à espectinomicina, verificou-se um aumento no desenvolvimento do biofilme e intensificou a colonização em coelhos, devido a não regulação de exoproteínas (Vuong *et al.*, 2004), ocorrendo nesse caso o aumento do biofilme e o não desprendimento das células.

A pesquisa do gene *mecA* foi encontrada em 90,1% dos *S. epidermidis* capazes de produzir biofilme, estando presente principalmente nas amostras que expressaram o operon *ica* e gene *aap* e ausente nas que expressaram apenas o gene *bhp*. Nos estudos realizados por Contreras *et al.* (2013) o gene *mecA* foi detectado em 95% de *S. epidermidis* produtores de biofilme, e segundo esses autores a presença do gene *mecA* apresenta-se reforçada nessas amostras, conferindo a resistência aos demais antimicrobianos beta - lactâmicos. A tipagem do SCC*mec* possibilitou a caracterização do SCC*mec* I, III e IV nessas amostras, sendo o SCC*mec* III o mais frequente. O SCC*mec* III é o mais encontrado em *Staphylococcus* multiresistentes relacionados a infecções nosocomiais, pois esse elemento pode carrear outros genes que conferem resistência a outros agentes antimicrobianos (Ito *et al.*, 1999).

Além da pesquisa do gene *mecA* foi determinada a concentração inibitória mínima para alguns antimicrobianos utilizados no tratamento das infecções causadas por ECN. A oxacilina apresentou 83,6% de resistência, sendo os valores de MIC50 acima de 256µg/ml. Os resultados também revelaram 4,3% das amostras resistentes à tigeciclina e uma amostra apresentou resistência intermediária à quinupristina/dalfopristina. Foram detectados baixos valores de CIM para a linezolida e daptomicina, porém maiores valores de MIC50 e MIC90, para a vancomicina. Segundo alguns autores, as bactérias não produtoras de biofilme são mais susceptíveis à ação dos

antimicrobianos e ao sistema imune do hospedeiro. Portanto, a pressão seletiva imposta pelo uso de antimicrobianos no ambiente hospitalar favorece as linhagens mais adaptadas e capazes de produzir o biofilme (Vuong *et al.*, 2004; Qin *et al.*, 2007). Embora haja um custo adaptativo no carregamento de genes relacionados à formação do biofilme e resistência aos antimicrobianos, mutações adicionais podem ser compensatórias, favorecendo esses microrganismos (Andersson *et al.*, 2010).

Foi realizada a caracterização do perfil clonal das amostras de *S. epidermidis* produtoras de biofilme, com a detecção de 11 clusters, com quatro maiores agrupando um número maior de amostras (6 a 10). A expressão do operon *ica*, locus *agrI* e SCCmec III foram encontrados nos clusters A, H e J e o SCCmec IV no G. O potencial de formar o biofilme favorece essas cepas que podem colonizar cateteres, próteses e demais materiais de uso clínico. Com isso podem causar infecções invasivas e a multirresistência comprovada nessas amostras, juntamente com a capacidade de escapar do sistema imune do hospedeiro e da ação dos demais antimicrobianos dificultam o tratamento dessas infecções. Além disso, foi comprovado, tanto nos clusters citados acima, como nos clusters menores (E, F) a permanência dessas bactérias por períodos longos, podendo ser observado um mesmo clone (A) em um intervalo de 17 anos. A análise por MLST caracterizou o cluster majoritário (H) como ST2. Segundo Otto (2009), as cepas de *S. epidermidis* apresentam alto nível de diversidade com 74 tipos de sequências identificadas (STs) até o momento, a maioria pertencente ao complexo clonal 2 (CC2), que inclui a mais frequentemente isolada, ST2. O sucesso da propagação da ST2 pode ser devido ao fato que todos os ST2 contêm sequência de inserção IS256 e genes *ica*, fatores que estão correlacionados a isolados de *S. epidermidis* invasivos. Em nosso estudo, os isolados de ST2 demonstraram capacidade de formação de biofilme *in vitro*.

Atualmente está bem esclarecido que *S. epidermidis* produtores de biofilme são mais patogênicos que os não produtores de biofilme, que são considerados microrganismos comensais. Visando uma melhor caracterização das cepas patogênicas de *S. epidermidis* isoladas de materiais clínicos, estudos sugerem que a detecção da capacidade de expressão do biofilme poderia ser um excelente marcador para determinação de cepas de *S. epidermidis* invasivas (Rohde *et al.*, 2010). Os biofilmes podem se formar em superfícies abióticas, tais como implantes cirúrgicos e cateteres, e resultar em infecções persistentes que são de difícil tratamento, agravando as infecções causadas por *S. epidermidis* e aumentando o tempo de internação dos pacientes hospitalizados. A caracterização da multirresistência, da relação com o locus *agrI* e a capacidade de formação do biofilme nas amostras de *S. epidermidis* isolados de hemocultura foi de grande importância para melhor conhecimento dos clones que persistem no Hospital das Clínicas de Botucatu em um período de 20 anos. A caracterização do clone majoritário como ST2 ressalta a importância dessas amostras invasivas, com o potencial de causar sérias infecções em pacientes internados e da disseminação desses clones dentro do ambiente hospitalar.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo (FAPESP- Processo: 2011/23742-2) e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq- Processo: 470649/2011-9) pelo suporte financeiro.

CONFLITO DE INTERESSES

Não há conflito de interesses

REFERÊNCIAS

- Andersson, D.I. and Hughes D. (2010) Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol* **8**,261-271.
- Arciola, C.R., Baldassarri, L., Montanaro, L. (2001) Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol* **39**, 2151-2156.
- Arciola, C.R., Gamberini, S., Campoccia, D., Visai, L., Speziale, P., Baldassari, L., Montanaro, L. (2005) A multiplex PCR method for the detection of all five individual genes of *ica* locus in *Staphylococcus epidermidis*. A survey on 400 clinical isolates from prosthesis-associated infections., doi: 10.1002/jbm.a.30445.
- Barry, T., Colleran, G., Glennon, M., Dunican, L.K., Gannon, F. (1991) The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods Appl* **1**,51-56.
- Bohach, G.A., Dinges, M.M., Mitchell, D.T., Ohlendorf, D.H., Schlievert, P.M. (1997) Exotoxins. In *The Staphylococci in Human Disease* ed. Crossley, K.B., Archer, G.L. pp 83-111. New York: Churchill Livingstone.
- Bowden, M.G., Chen, W., Singvall, J., Xu, Y., Peacock, S.J., Valtulina, V., Speziale, P., Hook, M. (2005) Identification and preliminary characterization of cell-wall-anchored proteins of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiol.* **155**, 1453-1464.
- CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute. (2013) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Approved Standard M100-S23. Wayne, PA, USA.

- Contreras, R.C., Ramírez, R.M., Camacho, A.N.G., Herrada, E.M. (2013) Antibiotic Resistance and Biofilm Production in *Staphylococcus epidermidis* Strains, isolated from a Tertiary Care Hospital in Mexico City. ISRN Microbiol. doi.org/10.1155/2013/918921
- Couto, I., Pereira, S., Miragaia, M., Sanches, I.S., Lencastre, H. (2001). Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by Internal Transcribed Spacer PCR. *Clin Microbiol* **39**, 3099–3103.
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I., Penades, J.R. (2001) Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* **183**, 2888–2896.
- Cunha, M.L.R.S., Sinzato, Y.K., Silveira, L.V.A. (2004) Comparison of methods for identification of Coagulase-negative Staphylococci. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **99**, 855-860.
- EUCAST (2013) The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.1. <http://www.eucast.org>.
- FDA (Tygacil package insert [June 2005], Wyeth Pharmaceuticals Inc., Philadelphia, PA)
- Ferreira, R.B.R., Iorio, N.L.P., Malvar, K.L., Nunes, A.P.F., Fonseca, L.S., Bastos, C.C.R., Santos, K.R.N. (2003) Coagulase-negative staphylococci: comparison of phenotypic and genotypic oxacillin susceptibility tests and evaluation of the Agar screening test by using different concentrations of oxacillin. *J Clin Microbiol* **41(8)**, 3609-3614.
- Fey, P.D., Olson, M.E. (2010) Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Fut Microbiol* **5(6)**, 917–933.
- Gill, S.R., Fouts, D.E., Archer, G.L., Mongodin, E.F., Deboy, R.T., Ravel, J. (2005) Insights on Evolution of Virulence and Resistance from the Complete Genome Analysis of an Early

- Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain and a Biofilm-Producing Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Strain. *J Bacteriol* **187**(7), 2426-2438.
- Hussain, M., Wilcox, M.H., White, P.J. (1993) The slime of coagulase–negative staphylococci: biochemistry and relation to adherence. *FEMS Microbiol Rev* **10**,191–207.
- Rohde, H., Burdelski, C., Bartscht, K., Hussain, M., Buck, F., Horstkotte, M.A., Knobloch, J.K.M., Heilmann, C., Herrmann, M., Mack, D. (2005) Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol Microbiol* **55**,1883-1895.
- Ito, T., Katayama Y., Hiramatsu, K. (1999) Cloning and nucleotide sequence determination of the entire mec DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother* **43**,1449-1458.
- Kloos, W.E. and Bannerman, T.L. (1999) *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In Manual of Clinical Microbiology ed. Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, F.C., Tenover, R.H. pp. 264-282. Washington: American Society Microbiology.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Winn Jr., W.C. (1997) Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott.
- Li, M., Guan, M., Jiang, X.F., Yuan, F.Y., Xu, M., Zhang, W.Z., Lu, Y. (2004) Genetic polymorphism of the accessory gene regulator (*agr*) locus in *Staphylococcus epidermidis* and its association with pathogenicity. *J Med Microbiol* **53**,545–549.
- Machado, A.B.M.P., Reiter, K.C., Paiva, R.M., Barth, A.L. (2007) Distribution of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) types I, II, III and IV in coagulase-negative staphylococci from patients attending a tertiary hospital in southern Brazil. *J Med Microb* **56**,1328-1333.

- Mason, W., Blevins, J.S., Beenken, K., Wibowo, N., Ojha, N. (2001) Multiplex PCR Protocol for the Diagnosis of Staphylococcal Infection. *J Clin Microbiol* **39(9)**,3332–3338.
- McCulloch, J.A. (2006) Avaliação da funcionalidade do locus *accessory gene regulator (agr)* em cepas de *Staphylococcus aureus* brasileiras com susceptibilidade reduzida aos glicopeptídeos [tese]. São Paulo (SP): Faculdade de Ciências Farmaceuticas, Universidade de São Paulo.
- McDougal, L.K., Steward, C.D., Killgore, G.E., Chaitram, J.M., McAllister, S.K., Tenover, F.C. (2003) Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the United States: Establishing a National Database. *J Clin Microbiol* **41**, 5113-5120.
- Murakami, K., Minamide, K., Wada, K., Nakamura, E., Teraoka, H., Watanabe, S. (1991) Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **29**,2240-2244.
- Novick, R. and Geisinger, E. (2008) Quorum Sensing in Staphylococci. *Annu Rev Genet* **42**,541–564.
- Oliveira, D.C. and Lencastre, H. (2002) Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **46(7)**,2155-61.
- Otto, M. (2004) Virulence factors of the coagulase-negative Staphylococci. *Front Biosci* **9**,841-863.
- Otto, M. (2008) Staphylococcal Biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* **322**, 207–228.
- Otto, M. (2009) *Staphylococcus epidermidis* - the ‘accidental’ pathogen. *Nat Rev Microbiol* **7**,556-557.

- Qin, Z., Yang, X., Yang, L., Jiang, J., Ou, Y., Molin, S., Qu, D. (2007) Formation and properties of in vitro biofilms of ica negative *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. *J Med Microbiol* **56**, 83-93
- Rohde, H., Frankenberger, S., Zahringer, U., Mack, M. (2010) Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. *Eur J Cell Biol* **85**, 103-111.
- Rowlinson, M.C., LeBourgeois, P., Ward, K., Song, Y., Finegold, S.M., Bruckner, D. A. (2006) Isolation of a Strictly Anaerobic Strain of *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Microbiol* **44(3)**,857-860.
- Schoenfelder, S.M.K., Langea, S., Eckart, M., Hennig, S., Kozytska, S., Ziebuhr, W. (2010) Success through diversity – How *Staphylococcus epidermidis* establishes as a nosocomial pathogen. *Int J Med Microbiol* **300**, 380–386.
- Vuong, C., Kocianova, S., Yao, Y., Carmody, A.B., Otto, M.(2004) Increased colonization of indwelling medical devices by quorum-sensing mutants of *Staphylococcus epidermidis* in vivo. *J Infect Dis* **190(8)**,1498–1505.

CONCLUSÕES

- Os métodos fenotípico e genotípico de identificação de ECN apresentaram concordância de 98%, com maior discrepância na identificação das espécies *S. haemolyticus* e *S. warneri*.
- A técnica de PCR comprovou o carreamento de todos os genes de enterotoxinas e TSST-1 nas espécies de ECN, sendo os genes *sea*, *sec*, *seg* e *sei* detectados em todas as espécies estudadas;
- Todos os genes relacionados à produção de biofilme foram detectados nas espécies estudadas, sendo os genes do operon *ica*, *bhp* e *aap* mais frequentes em *S. epidermidis*.
- Foi comprovada a expressão dos genes de *sea*, *sec*, *seg* e *sei* em *S. epidermidis* e nessa mesma espécie foi detectada a capacidade de produção do biofilme mediado pelo operon *ica* e pelas proteínas Bhp e Aap;
- As sequências dos genes de enterotoxinas expressos por *S. epidermidis* comprovaram altos valores de similaridade com as sequências dos genes de enterotoxinas de *S. aureus*;
- O locus *agrI* foi o mais frequente nas amostras que expressaram o RNAm de enterotoxinas ou dos genes de biofilme, e o *agrII* foi relacionado com o gene *bhp* e com a expressão do gene *sec* nas amostras de *S. epidermidis*;

- O gene *mecA* foi frequente em altas porcentagens em todas espécies de ECN, apresentando-se altas taxas principalmente em *S. epidermidis* capazes de produzir o biofilme;
- Quatro tipos de SCC*mec* foram detectados em ECN, sendo o tipo III o mais frequente e o tipo IV detectado apenas em *S. epidermidis*;
- A determinação da CIM apresentou altas taxas de resistência à oxacilina, resistência a tigeciclina e resistência intermediária a quinupristina/dalfopristina. Todas as amostras foram sensíveis à vancomicina, mas apresentaram altos valores de MIC50 e MIC90. A linezolida e a daptomicina apresentaram bons resultados, com baixos valores de CIM;
- Alguns isolados de *S. epidermidis* (3), *S. haemolyticus* (1), *S. hominis* (2) e *S. capitis* (1) apresentaram susceptibilidade reduzida à vancomicina no meio de BHI acrescentado de 8µg/mL de vancomicina e espessamento da parede celular determinado por microscopia eletrônico de transmissão.
- A caracterização do perfil clonal revelou 11 diferentes clones de *S. epidermidis* com quatro clones majoritários que expressaram o operon *ica*, sendo um desses tipado pelo MLST como o clone invasivo ST2.



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsardeni@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 14 de Fevereiro de 2011.

Of. 36/11-CEP

Ilustríssima Senhora
Prof^a. Dr^a. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha
Departamento de Micro/Imuno do
Instituto de Biociências de Botucatu

Prezada Dr^a. Maria de Lourdes,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que Projeto de Pesquisa (**Protocolo CEP 3782-2011**) **Evidência da presença do sistema agr, expressão de toxinas e resistência aos antimicrobianos em estafilococos coagulase-negativa isolados de hemoculturas**, a ser conduzido por Valéria Cataneli Pereira, orientada por Vossa Senhoria, recebeu do relator **parecer favorável** aprovado em reunião de 14 de fevereiro de 2011.

Situação do Projeto: **APROVADO**. Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP "**Relatório Final de Atividades**".

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP