

**Perfil de virulência e resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus haemolyticus*, *S. warneri*, *S. lugdunensis* e *S. hominis***

Carla Ivo Brito, Luiza Pinheiro, Valéria Cataneli Pereira, Adilson de Oliveira, Carlos Henrique Camargo, Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha<sup>§</sup>

Laboratório de Bacteriologia, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

<sup>§</sup>Autor correspondente:

Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, Laboratório de Bacteriologia, UNESP, Botucatu, Caixa Postal 510, CEP 18618-970, Telefone: 14 38116058, SP, Brasil. [cunhamlr@ibb.unesp.br](mailto:cunhamlr@ibb.unesp.br).

RUNNING TITLE: ECN: fatores de virulência e resistência

E-mails:

C.I.B.: [carlaivobrito@hotmail.com](mailto:carlaivobrito@hotmail.com)

L.P.: [luizapinheiro00@hotmail.com](mailto:luizapinheiro00@hotmail.com)

V.C.P.: [cataneli@ibb.unesp.br](mailto:cataneli@ibb.unesp.br)

A.O.: [adilsonoliveiralp@ig.com.br](mailto:adilsonoliveiralp@ig.com.br)

C.H.C.: [btcarlos@gmail.com](mailto:btcarlos@gmail.com)

M.L.R.S.C.: [cunhamlr@ibb.unesp.br](mailto:cunhamlr@ibb.unesp.br)

## Resumo

**Objetivos:** Estudar o perfil patogênico e de resistência aos antimicrobianos em amostras de *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus lugdunensis* e *Staphylococcus hominis*. **Métodos e Resultados:** Foram estudadas 65 amostras isoladas de pacientes do Hospital das Clínicas da FMB, Botucatu, sendo 23 *S. haemolyticus*, 23 *S. hominis*, 10 *S. warneri* e 9 *S. lugdunensis*. Foram pesquisados por PCR os genes responsáveis pela produção de biofilme (*icaA*, *icaC*, *icaD*), genes de enterotoxinas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*), Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico (*tst*) e resistência à oxacilina (*mecA*). Das 65 amostras estudadas, 83% apresentaram ao menos um dos genes das toxinas pesquisadas, 87,7% um dos genes *ica* e 63,1% o gene *mecA*. O SCC*mec* foi tipado por PCR-Multiplex, sendo o tipo I o mais prevalente (34,1%). A heterorresistência à vancomicina foi pesquisada através da triagem em ágar BHI com 4 µg ml<sup>-1</sup>, encontrada em 36,9% das amostras, e com 6 µg ml<sup>-1</sup> de vancomicina, encontrada em 15,4%. **Conclusões:** Todas as espécies estudadas foram altamente toxigênicas. A presença do SCC*mec* I apresentou relação com a heterorresistência à vancomicina. Ainda, *S. hominis* e *S. haemolyticus* se revelaram mais virulentos e resistentes, levando em conta os fatores de virulência, resistência à oxacilina e heterorresistência à vancomicina. **Significância e impacto do estudo:** A evidência e a necessidade de maior preocupação com as espécies *S. hominis* e *S. haemolyticus* ficou clara, o que ainda não havia sido relatado, bem como a relação entre a presença de SCC*mec* I e heterorresistência à vancomicina.

**Palavras-chave:** *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. lugdunensis*, resistência, toxinas

## Introdução

A patogenia das infecções causadas por estafilococos coagulase-negativa (ECN), como *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri* e *S. lugdunensis* não está completamente esclarecida, podendo ser complexa e multifatorial, já que são vários os fatores de virulência envolvidos nas infecções por *Staphylococcus* spp., como a produção de toxinas e biofilme, além da presença de genes de resistência a antibióticos.

Entre os fatores de virulência dos estafilococos estão as enterotoxinas estafilocócicas (EEs), que estão associadas a uma forma de gastroenterite que se manifesta clinicamente com vômitos com ou sem diarreia. Os tipos clássicos EEA, EEB, EEC1, EEC2, EEC3, EED e EEE são considerados os de maior ocorrência (Dinges et al., 2000; Martin et al., 2001). Até o momento a Polymerase Chain Reaction (PCR) é uma das técnicas mais freqüentemente usadas para a identificação dos genes responsáveis pela produção das enterotoxinas (*se*), apresentando alta sensibilidade e especificidade (Cunha e Calsolari, 2008).

A Síndrome do Choque Tóxico (TSS) é uma doença aguda mediada pela Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico, a TSST-1 (Bergdoll et al., 1981). Seu quadro clínico é caracterizado por febre, rachaduras cutâneas, descamação principalmente dos pés e das palmas das mãos, hipotensão e envolvimento multiorgânico (Dinges et al., 2000). A TSST-1 é codificada por um gene denominado de *tst*.

Os ECN também são caracterizados pela sua grande capacidade de aderência e crescimento em superfícies lisas de cateteres e de outros dispositivos médicos, envolvendo a produção de uma substância polissacarídica extracelular chamada adesina polissacarídica intercelular (PIA) (Vuong, 2002; Arciola et al., 2002; Arciola et al., 2003). O PIA forma o biofilme, protegendo as bactérias contra os mecanismos de defesa do hospedeiro e contra a terapia antimicrobiana, sendo considerado um importante fator de virulência (Klingenberg et al., 2005; Costa et al., 2004). A biossíntese do PIA é codificada pelo operon *ica*, que é composto pelo gene *icaR* (gene regulatório) e genes *icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC* (genes da biossíntese) (de Silva et al., 2002; Vasudevan et al., 2003).

Além da importância como patógeno envolvido em infecções nosocomiais, a freqüência de infecções comunitárias causadas por esses microrganismos tem aumentado nos últimos anos (Almer et al., 2002). Concomitantemente, a resistência a antibióticos tem também aumentado nas últimas décadas. A resistência à oxacilina é uma característica de caráter cromossomal, codificada pelo gene *mecA* (Chambers, 1997). As cepas com resistência à meticilina ou à oxacilina apresentam resistência cruzada aos demais betalactâmicos (cefalosporinas, cefamicinas, oxacefemas e carbapenêmicos) e geralmente se relacionam a multirresistência aos

antibióticos não-betalactâmicos, tais como aminoglicosídeos, macrolídeos, quinolonas e tetraciclina (Livermore, 2000). O gene *mecA* faz parte de um elemento genômico móvel designado SCC*mec*, ou seja, cassete cromossômico estafilocócico *mec* (Katayama et al., 2000)

O SCC*mec* é composto por diferentes combinações entre o complexo *mec*, que codifica resistência à meticilina, e o complexo *ccr*, que codifica enzimas responsáveis pela mobilidade (Oliveira et al., 2006). Os isolados que contêm os tipos I, II e III possuem classicamente origem hospitalar e os tipos IV e V têm origem comunitária (Deresinski, 2005). O aumento de amostras resistentes a meticilina e oxacilina deixa poucas alternativas para o tratamento das infecções causadas por estes agentes etiológicos.

O aumento do uso da vancomicina levou ao aparecimento de ECN com susceptibilidade reduzida e resistência a esta (Tiwari et al., 2006; Biavasco et al., 2000). ECN apresentando heterorresistência à vancomicina também foram notificados (Center et al., 2003; Van Der Zwet et al., 2002). O termo heterorresistência à vancomicina tem sido usado para isolados de estafilococos que contêm uma população celular com diferentes níveis de susceptibilidade à vancomicina, incluindo células resistentes. No Brasil, a situação é agravada pela pouca utilização de critérios microbiológicos de diagnóstico de infecções hospitalares (Gontijo Filho, 2002) e o consequente uso empírico desse antimicrobiano (Pannuti & Grinbaum, 1995; Couto et al., 1998; Oliveira et al., 2001).

Dessa forma, esse estudo objetivou elucidar o perfil de resistência e potencial patogênico das espécies de ECN *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. lugdunensis* e *S. hominis*, visando facilitar a elaboração de estratégias de intervenção e profilaxia de infecções causadas por esses agentes, através da verificação de produção de fatores de virulência (biofilme – genes *icaA*, *C*, e *D* - e toxinas estafilocócicas – genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *tst*) e da resistência a antibióticos, como oxacilina (gene *mecA*) e vancomicina. Todos esses fatores dificultam a profilaxia e o tratamento dessas infecções, reduzindo o espectro de substâncias que podem ser utilizadas.

## **Materiais e métodos**

### **Amostras**

Foram estudadas 65 amostras previamente isoladas de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HC-FMB), da Universidade Estadual Paulista. Tais amostras estavam estocadas na Coleção de Culturas do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu. Essas amostras incluem quatro espécies: *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri* e *S. lugdunensis*. O isolamento das amostras foi descrito segundo as normas propostas por Koneman et al (1997). A identificação das espécies dos ECN foi realizada utilizando o método simplificado proposto por Cunha et al (2004), e confirmada genotipicamente por Internal Transcribed Spacers-PCR (ITS-PCR), segundo descrito por Barry et al (1991) e Couto et al (2001).

### **Extração do DNA**

Para a extração de DNA foi utilizado o Kit Illustra (GE healthcare), que consistiu na digestão inicial das células de ECN com lisozima ( $10 \text{ mg ml}^{-1}$ ) e proteinase K ( $20 \text{ mg ml}^{-1}$ ). Então, 400  $\mu\text{l}$  da solução de extração foram adicionados à mistura e esta foi centrifugada a 10.000g por 4 minutos. O sobrenadante foi transferido para a coluna e centrifugado a 5.000 g por 1 minuto. O líquido coletado foi descartado e 500  $\mu\text{l}$  de solução de extração foram adicionados novamente à coluna. Após a centrifugação e descarte do líquido coletado, 500 $\mu\text{l}$  da solução de lavagem foram adicionados à coluna e esta submetida à centrifugação a 11000g por 3 min. A seguir, a coluna foi transferida para um tubo de 1,5 ml e 200  $\mu\text{l}$  de água Milli Q aquecida a 70°C foi utilizada para a eluição.

### **Deteccção dos genes de fatores de virulência**

#### *Deteccção de genes de enterotoxinas e TSST-1*

As reações de PCR para a deteção dos genes das enterotoxinas e da TSST-1 foram realizadas conforme os parâmetros descritos por Johnson et al (1991) e Cunha et al. (2007). Os

*primers* utilizados estão de acordo com Johnson et al (1991), Jarraud et al (1999), Barry et al (1991) e Couto et al (2001). As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 ml em volumes totais de 50 µl contendo 20pmol de cada *primer*, 2,5 U de Taq DNA polimerase, 200 µM de desoxiribonucleotídeos trifosfatados, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 0,75 mM de MgCl<sub>2</sub> e 5 µl da amostra. A incubação foi realizada em Termociclador PTC-100 MJ Resarch empregando seguintes parâmetros: 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. Então ocorreu 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, seguido por 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 à 4°C. Linhagens de *S. aureus* toxigênicas de referência internacional foram utilizadas como controle positivo, incluindo ATCC 51650 (TSST-1), ATCC 13565 (EEA), ATCC 14458 (EEB), ATCC 19095 (EEC), ATCC 23235 (EED). Para controle negativo foi utilizada a amostra *S. xyloso* ATCC 29971.

#### *Detecção do gene mecA (resistência à oxacilina)*

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 2,0 U de Taq DNA polimerase, 100 µM de desoxiribonucleotídeos trifosfatados, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 0,75 mM de MgCl<sub>2</sub>, 3µL de ácido nucléico e 10 pmol dos *primers mecA 1* (5' AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG 3') e *mecA 2* (5' AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG 3') com produto amplificado de 533 bp. A incubação foi realizada em termociclador apropriado, empregando os parâmetros descritos por Murakami et al. (1991). Em todas as reações realizadas foram utilizadas linhagens de referência internacional com controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591) e negativo (*S. aureus* ATCC 25923).

#### *Determinação do tipo de SCCmec*

A determinação do tipo de SCCmec foi realizada utilizando o método de reação PCR-Multiplex com os *primers* descritos por Oliveira et al (2002) e Machado et al (2007). As reações de PCR multiplex foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 ml em volumes totais de 50 µl contendo 10µl de DNA; PCR Buffer 1x contendo 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 200mM de cada desoxiribonucleotídeos trifosfatados; 1,25U de Taq polimerase; 10pmol dos *primers* CIF2 F2 e CIF2 R2; 6pmol dos *primers* KDP F1 e KDP R1 e 5pmol dos *primers* DCS F2, DCS R1, RIF4 F3 e RIF4 R9. A incubação em termociclador consistiu de um ciclo de 92°C por 3 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 92°C por 1 minuto, anelamento dos *primers* a 56°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1,5 minutos. Após completar os 30 ciclos, os tubos foram incubados a 72°C por 4 minutos.

#### *Detecção dos genes para formação do biofilme*

Os *primers* utilizados foram descritos por Arciola et al (2005). 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*, 2,0 U de Taq DNA polimerase, 100 gM de desoxiribonucleotídeos trifosfatados, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 0,75 mM de MgCl<sub>2</sub> e 3µL de ácido nucléico. A incubação foi realizada em termociclador tipo MJ Research, empregando os parâmetros descritos por Arciola et al. (2005). Em todas as reações realizadas, foram utilizadas linhagens de referência internacional com controle positivo e negativo, *S. epidermidis* ATCC 35984 (produtora de biofilme) e um controle negativo *S. epidermidis* ATCC 12228.

#### *Visualização dos produtos amplificados*

A resolução das amplificações foi observada por eletroforese em gel de agarose 2%, preparado em tampão 0,5 X TBE e corado com Sybr Safe. Os géis foram fotografados sob transiluminação UV.

## **Teste de triagem para detecção de Resistência Intermediária, Heteroresistência ou Resistência à Vancomicina**

Para verificação de resistência intermediária, heteroresistência ou resistência de ECN à vancomicina foi utilizado o meio de triagem preparado com ágar BHI adicionado de 4 µg ml<sup>-1</sup> de vancomicina (Hiramatsu, 2001) e 6 µg ml<sup>-1</sup> de vancomicina conforme recomendação do CLSI (2009). A presença de resistência intermediária, heteroresistência ou resistência à vancomicina foi identificada a partir do crescimento de uma ou mais colônias na superfície do ágar BHI. A amostra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, susceptível a vancomicina, foi utilizada como controle negativo e a amostra *E. faecalis* ATCC 51299, resistente a vancomicina, foi utilizada como controle positivo.

### **Análise estatística**

Para análise dos resultados obtidos foi utilizado o Teste de Qui-Quadrado. O nível de significância para todos os testes foi fixado em  $p < 0,05$  (Curi, 1997).

## **Resultados**

### **Identificação**

Das 65 amostras estudadas, 23 (35,4%) foram identificadas como *Staphylococcus hominis*, 23 (35,4%) foram identificadas como *Staphylococcus haemolyticus*, 10 (15,4%) como *Staphylococcus warneri* e 9 (13,8%) como *Staphylococcus lugdunensis*.

### **Genes para produção de toxinas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *tst*)**

Em relação à presença de genes para produção de toxinas, 44 amostras (67,7%) apresentaram o gene *sea*, 23 (35,4%) apresentaram o gene *seb*, 27 (41,5%) o gene *sec*, 2 (3,1%) o gene *sed* e 3 (4,6%) o gene *tst*, sendo que 83% das amostras apresentaram ao menos um gene codificador de toxinas. A distribuição da presença dos genes entre as espécies está expressa na Tabela 1.

### **Genes para produção de biofilme (*icaA*, *icaC* e *icaD*)**

Dentre as amostras, 4 (6,2%) apresentaram os genes *icaACD* concomitantemente, 7 (10,8%) apresentaram apenas o *icaC*, 19 (29,2%) apenas o *icaD*, 26 (40%) apresentaram os genes *icaC* e *icaD*, e 8 (12,3%) não apresentaram nenhum gene *ica*. Das 57 amostras que apresentaram ao menos um gene *ica*, 35,1% foram *S. haemolyticus*, 41,4% foram *S. hominis*, 14% foram *S. lugdunensis* e 10,5% foram *S. warneri*. Quanto à presença de genes *ica* de acordo com a espécie, os resultados estão expressos na Figura 1.

### **Gene para resistência à oxacilina (*mecA*) e Caracterização de SCC*mec***

O gene *mecA* esteve presente em 41 (63,1%) das amostras, sendo 19 dos *S. haemolyticus* (82,6%), 17 dos *S. hominis* (73,9%), 3 (30%) dos *S. warneri* e 2 (22,2%) dos *S. lugdunensis*. Quanto à caracterização dos tipos de SCC*mec*, 14 (34,1%) amostras pertenceram ao tipo I, 5 (12,2%) amostras pertenceram ao tipo II, 12 (29,3%) amostras ao tipo III e 10 (24,4%) não puderam ser tipadas pelo protocolo utilizado. A distribuição dos tipos de SCC*mec* entre as espécies pode ser vista na Figura 2.

### **Heterorresistência à vancomicina**

Entre as amostras estudadas, 24 (36,9%) cresceram em ágar BHI acrescido de 4µg/ml de vancomicina, sendo 14 *S. haemolyticus* (60,9%), 7 *S. hominis* (30,4%) e 3 *S. warneri* (30%). Dessas, 20 foram *mecA* positivas. Já em ágar BHI acrescido de 6µg ml<sup>-1</sup> de vancomicina, 10 (15,4%) cresceram, sendo 4 *S. haemolyticus* (17,4%) e 6 *S. hominis* (26,1%); e 9 foram *mecA* positivas. A distribuição da heterorresistência à vancomicina de acordo com a espécie e o número de colônias está expressa na Tabela 2. Nenhum *S. lugdunensis* apresentou heterorresistência, tanto no BHI com 4 µg ml<sup>-1</sup> quanto no de 6 µg ml<sup>-1</sup> de vancomicina.

### **Análise estatística**

Não foi encontrada nenhuma relação entre a presença dos genes codificadores de toxinas e qualquer outra das variáveis presentes nesse trabalho.

A presença de qualquer um dos genes *ica* foi relacionada com as espécies ( $p=0,016$ ), de forma que *S. hominis* e *S. haemolyticus* apresentaram uma incidência de genes *ica* significativamente maior do que *S. warneri* e *S. lugdunensis*.

A relação entre *mecA* e as espécies foi estatisticamente significativa ( $p=0,001$ ), ou seja, *S. hominis* e *S. haemolyticus* revelaram uma taxa muito maior de ocorrência de resistência à oxacilina do que as outras duas espécies envolvidas no estudo.

Das 24 amostras que apresentaram heterorresistência à vancomicina no BHI com 4  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de vancomicina, 20 (83,3%) foram *mecA* positivas ( $p=0,006$ ), sendo todas *S. haemolyticus* e *S. hominis*. Ainda, 8 amostras cresceram com mais de 1000 colônias, sendo 7 *S. hominis* ( $p=0,006$ ) com SCC*mec* do tipo I ( $p=0,000$ ). O SCC*mec* tipo I se apresentou estatisticamente relacionado com o crescimento em ágar BHI com 4 e 6  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de vancomicina, com qualquer colônia, com mais de 10 colônias, com mais de 100 colônias e com mais de 1000 colônias. A heterorresistência à vancomicina no ágar com 4  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de vancomicina esteve relacionada com a espécie ( $p=0,009$ ), de forma que *S. haemolyticus* e *S. hominis* apresentaram significativamente maior prevalência de heterorresistência à vancomicina do que *S. warneri* e *S. lugdunensis*.

## Discussão

Recentemente, o interesse em ECN aumentou devido às infecções causadas por esses microrganismos em ambiente hospitalar, particularmente as bacteremias nosocomiais (Cunha et al, 2004), assim como devido ao conhecimento desse grupo como bactérias essencialmente oportunistas. O aumento do uso de dispositivos médicos transitórios ou permanentes, como cateteres intravasculares e próteses, em pacientes imunocomprometidos ou severamente debilitados (Vasconcelos e Cunha, 2010), também são fatores que influenciaram no aumento de interesse e preocupação.

A pesquisa do genes de toxinas estafilocócicas nas quatro espécies (*S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri* e *S. lugdunensis*) revelou alto potencial toxigênico em todas as espécies de ECN estudadas. O gene mais encontrado foi da enterotoxina A, o que é preocupante, visto que esta é tóxica em baixas concentrações (Evenson et al, 1988) e é a mais envolvida em surtos de

intoxicação alimentar (Casman, 1965; Ko, 1965). Não foi encontrada relação entre a presença de genes para toxinas e outras variáveis envolvidas nesse trabalho.

De acordo com Gerke et al (1998), em *S. epidermidis* quando os genes *icaA*, *icaC* e *icaD* são conjuntamente expressos, a indução enzimática é muito maior, gerando maior quantidade de PIA. O gene *icaA* é o único dos genes capaz de induzir sozinho a produção, ainda que pequena, de PIA. Nesse estudo, o *icaA* apareceu somente concomitantemente ao *icaC* e *icaD*, e em apenas 4 amostras (três *S. hominis* e um *S. warneri*), ou seja, 6,1%. Então, pode ser sugerido que tais amostras são produtoras de grande quantidade de biofilme. Esse mesmo estudo relata que a presença de apenas o *icaD* não promove produção de biofilme, de forma que 29,2% das amostras com presença somente de *icaD* não formam biofilme. A presença de ao menos um *ica* ocorreu mais frequentemente em *S. hominis* e *S. haemolyticus*, o que foi estatisticamente significativo, mostrando que essas duas espécies tem uma probabilidade maior de carrear ao menos um destes genes.

Houve alta taxa de resistência à oxacilina, pesquisada através do gene *mecA* (63,1%). Entretanto, esse gene apareceu em uma proporção muito maior nas espécies *S. haemolyticus* e *S. hominis*, de forma significativa, corroborando o fato de que ambas as espécies são mais frequentemente isoladas, estando portanto mais sujeitas a pressão seletiva do uso de antimicrobianos do que as outras duas que fizeram parte do estudo, *S. lugdunensis* e *S. warneri*. O tipo de SCC*mec* mais encontrado foi o I, seguido do III e então do II. Nenhum tipo IV foi encontrado, o que já era esperado visto que as amostras estudadas são de origem hospitalar.

Em relação à heterorresistência à vancomicina, *S. hominis* e *S. haemolyticus* cresceram significativamente mais do que as outras espécies, tanto no BHI com 4µg ml<sup>-1</sup> quanto no de 6µg ml<sup>-1</sup> de vancomicina. Ainda, entre as amostras que cresceram com mais de 1000 colônias no BHI acrescido de 4µg ml<sup>-1</sup> de vancomicina, a quase totalidade era de *S. hominis* SCC*mec* I. Dessa forma, há relação estatisticamente significativa entre SCC*mec* tipo I e o crescimento com mais de 1000 colônias, assim como entre esse crescimento e a espécie *S. hominis*. O SCC*mec* tipo I esteve altamente relacionado à heterorresistência à vancomicina, em todos os níveis de concentração de vancomicina e de crescimento de colônias, sugerindo que de alguma forma esse

cassete pode influenciar no aumento de ocorrência dessa heterorresistência, o que ainda não havia sido relatado.

No quesito heterorresistência à vancomicina, *S. hominis* se revelou com um perfil muito mais alarmante do que as outras espécies, já que apresentou muito mais colônias heterorresistentes. Ainda que *S. haemolyticus* tenha crescido em maior proporção, houve crescimento de um número muito menor de colônias, mostrando que entre a população de cada amostra houve menos células resistentes em comparação a *S. hominis*.

A presença do gene *mecA* esteve relacionada ao crescimento positivo em placas de ágar BHI acrescido de  $4\mu\text{g ml}^{-1}$  de vancomicina, fato comprovado pela proporção de amostras *mecA* positivas que cresceram no meio de triagem e pela análise estatística. Essa relação é altamente preocupante e perigosa, já que inclui resistência a dois antibióticos importantes, e já foi sugerida por outros autores, como Yoko e colaboradores (2001).

A partir desses resultados, pode-se concluir que as quatro espécies apresentaram alta taxa de toxigenicidade, o que é muito preocupante visto que essas bactérias são muito encontradas no ambiente hospitalar. Porém, as espécies *S. haemolyticus* e *S. hominis* possuem significativamente mais genes para produção de biofilme e são mais resistentes à oxacilina e heterorresistentes à vancomicina, levando a crer que essas espécies são mais virulentas e resistentes e que devem ser tratadas com especial atenção, já que são microorganismos oportunistas de alta patogenicidade. Dessa forma, o espectro de antimicrobianos que pode ser usado em infecções com essas espécies fica reduzido, mostrando a importância de critérios microbiológicos no controle de infecções hospitalares e no uso de antimicrobianos, melhorando o tratamento e a profilaxia tanto de infecções por *S. hominis* e *S. haemolyticus*, quanto por outras espécies de ECN.

### **Agradecimentos**

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

## Referências Bibliográficas

- Almer L.S. et al (2002) Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of community-acquired methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* **43**, 225-232.
- Arciola C.R. et al (2002) Detection of slime Production by means of na optimized Congo red agar plate based on a Colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus. *Biomaterials* **23**, 4233-4239.
- Arciola C.R. et al (2003) Occurrence of *ica* genes for slime synthesis in a collection of *Staphylococcus epidermidis* strains from orthopedic prosthesis infection. *Acta Orthop Scand* **5**, 617-621.
- Arciola C.R. et al (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. *J Biomedicals Materials Research* **75**, 408-413.
- Barry T. et al (1991) The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods Appl* **1**, 51-56.
- Bergdoll M.S. et al (1981) A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic-shock syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. *Lancet* **1**, 1017-21.
- Biavasco F. et al (2000). Glycopeptide resistance in coagulase-negative staphylococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **19**, 403- 417.
- Casman E.P., Bennett R.W. (1965) Detection of staphylococcal enterotoxin in food. *Appl. Microbiol* **13**, 181-9.
- Center K.J. et al (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.
- Chambers H.F. (1997) Methicilin resistance in Staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* **10**, 781-791.
- Costa F.S. et al (2004) Mucosa or Skin as source of coagulase-negative staphylococcal bacteremia. *Clin Infect Dis* **4**, 278-286.

Couto H.G. et al (1998) Vancomycin use in a Brazilian University Hospital. Comparison with Hospital Infection Control Practices Advisory Committees Guidelines. In: 6° Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar; Campos do Jordão:SP.

Couto I. et al (2001) Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by Internal Transcribed Spacer PCR. *J Clin Microbiol* **39**, 3099–103.

Cunha M.L.R.S. et al (2004) Comparison of methods for identification of Coagulase-negative Staphylococci. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **99**, 855-60.

Cunha M.L.R.S. et al (2007) Detection of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin 1 genes in *Staphylococcus*, with emphasis on coagulase-negative staphylococci. *Microbiology and Immunology* **51**, 381–90.

Cunha M.L.R.S., Calsolari R.A.O. (2008) Toxigenicity in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-negative Staphylococci: Epidemiological and Molecular Aspects. *Microbiol Insights* 11–12.

Curi P.R. (1997) Metodologia e análise da pesquisa em Ciências Biológicas. Botucatu: Tipomic.

de Silva G.D. et al (2002) The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* **40**, 382-8.

Deresinski S. (2005) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. *Clin Infect Dis* **40**, 562-573.

Dinges M.M. et al (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* **13**, 16-34.

Evenson, M. L. et al (1988) Estimation of human dose of Staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *Int J Food Microbiol* **7**, 311-316.

Gerke C. et al (1998) Characterization of the N- acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesion. *J Biol Chem* **273**, 18856-93.

- Gontijo Filho P.P. (2002) Definições de infecções hospitalares sem a utilização de critérios microbiológicos e sua consequência na vigilância epidemiológica no Brasil. *News Lab* **53**, 120-4.
- Hiramatsu K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infect Dis* **1**, 147-55.
- Jarraud S. et al (1999) Involvement of enterotoxins G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlet fever. *J Clin Microbiol* **37**, 2446-49.
- Johnson W.M. et al (1991) Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **29**, 426-430
- Katayama Y. et al (2000) A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 1549-1555.
- Klingenberg C. et al (2005) Coagulase-Negative Staphylococcal Sepsis em Neonates – Association Between Antibiotic Resistance, Biofilm Formation and the Host Inflammatory Response. *The Ped Infec Dis* **24**, 817-822.
- Ko, H.C., Chang, T.Y. (1995) Using reversed passive latex agglutination method to detect enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and enterotoxin in foods. *J Food Drug Anal* **3**, 57–63.
- Koneman E.W. et al (1997) Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott. 1997
- Livermore D.M. (2000) Antibiotic resistance in staphylococci. *Int J Antimicrob Agents* **16**, S3-S10.
- Machado A.B.M.P. et al (2007) Distribution of staphylococcal cassette chromosome *mec* (*SCCmec*) 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.
- Martin S.E. et al (2001) *Staphylococcus aureus*. In: Hui YH, Pierson MD, Gorham JR, editors. Foodborn disease handbook – bacterial pathogens. 2nd ed. New York: 2001. p.345-381.

- Murakami K. et al (1991) Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **29**, 2240-44.
- Oliveira D.C., de 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**, 2155-61.
- Oliveira D.C. et al (2006) Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec* type VI. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 3457-3459.
- Oliveira G.A. et al (2001) Isolation in Brazil of Nosocomial *S. aureus* with Reduced Susceptibility to Vancomycin. *Infect Control Hosp Epidemiol* **22**, 443-8.
- Pannuti C.S., Grinbaum R.S. (1995) An Overview of Nosocomial Infection Control in Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol* **16**, 170-174.
- Tiwari H.K., Sen M.R. (2006) Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. *BMC Infect Dis* **6**.
- Van Der Zwet W.C. et al (2002) Nosocomial spread of a *Staphylococcus capitis* strain with heteroresistance to vancomycin in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* **40**, 2520-2525.
- Vasconcelos N.G., Cunha M.L.R.S. (2010) Staphylococcal enterotoxins: molecular aspects and detection methods. *J Public Health and Epid* **2**, 29-42.
- Vasudevan P. et al (2003) Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet Microbiol* **92**, 179-85.
- Vuong C., Otto M. (2002) *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microb Infect* **4**: 481-489.
- Yoko T. et al (2001) Glycopeptide susceptibility profiles of nosocomial multiresistant *Staphylococcus haemolyticus* isolates. *J Infect Chemoter* **7**, 142-147.

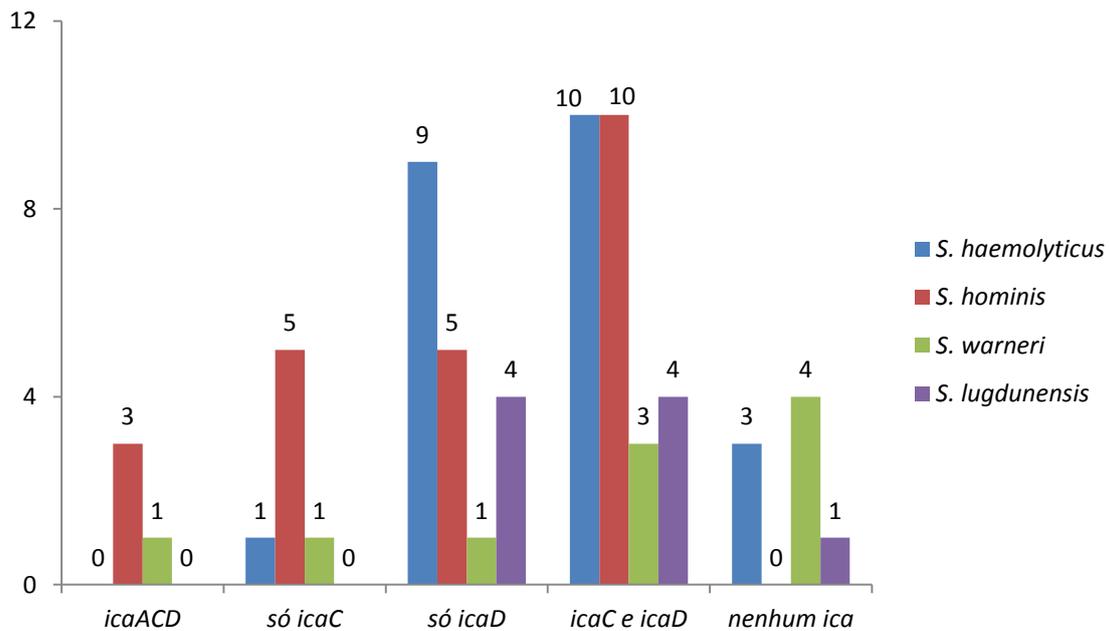
**Tabela 1.** Prevalência dos genes codificadores de toxinas de acordo com a espécie de ECN.

	<i>S. haemolyticus</i> n=23	<i>S. hominis</i> n= 23	<i>S. lugdunensis</i> n = 9	<i>S. warneri</i> n= 10
<i>sea</i>	16 (69,6%)	16 (69,6%)	4 (44,4%)	8 (80%)
<i>seb</i>	9 (39,1%)	10 (43,5%)	0	4 (40%)
<i>sec</i>	7 (30,4%)	12 (57,2%)	5 (55,5%)	3 (30%)
<i>sed</i>	1 (4,4%)	0	0	1 (10%)
<i>tst</i>	1 (4,4%)	1 (4,4%)	1 (11,1%)	0
nenhum	6 (26,1%)	2 (8,7%)	2 (22,2%)	1 (10%)

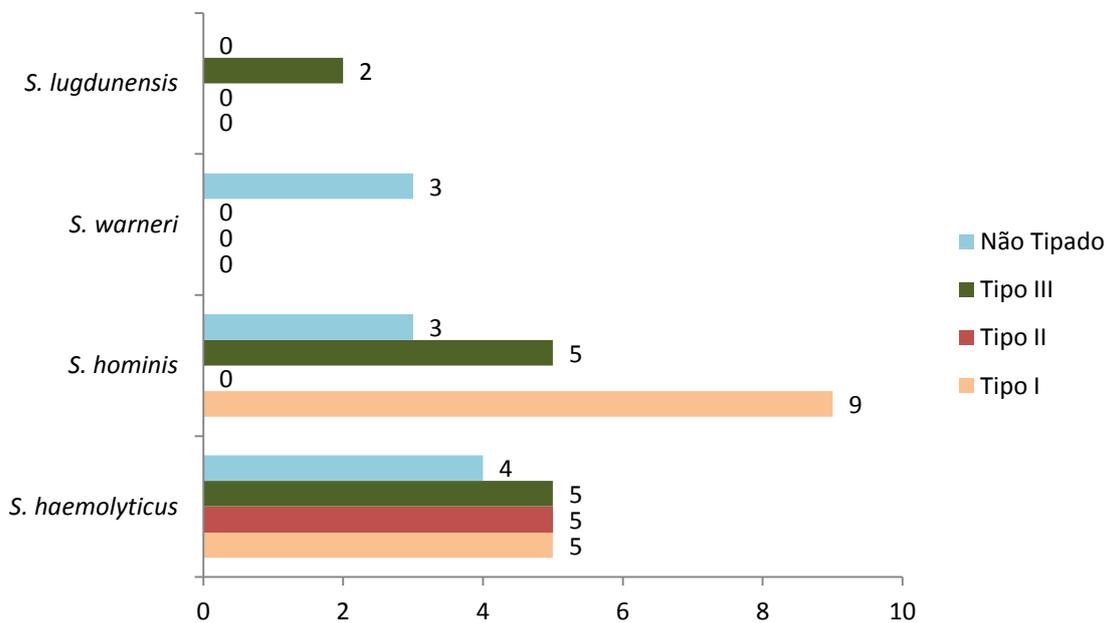
**Tabela 2.** Distribuição das amostras heterorresistentes à vancomicina de acordo com o número de colônias crescidas em ágar BHI com vancomicina.

Amostras Heteroresistentes n=24	Crescimento em ágar BHI com 4µg ml <sup>-1</sup> de vancomicina de acordo com n° de colônias				Crescimento em ágar BHI com 6µg ml <sup>-1</sup> de vancomicina de acordo com n° de colônias*			
	Uma a nove colônias	De 10 a 99 colônias	De 100 a 999 colônias	Mais de 1000 colônias	Uma a nove colônias	De 10 a 99 colônias	De 100 a 999 colônias	Mais de 1000 colônias
<i>S. haemolyticus</i> (n=14; 60,9% )	5 (21,7%)	6 (26,1%)	2 (8,7%)	1 (4,4%)	4 (17,4%)	0	0	0
<i>S. hominis</i> (n=7; 30,4% )	0	0	0	7 (30,4%)	0	2 (8,7%)	0	4 (17,4%)
<i>S. warneri</i> (n=3; 30%)	2 (20%)	1 (10%)	0	0	0	0	0	0
Total	7	7	2	8	4	2	0	4

\* Nem todas as amostras que cresceram em ágar BHI com 4µg ml<sup>-1</sup> de vancomicina também cresceram em ágar BHI com 6 µg ml<sup>-1</sup>.



**Figura 1.** Distribuição dos genes *ica* segundo as espécie de ECN.



**Figura 2.** Distribuição dos tipos de SCCmec de acordo com as espécies de ECN