Instituto de Biociências

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

PG-BGA

Staphylococcus epidermidis e S*taphylococcus haemolyticus*: detecção de genes codificadores de biofilme, toxinas, resistência a antimicrobianos e tipagem clonal em isolados de hemoculturas

LUIZA PINHEIRO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *21202010.*

Prof. Adj. Maria de Lourdes R. S. da Cunha

BOTUCATU – SP
2014

Instituto de Biociências

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

PG-BGA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Staphylococcus epidermidis e S*taphylococcus haemolyticus*: detecção de genes codificadores de biofilme, toxinas, resistência a antimicrobianos e tipagem clonal em isolados de hemoculturas

LUIZA PINHEIRO

MARIA DE LOURDES RIBEIRO DE SOUZA DA CUNHA
ORIENTADORA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *21202010.*

Prof. Adj. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

BOTUCATU – SP
2014

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

Pinheiro, Luiza.
Staphylococcus epidermidis e Staphylococcus haemolyticus: detecção de genes codificadores de biofilme, toxinas, resistência a antimicrobianos e tipagem clonal em isolados de hemoculturas / Luiza Pinheiro. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha
Capes: 21202010

1. Estafilococos. 2. Biofilme. 3. Toxinas. 4. Infecções estafilococicas.

Palavras-chave: Biofilme; Resistência; Staphylococcus epidermidis; Staphylococcus haemolyticus; Toxinas.

"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas, graças a Deus, não sou o que era antes".
(Martin Luther King)

A Deus,

por me proporcionar saúde e disposição para cumprir esta jornada, sempre atendendo meus pedidos.

À minha mãe, Leda,

exemplo de dedicação e força, que muitas vezes renunciou a seus próprios sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Obrigada pelo apoio, carinho e educação que me permitiram ser uma pessoa melhor. Palavras não são suficientes para mensurar tamanha importância de sua presença em minha vida.

Ao meu namorado, Roberto,

quem sempre me encorajou e apoiou. Obrigada pelo amor e incentivo durante esses anos, e pela cumplicidade em todos os momentos.

À minha querida amiga Carla (*in memoriam*),

Palavras não podem descrever a falta que sua presença e sua alegria me fazem. Pessoa de grandeza inestimável e coração imenso, cuja lembrança levarei comigo em todos os dias da minha vida. Obrigada por me ajudar a concretizar esta jornada com que, um dia, você também sonhou. Este trabalho também é seu.

Agradecimentos

A Deus,

por me dar a vida e a força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me permitir cumprir mais esta etapa.

A meus pais, Leda e Luciano,

pelo suporte e apoio incondicionais durante esses anos, dedicação, carinho, e pelos sacrifícios que fizeram por mim. Sem vocês, eu não teria chegado até aqui. Todo o meu carinho e gratidão.

A meu namorado, Roberto,

pelo amor, companheirismo, dedicação, e por muitas vezes entender minha ausência, estando sempre presente nessa jornada, partilhando os momentos alegres e difíceis. Todo o meu amor e admiração.

A meus irmãos, Lucas e Gabriel,

por estarem sempre presentes, pelo companheirismo e incentivo.

Aos meus avós, Catarina e Guido,

pelo cuidado, carinho, dedicação e incentivo durante todos esses anos.

Aos meus tios, Paula e Luciano Bolla,

por sempre torcerem por mim, e me apoiarem.

À minha amiga Carla (*in memoriam*),

pela amizade, companheirismo e convivência, pela imensa contribuição neste trabalho, e em minha vida. Obrigada por me permitir ser sua amiga, e me ensinar tanto. Saudades...

Agradecimentos

Às amigas,

Joice,

pela longa e fiel amizade, pelo apoio e paciência em me ouvir.

Elaine,

pela convivência nesses anos de faculdade, e incentivo nos momentos difíceis.

A Carine e Renan,

companheiros de viagem, agradeço a colaboração, amizade e apoio.

Aos amigos e colegas de laboratório,

Carlos, Cláudia, Danilo, Dharlan, Eduardo, Eliane, Fabiana, Iara, Katheryne, Lígia, Luisa, Mariana, Maria Rachel, Natália, Patrícia, Taisa, Thais e Valéria, pela contribuição, ensinamentos, e boa convivência, em especial a Adilson, Ariane, Aydir, Camila e Priscila, pela amizade e incentivo.

Aos Professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia,

em especial Sandra Bosco e Terue Sadatsune,
pela amizade, apoio e contribuições.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia,

Luiz Severino, Larissa, D. Anita, Sonia, Aline, Luiz Alquati e Ana, por me atenderem sempre que necessitei e pelo excelente auxílio prestado ao Departamento.

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

pelo auxílio financeiro.

Em especial, gostaria de agradecer

à minha orientadora, Maria de Lourdes,

por ter me dado a oportunidade de realizar este trabalho, por acreditar e investir em mim, e permitir-me desenvolver profissionalmente. Obrigada pela paciência , apoio e incentivo durante esses quatro anos. Toda minha gratidão e admiração.

Sumário

RESUMO GERAL **11**
GENERAL ABSTRACT **13**
INTRODUÇÃO **16**
OBJETIVO GERAL **28**
OBJETIVOS ESPECÍFICOS **29**
REFERÊNCIAS **31**
ARTIGO I **43**
Resumo 44
Abstract 45
Introdução 46
Materiais e Métodos 48
Amostras *48*
Extração do DNA *48*
Identificação genotípica de S. epidermidis e S. haemolyticus *48*
Detecção do gene mecA *49*
Determinação do SCCmec *49*
Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos antimicrobianos pelo método de Etest® *50*
Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) de vancomicina por Microdiluição em Caldo (BMD) *50*
Detecção dos genes vanA e vanB *51*
Análise por PFGE *51*
Análise estatística *52*
Resultados 53
Discussão 60
Conclusões 67
Agradecimentos 67
Suporte Financeiro 67
Conflitos de Interesse 67
Referências 68
ARTIGO II **78**
Resumo 79
Abstract 81
Introdução 83
Materiais e Métodos 85
Amostras *85*
Extração do DNA *85*
Identificação genotípica de S. epidermidis e S. haemolyticus *85*
Detecção de genes de enterotoxinas por PCR *86*
Detecção dos genes de hemolisinas por PCR *86*
Produção fenotípica de hemolisinas beta e delta *87*
Detecção dos genes responsáveis pela produção de biofilme icaA e icaD *87*
Detecção do gene associado à produção do biofilme bhp *88*
Estudo da produção de biofilme *89*
Pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em tubo de borossilicato *89*

Pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em placa de poliestireno modificado *89*
Análise estatística *90*
Resultados 91
Detecção de genes codificantes de enterotoxinas 91
Detecção dos genes de hemolisinas e hemólise fenotípica 92
Detecção dos genes codificadores de biofilme e produção fenotípica 93
Discussão 96
Conclusões 104
Lista de abreviações 104
Conflitos de Interesse 105
Contribuição dos autores 105
Agradecimentos 105
Referências 106
CONCLUSÕES GERAIS 116

Resumo Geral

Staphylococcus epidermidis e *Staphylococcus haemolyticus* são considerados patógenos oportunistas, cujas infecções estão principalmente associadas à produção de biofilme. As enterotoxinas, superantígenos relacionados a intoxicações alimentares, e as hemolisinas, moléculas capazes de causar lise de membranas celulares, parecem estar associadas à patogênese das infecções estafilocócicas, apesar de ainda ser questionado se elas constituem fatores de virulência importantes nesses organismos. O uso indiscriminado de antimicrobianos vem selecionando cepas resistentes à oxacilina com menor suscetibilidade à vancomicina. A resistência à oxacilina é codificada pelo gene *mecA*, contido em um elemento genético móvel, denominado SCC*mec*. Novos antimicrobianos, como a linezolida, tigeciclina, daptomicina e quinupristina/dalfopristina vêm sendo empregados no tratamento de infecções por estafilococos multirresistentes. Este estudo objetivou caracterizar *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* isolados de hemoculturas quanto à presença de genes de hemolisinas, enterotoxinas, suscetibilidade aos antimicrobianos e perfil clonal. Cento e sessenta e nove isolados foram pesquisados quanto à presença do gene *mecA* por PCR em tempo real, estando presente em 100% dos *S. haemolyticus* e 92,9% dos *S. epidermidis*, cujos tipos de SCC*mec* mais frequentes, determinados por PCR Multiplex, foram, respectivamente, I e III. Os MICs (Concentração Inibitória Mínima) de linezolida, tigeciclina, daptomicina, quinupristina/dalfopristina e vancomicina foram obtidos por Etest® e revelaram 4,7% de isolados resistentes à tigeciclina, 1,2% resistentes ou com resistência intermediária à quinupristina/dalfopristina, sendo o MIC máximo de vancomicina igual a 3 µg/ml. A microdiluição em caldo para vancomicina mostrou MICs de 0,25 a 2 µg/ml, concordando em 88,2% com os resultados obtidos com Etest®. A tipagem por PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) revelou clones de *S. epidermidis* presentes em períodos de até 4 anos no Hospital da Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. Todos os genes das enterotoxinas A, B, C, D, E, G, H, I, detectados por PCR, estiveram presentes em pelo menos um

dos isolados, e 95,3% das amostras possuíam pelo menos um destes genes. Os genes das hemolisinas *hla*, *hlb* e *hld* estiveram presentes em mais de 90% de *S. epidermidis;* em *S. haemolyticus* o gene *hla* foi detectado em 91,7% e as hemolisinas β e δ com menor frequência (81 e 40,5%, respectivamente). A produção do biofilme foi detectada pelos testes do tubo de borossilicato (28,4% dos isolados) e placa de poliestireno (27,8%), que se associaram estatisticamente à presença dos genes *icaAD* concomitantes, pesquisados por PCR em tempo real e encontrados em 46,7% dos isolados. O gene *bhp*, detectado por PCR, foi observado em 15,3% dos *S. epidermidis* apenas. Este trabalho revela altas taxas de resistência à oxacilina, que estiveram associadas a maiores MICs de quinupristina/dalfopristina, além da resistência à tigeciclina, raramente relatada entre *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*; apesar disso, estas drogas foram altamente eficazes contra a maioria dos isolados estudados. O Etest® superestimou sutilmente os MICs de vancomicina, e isolados com MICs ligeiramente elevados deste antimicrobiano possuíam grande diversidade de SCC*mec*, revelando a facilidade com que *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* adquirem elementos genéticos de resistência. As enterotoxinas e hemolisinas parecem ter um papel relevante na patogênese das infecções por *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, já que as cepas hospitalares carreavam estes genes com alta frequência. A constituição do biofilme de *S. haemolyticus* parece diferir do biofilme de *S. epidermidis* quanto ao menor envolvimento dos genes *ica* e do *bhp*. *S. epidermidis* revelou ser melhor produtor de biofilme, o que pode estar associado à maior frequência de *icaA*; o gene da hemolisina delta parece desenvolver um papel relevante no biofilme, observações que devem ser melhor elucidadas futuramente. Este trabalho permitiu corroborar as hipóteses de que *S. epidermidis* se destaca pela maior frequência de fatores de virulência, como toxinas e biofilme, enquanto *S. haemolyticus* pela maior resistência e redução da suscetibilidade antimicrobiana que fazem com que esses microrganismos obtenham sucesso como agentes oportunistas.

Palavras-chave: *S. epidermidis*; *S. haemolyticus*; oxacilina; vancomicina; biofilme, toxinas.

General Abstract

Staphylococcus epidermidis and *Staphylococcus haemolyticus* are opportunistic pathogens that cause infections which are mainly related to the formation of a biofilm. Enterotoxins, superantigens related to food poisoning and hemolysins, molecules able to lyse mammalian cells, seem to be involved in the pathogenesis of staphylococcal infections, although the question remains whether they represent important virulence factors in these organisms. The indiscriminate use of antimicrobial drugs has selected strains that are resistant to oxacillin, in addition to isolates with reduced vancomycin susceptibility. Oxacillin resistance is encoded by the *mecA* gene which is carried on a mobile genetic element, SCC*mec*. New antimicrobial drugs such as linezolid, tigecycline, daptomycin and quinupristin/dalfopristin are being used for the treatment of infections caused by multidrug-resistant staphylococci. The objective of this study was to characterize *S. epidermidis* and *S. haemolyticus* strains isolated from blood cultures regarding the presence of hemolysin and enterotoxin genes, antimicrobial susceptibility, and clonal profile. Investigation of the *mecA* gene by real-time PCR in 169 isolates revealed the presence of the gene in 100% of *S. haemolyticus* isolates and 92.9% of *S. epidermidis*. The most frequent SCC*mec* types determined by multiplex PCR were types I and III, respectively. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of linezolid, tigecycline, daptomycin, quinupristin/dalfopristin and vancomycin determined by the Etest® showed that 4.7% of the isolates were resistant to tigecycline and 1.2% were resistant or intermediate resistant to quinupristin/dalfopristin. The maximum MIC for vancomycin was 3 μg/ml. Broth microdilution revealed vancomycin MICs of 0.25 to 2 μg/ml, showing 88.2% agreement with the Etest results. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing revealed the presence of *S. epidermidis* clones at the University Hospital of the Botucatu School of Medicine over a period of up to 4 years. All enterotoxin genes (A, B, C, D, E, G, H, I) were detected by PCR in the isolates and 95.3% carried at least one of these genes. *S. epidermidis* exhibited the highest toxigenic potential. The

hemolysin genes *hla*, *hlb* and *hld* were detected in more than 90% of *S. epidermidis* isolates; *hla* was detected in 91.7% of *S. haemolyticus* isolates, whereas beta- and delta hemolysins were detected at a lower frequency (81 and 40.5%, respectively). Biofilm formation was observed on borosilicate tubes (28.4% of the isolates) and on polystyrene plates (27.8%) and was significantly associated with the presence of the *icaAD* genes detected by real-time PCR in 46.7% of the isolates. The *bhp* gene was detected by PCR only in 15.3% of *S. epidermidis*. This study demonstrates high rates of oxacillin resistance that were associated with high MICs for quinupristin/dalfopristin, in addition to tigecycline resistance which is rarely reported in *S. epidermidis* and *S. haemolyticus*. Nevertheless, these drugs were highly effective against most of the isolates studied. The Etest subtly overestimated vancomycin MICs and isolates with slightly elevated vancomycin MICs exhibited great diversity of SCC*mec*, a finding that shows how easily these species acquire resistance-conferring genetic elements. Enterotoxins and hemolysins seem to play an important role in the pathogenesis of infections caused by *S. epidermidis* and *S. haemolyticus*, since nosocomial strains frequently carried these genes. Biofilm formation by *S. haemolyticus* seems to differ from *S. epidermidis*, with the less frequent involvement of the *ica* and *bhp* genes. The *icaD* gene may be considered a marker of biofilm formation and the delta-hemolysin gene seems to play an important role in the biofilm. Further studies are needed to clarify these observations. This work allowed us to conclude that *S. epidermidis* is distinguished by a higher frequency of virulence factors, as toxins and biofilm, while *S. haemolyticus* stands out by high rates of antimicrobial resistance and reduced susceptibility to drugs, characteristics that allow them to succeed as important opportunist agents.

Keywords: *S. epidermidis*; *S. haemolyticus*; oxacillin; vancomycin; biofilm, toxins.

Introdução

Os estafilococos coagulase-negativa (ECN) são agentes bacterianos comensais, frequentemente isolados de diversos locais do organismo de seres humanos [1]. Entre as espécies de ECN, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus* são as mais frequentemente encontradas em amostras clínicas [2]. Enquanto *S. haemolyticus* coloniza comumente áreas com glândulas apócrinas, como axilas, zonas inguinal e perineal, *S. epidermidis* pode ser isolado de todos os locais do corpo [3]. Este último pode funcionar de forma benéfica ao hospedeiro ao inibir a colonização do patogênico *S. aureus* [4]. Adultos saudáveis possuem de 10 a 24 cepas distintas de *S. epidermidis* [3], e o número de ECN na pele humana varia de 10 a 10^5 unidades formadoras de colônia (CFU)/cm^2 em adultos saudáveis da comunidade [5].

O potencial patogênico dessas bactérias reside em sua habilidade de colonizar e proliferar em biomateriais [6]. As bacteremias por ECN ocorrem como resultado do uso prolongado de cateteres venosos centrais, administração de nutrição parenteral e antibioticoterapia prévia, imunodepressão, permanência em unidade de cuidado intensivo, e outros fatores de predisposição [7,8,9]. *S. aureus* e ECN representam etiologia de 30% de infecções adquiridas no ambiente hospitalar [10], e associam-se a gastos estimados em dois bilhões de dólares em tratamentos nos Estados Unidos [11].

Os ECN são a principal causa de bacteremias de origem hospitalar, responsáveis por 30 a 40% delas [12]. A maior parte dessas infecções é resultado do uso de cateteres intravasculares [13], sendo *S. epidermidis* o responsável por 50-70% dessas infecções [14]. Essas bactérias também são frequentemente encontradas em infecções do sistema nervoso central [15,16], infecções do trato urinário[14], infecção de sítio cirúrgico[17], endoftalmite[18], infecções de próteses valvares cardíacas[19] e, com menos frequência, endocardites[20].

Em contraste com *S. aureus*, que causam frequentemente infecções sérias e fatais, *S. epidermidis* possui uma predisposição a causar infecções crônicas e recorrentes[13,21,22,23]. Sua

identificação como agente etiológico de infecções, entretanto, pode ser dificultada devido à maior parte das infecções associadas com este micro-organismo serem caracterizadas por manifestações clínicas não específicas e, como parte da microbiota normal cutânea, é com frequência encontrado como contaminante em culturas. Contudo, *S. epidermidis* é reconhecido atualmente como uma importante causa de infecções nosocomiais e classificado como a terceira causa mais comum de sepse hospitalar em alguns estudos[24,25,26], e causa significante de morbidade e óbitos[27].

Segunda espécie mais comumente isolada de ECN, *S. haemolyticus* é frequentemente isolado de hemoculturas de pacientes de UTIs neonatais, caracterizando-se, inclusive, como agente de sepse, além de ter sido repetidamente implicado em infecções de corrente sanguínea, peritonites, infecções do trato urinário, em feridas, infecções ósseas e articulares [28].

A habilidade de causar infecções em pacientes que se utilizam de dispositivos médicos é primariamente associada à capacidade de alguns ECN de formar biofilmes, nos quais a bactéria adere à superfície inerte plástica destes dispositivos, disparando mudanças no comportamento bacteriano, como a ativação do mecanismo de *quorum sensing*, pelo qual as camadas exteriores de células protegem a comunidade interior [29] e conferem resistência aumentada aos agentes antimicrobianos [30].

As bactérias envolvidas no ambiente do biofilme são de 100 a 1.000 vezes menos suscetíveis aos antibióticos do que as bactérias em fase planctônica [31]. Essa redução da suscetibilidade aos antimicrobianos pode ser explicada por diversos mecanismos, como a ligação de antibióticos com o biofilme, a baixa penetração do antibiótico, o crescimento lento dos micro-organismos no biofilme, a alta densidade de bactérias, e as alterações na expressão gênica das bactérias presentes no biofilme [30,32,33].

O processo de formação de biofilme consiste em duas etapas complexas. A primeira fase acontece no reconhecimento célula a célula para tornar possível a aderência das bactérias na

presença de adesinas, o que dependerá da estrutura bacteriana e a natureza do biomaterial, através de diferentes forças físico-químicas [23,34]. A aderência está associada com proteínas da superfície bacteriana denominadas de SSP-1 e SSP-2 (*Staphylococcal Surface Proteins*). Outras proteínas da superfície bacteriana também parecem estar envolvidas, tais como uma autolisina AtlE, que é observada em *Staphylococcus epidermidis* [35].

Na segunda etapa, ocorre a multiplicação bacteriana e o acúmulo de um conglomerado de células aderidas entre si e associadas com a produção da adesina polissacarídica intercelular (PIA), formando multicamadas de biofilme. O PIA é considerado crucial para a adesão célula a célula e para a acumulação de biofilme [36]. A biossíntese do PIA é codificada pelo operon *ica*, composto pelos genes *icaR* (regulatório) e genes *icaA, icaD, icaB* e *icaC* [37,38]. Um gene que codifica uma proteína Bap homóloga (produzida por *S. aureus*), denominada de Bhp, foi encontrado no genoma de isolados clínicos de *S. epidermidis*, parecendo contribuir para a formação do biofilme nesta bactéria [23]. Entretanto, a formação de biofilme independente do PIA já foi relatada [39].

A multiplicação de bactérias no biofilme é acompanhada pela liberação de sinais que permitem a comunicação, através do *quorum sensing*, entre as células bacterianas, que ativam mecanismos genéticos responsáveis pela produção de exopolissacarídeos [40]. Assim, ocorre o maior crescimento de microrganismos adjuntos, levando à formação de agregados bacterianos densos embutidos na matriz exopolimérica, típica de biofilmes maduros [41].

O operon *ica* têm se mostrado presente mais em *S. epidermidis* do que em *S. haemolyticus*. A similaridade entre os operons *ica* em diferentes espécies de estafilococos é alta, e análises filogenéticas demonstram que o operon de *S. haemolyticus* é altamente correspondente ao de *S. epidermidis* [42]. Resultados do estudo de Fredheim et al[42] demonstram que *S. haemolyticus* formam principalmente biofilmes PIA-independentes, constituído principalmente

de proteínas e DNA extracelular. A produção de biofilme sem a presença do PIA foi também relatada em outras espécies, como *S. epidermidis*, *S. aureus* e *S. lugdunensis* [43,44,45,46,47].

Os fatores de virulência de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* estão altamente associados com sua invasividade e a patogenicidade das infecções. Dentre os principais fatores de virulência dos ECN, estão as toxinas estafilocócicas, consideradas superantígenos, relatadas inicialmente em 1959 por Bergdoll et al[48]. Em adição as cinco SEs (enterotoxinas estafilocócicas) clássicas e antigenicamente distintas descobertas nos anos 1960 (A, B, C1, C2, C3, D e E) codificadas pelos genes *sea*, *seb*, *sec-1*, *sec-2*, *sec-3*, *sed* e *see*, 18 novos tipos de SEs ou SEl foram descritos (SEG-SElU, SElV2, SElX)[49,50,51,52]. O Comitê Internacional de Nomenclatura dos Superantígenos Estafilocócicos propõe que somente os superantígenos que induzem êmese após ingestão oral devam ser designados como enterotoxinas estafilocócias (SE), e que as toxinas similares que apresentam atividade superantigênica, mas não emética, devam ser designadas com *like* toxinas (SEl) tipo X[53,54].

Todos os genes codificantes de enterotoxinas estão localizados em elementos genéticos móveis, incluindo bacteriófagos, ilhas de patogenicidade, ilhas genômicas e plasmídeos [56,57]. A associação de genes de enterotoxinas com elementos genéticos móveis resulta em maior transferência horizontal de genes de superantígenos entre linhagens de estafilococos, e constituem um importante papel na evolução dos ECN como patógenos.

As enterotoxinas estafilocócicas são monoméricas, proteínas globulares solúveis em água, com pesos moleculares de 26.000 a 29.000 daltons, que são ricas em lisina, ácido aspártico, ácido glutâmico e cisteínas, formando pontes dissulfeto [57]. São resistentes ao calor e às enzimas proteolíticas tripsina, pepsina e renina, o que permite sua passagem pelo trato gastrointestinal sem perda da atividade [57,58]. As enterotoxinas são consideradas como a maior causa de intoxicação alimentar. Elas estão associadas com uma forma de gastroenterite

manifestada clinicamente com vômitos, com ou sem diarréia, resultado da ingestão de uma ou mais enterotoxinas presentes no alimento contaminado com essas bactérias [59].

Cunha et al[60], estudando ECN provenientes de recém-nascidos, observaram uma relativa alta porcentagem (37%) de isolados produzindo uma ou a combinação de duas ou mais SEs clássicas pelo método de aglutinação reversa passiva de látex (RPLA). Em outro trabalho, Cunha et al[61], focando na detecção de enterotoxinas e TSST-1 (Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico) em estafilococos isolados de amostras clínicas, revelaram a presença de genes de uma ou mais enterotoxinas em ECN.

Barretti et al[62], em estudo envolvendo fatores de virulência em peritonites por estafilococos, postularam que enterotoxinas produzidas por ECN, exercendo efeitos superantigênicos, tóxicos e pirogênicos, podem influenciar o curso da infecção em níveis mais altos do que resistência antimicrobiana dos patógenos. O mesmo trabalho observou produção pelo método RPLA de SEA, SEB, SEC e TSST-1, sozinhos ou em combinação, por *S. epidermidis*, enquanto *S. haemolyticus* e *S. lugdunensis* produziram SEC[62]. A expressão de RNAm de enterotoxinas por ECN, incluindo SEE, SEG, SEH e SEI, foi relatada por Vasconcelos et al[63].

As hemolisinas são consideradas importantes fatores de virulência de estafilococos. Estas são capazes de produzir lesão diretamente na membrana externa das células-alvo [64], e são denominadas hemolisinas alfa (α), beta (β), delta(δ) e gama(γ). Vários estudos demonstram sua prevalência em *S. aureus*, mas a presença de hemolisinas em ECN e sua contribuição para a patogenicidade dessas infecções é pouco elucidada.

A hemolisina alfa é uma toxina hemolítica formadora de poros que causa dano à membrana de vários tipos de células de mamíferos[65], é dermo-necrótica e neurotóxica, podendo ser letal em sistemas animais. Esses fatores contribuem com o consenso de que essa toxina é importante na formação de abscessos característicos de infecções causadas por *S. aureus*. O gene

codificante da hemolisina alfa, *hla*, foi clonado do cromossomo de *S. aureus* e seqüenciado em 1984 por Gray e Kehoe[66].

A toxina beta degrada a esfingomielina na camada fosfolipídica externa da membrana eritrocítica. Sua atividade hemolítica é reforçada pela incubação abaixo de 10°C após o tratamento a 37°C, e por isso ela é conhecida como hemolisina "hot-cold". O gene responsável pela sua produção é denominado *hlb* e localizado no cromossomo bacteriano, codificando um polipeptídeo com 300 aminoácidos [67].

A hemolisina delta, peptídeo com 26 aminoácidos em *S. epidermidis*, é capaz de causar dano à membrana, com uma ação detergente que resulta na lise celular. Entre as citotoxinas estafilocócicas, a hemolisina delta é caracterizada por termoestabilidade, neutralização pela lectina e sinergismo com a hemolisina beta [68]. Ela também tem um importante papel na patogênese de doenças intestinais e pode causar desde uma diarréia aguda até uma enterite severa [69]. O gene que codifica a hemolisina delta, *hld*, está locado no locus RNAIII do gene *agr*, e seu produto difere em apenas três aminoácidos da hemolisina delta de *S. aureus*[70,71].

A produção das hemolisinas alfa e beta por ECN é pouco descrita[72,73], apesar da hemolisina delta ser frequentemente encontrada na maioria dessas espécies[74,75,76,77,78,79]. Toxinas similares, como hemolisina III (SE_1760) e hemolisina (SE_0613) foram observadas como fatores de virulência em *S. epidermidis*[80].

O sucesso dos ECN como agentes causadores de infecção, nas últimas décadas, se apoia na seleção de cepas com resistência aos antimicrobianos, devido ao uso indiscriminado dessas drogas. A resistência à oxacilina, antimicrobiano que substituiu a meticilina em pacientes com infecções por estafilococos resistentes à penicilina, tem crescido de forma exponencial entre os ECN no Brasil e no mundo. Em 1968, a resistência à meticilina/oxacilina atingia 10% dos *S. epidermidis*[81], valores que cresceram até o final da década de 1970 – 48%[82]. Já no final da

década de 1990, a resistência à oxacilina atingiu 68% dos ECN[83], 71% no final dos anos 2000[84], e 82,5% em 2012[85].

Entre as espécies, a que aparece com maior prevalência de resistência é *S. haemolyticus* (82%), seguido por *S. epidermidis* (62%), *S. hominis* (54%), *S. simulans* (26%), *S. cohnii* (16%) e *S. warneri* (9%)[86]. No Brasil, a resistência à oxacilina parece ser ainda maior em *S. epidermidis* (94,2%), *S. haemolyticus* (94,1%) e *S. hominis* (94,3%), tornando-se presente em apenas 3,5% de *S. saprophyticus* e 75% de *S. warneri*[87]. Já Martins et al [88], analisando ECN de hemoculturas de pacientes de hospital universitário brasileiro, relataram taxas de 75% em *S. haemolyticus,* 70,7% em *S. epidermidis*, 7,8% em *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* e 6% em *S. saprophyticus*.

A resistência à meticilina/oxacilina é principalmente devida à presença de uma proteína ligante de penicilina 2 (PBP 2) modificada, a PBP2' ou PBP2a, que possui baixa afinidade aos beta-lactâmicos. Esta proteína é codificada pelo gene *mecA*, que opera com os reguladores *mecR1* e *mecI*[89]. Foi demonstrado que ECN resistentes à meticilina (em inglês, *Methicillin Resistant Coagulase Negative Staphylococci* - MR-CoNS) produzem o mesmo tipo de PBP modificada que *S. aureus*[90,91], bem como observada a alta similaridade do gene *mecA* e de seus reguladores[92].

Trabalhos revelam que os fatores genéticos determinantes da resistência à meticilina são originários de ECN e posteriormente foram transferidos a outros estafilococos [93,94]. Em particular, *S. fleurettii* [95] é apontado como reserva natural do gene *mecA*, que atualmente está distribuído tanto entre coagulase-positivos como coagulase-negativos.

O gene *mecA* está contido em elemento genético móvel denominado Cassete Cromossômico Estafilocócico *mec* (SCC*mec*), considerado um intercâmbio de resistência entre ECN e *S. aureus*, já que ele confere resistência a todos os antimicrobianos beta-lactâmicos [96]. O SCC*mec* é composto de diferentes combinações entre o complexo *mec*, que codifica a resistência à meticilina, e o complexo *ccr*, que codifica as enzimas recombinases responsáveis pela

mobilidade do elemento genético. O complexo *mec* é composto de IS431, *mecA* e sequências intactas ou truncadas de genes regulatórios *mecI* e *mecR1*. O complexo *ccr* pode ser composto dos genes recombinases *ccrA* e *ccrB* ou *ccrC* [96,97,98,99,100].

Foram descritos 11 tipos de SCC*mec* em *S. aureus*, enquanto só foram identificados em ECN os tipos I, II, III, IV, V, VI e VIII[101]. As cepas carreando SCC*mec* dos tipos I, IV, e V são frequentemente mais susceptíveis a antibióticos, já que esses tipos não contêm outros genes de resistência além do *mecA*[102]. Os tipos I, II e III estão principalmente associados a infecções hospitalares, enquanto os tipos IV e V estão relacionados a infecções adquiridas na comunidade[96,103].

O elemento menor, o SCC*mec* tipo IV, tem a possibilidade de ser adquirido com mais freqüência, já que a eficiência da transferência é maior, quanto menor o DNA. O SCC*mec* tipo IV, assim, parece ter um menor custo metabólico para a transferência, tornando este um elemento seletivamente favorecido para a transferência entre os estafilococos [104,105].

O SCC*mec* tipo III, por sua vez, é considerado o maior entre os elementos gênicos, além de ser mais complexo e codificar mais genes de resistência, como aqueles resistentes a antibióticos não beta-lactâmicos e a metais pesados, podendo assim sofrer seleção no meio com antimicrobianos e prevalecer sobre as cepas sensíveis[106]. Assim como para MRSA, em ECN, altos níveis de resistência à oxacilina ou à cefoxitina parecem estar associados à presença do SCC*mec* tipo III [107,108].

Nas últimas décadas, o crescimento no número de cepas de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* resistentes à oxacilina levou à utilização mais frequente de antimicrobianos considerados como últimas opções terapêuticas, como os glicopeptídeos e, em particular, a vancomicina. Entretanto, já na década de 1980 começaram a ser descritas as primeiras cepas de *S. epidermidis* com suscetibilidade reduzida à vancomicina nos Estados Unidos[109], e o primeiro relato envolvendo *S. aureus* com suscetibilidade reduzida à droga foi no Japão, em 1997[110].

O trabalho de Froggatt et al[111] revelou a presença de 42% dos isolados de *S. haemolyticus* com suscetibilidade reduzida à vancomicina, e, apesar da resistência à vancomicina ter sido primeiramente observada em cepas clínicas dessa espécie, no final da década de 1980[112,113], não há muitos relatos de ECN com resistência à droga[114]. No Brasil, foram observadas, entre 1996 e 1997, duas cepas de ECN (um *Staphylococcus epidermidis* e um *Staphylococcus haemolyticus*) com resistência intermediária à vancomicina[115]. Em 2005, Palazzo et al[116] encontraram cepas de *S. aureus* e ECN resistentes à vancomicina, incluindo *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. capitis*.

Entre os mecanismos associados à suscetibilidade reduzida e resistência à vancomicina, estão o espessamento da parede celular, com produção aumentada de peptideoglicano, mais monômeros de mureína e mais camadas na parede celular, o que gera o aprisionamento das moléculas de vancomicina nas camadas do peptideoglicano, impedindo que cheguem à membrana citoplasmática, onde a síntese deste ocorre [117,118].

Outro mecanismo de resistência à vancomicina está associado com o produto dos genes *van*, descritos em *Enterococcus*, incluindo *vanA, vanB, vanC, vanD, vanE, vanF, vanG* [119,120,121] e, mais recentemente, *vanL*, *vanM* e *vanN* [122,123,124]. Este tipo de resistência adquirida está associado à alteração do peptídeo terminal de D-alanil-D-alanina para D-alanil-D-lactato, que somente ocorre com a exposição a baixas concentrações de vancomicina, sendo que o novo dipeptídeo possui uma baixa afinidade à droga[125].

Em 1992, a transferência conjugativa do gene *vanA* de enterococos para *S. aureus* foi demonstrada *in vitro*[126] e, em 2003, uma cepa clínica de *S. aureus* com resistência total à vancomicina codificada pelo gene *vanA* foi identificada, possuindo MIC (Concentração Inibitória Mínima) de 1024 μg/ml[127]. Okee et[128] identificaram os genes *vanA* e *vanB* em 10% de *S. epidermidis* isolados de pacientes internados em UTIs. Recentemente, Ishihara et al[129]

encontraram o gene *vanA* em uma cepa de *Staphylococcus saprophyticus*, cujo MIC foi determinado em > 256 μg/ml.

Nos últimos anos, novas opções terapêuticas surgiram como alternativa à vancomicina. A daptomicina, um lipopeptídeo cíclico altamente bactericida contra patógenos gram-positivos, e quinupristina/dalfopristina, que possui ação inibidora da síntese protéica bacteriana, foram aprovados recentemente pelo FDA (Food and Drug Administration - Estados Unidos) para o tratamento de bacteremias ocasionadas por cocos gram-positivos multirresistentes. A daptomicina foi aprovada em 2003 para tratamento de infecções de pele e tecidos moles, sendo considerada tão eficiente quanto à vancomicina em testes clínicos com bacteremias causadas por estafilococos[130]. Entretanto, cepas de ECN com resistência à daptomicina e à quinupristina/dalfopristina já têm sido descritas[131,132].

A tigeciclina, que possui uma atividade mais potente contra organismos resistentes à tetraciclina, e a linezolida, um antibiótico oxazolidinona inibidor da síntese proteica, também fazem parte deste novo arsenal terapêutico; porém, ainda não foram aprovados para o tratamento de infecções da corrente sanguínea[133,134]. Trabalhos mostram alta eficácia da tigeciclina contra ECN, sendo que concentrações até 0,5 μg/ml inibiram 98,6% dos ECN[135,136]. A linezolida, introduzida na prática clínica no início dos anos 2000, é uma das poucas opções terapêuticas efetivas contra MRSA, incluindo infecções complicadas de pele e tecidos moles, osteomielites e pneumonia[137]. Entretanto, estudos revelam que a resistência à linezolida em ECN pode atingir até 2% dos isolados [138,139,140].

Os estafilococos, apesar de serem considerados micro-organismos oportunistas, possuem uma alta clonalidade populacional [141]. É possível que alguns clones sejam mais invasivos que outros, devido à presença de fatores de virulência que aumentam a possibilidade de acesso a locais normalmente estéreis. A pressão seletiva pode atuar como facilitadora da disseminação de clones, sendo que cepas resistentes a certas drogas podem possuir alta relação clonal, e

possivelmente serem transmitidos de paciente e paciente, como demonstrado por Potoski et al [142], em ECN resistentes à linezolida.

A emergência dos ECN, representados principalmente por *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, como importantes patógenos nosocomiais, torna necessários estudos envolvendo seus fatores de virulência e suscetibilidade aos antimicrobianos. Este trabalho objetivou caracterizar *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* isolados de hemoculturas, quanto à produção de toxinas, biofilme, à suscetibilidade antimicrobiana e relação clonal.

Objetivo Geral

Elucidação do perfil de virulência, resistência aos antimicrobianos e relação clonal em *Staphylococcus epidermidis* e *S. haemolyticus* isolados de hemoculturas de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Objetivos Específicos

- Isolamento e identificação de 169 amostras de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* provenientes de hemoculturas de pacientes internados no HC da FMB no período de 2000 a 2011;
- Identificação genotípica das amostras pela técnica ITS-PCR;
- Detecção da presença de genes que codificam as enterotoxinas A, B, C, D, E, G, H e I nas amostras isoladas;
- Detecção da presença de genes que codificam hemolisinas Alfa, Beta e Delta nas amostras estudadas;
- Detecção em Tempo Real dos genes responsáveis pela produção de biofilme, *icaA* e *icaD*;
- Detecção do gene associado ao biofilme *bhp*;
- Detecção da produção de biofilme fenotipicamente pelos testes de aderência em tubo de borossilicato e em placa de poliestireno;
- Detecção em Tempo Real do gene *mecA*;
- Caracterização do SCC*mec* nas amostras positivas para o gene *mecA*;
- Determinação da Concentração Inibitória Mínima à Vancomicina, Daptomicina, Linezolida, Quinopristina/Dalfopristina e Tigeciclina pelo método de Etest®;
- Determinação da Concentração Inibitória Mínima à Vancomicina pelo método de Microdiluição em caldo e comparação com a técnica de Etest®;
- Detecção dos genes *vanA* e *vanB* nas amostras que apresentarem redução da susceptibilidade à vancomicina;
- Tipagem clonal dos isolados que apresentaram menor suscetibilidade à vancomicina (MIC $\geq$ 2 μg/ml).

Referências

1. Conlan S, Mijares LA, NISC Comparative Sequencing Program, Becker J, Blakesley RW, Bouffard GG, et al. *Staphylococcus epidermidis* pan-genome sequence analysis reveals diversity of skin commensal and hospital infection-associated isolates. Genome Biology 2012, 13:R64. doi:10.1186/gb-2012-13-7-r64.
2. Piette A, Verschraegen G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. Vet Microbiol 2009; 134: 45–54.
3. Kloos WE, Musselwhite MS. Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. Appl Microbiol 1975;30(3):381–5.
4. Iwase T, Uehara Y, Shinji H, Tajima A, Seo H, Takada K,et al. *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. Nature 2010; 465:346-349.
5. Kloos WE. Natural populations of the genus *Staphylococcus*. Annu Rev Microbiol 1980;34:559–92.
6. Gotz F. Staphylococcus and biofilms. Mol Microbiol 2002;43(6):1367–78.
7. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Mandell, Dauglas and, Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th edition. Philadelphia: Churchill Livingstone Inc; 2000.
8. Mayhall CG. Hospital epidemiology and infection control. 3rd edition. Philadelphia: Lippincott Wiliam and Wilkins; 2004.
9. Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed. Philadelphia: 2006.
10. Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, et al. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. Infect Control Hosp Epidemiol 2008, 29:996-101.
11. Otto M. *Staphylococcus epidermidis* - the "accidental" pathogen. Nat Rev Microbiol 2009; 7:555-567.
12. Rupp ME. Nosocomial bloodstream infections. In: Mayhall CG, editor. Hospital epidemiology and infection control, 3rd Edition, vol. 1. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2004. p. 253–66.
13. Rogers KL, Fey PD, Rupp ME. Coagulase-negative staphylococcal infections. Infect Dis Clin North Am 2009; 23: 73–98.
14. Archer GL. *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci. In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Principles and Practice of Infectious Diseases. New York: Churchill Livingston; 1995. p.1777–84.
15. Roos KL, WM Scheld. *Central nervous system infections.* In: KB Crossley, GL Archer, editors. The Staphylococci in Human Disease . New York: Churchill Livingston; 1997. p. 413-39.

16. Tunkel AR, Kaufman BA. Cerebrospinal fluid shunt infections. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Principles and Practice of Infectious Diseases, 6th editon. Philadelphia: Elsevier; 2005. p. 1126–32.
17. Boyce JM. Coagulase-negative staphylococci. In: Mayhall CG, editor. Hospital epidemiology and infection control, 3rd edition, vol. 1. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins; 2004. p. 495–516.
18. Duch-Samper AM, Menezo JL, Hurtado-Sarrio M. Endophthalmitis following penetrating eye injury. Acta Ophthalmol Scand 1997; 75:104–6
19. Gandelman G, Frishman WH, Wiese C, Green-Gastwirth V, Hong S, Aronow WS, et al. Intravascular device infections: epidemiology, diagnosis, and management. Cardiol Rev 2007;15(1):13–23.
20. Wang A, Athan E, Pappas PA, Fowler VG Jr, Olaison L, Paré C, et al. Contemporary clinical profile and outcome of prosthetic valve endocarditis. JAMA 2007;297(12):1354–61.
21. Huebner J, Goldmann DA. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. Ann Rev Med 1999; 50: 223–236.
22. Gill SR, Fouts DE, Archer GL, Mongodin EF, Deboy RT, Ravel J, 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: 2426–2438.
23. von Eiff C, Peters G, Heilmann C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. Lancet Infect Dis 2002; 2(11):677-85.
24. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Kugler KC, Beach ML. Survey of blood stream infections attributable to gram-positive cocci: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and Latin America from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. SENTRY Participants Group. Diagn Microbiol Infect Dis 1999; 33: 283–297.
25. Emory TG, Gaynes RP. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. Clin Microbiol Rev 1993; 6: 428–442.
26. Garza-González E, Otero RMN, Llaca-Díaz JM, Rodriguez-Noriega E. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci. A review and the experience in a tertiary-care setting. Epidemiol Infect 2010; 138: 645–654.
27. Cheung GYC, Otto M. Understanding the significance of *Staphylococcus epidermidis* bacteremia in babies and children. Curr Opin Infect Dis 2010; 23(3): 208–216.
28. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, Beach M, et al. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific

region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. Clin Infect Dis 2001; 32 (Suppl. 2): S114–32.

29. Davey ME, O'Toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol Molec Biol Rev 2000; 64: 847–867.
30. Stewart P, Costerton J. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet 2001; 58: 135–138.
31. Donlan RM. Role of biofilms in antimicrobial resistance. ASAIO J 2000; S47-S52.
32. Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay D, Fatma T, Rattan A. Adverse effect of staphylococci slime on in vitro activity of glycopeptides. Jpn J Infect Dis 2005; 58: 353–7.
33. Singh R, Ray P, Das A, Sharma M. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. J Antimicrob Chemother 2010; 65: 1955 –1958.
34. Vuong C, Christiane G, Somerville GA, Fischer ER, Otto M. Quorum-sensing control of biofilm factors in*Staphylococcus epidermidis* . J Infect Dis 2003;188:706–18.
35. Heilmann C, Hussain M, Peters G, Gotz F. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. Mol Microbiol 1997; 24:1013–1024.
36. Mack D, Nedelmann M, Krokotsch A, Schwarkkopf A, Heesemann J, Laufs R. Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesion. Infect Immun 1994; 62:3244-53.
37. de Silva GD, Kantzanou M, Justice A, Massey RC, Wilkinson AR, Day NP, Peacock SJ. The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. J Clin Microbiol 2002;40(2):382-8.
38. Vasudevan P, Nair MKM, Annamalai T, Venkitanarayanan KS. Phenotypic and genotipic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. Vet Microbiol 2003; 92(1-2):179-85.
39. Hennig S,NyuntWai SN, Ziebuhr W. Spontaneous switch to PIA-independent biofilm formation in an ica-positive *Staphylococcus epidermidis* isolate. Int J Med Microbiol 2007; 297(2):117-22.
40. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 1999;284(5418):1318-22.
41. Wilson M. Bacterial biofilms and human disease. Sci Prog 2001;84(Pt 3):235-54.
42. Fredheim EGA, Klingenberg C, Rohde H, Frankenberger S, Gaustad P, Flægstad T et al. Biofilm Formation by *Staphylococcus haemolyticus.* J Clin Microbiol 2009.; 47(4): 1172–80.
43. Toledo-Arana A, Merino N, Vergara-Irigaray M, Debarbouille M, Penades JR, Lasa I. *Staphylococcus aureus* develops an alternative, *ica*-independent biofilm in the absence of the *arlRS* two-component system. J Bacteriol 2005; 187: 5318–5329.

44. Sadovskaya I, Vinogradov E, Flahaut S, Kogan G, Jabbouri S. Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A. Infect Immun 2005; 73:3007–3017.
45. Qin Z, Yang X, Yang L, Jiang J, Ou Y, Molin S, Qu D. Formation and properties of in vitro biofilms of *ica*-negative *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. J Med Microbiol 2007; 56:83–93.
46. Frank KL, Patel. Poly-*N*-acetylglucosamine is not a major component of the extracellular matrix in biofilms formed by *icaADBC*-positive *Staphylococcus lugdunensis* isolates. Infect Immun 2007; 75:4728–4742.
47. Fitzpatrick F, Humphreys H, O'Gara JP. Evidence for *icaADBC*-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. J Clin Microbiol 2005; 43:1973–1976.
48. Bergdoll MS, Surgalla MJ, Dack GM. Staphylococcal enterotoxin: identifi cation of a specific precipitating antibody with enterotoxin neutralizing property. J Immunol 1959;83:334–8.
49. Hennekinne JA, De Buyser ML, Dragacci S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. FEMS Microbiol Rev 2012; 36: 815–836.
50. Ortega, E, Abriouel H, Lucas R, Gálvez A. Multiple roles of *Staphylococcus aureus* enterotoxins: pathogenicity, superantigenic activity, and correlation to antibiotic resistance. Toxins 2010; 2: 2117–2131.
51. Thomas DY, Chou S, Dauwalder O, Lina G. Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Chem Immunol Allergy 2007; 93, 24–41.
52. Wilson GJ, Seo KS, Cartwright RA, Connelley T, Chuang-Smith ON, Merriman JA, et al. A novel core genome-encoded superantigen contributes to lethality of community-associated MRSA necrotizing pneumonia. PLoS Pathogens 2011; 7:e1002271.
53. Lisa RW. *Staphylococcus aureus* exfoliative toxins: How they cause disease. Derm Foundat 2004; 122: 1070-7.
54. Omoe K, Hu DL, Omoe HT, Nakane A, Shinagawa K. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. Infect Immun 2003; 71:6088–94.
55. Schmidt H, Hensel M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. Clin Microbiol Rev 2004; 17: 14-56.
56. Holtfreter S, Bauer K, Thomas D, Feig C, Lorenz V, Roschack K et al. *egc*-encoded superantigens from *Staphylococcus aureus* are neutralized by human sera much less efficiently than are classical staphylococcal enterotoxins or toxic shock syndrome toxin. Infect Immun 2004; 72: 4061- 71.
57. Bergdoll MS, Crass BA, Reiser RF, Robbins RN, Davis JP. A new staphylococcus enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic shock syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. Lancet 1981;1:1017-21.

58. Huy YH. Foodborne disease handbook: diseases caused by bacteria. New York: Marcel Dekker; 1994. p. 493
59. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert P M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev 2000; 13: 16-34.
60. Cunha MLRS, Rugolo, LM, Lopes CA. Study of virulence factors in coagulase negative staphylococci isolated from newborns. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; 101: 661–668.
61. Cunha MLRS, Calsolari RA, Júnior 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.
62. Barretti P, Montelli AC, Batalha JE, Caramori JC, Cunha MLRS. The role of virulence factors in the outcome of staphylococcal peritonitis in CAPD patients. BMC Infect Dis 2009; 9, 212.
63. Vasconcelos NG, Pereira VC, Araújo Júnior JP, Cunha MLRS. Molecular detection of enterotoxins E, G, H and I in Staphylococcus aureus and coagulasenegative staphylococci isolated from clinical samples of newborns in Brazil. J App Microbiol 2011; 111:749–762.
64. Freer JH, Arbuthnott JP. Toxins of *Staphylococcus aureus*. Pharmacol Ther 1983; 19:55–106.
65. Harshman S, Boquet P, Duflot E, Alouf JE, Montecucco C, Papini E. Staphylococcal -toxin: a study of membrane penetration and pore formation. J Biol Chem 1989; 264:14978–84.
66. Gray GS, Kehoe M. Primary sequence of the α-toxin gene from *Staphylococcus aureus.* Infect Immun 1984; 46:615–8.
67. Projan SJ, Kornblum J, Kreiswirth B, Moghazeh SL, Eisner W, Novick RP. Nucleotide sequence: the β-hemolysin gene of *Staphylococcus aureus*. Nucleic Acids Res 1989; 17:3305.
68. Scheifele DW, Bjornson Gl. Delta toxin activity in coagulase-negative staphylococci from the bowels of neonates. J Cli Microbiol 1988; 26:279–82.
69. Rogolsky M. Nonenteric toxins of *Staphylococcus aureus*. Microbiol Rev 1979; 43:320–60.
70. Donvito B, Etienne J, Greenland T, Mouren C, Delorme V, Vandenesh F. Distribution of synergistic haemolysin genes *hld* and *slush* with respect to *agr* in human staphylococci. FEMS Microbiol Lett, 1997, 151: 139-44.
71. Vermont CL, Hartwig NG, Fleer A, Man P, Verbrugh H, Anker J et al. Persistence of clones of coagulase-negative staphylococci among premature neonates in neonatal intensive care units: two center study of bacterial genotyping and patient risk factors. J Clin Microbiol 1998; 36, 2485-90.
72. Hebert GA. Hemolysins and other characteristics that help differentiate and biotype *Staphylococcus lugdunensis* and *Staphylococcus schleiferi*. J Clin Microbiol 1990; 11: 2425–31.
73. Molnar C, Hevessy Z, Rozgonyi F, Gemmell CG. Pathogenicity and virulence of coagulase negative staphylococci in relation to adherence, hydrophobicity and toxin production. J Clin Pathol 1994; 47: 743–8.
74. Bhakdi S. Positive camp-phenomenon elicited by coagulase-negative staphylococci. Med Microbiol Immunol. 1985; 174: 275–9.

75. Hebert GA, Crowder CG, Hancock GA, Jarvis WR, Thornsberry C. Characteristic of coagulase negative staphylococci that help differentiate these species and other members of the family Micrococcaceae. J Clin Microbiol 1988; 10: 1939–49.
76. Hebert GA, Hancock GA. Synergistic hemolysis exhibited by species of staphylococci. J Clin Microbiol 1985; 22: 409–15.
77. Marconi C, Cunha MLRS, Araújo Jr JP, Rugolo LMSS. Standardization of the PCR technique for the detection of delta toxin in *Staphylococcus* spp. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis 2005; 11(2).
78. 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: 111–133.
79. Davis MF, Cain CL, Brazil AM, Rankin SC. Two coagulase-negative staphylococci emerging as potential zoonotic pathogens: wolves in sheep's clothing? Front Microbiol. 2013; 4:123. doi: 10.3389/fmicb.2013.00123.
80. Even S, Leroy S, Charlier C, Zakour NB, Chacornac JP, Lebert I, et al. Le Loir Low occurrence of safety hazards in coagulase negative staphylococci isolated from fermented foodstuffs. Int J Food Microbiol 2010; 139: 87–95.
81. Sabath LD, Barrett FF, Wilcox C, Gerstein DA, Finland M. Methicillin resistance of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis.* Antimicrob Agents Chemother 1968; 8:302-306.
82. Siebert WT, Moreland N, Williams TW Jr. Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis*. South Med J 1978; 71(11): 1353-5.
83. Marshall SA, Wilke WW, Pfaller MA, Jones RN. *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from blood stream infections: frequency of occurrence, antimicrobial susceptibility, and molecular (*mecA*) characterization of oxacillin resistance in the SCOPE program. Diagn Microbiol Infect Dis 1998; 30(3): 205-214.
84. Oliveira ADD, d'Azevedo PA, de Sousa LB, Viana-Niero C, Francisco W, Lottenberg C, Martino MD, Höfling-Lima AL. Laboratory detection methods for methicillin resistance in coagulase negative *Staphylococcus* isolated from ophthalmic infections. Arq Bras Oftalmol 2007; 70(2): 667-675.
85. Ustulin DR, Cunha MLRS. Methods for detection of oxacillin resistance among coagulase-negative staphylococci recovered from patients with bloodstream infections at the university hospital in Brazil. J Virol Microbiol 2012; doi: 10.5171/2012.164822.
86. John MA, Pletch C, Hussain Z. *In vitro* activity of quinupristin/dalfopristin, linezolid, telithromycin and comparator antimicrobial agents against 13 species of coagulase-negative staphylococci. J Antimicrob Chemother 2002; 50: 933–938.
87. Antunes ALS, Secchi C, Reiter KC, Perez LRR, Freitas ALP, d'Azevedo PA. Evaluation of oxacillin and cefoxitin disks for detection of resistance in coagulase negative staphylococci. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007; 102(6), 719-723.

88. Martins A, Riboli DF, Camargo CH, Pereira VC, Sampaio RA, Cunha MRLS. Antimicrobial resistance and persistence of *Staphylococcus epidermidis* clones in a Brazilian university hospital. Diagn Microbiol Infect Dis 2013; 77(2): 164-168.
89. Matsuhashi M, Song MD, Ishino F, Wachi M, Doi M, Inoue M, et al. Molecular cloning of the gene of a penicillin-binding protein supposed to cause high resistance to beta-lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 1986; 167(3): 975–980.
90. Chambers HF. Coagulase-negative staphylococci resistant to f-lactam antibiotics in vivo produce penicillin-binding protein 2a. Antimicrob Agents Chemother 1987; 31: 1919-1924.
91. Pierre J, Williamson R, Bornet M, Gutmann L. Presence of an Additional Penicillin-Binding Protein in MethicillinResistant *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus simulans* with a Low Affinity for Methicillin, Cephalothin, and Cefamandole. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34(9): 1691-1694.
92. Suzuki E,Kuwahara-Arai K, Richardson JF, Hiramatsu K .Distribution of mec Regulator Genes in Methicillin-Resistant *Staphylococcus* Clinical Strains. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37 (6): 1219-1226.
93. Archer GL, Climo MW. Antimicrobial Susceptibility of Coagulase-Negative Staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38(10): 2231-2237.
94. Barbier F, Ruppe E, Hernandez D, Lebeaux D, Francois P, Felix B, et al. Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the community: high homology of SCC*mec* IVa between *Staphylococcus epidermidis* and major clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis 2010, 202:270-281.
95. Tsubakishita S, Kuwahara-Arai K, Sasaki T, Hiramatsu K. Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 2010, 54:4352-4359.
96. Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, Hiramatsu K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 2637–51.
97. Ma X X, Ito T, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chongtrakool P, Boyle-Vavra S et al. Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec identified in community acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46:1147–52.
98. Chongtrakool P, Ito T, Ma XX, Kondo Y, Trakulsomboon S, Tiensasitorn C et al. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCC*mec* elements. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50:1001–12.
99. Oliveira DC, Milheirico C, de Lencastre H. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec* type VI. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50:3457–9.

100. Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, Hiramatsu K. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51:264-74.

101. Zong Z, Peng C, Lü X. Diversity of SCC*mec* Elements in Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci Clinical Isolates. PLoS ONE 2011; 6(5): e20191. doi:10.1371/journal.pone.0020191.

102. Hanssen A, Sollid JUE. SCC*mec* in staphylococci: genes on the move. FEMS Immunol Med Microbiol 2006;46:8–20.

103. Martins A, Cunha MLRS. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects. Microbiol Immunol 2007;51:787–795.

104. Hiramatsu K, Watanabe S, Takeuchi F, Ito T, Baba T. Genetic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Vaccine 2004; 22 (Suppl. 1): S5–S8.

105. Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimito K, Tiensasitorn C, Hiramatsu, K. Structural Comparison of three types of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* integrated in the chromosome in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45:5-1323-36.

106. Robinson DA, Enright MC. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 3926-34.

107. Machado ABMP, Reiter KC, Paiva RM, Barth 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 Medical Microbiol 2007; 56: 1328–1333.

108. Ruppe E, Barbier F, Mesli Y, Maiga A, Cojocaru R, Benkhalfat M, et al**.** Diversity of staphylococcal cassette chromosome *mec* structures in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* strains among outpatients from four countries. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53: 442–9.

109. Cherubin CE, Corrado ML, Sierra MF, Gombert ME, Shulman M. Susceptibility of gram-positive cocci to various antibiotics including cefotaxime, moxalactam, and N-formimidoyl thienamycin. Antimicrob Agents Chemother 1981;20:553-5.

110. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J Antimicrob Chemother 1997; 40:135–6.

111. Froggatt JW, Johnston JL, Galetto DW, Archer GL. Antimicrobial resistance in nosocomial isolates of *Staphylococcus haemolyticus*. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33(4):460-6.

112. Schwalbe RS, Stapleton JT, Gilligan PH. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. N Engl J Med 1987; 316:927–31.

113. Veach LA, Pfaller MA, Barrett M, Koontz FP, Wenzel RP. Vancomycin resistance in *Staphylococcus haemolyticus* causing colonization and bloodstream infection. J Clin Microbiol 1990; 28:2064–8.

114. Stuart JI, John MA, Milburn S, Diagre D, Wilson B, Hussain Z. Susceptibility patterns of coagulase-negative staphylococci to several newer antimicrobial agents in comparison with vancomycin and oxacillin. Int J Antimicrob Agents 2011; 37: 248–252.

115. Del' Alamo L, Cereda RF, Tosin I, Miranda EA, Sader HS. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci and characterization of isolates with reduced susceptibility to glycopeptides. Diagn Microbiol Infect Dis 1999; 34: 185–191.

116. Palazzo ICV, Araujo MLC, Darini ALC. First Report of Vancomycin-Resistant Staphylococci Isolated from Healthy Carriers in Brazil. J Clin Microbiol 2005, 43(1): 179–185.

117. Hanaki H, Kuwahara-Arai K, Boyle-Vavra S, Daum RS, Labischinski H, Hiramatsu K. Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. Antimicrob Chemother 1998; 42: 199–209.

118. Hanaki H, Labischinski H, Inaba Y, Kondo N, Murakami H, Hiramatsu K. Increase in glutamine-non-amidated muropeptides in the peptidoglycan of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain Mu50. J Antimicrob Chemother 1998; 42: 315–20.

119. Fines M, Perichon B, Reynolds P, Sahm DF, Courvalin P. *VanE*, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43(9):2161-4.

120. Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-resistance Enterococci. Clin Microbiol Rev 2000; 13(4):686-707.

121. Mckessar SJ, Berry AM, Bell JM, Turnidge JD, Paton JC. Genetic characterization of *van G*, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44(11):3224-8.

122. Boyd DA, Willey BM, Fawcett D, Gillani N, Mulvey MR. Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06–0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, *vanL*. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 2667–72.

123. Xu X, Lin D, Yan G, Ye X, Wu S, Guo Y. *vanM*, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium.* Antimicrob Agents Chemother 2010; 54(11):4643–7.

124. Lebreton F, Depardieu F, Bourdon N, Fines-Guyon M, Berger P, Camiade S, et al. D-Ala-D-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus* faecium. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55(10):4606-12.

125. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. J Clin Invest 2003; 111: 1265–1273.

126. Noble WC, Virani Z, Cree RG. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett 1992; 72:195-8.

127. Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Frances Pouch Downes, et al. Infection with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Containing the *vanA* Resistance Gene. N Engl J Med 2003;348:1342-7.

128. Okee MS, Joloba ML, Okello M, Najjuka FC, Katabazi FA, Bwanga F, et al. Prevalence of virulence determinants in *Staphylococcus epidermidis* from ICU patients in Kampala, Uganda. J Infect Dev Ctries 2012; 6(3):242-250.

129. Ishihara S, Bitner JJ, Farley GH, Gillock ET. Vancomycin-Resistant Gram-Positive Cocci Isolated from the Saliva of Wild Songbirds. Curr Microbiol 2013; 66:337–343.

130. Fowler VG Jr, Boucher HW, Corey GR, Abrutyn E, Karchmer AW, Rupp ME, et al. Daptomycin versus standard therapy for bacteremia and endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. N Engl J Med 2006; 355(7):653-65.

131. Bongiorno D, Campanile F, Mongelli G, Baldi MT, Provenzani R, Reali S, et al. DNA methylase modifications and other linezolid resistance mutations in coagulase-negative staphylococci in Italy. J Antimicrob Chemother 2010; 65: 2336–2340.

132. Sader HS, Flamm RK, Jones RN. Antimicrobial activity of ceftaroline tested against staphylococci with reduced susceptibility to linezolid, daptomycin, or vancomycin from U.S. hospitals, 2008 to 2011. Antimicrob Agents Chemother 2013; 57(7):3178-81.

133. Manfredi R, Sabbatani S. Novel pharmaceutical molecules against emerging resistant gram-positive cocci. Braz J Infect Dis. 2010; 14:96-108.

134. Gu B, Kelesidis T, Tsiodras S, Hindler J, Humphries RM. The emerging problem of linezolid-resistant *Staphylococcus*. J Antimicrob Chemother 2013; 68(1): 4-11

135. Farrell DJ, Turnidge JD, Bell J, Sader HS, Jones RN. The in vitro evaluation of tigecycline tested against pathogens isolated in eight countries in the Asia-Western Pacific region (2008). J Infect 2010; 60, 440-451.

136. Gales AC, Jones RN, Andrade SS, Pereira AS, Sader HS, et al. In vitro activity of tigecycline, a new glycylcycline, tested against 1,326 clinical bacterial strains isolated from Latin America. Braz J Infect Dis 2005; 9:348–56.

137. Diekema DJ, Jones RN. Oxazolidinone antibiotics. Lancet 2001; 358: 1975–82.

138. Flamm RK, Mendes RE, Ross JE, Sader HS, Jones RN. Linezolid Surveillance Results for the United States: LEADER Surveillance Program 2011. Antimicrob Agents Chemother 2013; 57 (2): 1077–1081

139. Ross JE, Farrell DJ, Mendes RE, Sader HS, Jones RN, et al. Eight-year (2002–2009) summary of the linezolid (Zyvox®). Annual Appraisal of Potency and Spectrum; ZAAPS) program in European countries. J Chemother 2011; 23: 71–6.

140. Sader HS, Jones RN. Antimicrobial susceptibility of Gram-positive bacteria isolated from US medical centers: results of the Daptomycin Surveillance Program (2007–2008). Diagn Microbiol Infect Dis 2009; 65: 158–62.

141. Feil EJ, Cooper JE, Grundmann H, Robinson DA, Enright MC, Berendt T, et al. How clonal is *Staphylococcus aureus*? J Bacteriol 2003; 185(11): 3307–3316.

142. Potoski BP, Adams J, Clarke L, Shutt K, Linden PK, Baxter C, et al. Epidemiological profile of linezolid-resistant coagulase-negative staphylococci. Clin Infect Dis 2006; 43:165–7.

Artigo I

Este artigo foi escrito de acordo com as normas da revista "*Journal of Antimicrobial Chemotherapy*".

Perfil de suscetibilidade à oxacilina, vancomicina e aos novos antimicrobianos em *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus* isolados de hemoculturas em estudo de 12 anos

Luiza Pinheiro[1], Carla Ivo Brito[1], Valéria Cataneli Pereira[1], Adilson de Oliveira[1], Ariane Rocha Bartolomeu[1], Carlos Henrique Camargo[2], Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha[1].

1. Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.
2. Núcleo de Doenças Entéricas e Infecções por Patógenos Especiais, Centro de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

Running-title: Resistência antimicrobiana em *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*

Palavras chave: *Staphylococcus epidermidis*; *Staphylococcus haemolyticus*; vancomicina, oxacilina, novos antimicrobianos.

Autor correspondente: Luiza Pinheiro

e-mail: luizapinheiro@ibb.unesp.br

Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP - Campus de Botucatu

Distrito de Rubião Júnior, s/n

CEP: 18618-970 - Botucatu, SP, Brasil

Tel: (14)3880-0429

Resumo

Objetivos: Este trabalho objetivou avaliar o perfil de susceptibilidade à oxacilina, vancomicina e novos antimicrobianos em *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococus haemolyticus* isolados de hemoculturas em período de 12 anos.

Métodos: Os isolados de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* foram obtidos de hemoculturas de pacientes internados em hospital de ensino. O gene *mecA* foi detectado por PCR em tempo real; a tipagem do SCC*mec* por PCR Multiplex; o MIC de tigeciclina, linezolida, daptomicina e quinupristina/dalfopristina por Etest®, e vancomicina, por Etest® e Microdiluição em Caldo (BMD). Os isolados com MIC ≥ 2 mg/L de vancomicina foram tipados por *Pulsed-Fied Gel Electrophoresis*.

Resultados: A resistência à oxacilina e os tipos de SCC*mec* mais frequentes em *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* foram, respectivamente, 92,9% e III, e 100% e I. Todos os isolados foram sensíveis a linezolida e daptomicina, mas 7,1% dos *S. haemolyticus* e 2,3% de *S. epidermidis* foram resistentes à tigeciclina, 1,2% de *S. haemolyticus* resistentes à quinupristina/dalfopristina e 1,2% de *S. epidermidis* apresentaram resistência intermediária. *S. epidermidis* demonstrou maiores MICs de vancomicina (40% com MIC ≥ 2 mg/L), e o Etest® apresentou concordância de 88,2% com o BMD. A tipagem clonal revelou clones de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* presentes em períodos de até 4 anos.

Conclusões: As novas drogas testadas apresentaram alta eficácia *in vitro* para as cepas estudadas, apesar de ter sido encontrada alta taxa de resistência à oxacilina e alguns isolados resistentes à tigeciclina e quinupristina/dalfopristina. O Etest® superestimou sutilmente os valores de MIC para vancomicina; e este mostrou eficiência contra os isolados, apesar dos MICs elevados, que podem levar à falha no tratamento. Os clones apresentaram grande diversidade de SCC*mec*, revelando a facilidade com que *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* adquirem elementos genéticos de resistência.

Abstract

Objectives: To evaluate the susceptibility profile of *Staphylococcus epidermidis* and *S. haemolyticus* isolated from blood cultures to oxacillin, vancomycin and new antimicrobial drugs.

Methods: *S. epidermidis* and *S. haemolyticus* isolates were obtained from blood cultures of patients seen at a teaching hospital. The *mecA* gene was detected by real-time PCR and SCC*mec* typing was performed by multiplex PCR. The MICs for tigecycline, linezolid, daptomycin and quinupristin/dalfopristin were determined by the Etest® and vancomycin MICs by the Etest® and broth microdilution (BMD). Isolates exhibiting vancomycin MICs ≥ 2 mg/l were typed by pulsed-field gel electrophoresis.

Results: Oxacillin resistance was 92.9% and 100% in *S. epidermidis* and *S. haemolyticus*, respectively, and the most frequent SCC*mec* types were III and I. All isolates were susceptible to linezolid and daptomycin, but 7.1% of *S. haemolyticus* and 2.3% of *S. epidermidis* isolates were resistant to tigecycline, 1.2% of *S. haemolyticus* were resistant to quinupristin/dalfopristin, and 1.2% of *S. epidermidis* presented intermediate resistance to that drug. *S. epidermidis* exhibited the highest vancomycin MICs (40% with MIC ≥ 2 mg/L). The Etest showed 88.2% agreement with BMD. Clonal typing revealed the presence of *S. epidermidis* clones over a period of up to 4 years.

Conclusions: The new drugs tested showed high *in vitro* efficacy against the strains studied, although a high oxacillin resistant rate was observed and some isolates were resistant to tigecycline and quinupristin/dalfopristin. The Etest subtly overestimated vancomycin MICs. This antibiotic was effective against the isolates despite high MICs that can lead to treatment failure. The clones presented great diversity of SCC*mec*, demonstrating that *S. epidermidis* and *S. haemolyticus* easily acquire resistance-conferring genetic elements.

Introdução

Staphylococcus epidermidis e *Staphylococcus haemolyticus*, principais representantes do grupo de Estafilococos Coagulase-Negativa (ECN), são os micro-organismos mais prevalentes colonizando as narinas humanas[1, 2], e as espécies de ECN mais frequentemente isoladas de materiais clínicos[3]. *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* constituem os principais organismos envolvidos em bacteremias, correspondendo a 30% dos agentes causadores de infecções associadas à corrente sanguínea[4, 5], e são responsáveis por episódios de sepse, principalmente em indivíduos imunocomprometidos e recém-nascidos[6,7,8].

As bacteremias causadas por ECN são relacionadas principalmente às infecções relacionadas a cateteres intravasculares e, em particular, cateteres de uso prolongado, sendo que a taxa de infecções relacionadas a cateteres aumenta em paralelo com a duração de uso[9,10]. A origem das infecções associadas a ECN foi anteriormente considerada endógena [11]. Entretanto, vários estudos durante as últimas décadas têm demonstrado que certos genótipos nosocomiais de ECN estão bem estabelecidos como patógenos oportunistas no ambiente hospitalar [10, 12, 13, 14, 15].

O uso do glicopeptídeo vancomicina em sepses e outras infecções causadas por ECN é amparado por suas altas taxas de carreamento do gene *mecA*, codificante da proteína ligadora de penicilina 2 modificada (PBP2a), que confere resistência aos antibióticos beta-lactâmicos, incluindo à meticilina/oxacilina [16], e que está contido em um elemento genético móvel - SCC*mec* (Cassete Cromossômico Estafilocócico *mec*), considerado um intercâmbio de resistência antimicrobiana entre estafilococos [17]. Entretanto, o uso indiscriminado de vancomicina é objeto de preocupação, já que os ECN foram os primeiros organismos nos quais a resistência adquirida a glicopeptídeos foi reconhecida (MIC de vancomicina ≥8 mg/L) [18]. Os genes *vanA* e *vanB,* que foram primeiramente descritos em enterococos e então em *S. aureus*[19], e que codificam resistência à vancomicina, foram relatados recentemente em cepas de ECN, como *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* [20,21].

Devido ao uso de beta-lactâmicos por longos períodos de tempo, ou de forma intermitente por re-hospitalizações contínuas, os valores do MIC de vancomicina têm aumentado progressivamente nos últimos anos, sendo que um grande número de isolados pode alcançar valores acima de 2 mg/L [22,23,24,25]. Esses valores de MIC, apesar de estarem na faixa de sensibilidade, podem indicar perda de eficácia da vancomicina *in vivo* [26,27,28]. Desse modo, a avaliação dos valores de MIC para vancomicina em ECN é altamente recomendada [29]. As técnicas mais utilizadas para aferição do MIC são a microdiluição em caldo, e as tiras plásticas Etest® (AB Biodisk, Solna, Suécia), sendo que esta última pode apresentar valores superiores àqueles obtidos pela microdiluição em caldo, tanto em *S. aureus*, como ECN [29,30,31].

Haja vista as crescentes taxas de resistência à oxacilina e redução na suscetibilidade à vancomicina, passa a ser necessária a utilização de novas alternativas para o tratamento das infecções estafilocócicas, como a linezolida, tigeciclina, daptomicina e quinupristina/dalfopristina. A linezolida e a tigeciclina, apesar de não terem sido aprovadas para uso em infecções associadas à corrente sanguínea, apresentam alta efetividade contra ECN [32,33,34]. A maior parte das cepas de ECN isoladas de bacteremias é altamente suscetível à daptomicina [35], e quinupristina/dalfopristina apresentam ótima atividade bactericida e um efeito pós-antibiótico prolongado contra cocos gram positivos[36].

Considerando a emergência da resistência antimicrobiana nos estafilococos coagulase-negativa, este estudo objetiva avaliar a resistência à oxacilina, os valores de MIC para linezolida, tigeciclina, daptomicina, quinupristina/dalfopristina, vancomicina e, para esta última, comparar os resultados da microdiluição em caldo e Etest®, em *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus* isolados de hemoculturas.

Materiais e Métodos

Amostras

As amostras foram isoladas de hemoculturas provenientes de pacientes internados no Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu, no período de 2000 a 2011. O isolamento das amostras foi realizado conforme as normas descritas por Koneman et al [37].

Identificação

A identificação do gênero *Staphylococcus* foi realizada conforme as normas descritas por Baker [38] e Koneman et al [37]. A identificação das espécies *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* foi realizada utilizando-se o método simplificado proposto por Cunha et al [39], conforme esquema de provas bioquímicas, o qual estabelece a realização das provas de catalase, coagulase e de testes de utilização de açúcares: xilose, sacarose, trealose, manitol, maltose, e frutose, bem como da caracterização de hemolisinas, redução de nitrato, urease, ornitina descarboxilase, crescimento em anaerobiose e sensibilidade à novobiocina.

Extração do DNA

Para a extração foi utilizado o Kit Illustra (GE healthcare), após digestão inicial das células de estafilococos com lisozima (10 mg/mL) e proteinase K (20 mg/ml).

Identificação genotípica de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*

A confirmação da identificação bioquímica foi realizada genotipicamente utilizando-se primers de sequências conservadas adjacentes aos genes 16S e 23S pela técnica ITS-PCR descrita por Barry et al [40] e Couto et al [41]. Para controle dos resultados, foram utilizadas as seguintes linhagens de referência internacional: *S. epidermidis* (ATCC 12228), *S. epidermidis* (ATCC 35983) e *S. haemolyticus* (ATCC 29970).

Detecção do gene *mecA*

O PCR em tempo real para o gene *mecA* foi executado através do Sistema StepOnePlus® (Life). As reações de PCR foram realizadas de acordo com os parâmetros utilizados por Vandecasteele et al [42]: reações contendo 2 µl de ácido nucléico, 12,5 µl de 2X TaqMan® Fast Advanced Master Mix (PE Applie Biosystems), 900nmol/L de cada primer e 200 nmol/L da sonda, em um volume final de 25 µl. A incubação foi realizada com desnaturação inicial a 50°C por 2 minutos, 20 s a 95 °C, 1 s a 95 °C, e 20 s a 60°C. Os seguintes primers foram utilizados: Fw: TAACATTGATCGCAACGTTCAAT, Rv: GCTTTGGTCTTTCTGCATTCCT, e a sonda: FAM-5' AATGACGCTATGATCCCAATCTAACTTCCACAT Tamra 3' (Vandecasteele et al, 2003). Em todas as reações utilizaram-se linhagens de referência internacional com controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591) e negativo (*S. aureus* ATCC 25923). A figura 1 mostra a curva de amplificação do *mecA*.

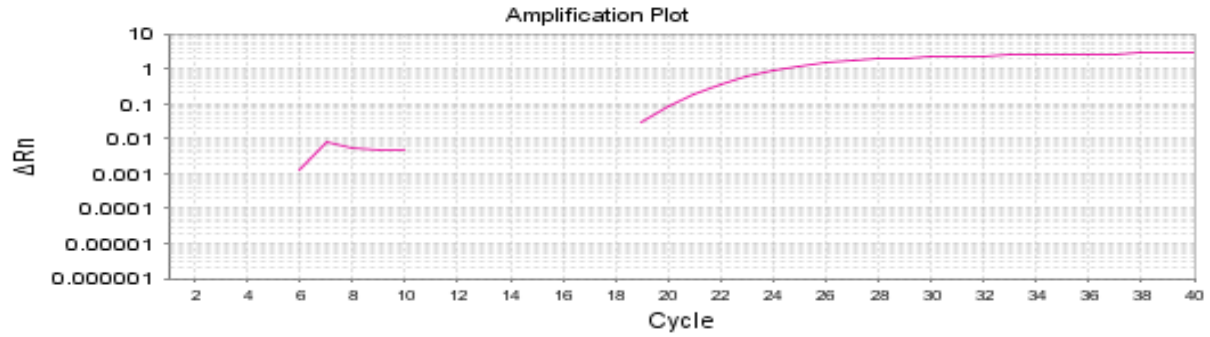


Figura 1. Curva de amplificação para o gene *mecA*.

Determinação do SCC*mec*

A determinação do tipo de *SCCmec* foi realizada utilizando-se PCR-Multiplex de acordo com o protocolo de Machado et al [43], adaptado de Oliveira et al [44]. Foram utilizadas linhagens de referência internacional como controle dos tipos de SCC*mec*: *S. aureus* COL; *S. aureus* N315; *S. aureus* 85/2082; e *S. aureus* JCSC3624.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos antimicrobianos pelo método de Etest®

Para a detecção da Concentração Inibitória Mínima por Etest® utilizaram-se meio de cultura de Müeller-Hinton, inóculo com concentração final semelhante à turvação correspondente a escala 0,5 de McFarland e incubação a 35°C por 24 horas conforme as recomendações do fabricante. Os pontos de corte para classificação dos isolados estão descritos na Tabela 1.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) de vancomicina por Microdiluição em Caldo (BMD)

Para a microdiluição em caldo, foram utilizadas placas de microtitulação estéreis, com caldo Müeller-Hinton ajustado com cátions (Oxoid, 1 U.K.), conforme recomendado pelo CLSI [45] e com as normativas do documento do NCCLS [46]. Uma solução-estoque de vancomicina foi preparada em água destilada na concentração de 3200 mg/L. Em placa de microtitulação, foram feitas diluições seriadas de vancomicina nas concentrações de uma escala logarítmica de 2, compreendendo os *breakpoints*[45] 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 mg/L, em caldo Müeller-Hinton, com um volume final de 100μL. Para o preparo do inóculo as amostras foram inicialmente semeadas em Ágar Sangue e após incubação por 24 h, colônias isoladas foram semeadas em caldo BHI e após incubação uma suspensão bacteriana com turvação correspondente a escala 0,5 de McFarland (1 x 10^8 UFC/mL) foi preparada e diluída em 1:1000, adicionada nos poços com volume final de 200 μL, e concentração final bacteriana de 5 x 10^4 UFC/mL. As placas foram incubadas em estufa a 35°C e a leitura do MIC feita após 24 e 48 horas de incubação. Foram utilizados um controle positivo, contendo o caldo e a suspensão bacteriana, e um controle negativo contendo apenas o caldo Müeller-Hinton. As cepas *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *S. aureus* ATCC 29213, susceptíveis a vancomicina, foram utilizados como controle negativo e *E. faecalis* ATCC 51299, resistente a vancomicina,

foi utilizada como controle positivo. O MIC foi considerado como a menor concentração de antimicrobiano que inibiu completamente o crescimento do micro-organismo, conforme detectado a olho nu: foram classificados com crescimento positivo os poços que apresentaram turvação e/ou presença de bactérias no fundo do poço. Os pontos de corte para classificação dos isolados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Pontos de Corte considerados para classificação de suscetibilidade.

MIC (mg/L)	Sensível	Intermediário	Resistente
Vancomicina *	<4	8-16	>32
Quinupristina/dalfopristina *	≤1	2	≥4
Linezolida*	≤4	-	≥8
Daptomicina*	≤1	-	-
Tigeciclina**	≤0,5	-	-

Legenda: *CLSI[45]; **EUCAST[49].

Detecção dos genes *vanA* e *vanB*

As reações de PCR para a detecção dos genes *vanA* e *vanB* foram realizadas conforme os parâmetros descritos por Clark et al [47].

Análise por PFGE

A tipagem por PFGE foi realizada conforme protocolo modificado de McDougal et al [48]. As amostras foram colocadas em caldo BHI e incubadas em estufa a 37°C por 24h. Em um microtubo, 0,25ml da amostra crescida foi centrifugada a 12.000rpm por 50s. Depois de desprezado o sobrenadante, foi adicionado 150 µl de solução TE (10mM de Tris, 1mM EDTA [pH 8,0]). As amostras foram deixadas em banho-maria por 10min a 37°C. Após vortexar, foram adicionados 2,5 µl de lisostafina (1mg/ml em 20mM de acetato de sódio [pH 4,5]) e 150µl de agarose *low melt*. As amostras foram despejadas nos moldes para plugues até que endurecessem e, então, colocadas em 2ml de solução EC (6mM Tris-HCl, 1M NaCl, 100mM EDTA, 0,5% Brij-58, 0,2% deoxicolato de sódio, 0,5% laurilsarcosil sódico) e incubadas à 37°C por pelo menos 4h. O EC foi retirado e os plugues lavados com 2ml de TE quatro vezes à temperatura ambiente por meia hora. A restrição enzimática foi feita em um quarto do plugue com a enzima

*Sma*I em 50µl de tampão de restrição. Géis de agarose a 1% foram preparados com TBE 0,5X onde os plugues foram colocados e cobertos com agarose *low melt*. A corrida foi feita à 6V/cm e 14°C por 21h. A análise dos resultados foi realizada pelo software Bionumerics 7.1, utilizando-se valores de otimização iguais a 1,0, e tolerância a 1,25.

Análise Estatística

Foi utilizado o teste χ^2 para verificar associações entre variáveis e limite de significância de 0,05.

Resultados

Foram analisados 169 isolados, sendo 85 de *S. epidermidis* e 84 de *S. haemolyticus*. O gene *mecA* foi detectado em 84 (100%) dos *S. haemolyticus*, e 79 (92,9%) dos *S. epidermidis*, os quais foram analisados quanto ao tipo de SCC*mec*. A tabela 2 mostra a distribuição dos tipos de SCC*mec* entre os isolados de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus.*

Tabela 2. Distribuição dos tipos de SCC*mec* encontrados em *S. epidermidis* e *S. haemolyticus.*

SCC*mec*	*S. epidermidis* (%)	*S. haemolyticus* (%)
I	23 (29,1)	27 (32,1)
II	0	22 (26,2)
III	42 (53,2)	13 (15,5)
IV	10 (12,7)	3 (3,6)
Não-tipados	4 (5)	19 (22,6)
Total	79 (100)	84 (100)

Os resultados para valores de MIC obtidos para linezolida, tigeciclina, daptomicina e quinupristina/dalfopristina apresentam-se na tabela 3. Todos os isolados foram classificados como sensíveis para a linezolida e daptomicina. De acordo com os *breakpoints* definidos por EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)* [49] para estafilococos, 6 (7,1%) *S. haemolyticus*, 2 (2,3%) de *S. epidermidis* classificaram-se como resistentes à tigeciclina. Todos esses isolados foram positivos para o gene *mecA*, sendo 1 isolado de *S. haemolyticus* com SCC*mec tipo* II, 2 *S. epidermidis* e 2 *S. haemolyticus* com SCC*mec* tipo III, 2 isolados de *S. epidermidis* com tipo I e 1 *S. haemolyticus* não pôde ser tipado. Um (1,2%) dos isolados de *S. haemolyticus* foi considerado resistente à quinupristina/dalfopristina e um (1,2%) isolado de *S. epidermidis* classificado com resistência intermediária. Ambos se revelaram carreadores do gene *mecA* e SCC*mec* tipo IV.

Tabela 3. Distribuição dos MICs de linezolida, tigeciclina, daptomicina e quinupristina/dalfopristina para todos os isolados de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, segundo a metodologia de Etest®.

Micro-organismos (n° Isolados)	Antibiótico	MIC (mg/L)			Suscetibilidade (%)	
		Variação	MIC50	MIC90	Resistente	Suscetível
S. epidermidis (85)	LIN	0.047-1	0,25	0,5	0	100
	TIG	0.016-0.75	0,094	0,38	2.3**	97.7
	DAP	0.016-0.125	0,094	0,19	0	100
	QN/DF	0.032-1.5	0,19	0,38	1.2*	98.8
S. haemolyticus (84)	LIN	0.047-1.5	0.38	0.75	0	100
	TIG	<0.016-2	0.19	0.5	7.1**	92.9
	DAP	<0.016-0.125	0.047	0.094	0	100
	QN/DF	0.025-4	0.25	0.5	1.2	98.8

*Resistência Intermediária
**Considerados os breakpoints de tigeciclina segundo EUCAST[49].
LIN = Linezolida; TIG= Tigeciclina; DAP = Daptomicina; QN/DF = Quinupristina/Dalfopristina

O Etest® mostrou variações nos MICs de vancomicina de 0,125 a 3 mg/L para ECN. Já a microdiluição em caldo revelou MICs entre 0,125 a 2 mg/L, na leitura após 24 horas de incubação, e variação de 0,125 a 4 mg/L após 48 horas. A tabela 4 e a figura 2 apresentam os valores de MIC de vancomicina obtidos por BMD e Etest®, bem como a comparação dos resultados obtidos pelos métodos. De acordo com Etest® e BMD, respectivamente, 25 (14,8%) e 57 (33,7%) dos isolados mostraram MIC≥ 2 mg/L, sendo 13% (Etest®) e 40% (BMD) dos *S. epidermidis*, e 16,7% (Etest®) e 27,4% (BMD) dos *S. haemolyticus*. A avaliação da concordância da BMD e do Etest® foi definida como a variação de até ±1-log(2) entre os resultados das metodologias e apresentou o valor de 88,2%.

Tabela 4. Variação dos MICs e valores de MIC50 e MIC90 de vancomicina por Etest® e BMD para os isolados de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* (em mg/L).

Organismo	Etest®			BMD 24h			BMD 48h		
	Variação MIC	MIC50	MIC90	Variação MIC	MIC50	MIC90	Variação MIC	MIC50	MIC90
S. epidermidis	0.25-3	1,5	2,0	1-2	1,0	2,0	1-4	2,0	2,0
S. haemolyticus	0.125-3	1,0	2,0	0.25-2	1,0	2,0	0,25-4	1,0	2,0

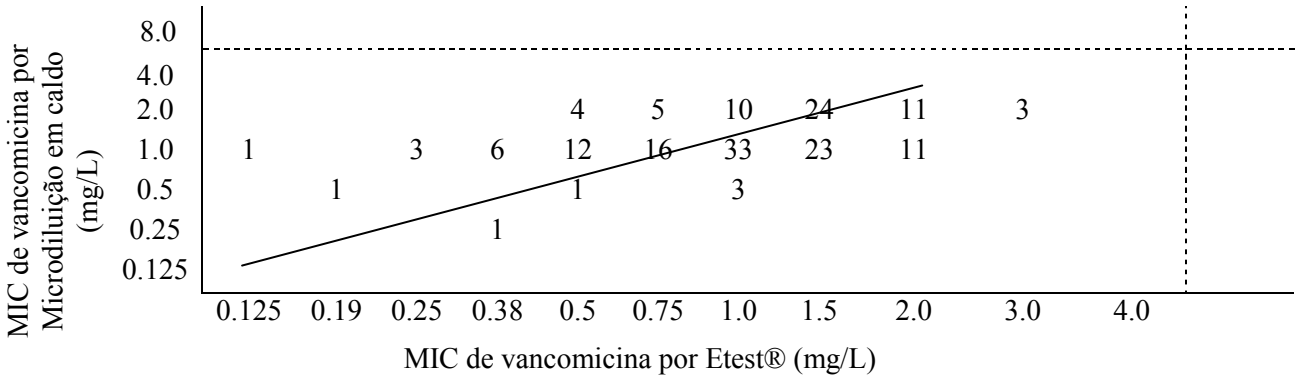


Figura 2. Gráfico de dispersão mostrando a correlação entre os MICs de vancomicina obtidos por BMD e Etest®. Linhas quebradas representam o ponto de corte para susceptibilidade para ECN (CLSI 2013), e a linha sólida indica concordância total entre os resultados dos dois métodos.

A evolução dos valores de MIC de vancomicina nos isolados de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, determinados por Etest®, está representada na Figura 3. A porcentagem de isolados com MICs ≤ 1 mg/L reduziu-se ao longo dos 12 anos, enquanto a taxa de isolados com MIC ≥ 2 mg/L aumentou no período estudado.

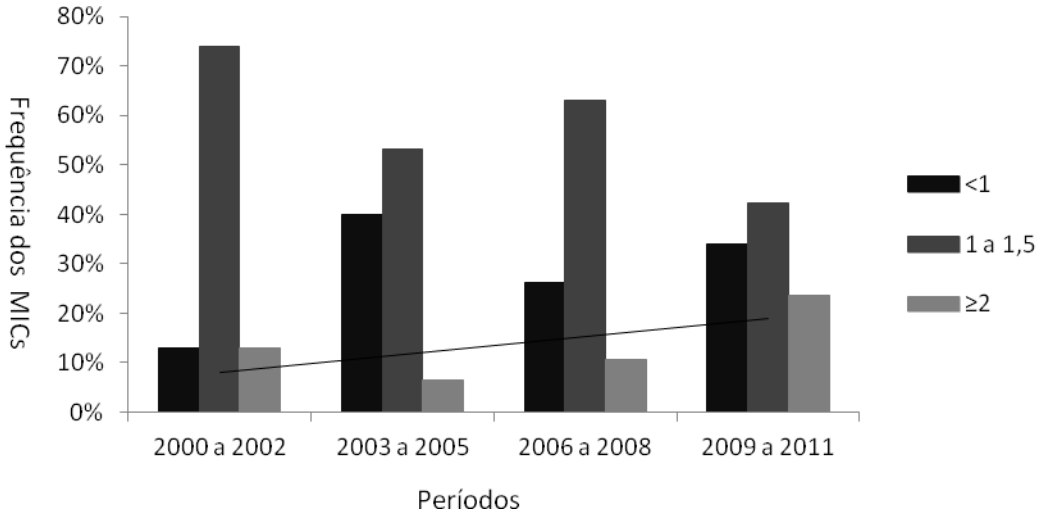


Figura 3. Evolução dos valores de MIC para vancomicina, segundo o Etest®, no período de 2000 a 2011. Os valores de MIC estão em mg/L.

Para verificar associação entre os MICs das drogas e a resistência à oxacilina (*mecA*), e o SCC*mec*, os valores de MIC por Etest® foram divididos em faixas, em mg/L: Vancomicina: 0,125 a 0,38 - 0,5 a 1,0 - 1,5 a 3,0; Linezolida: 0,047 a 0,19 - 0,25 a 0,75 – 1,0 a 1,5; Quinupristina/Dalfopristina: 0,025 a 0,094 – 0,125 a 0,75 – 0,75 a 4,0; Tigeciclina: 0,016 a 0,094 - 0,0125 a 0,5 - 0,75 a 2,0; Daptomicina: 0,016 a 0,032 – 0,047 a 0,094 – 0,125 a 0,25. A análise estatística das faixas de MIC dos antimicrobianos, presença do gene *mecA* e dos tipos de SCC*mec* revelou associação entre maiores MICs de quinupristina/dalfopristina e a presença do gene *mecA* (p=0,01) e entre menores MICs de tigeciclina a SCC*mec* dos tipos I e IV, e maiores MICs aos tipos II e III (p=0,01). Observou-se também que houve associação entre menores MICs de tigeciclina e ausência do *mecA*, sendo que todos os *mecA* negativos apresentavam-se na menor faixa de MIC de tigeciclina (p=0,008).

Todos os isolados que apresentaram MIC de vancomicina ≥ 2 mg/L foram analisados quanto à presença dos genes *vanA* e *vanB*. Nenhum dos isolados se revelou positivo.

As amostras com MIC de vancomicina ≥ 2 mg/L foram analisadas quanto ao seu perfil clonal através de Pulsed Field Gel Eletrophoresis (PFGE). Foram observados 08 clones de *S. epidermidis*, representados na Figura 4, e 06 clones de *S. haemolyticus*, sendo representados na Figura 5. A maior parte dos isolados de *S. epidermidis* com MICs de vancomicina ≥ 2 mg/L possuía SCC*mec* tipos III e I, sendo que os clones mais prevalentes apresentaram estes mesmos tipos. Os clones de *S. haemolyticus* apresentaram maior diversidade de SCC*mec*.

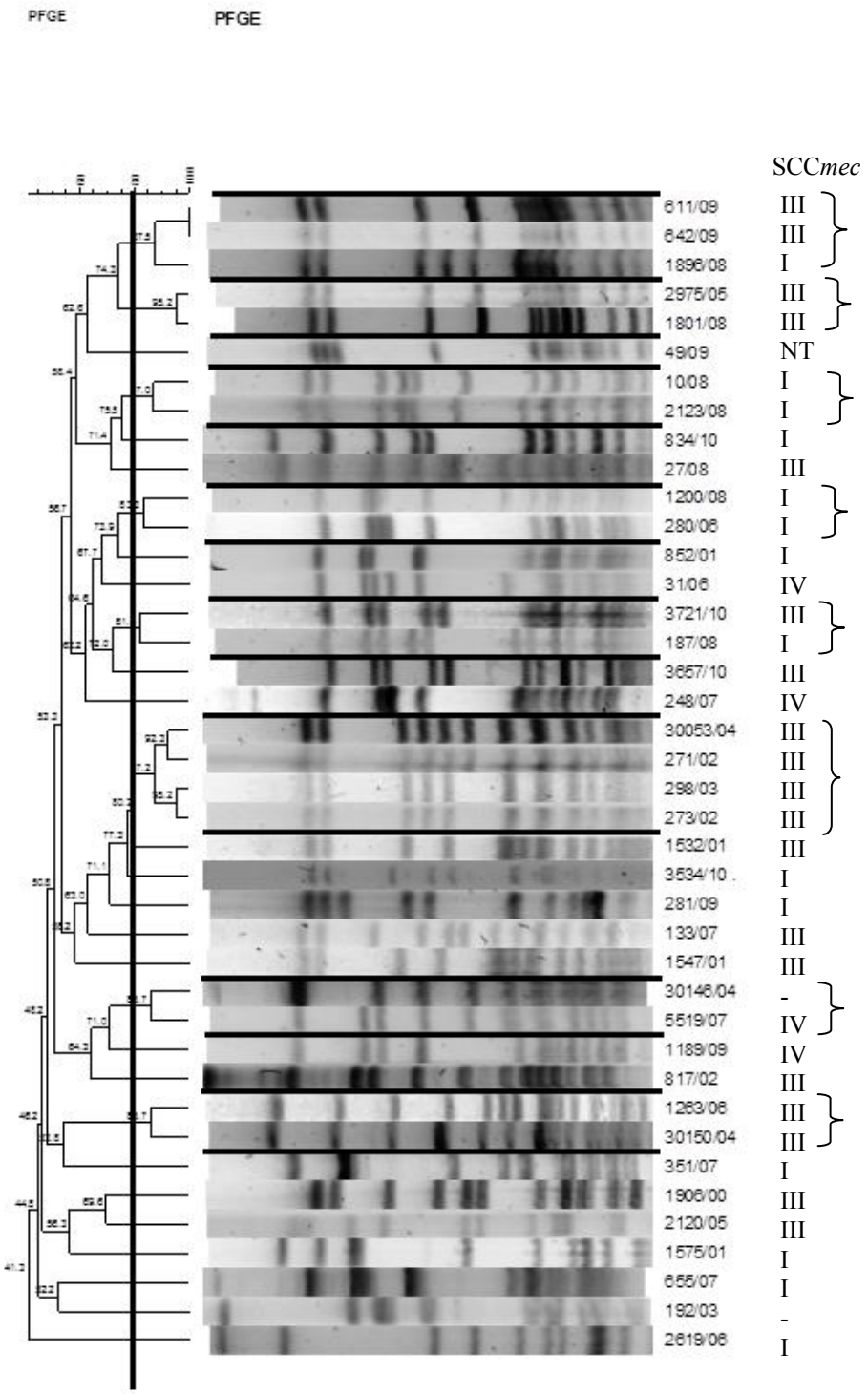


Figura 4. *Pulsed Field Gel Electrophoresis* de *S. epidermidis* com MIC de vancomicina ≥ 2 mg/L e seus tipos de SCC*mec*. As linhas e colchetes separam cepas do mesmo clone – coeficiente de similaridade ≥ 80%.

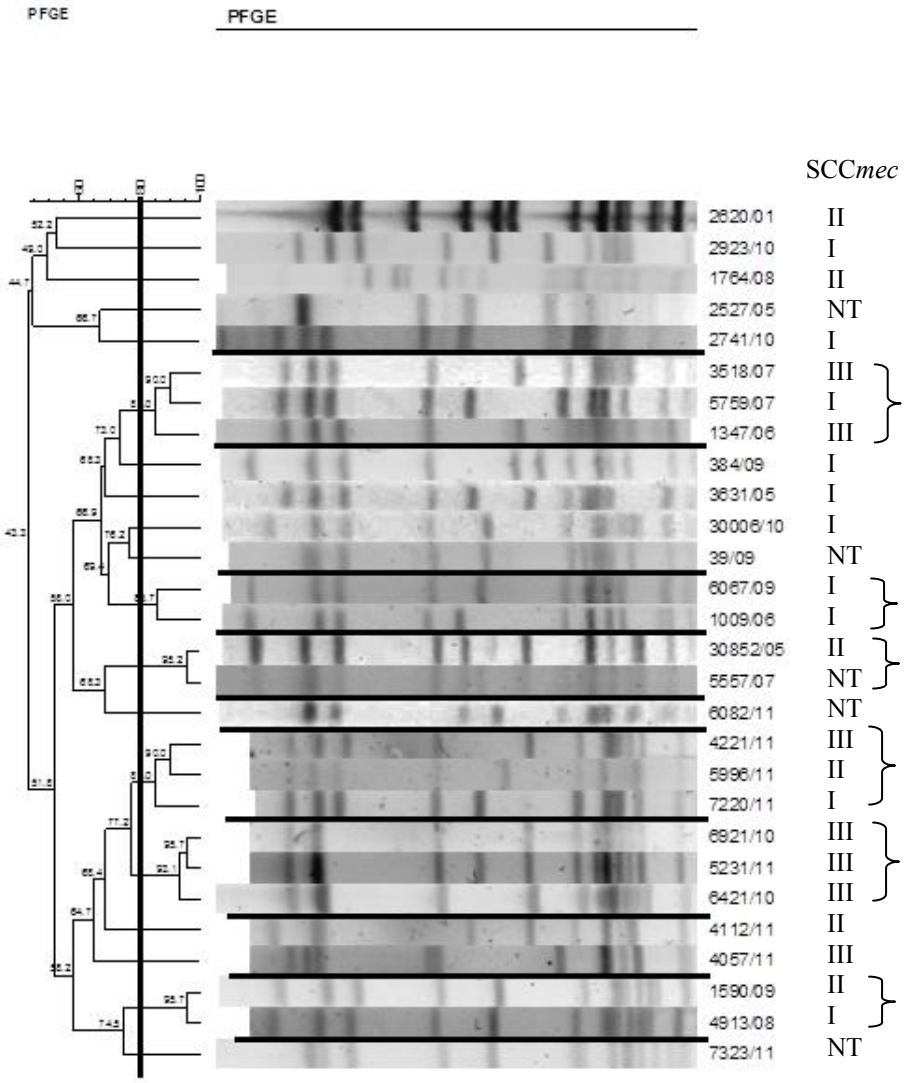


Figura 5. *Pulsed Field Gel Electrophoresis* de *S. haemolyticus* com MIC de vancomicina ≥ 2 mg/L e seus tipos de SCC*mec*. As linhas e colchetes separam cepas do mesmo clone – coeficiente de similaridade ≥ 80%.

Discussão

A resistência aos antimicrobianos em ECN associados a infecções humanas é cada vez mais frequente, principalmente a resistência aos beta-lactâmicos, representados pela oxacilina/meticilina [50,51]. Nas últimas décadas, um aumento em nível mundial no número de ECN com suscetibilidade reduzida à vancomicina também tem sido descrito [52,53], e novos antimicrobianos têm sido desenvolvidos para solucionar o problema da resistência em ECN. Esses antibióticos incluem a linezolida, daptomicina, tigeciclina e quinupristina/dalfopristina. A suscetibilidade de isolados de ECN a esses agentes é geralmente 100% [54,55]. Em estudos de vigilância, as menores porcentagens de suscetibilidade descritas são 98,4% para linezolida [56], 99% para quinupristina/dalfopristina [57] e 99,9% para daptomicina [55].

As altas taxas de resistência à oxacilina em ECN se mostram preocupantes, já que o elemento que contém o gene de resistência, SCC*mec* e *mecA*, parece estar suscetível à transferência entre as espécies de estafilococos [58]. Os resultados do presente estudo revelaram 100% dos isolados de *S. haemolyticus* e 92,9% de *S. epidermidis* resistentes à oxacilina no ambiente hospitalar. Estudos anteriores mostraram grande frequência de resistência a este antimicrobiano, com cerca de 80% de isolados hospitalares resistentes [59,60,61]. Outros trabalhos demonstraram taxas no Brasil variando de 69% em amostras neonatais [62], 75% [63], e 82,5% em isolados clínicos [64]. As diferenças entre os valores do presente trabalho e de anteriores podem ser devidas à maior sensibilidade da PCR em tempo real para detecção do gene *mecA*, em relação à PCR convencional [65], e dos isolados incluírem apenas *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, e não outras espécies de ECN, que comumente apresentam taxas bem menores de resistência à oxacilina [66]. Antunes et al [67], por exemplo, verificando a resistência à oxacilina em espécies de ECN, relataram taxas elevadas, de 94,2% e 94,1% em *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, respectivamente. A resistência à oxacilina em 100% dos *S. haemolyticus* corrobora a descrição de que esta espécie apresenta fenótipo de alta resistência antimicrobiana [68].

A tipagem do SCC*mec* permitiu identificar os tipos I (29,1%), III (53,2%) e IV (12,7%) em *S. epidermidis* e I (32,1%), II (26,2%), III (15,5%) e IV (3,6%) em *S. haemolyticus.* A distribuição dos tipos encontrados foi similar ao observado por Machado et al [43]: para *S. epidermidis*, 28,7% tipo I, 27,6% tipo III, 1,1% tipo IV e 3,4% não tipados; para *S. haemolyticus*, 66,6% tipo I, 26,6% tipo II e 6,6% não tipados. O SCC*mec* tipo II foi encontrado apenas em *S. haemolyticus*, estando ausente em todos os isolados de *S. epidermidis*, dados já observados anteriormente no Brasil[43]. O SCC*mec* tipo II está associado a clones hospitalares de *S. aureus* [69], e em isolados encontrados na interface comunidade e hospital [70]. Estudos futuros são necessários para se entender a alta prevalência do SCC*mec* tipo II em *S. haemolyticus* e sua ausência em isolados de *S. epidermidis* no Brasil.

A presença do SCC*mec* tipo III em ambas as espécies já era esperada, devido ao fato de se tratar de isolados hospitalares [58]. O problema da alta frequência do tipo III se deve ao fato de que altos níveis de resistência à oxacilina ou cefoxitina estão associados à presença deste SCC*mec* em ECN [43,71], deste ser o elemento mais complexo e que codifica mais genes de resistência, como aqueles resistentes a antibióticos não beta-lactâmicos e a metais pesados, podendo assim sofrer seleção no meio com antimicrobianos e prevalecer sobre as cepas sensíveis [72].

A porcentagem de cepas com SCC*mec* não tipado foi mais alta em *S. haemolyticus* (22,6%), o que pode ser explicado pela presença de novas classes de SCC*mec* não tipadas pelo protocolo utilizado nesse estudo. Garza-Gonzalez et al [73] observaram isolados de *S. haemolyticus* com os SCC*mec* II, III e V, e vários que não puderam ter seu SCC*mec* tipado. As espécies de ECN apresentam uma plasticidade genômica, como sugerido para *S. epidermidis* [74,75] e *S. haemolyticus*[76], o que pode facilitar inserções de elementos genéticos diversos no *orfX* e contribuir para a geração frequente de novos elementos SCC. *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* são considerados reservatórios, respectivamente, dos SCC*mec* IV e V [71], o que pode também

explicar que mais de um quinto dos *S. haemolyticus* e apenas 5% dos *S. epidermidis* não foram tipados pelo protocolo, que inclui apenas os tipos I-IV[43]. Estes resultados justificam outros estudos utilizando novas técnicas de tipagem do SCC*mec*.

A tipagem por PFGE demonstrou, entre os clones, grande diversidade dos tipos de SCC*mec*, principalmente nos isolados de *S. haemolyticus*, o que sugere que esses micro-organismos apresentam alta probabilidade de perder e adquirir os elementos SCC*mec* com facilidade [14,77], graças à alta taxa de eventos de recombinação e aquisição genética [78]. De acordo com Miragaia et al [78], cepas com o mesmo tipo de PFGE, subtipo de PFGE, complexo clonal ou *sequence type* (na tipagem MLST- *multilocus sequence typing*) podem carrear diferentes tipos de SCC*mec*, devido à frequente aquisição de SCC*mec* por cepas abrigando o mesmo tipo de PFGE, e à alta taxa de inserção/excisão do SCC*mec* no cromossomo dos ECN [13,79].

A linezolida foi o primeiro antimicrobiano da classe de oxazolidinonas a ser aprovado para tratamento de infecções causadas cocos gram-positivos, incluindo estafilococos resistentes à meticilina (MRS) e com susceptibilidade reduzida à vancomicina [80]. Entretanto, estudos de vigilância recentes evidenciam a resistência à linezolida [34,81,82], variando em taxas de 1 a 2% em ECN. Alguns estudos mostram que o uso frequente de linezolida está associado com a resistência [83,84], e trata-se principalmente de casos de disseminação clonal [85]. A resistência à linezolida pode ocorrer por mutações no sítio de ligação da droga no rRNA 23S, nas proteínas ribossomais L3 ou L4 do centro da translocação do peptídeo ribossomal ou pela aquisição plasmidial do gene *cfr* [86,87], todos já descritos em ECN [88]. Em contrapartida, nossos isolados mostraram-se totalmente sensíveis à linezolida, com MICs variando de 0,047 a 1,5 mg/L. Sensibilidades de 100% à linezolida foram também observadas por Hope et al [53] e Hellmark et al [89], utilizando-se de, respectivamente, diluição em ágar e Etest®, com MICs máximos de 4 e 0,5 mg/L em ECN. Os valores de MIC50 e MIC90 de linezolida revelaram-se ligeiramente superiores em *S. haemolyticus* (respectivamente, 0,38 e 0,75 mg/L*;* em *S. epidermidis*: 0,25 e 0,5 mg/L),

diferentemente do observado por outros autores [51], cujo estudo inferiu os menores valores nessa espécie (1 mg/L) em relação aos outros ECN (2 mg/L). *S. haemolyticus* resistente à linezolida têm sido descrito em casos de surto [90,85]. Apesar disso, a linezolida ainda figura entre os antimicrobianos com a maior eficácia entre os ECN [91], sendo a baixa taxa de resistência a esta droga um bom determinante para seu uso em gram-positivos multirresistentes.

A tigeciclina, por sua vez, é um antimicrobiano utilizado frequentemente para infecções de pele causadas por gram-positivos e gram-negativos, aprovado pelo FDA para tal fim em 2005, e pelo *European Medicines Agency* (EMEA) em 2006. Em ECN apresenta baixa incidência de resistência [92], sendo então considerada uma droga eficaz no tratamento dessas infecções. Os MICs de tigeciclina em *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, no presente estudo, variaram de <0,016 a 2,0 mg/L. Valores ligeiramente menores, de 0,125 a 0,5 mg/L [51], e similares, 0,125 a 2,0 mg/L [93], foram observados por outros trabalhos. Enquanto o CLSI ainda não determinou *breakpoints* para tigeciclina em estafilococos, o EUCAST [49] determina para estafilococos e o FDA (*Food and Drug Administration*) somente para *S. aureus* (*Tygacil package insert [June 2005], Wyeth Pharmaceuticals Inc., Philadelphia, PA*) para sensibilidade valores de MIC ≤ 0,5 mg/L. O FDA ainda aponta que, apesar de em 90% dos isolados serem encontrados MICs menores ou iguais a 0,5 mg/L, a significância clínica e a efetividade deste antimicrobiano são desconhecidas.

No presente estudo, as maiores variações nos MICs de tigeciclina observados foram também em *S. haemolyticus* (<0,016 a 2,0 mg/L), dados consistentes com os descritos recentemente [51]. Um (1,2%) isolado de *S. haemolyticus* demonstrou MIC de 2 mg/L, sendo também portador do gene *mecA* e de MIC 2 mg/L para vancomicina. Vários estudos já relataram cepas de *S. haemolyticus* com MICs superiores a 1 mg/L [51,53,94], e sugeriram uma possível correlação dos MICs altos de tigeciclina com a presença do gene *mecA*, apesar de trabalhos anteriores terem falhado ao demonstrar essa correlação [95]. O presente estudo mostra uma associação entre faixas de MICs elevados de tigeciclina com a resistência à oxacilina (gene

mecA)(p=0,008), sendo que todos os isolados com MIC ≥0,5 mg/L foram portadores do *mecA*, e 65% eram *S. haemolyticus*. Entretanto, devido à alta frequência de resistência à oxacilina neste estudo, torna-se dificultada a interpretação desta associação.

A espécie *S. haemolyticus* é descrita como portadora de uma grande tendência no desenvolvimento de multirresistência a antimicrobianos [96]. Observamos um (1,2%) isolado com resistência à quinupristina/dalfopristina, apesar de alguns estudos revelarem 100% de sensibilidade a este antimicrobiano nesta espécie [97, 98]. A cepa resistente ainda se mostrou portadora do gene *mecA* e do SCC*mec* tipo IV, características que podem permitir sua disseminação no ambiente hospitalar. Esses dados reforçam a importância de *S. haemolyticus* como um patógeno multi-resistente, cujo tratamento com antibióticos convencionais é dificultado [96,99].

Um isolado de *S. epidermidis* se apresentou não susceptível à quinupristina/dalfopristina (MIC = 1,5 mg/L), resultado também encontrado por John et al (2002) [100], que reporta resistência apenas em *S. epidermidis* e *S. hominis*. Apesar disso, a quinupristina/dalfopristina parece apresentar boa eficácia, sendo que o potencial de desenvolvimento de resistência à droga é baixo, já que ela apresenta prolongado efeito pós-antibioticoterapia [101]. Entretanto, vários mecanismos e genes associados à resistência a este antimicrobiano vêm sendo identificados – genes *erm, msr*(A), *vgb*, *vat* e *vga* [102,103,104,105,106].

A daptomicina foi a droga que, entre as verificadas no presente estudo, se mostrou mais eficaz contra *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, e cujos MICs foram os menores entre as outras drogas, muito abaixo do ponto de corte para sensibilidade definido pelo CLSI [45]. Por se tratar de uma droga recentemente aprovada para uso pelo FDA-USA [107] e ainda pouco utilizada no Brasil, a resistência à daptomicina se mantém muito rara nos isolados de ECN [91]. Todavia, alguns estudos têm mostrado ECN com resistência à daptomicina, com MICs maiores que 2 mg/L [55, 108]. Enquanto Picazo et al [109] observaram isolados com MICs ≤ 0,125 mg/L totalizando apenas 12%,

o presente estudo verificou que 85,2% dos isolados de ECN apresentaram MICs ≤ 0,125 mg/L. Assim, apesar de eventuais casos de ECN resistentes, a daptomicina demonstra alta efetividade *in vitro* contra esses micro-organismos.

Os resultados do presente estudo confirmam a eficácia da vancomicina em relação a ECN, cujos MICs estão abaixo do *breakpoint* para sensibilidade (<4 mg/L). Entretanto, a terapia com vancomicina pode ser menos eficaz em infecções causadas por isolados com MICs de vancomicina superiores a 2 mg/L [110, 111, 112, 113]. Considerando que 33,7% dos isolados demonstraram MICs de vancomicina iguais a 2 mg/L, é necessário cautela na indicação deste antimicrobiano nos tratamentos para esses micro-organismos.

Foi possível observar em *S. epidermidis* maiores MICs de vancomicina (40% MIC igual a 2 mg/L), observação também descrita por alguns trabalhos [114, 100], mas diferente do relatado por Paiva et al [29], cujo estudo demonstrou maiores MICs para *S. haemolyticus*, espécie sabidamente menos suscetível a glicopeptídeos [115].

Apesar de ter-se encontrado pelo Etest® 14,8% de isolados com MIC de vancomicina ≥ 2mg/L, e pela BMD 33,7%, essa diferença pode se dever às diferentes escalas utilizadas, já que para a BMD foram utilizadas menos diluições. Assim, os valores de MIC50 e MIC90 para vancomicina revelam que o Etest® superestima sutilmente os MICs em relação ao padrão-ouro, microdiluição em caldo, resultados observados também por outros estudos envolvendo ECN e *S. aureus* [29, 31]. Outro trabalho [116], por sua vez, detectou maiores MICs por Etest® apenas em *S. aureus*, enquanto os ECN apresentaram MICs similares por ambos os métodos. Neste estudo, a concordância entre os dois métodos foi calculada em 88,2%, e essas diferenças podem se dever à diferença de escala utilizada nos dois métodos. Apesar disso, mesmo sendo o Etest® considerado uma alternativa rápida e fácil, é necessária a utilização de métodos de referência na determinação do MIC de vancomicina.

O aumento do MIC de vancomicina observado na leitura de 48 horas da BMD poderia associar-se à presença de subpopulações com MICs de vancomicina aumentados, cuja presença seria detectável com um maior período de incubação [117], já que os valores dos MICs dos controles *S. aureus* ATCC 29213 e *E. faecalis* ATCC 29212 e ATCC 51299 permaneceram iguais durante o mesmo período. Um maior tempo de incubação (48 horas) poderia também permitir a expressão de subpopulações heterorresistentes à vancomicina [118, 119]. Estudos futuros são necessários para elucidar essas questões.

A análise clonal de isolados com MIC de vancomicina ≥ 2 mg/L revelou alguns clones de *S. epidermidis*, incluindo clones importantes, presentes desde o ano de 2001 até 2004, e desde 2005 a 2009, e de *S. haemolyticus*, de 2006 a 2007, e de 2010 a 2011. Apesar de essas espécies serem consideradas comensais e avirulentas [120], alguns clones parecem permanecer no ambiente hospitalar e possuir potencial para causar infecções. Embora não se tenha avaliado se os isolados estavam associados com infecção verdadeira ou contaminação, clones com característica de MICs altos de vancomicina estiveram presentes por longo período de tempo na instituição (2001-2004; 2005-2009; 2006-2007; 2010-2011), o que leva a crer que se trata de cepas selecionadas, com potencial para causar infecções e que de alguma forma podem ser transferidas de um paciente a outro no ambiente hospitalar.

Além disso, verificou-se que os MICs de vancomicina nos isolados de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* apresentaram um aumento no período de 12 anos, resultados também já descritos para *S. aureus*[121], e para resistência à teicoplanina em ECN[122], em períodos de 5 anos. Tais observações caracterizam uma tendência de redução de suscetibilidade a este antimicrobiano no ambiente hospitalar, possivelmente devido ao uso indiscriminado de vancomicina, que selecionou cepas com MICs reduzidos e que possibilita a disseminação de clones menos suscetíveis.

Conclusões

Apesar da alta taxa de resistência à oxacilina e prevalência dos SCC*mec* tipos III e I, *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* isolados de hemoculturas no período de 12 anos permanecem altamente sensíveis aos novos antimicrobianos, linezolida, tigeciclina, daptomicina e quinupristina/dalfopristina e à vancomicina, apesar de alguns clones com MICs elevados de vancomicina parecerem estar disseminados no ambiente hospitalar.

Agradecimentos

Agradecemos o Prof. Dr. Antonio Carlos Pignatari, do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (UNIFESP), pelo fornecimento das cepas *S. faecalis* ATCC 51299 e *S. faecalis* ATCC 29213.

Suporte Financeiro

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Processo FAPESP n° 2011/15396-1.

Conflitos de Interesse

Nada a declarar.

Referências

1 Becker K, Pagnier I, Schuhen B *et al*. Does nasal cocolonization by methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains occur frequently enough to represent a risk of false-positive methicillin-resistant *S. aureus* determinations by molecular methods? *J Clin Microbiol* 2006; **44**:229-231.

2 Costa SF,Miceli MH, Anaissie EJ. Mucosa or skin as source of coagulase-negative staphylococcal bacteraemia? *Lancet Infect Dis* 2004; **4**:278-286.

3 Piette A, Verschraegen G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. *Vet Microbiol* 2009; **134**: 45–54.

4 Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM *et al*. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004; **39**(3):309–317

5 Widerström M, Wiström J, Sjöstedt A *et al*. Coagulase-negative staphylococci: update on the molecular epidemiology and clinical presentation, with a focus on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; **31**:7–20.

6 Heikens E, Fleer A, Paauw A et al. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 2005; **43**(5): 2286-90.

7 Kloos WE, Bannerman TL. Update on clinical Significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 1994; **7**: 117-40.

8 Marchant EA, Boyce GK, Sadarangani M *et al*. Neonatal Sepsis due to Coagulase-Negative Staphylococci. Clin Dev Immunol 2013, Article ID 586076, 10 pages, 2013. http://dx.doi.org/10.1155/2013/586076 (acesso em 22 dez 2013).

9 Mermel LA, Allon M, Bouza E et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009; **49** (1):1–45.

10 Widerström M, Monsen T, Karlsson C *et al*. Clonality among multidrug-resistant hospital associated *Staphylococcus epidermidis* in northern Europe. *Scand J Infect* Dis 2009; **41**(9):642–649

11 Kernodle DS, Barg NL, Kaiser AB. Low-level colonization of hospitalized patients with methicillin-resistant coagulasenegative staphylococci and emergence of the organisms during surgical antimicrobial prophylaxis. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; **32**(2):202–208

12 Schoenfelder SM, Lange C, Eckart M *et al*. Success through diversity—how *Staphylococcus epidermidis* establishes as a nosocomial pathogen. *Int J Med Microbiol* 2010; **300**(6):380–386

13 Miragaia M, Thomas JC, Couto I *et al*. Inferring a population structure for *Staphylococcus epidermidis* from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol* 2007; **189**(6):2540–2552

14 Kozitskaya S, Olson ME, Fey PD *et al*. Clonal analysis of *Staphylococcus epidermidis* isolates carrying or lacking biofilm-mediating genes by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 2005; **43**(9):4751–4757

15 Li M, Wang X, Gao Q *et al*. Molecular characterization of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from a teaching hospital in Shanghai, China. *J Med Microbiol* 2009; **58**(Pt 4):456–461

16 Fleer A, Hemels MAC, Paauw A *et al*. Reduced expression of PBP-2A by neonatal *mecA*-positive coagulase-negative staphylococci (CoNS) blood isolates: β-lactams are useful first-line agents for the treatment of neonatal CoNS sepsis, restricting the use of vancomycin. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67** (7): 1616-1618.

17 Ito T, Ma XX, Takeuchi F *et al*. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 2637–51.

18 Biavasco F, Vignaroli C, Varaldo PE. Glycopeptide resistance in coagulase-negative staphylococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; **19**: 403–17.

19 Chang S, Sievert DM, Hageman JC *et al*. Infection with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Containing the *vanA* Resistance Gene. *N Engl J Med* 2003; **348**:1342-7.

20 Ishihara S, Bitner JJ, Farley GH *et al*. Vancomycin-Resistant Gram-Positive Cocci Isolated from the Saliva of Wild Songbirds. *Curr Microbiol* 2013; **66**:337–343.

21 Okee MS, Joloba ML, Okello M *et al*. Prevalence of virulence determinants in *Staphylococcus epidermidis* from ICU patients in Kampala, Uganda. *J Infect Dev Ctries* 2012; **6**(3):242-250.

22 Natoli S, Fontana C, Favaro M. Characterization of coagulase-negative staphylococcal isolates from blood with reduced susceptibility to glycopeptides and therapeutic options. *BMC Infectious Diseases* 2009, **9**:83. doi:10.1186/1471-2334-9-83

23 Nunes AP, Schuenck RP, Bastos CC *et al*. Heterogeneous resistance to vancomycin and teicoplanin among *Staphylococcus* spp. isolated from bacteremia. *Braz J Infect Dis* 2007; **11**(3):345-50.

24 Srinivasan A, Dick JD, Perl TM.Vancomycin resistance in staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 2002; **15**(3):430-8.

25 Tacconelli E, Tumbarello M, Donati KG *et al*. Glycopeptide resistance among coagulase-negative staphylococci that cause bacteremia: epidemiological and clinical findings from a case-control study. *Clin Infect Dis* 2001; **33**:1628-1635.

26 Soriano A, Marco F, Martínez JA *et al*. Influence of vancomycin minimum inhibitory concentration on the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis* 2008; **46**(2):193-200.

27 Lodise TP, Graves J, Evans A *et al*. Relationship between vancomycin MIC and failure among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia treated with vancomycin. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(9): 3315–3320.

28 Olivares MF, Orozco RH, Garrido SR *et al*. Activity of vancomycin, teicoplanin and linezolid in methicillin resistant coagulase-negative Staphylococci isolates from paediatric blood cultures. *Rev Esp Quimioter* 2012; **25**(1):25-30.

29 Paiva RM, Machado ABMP, Zavascki AP *et al*. Vancomycin MIC for methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* isolates: evaluation of the broth microdilution and Etest methods. *J Clin Microbiol* 2010; **48**: 4652-4654.

30 Prakash V, Lewis II JS, Jorgensen JH. Vancomycin MICs for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates differ based upon the susceptibility test method used. Antimicrob Agents Chemother 2008; **52:**4528.

31 Sader HS, Rhomberg PR, Jones RN. Nine-hospital study comparing broth microdilution and Etest method results for vancomycin and daptomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53:**3162–3165.

32 Manfredi R, Sabbatani S. Novel pharmaceutical molecules against emerging resistant gram-positive cocci. *Braz J Infect Dis* 2010; **14**:96-108.

33 Gu B, Kelesidis T, Tsiodras S *et al*. The emerging problem of linezolid-resistant *Staphylococcus*. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**(1): 4-11

34 Flamm RK, Mendes RE, Ross JE *et al*. Linezolid Surveillance Results for the United States: LEADER Surveillance Program 2011. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**(2): 1077–1081.

35 Fowler Jr VG, Boucher HW, Corey GR *et al*. Daptomycin *versus* standard therapy for bacteremia and endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med* 2006; **355**:653-65.

36 Tünger A, Aydemir S, Uluer S, Cilli F. In vitro activity of linezolid & quinupristin/dalfopristin against Gram-positive cocci. *Indian J Med Res* 2004; **120**(6):546-52.

37 Koneman EW, Allen SD, Janda WM *et al*. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott, 1997.

38 Baker JS. Comparison of various methods for differentiation of staphylococci and micrococci. *J Clin Microbiol* 1984; **9**:875-9.

39 Cunha MLRS, Sinzato YK, Silveira LVA. Comparision of methods for identification of Coagulase-negative Staphylococci. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; **99**:855-60.

40 Barry T, Colleran G, Glennon M *et al*. The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods Appl* 1991; **1**:51-56.

41 Couto I, Pereira S, Miragaia M *et al*. Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by Internal Transcribed Spacer PCR. *J Clin Microbiol* 2001; **39**:3099–103.

42 Vandecasteele SJ, Peetermans WE, Merckx R *et al*. Expression of Biofilm-Associated Genes and In Vivo Foreign Body Infections. *J Infect Dis* 2003; **188**:730–7

43 Machado AB, Reiter KC, Paiva RM *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 Microbiol* 2007; **56**: 1328–1333.

44 Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**:2155-61.

45 Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Approved Standard M100-S23.* CLSI, Wayne, PA, USA, 2013.

46 National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically—Sixth Edition: Approved Standard M7-A6*. NCCLS, Wayne, PA, USA, 2003.

47 Clark NC, Cooksey RC, Hill BC *et al*. Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from U.S. hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; **37**:2311-7.

48 McDougal LK, Steward CD, Killgore GE *et al*. 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.

49 The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters*. Version 3.1, 2013. http://www.eucast.org.

50 Hussain Z, Stoakes L, Massey V *et al*. Correlation of oxacillin MIC with *mecA* gene carriage in coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 752–4.

51 Stuart I, John MA, Milburn S *et al*. Susceptibility patterns of coagulase-negative staphylococci to several newer antimicrobial agents in comparison with vancomycin and oxacillin. International *J Antimicrob Agents* 2011; **37**: 248–252.

52 Garrett DO, Jochimsen E, Murfitt K *et al*. The emergence of decreased susceptibility to vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999; **20:**167–170.

53 Hope R, Livermore DM, Brick G *et al*. Non-susceptibility trends among staphylococci from bacteraemias in the UK and Ireland, 2001-06. J Antimicrob Chemother 2008; **62:**65–74.

54 Garrison MW, Neumiller JJ, Setter SM. Tigecycline: an investigational glycylcycline antimicrobial with activity against resistant gram-positive organisms. *Clin Ther* 2005; **27**:12–22.

55 Sader HS, Watters AA, Fritsche TR, Jones RN. Daptomycin antimicrobial activity tested against methicillin-resistant staphylococci and vancomycin-resistant enterococci isolated in European medical centers (2005). *BMC Infect Dis* 2007; **7**(29). doi:10.1186/1471-2334-7-29

56 Jones RN, Fritsche TR, Sader HS *et al*. LEADER surveillance program results for 2006: an activity and spectrum analysis of linezolid using clinical isolates from the United States (50 medical centers). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; **59**: 309–317.

57 Jones RN, Fritsche TR, Sader HS *et al*. Zyvox® annual appraisal of potency and spectrum program results for 2006: an activity and spectrum analysis of linezolid using clinical isolates from 16 countries. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; **59**: 199–209.

58 Otto M. Coagulase-negative staphylococci as reservoirs of genes facilitating MRSA infection Staphylococcal commensal species such as *Staphylococcus epidermidis* are being recognized as important sources of genes promoting MRSA colonization and virulence. *Bioessays* 2012; **35**: 4–11.

59 Huebner J, Goldmann DA. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annu Rev Med* 1999; **50**: 223–236.

60 Koziol-Montewka M, Szczepanik A, Baranowicz I *et al*. The investigation of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci nasal carriage among patients undergoing haemodialysis. *Microbiol Res* 2006; **161**: 281–287.

61 Mattos EM, Teixeira LA, Alves VM *et al*. Isolation of methicillin-resistant coagulasenegative staphylococci from patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) and comparison of different molecular techniques for discriminating isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; **45**: 13–22.

62 Pereira VC, Cunha MLRS. Coagulase-negative staphylococci strains resistant to oxacillin isolated from neonatal blood cultures. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013; **108**(7):939-42.

63 Martins A, Riboli DF, Camargo CH *et al*. Antimicrobial resistance and persistence of *Staphylococcus epidermidis* clones in a Brazilian university hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; **77**(2): 164-168.

64 Ustulin DR, Cunha MLRS. Methods for detection of oxacillin resistance among coagulase-negative staphylococci recovered from patients with bloodstream infections at the university hospital in Brazil. *J Virol Microbiol* 2012; doi: 10.5171/2012.164822.

65 Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM *et al*. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 2006; **19**:165-256.

66 Arciola CR, Campoccia D, An YH et al. Prevalence and antibiotic resistance of 15 minor staphylococcal species colonizing orthopedic implants. *Int J Artif Organs* 2006; **29**:395–401.

67 Antunes ALS, Secchi C, Reiter K *et al*. Evaluation of oxacillin and cefoxitin disks for detection of resistance in coagulase negative staphylococci. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; **102**(6), 719-723.

68 Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, *et al*. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. *Clin Infect Dis* 2001; **32** Suppl 2: 114–32.

69 Echániz-Aviles G, Velázquez-Meza ME, Aires-de-Sousa M, *et al*. Molecular characterisation of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone in a Mexican hospital (1999–2003). *Clin Microbiol Infection* 2006; **12**: 22–28.

70 Bonesso MF. Determinação da virulência e da resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp. isolados de pacientes do serviço de dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. [Dissertação de Mestrado]. Botucatu; 2011.

71 Ruppé E, Barbier F, Mesli Y *et al*. Diversity of staphylococcal cassette chromosome *mec* structures in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* strains among outpatients from four countries. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 442–449.

72 Robinson DA, Enright MC. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 3926-34.

73 Garza-González E, Morfín-Otero R, Llaca-Díaz JM, Rodriguez-Noriega E. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC *mec*) in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci. A review and the experience in a tertiary-care setting. *Epidemiol Infect* 2010; **138**(5):645-54.

74 Zhang YQ, Ren SX, Li HL, *et al*. Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). *Mol Microbiol* 2003;**49**:1577-1593.

75 Gill SR, Fouts DE, Archer GL, *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**:2426-2438.

76 Takeuchi F, Watanabe S, Baba T, *et al*. 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**:7292-7308.

77 Hanssen AM, Kjeldsen G, Sollid JU. Local variants of staphylococcal cassette chromosome *mec* in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin- resistant coagulase-negative staphylococci: evidence of horizontal gene transfer? *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 285–296.

78 Miragaia M, Carriço JA, Thomas JC, Couto I, Enright MC, Lencastre H. Comparison of Molecular Typing Methods for Characterization of *Staphylococcus epidermidis*: Proposal for Clone Definition. *J Clin Microbiol* 2008; **46**(1): 118–129.

79 Miragaia M, Couto I, Lencastre H. Genetic diversity among methicillin-resistant*Staphylococcus epidermidis* (MRSE). *Microb Drug Resist* 2005; **11**(2): 83-93.

80 Farrell DJ, Mendes RE, Ross JE *et al*. Linezolid surveillance program results for 2008 (LEADER Program for 2008). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; **65**:392–403.

81 Farrell DJ, Mendes RE, Ross JE *et al*. LEADER Program Results for 2009: an Activity and Spectrum Analysis of Linezolid Using 6,414 Clinical Isolates from 56 Medical Centers in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**(8): 3684–3690.

82 Ross JE, Farrell DJ,Mendes RE *et al*. Eight-year (2002-2009) Summary of the linezolida (Zyvox ® Annual Appraisal of potency and Spectrum; ZAApS) program in european countries. *J Chemother* 2011; **23**(2):71-76.

83 Kelly S, Collins J, Maguire M *et al*. An outbreak of colonization with linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in an intensive therapy unit. *J Antimicrob Chemother* 2008; **61**: 901–907.

84 Potoski BA, Adams J, Clarke L *et al*. Epidemiological profile of linezolid-resistant coagulase-negative staphylococci. *Clin Infect Dis* 2006; **43**: 165–171.

85 Rodríguez-Aranda A, Daskalaki M, Villar J *et al*. Nosocomial spread of linezolid-resistant *Staphylococcus haemolyticus* infections in an intensive care unit. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; **63**(4): 398–402.

86 Zhu W, Tenover FC, Limor J *et al*. Use of pyrosequencing to identify point mutations in domain V of 23S rRNA genes of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; **26**: 161–5.

87 Meka VG, Pillai SK, Sakoulas G *et al*. Linezolid resistance in sequential *Staphylococcus aureus* isolates associated with a T2500A mutation in the 23S rRNA gene and loss of a single copy of rRNA. *J Infect Dis* 2004; **190**: 311–7.

88 Long KS, Vester B. Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 603–12.

89 Hellmark, Unemo M, Nilsdotter-Augustinsson A, *et al*. In vitro antimicrobial synergy testing of coagulase-negative staphylococci isolated from prosthetic joint infections using Etest and with a focus on rifampicin and linezolida B. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; **29**:591–595.

90 Mazzariol A, Cascio GL, Kocsis E, *et al*. Outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus haemolyticus* in an Italian intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; **31**:523–527.

91 Gales AC, Sader HS, Ribeiro J *et al*. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in brazilian hospitals participating in the SENTRY Program (2005-2008). *Braz J Infect Dis* 2009; **13**(2):90-98.

92 Farrell DJ, Sader H, Putnam SD *et al*. Multicenter evaluation of tigecycline activity in Latin America: Report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Int J Infect Dis* 2010; **14**: e344-e345.

93 Sader HS, Jones RN. Antimicrobial activity of daptomycin in comparison to glycopeptides and other antimicrobials when tested against numerous species of coagulase-negative *Staphylococcus. Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; **73**: 212–214.

94 Kresken M, Leitner E, Brauers J *et al*.Susceptibility of common aerobic pathogens to tigecycline: results of a surveillance study in Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; **28**: 83–90.

95 Gales AC, Sader HS, Fritsche TR. Tigecycline activity tested against 11808 bacterial pathogens recently collected from US medical centers. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; **60**: 421–7.

96 Froggatt JW, Johnston JL, Galetto DW *et al*. Antimicrobial resistance in nosocomial isolates of *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; **33:**460-466.

97 Chaudhury A, Kumar A G. *In vitro* activity of antimicrobial agents against oxacillin resistant staphylococci with special reference to *Staphylococcus haemolyticus*. *Indian J Med Microbiol* 2007; **25**:50-2.

98 Campanile F, Bongiorno D, Borbone S *et al*.*In vitro* activity of daptomycin against methicillin- and multi-resistant *Staphylococcus haemolyticus* invasive isolates carrying different *mec* complexes . *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; **61**(2): 227–231.

99 Billot-Klein D, Gutmann L, Bryant D *et al*. Peptidoglycan synthesis and structure in *Staphylococcus haemolyticus* expressing increasing levels of resistance to glycopeptide antibiotics. *J Bacteriol* 1996; **178:** 4696-4703.

100 John MA, Pletch C, Hussain Z. In vitro activity of quinupristin/dalfopristin, linezolid, telithromycin and comparator antimicrobial agents against 13 species of coagulase-negative staphylococci. *J Antimicrob Chemother* 2002; **50**(6):933-8.

101 Vannuffel P, Cocito C. Mechanism of action of streptogramins and macrolides. *Drugs* 1996; **51** Suppl 1: 20–30.

102 Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis* 2002; **34**: 482–92.

103 Allignet J, el Solh N. Characterization of a new staphylococcal gene, *vgaB*, encoding a putative ABC transporter conferring resistance to streptogramin A and related compounds. *Gene* 1997; **202**: 133–8

104 Hershberger E, Donabedian S, Konstantinou K *et al*. Quinupristindalfopristin resistance in gram-positive bacteria: mechanism of resistance and epidemiology. *Clin Infect Dis* 2004; **38**: 92–8.

105 Reynolds E, Ross JI, Cove JH. msr(A) and related macrolide/ streptogramin resistance determinants: incomplete transporters? *Int J Antimicrob Agents* 2003; **22**: 228–36.

106 Mukhtar TA, Koteva KP, Hughes DW *et al*. Vgb from Staphylococcus aureus inactivates streptogramin B antibiotics by an elimination mechanism not hydrolysis. *Biochemistry* 2001; **40**: 8877–86.

107 Fowler VG Jr, Boucher HW, Corey GR *et al*. Daptomycin versus standard therapy for bacteremia and endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med* 2006; **355**(7):653-65.

108 Rodríguez-Avial I, Culebras E, Betriu C, *et al*. In vitro activity of tedizolid (TR-700) against linezolid-resistant staphylococci. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**:167–169.

109 Picazo JJ, Betriu C, Culebras E *et al*. Activity of daptomycin against staphylococci collected from bloodstream infections in Spanish medical centers. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; **64**(4): 448–451.

110 Wootton M, Walsh TR, MacGowan AP. Evidence for reduction in breakpoints used to determine vancomycin susceptibility in Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 3982–3.

111 Tenover FC, Moellering RC Jr. The rationale for revising the Clinical and Laboratory Standards Institute vancomycin minimal inhibitory concentration interpretive criteria for *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2007; **44**: 1208–15.

112 Moise-Broder PA, Sakoulas G, Forrest A *et al*. Vancomycin in vitro bactericidal activity and its relationship to efficacy in clearance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **42**: 2398–402.

113 Gould IM. The problem with glycopeptides. *Int J Antimicrob Agents* 2007; **30**: 1–3.

114 Kratzer C, Rabitsch W, Hirschl AM, *et al*. In vitro activity of daptomycin and tigecycline against coagulase-negative *staphylococcus* blood isolates from bone marrow transplant recipients. *Eur J Haematol* 2007; **79**:405–409.

115 Bannerman TL, Peacock SJ. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, ed. *Manual of clinical microbiology*, 9th ed. Washington: ASM Press, 2007; 390–411.

116 Picazo JJ, Betriu C, Rodríguez-Avial I, *et al*. Comparative activities of daptomycin and several agents against staphylococcal blood isolates. Glycopeptide tolerance**.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;**70**(3): 373–379.

117 Wong SSY, Ho PL, *et al*. Bacteremia caused by staphylococci with inducible vancomycin heteroresistance. *Clin Infect Dis* 1999; **29**(4):760-767.

118 Moreira B, Boyle-Vavra S, de Jonge BL *et al*. Increased production of penicillin-binding protein 2, increased detection of other penicillin-binding proteins, and decreased coagulase activity associated with glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; **41**:1788–1793.

119 Srinivasan A, Dick JD, Perl TM. Vancomycin Resistance in Staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 2002; **15**(3): 430–438.

120 Ziebuhr W, Hennig S, Eckart M *et al*. Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. *Int J Antimicrob Agents* 2006; **28** Suppl 1: 14–20.

121 Wang G, Hindler JF, Ward KW *et al*. Increased vancomycin MICs for *Staphylococcus aureus* clinical isolates from a university hospital during a 5-year period. *J Clin Microbiol* 2006; **44**(11): 3883-3886.

122 Ma XX, Wang EH, Liu Y *et al*. Antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci (CoNS): emergence of teicoplanin non-susceptible CoNS strains with inducible resistance to vancomycin. *J Med Microbiol* 2011; **60**: 1661-1668.

Artigo II

Este artigo foi escrito de acordo com as normas da revista "BMC Microbiology"

Staphylococcus epidermidis e *Staphylococcus haemolyticus*: pesquisa genotípica e fenotípica de hemolisinas, biofilme e genes de enterotoxinas em isolados de hemoculturas de pacientes de um hospital universitário brasileiro

Luiza Pinheiro[1], Carla Ivo Brito[1], Adilson de Oliveira[1], Patrícia Yoshida Faccioli Martins[1], Valéria Cataneli Pereira[1], Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha[1].

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

E-mail dos autores:
LP: luizapinheiro@ibb.unesp.br
CIB: carlaivobrito@hotmail.com
AO: adilsonoliveiralp@ig.com.br
PYFM: patríciayf@yahoo.com.br
VCP: valeriacataneli@gmail.com
MLRSC: cunhamlr@ibb.unesp.br

Autor correspondente: luizapinheiro@ibb.unesp.br

Resumo

Introdução: Os estafilococos coagulase-negativa, representados por *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, foram por muito tempo considerados organismos avirulentos. Entretanto, sabe-se atualmente que o biofilme consiste em um dos seus principais fatores de virulência e, nas últimas décadas, as enterotoxinas e hemolisinas vêm emergindo como importantes moléculas envolvidas na patogênese de suas infecções. Objetivou-se caracterizar isolados de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* provenientes de hemoculturas quanto à presença de genes de enterotoxinas e hemolisinas, bem como a produção de biofilme e a presença dos genes *ica* e *bhp*.

Resultados: Dos 85 *S. epidermidis* estudados, 95,3% possuía pelo menos um gene de enterotoxina e para os 84 *S. haemolyticus*, esse valor foi de 79,8%. Os genes de enterotoxinas mais frequentes foram *sea* (53,3%), *seg* (64,5%) e *sei* (67,5%). O gene *seg* se associou positivamente a *S. epidermidis* (p=0,02), sendo que esta espécie demonstrou ser mais enterotoxigênica do que *S. haemolyticus*. O gene da hemolisina alfa (*hla)* foi detectado em 92,9% e 91,7% dos isolados de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, respectivamente*, hlb* (hemolisina beta) em 92,9% e *hld* (hemolisina delta) em 95,3% dos *S. epidermidis*. A produção de hemolisina beta foi detectada em 81% dos *S. haemolyticus* e a delta em 40,5%. A produção de biofilme pelo teste do tubo de borossilicato e teste da placa de poliestireno foi observada, respectivamente, em 28,4% e 27,8% do total de isolados de ECN, com alta concordância entre os testes. Os genes *icaA* e *icaD* foram detectados em, respectivamente, 78,8% e 50,6% de *S. epidermidis*, e 45,2% e 84,5% dos *S. haemolyticus*. A presença concomitante dos genes *icaAD* foi observada em 46,7% dos ECN e associou-se aos testes do tubo e placa. O gene *bhp* foi encontrado apenas nos isolados de *S. epidermidis* (15,3%). O gene *hld* foi detectado em todos os biofilme-positivos.

Conclusões: *S. epidermidis* revelou ser melhor produtor de biofilme, o que parece estar associado à maior frequência de *icaA*. Os mecanismos responsáveis pela formação de biofilme

de *S. haemolyticus* parecem ser diferentes dos determinantes de *S. epidermidis,* e o gene *hld* mostrou estar associado à formação do biofilme. *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* presentes no ambiente hospitalar demonstraram grande potencial toxigênico e, portanto, devem ser levados em conta como importantes agentes de infecção, cujo controle se torna necessário.

Palavras-chave: *Staphylococcus epidermidis; Staphylococcus haemolyticus*; enterotoxinas; hemolisina; biofilme; *ica.*

Abstract

Introduction: Coagulase-negative staphylococci (CoNS), including *S. epidermidis* and *S. haemolyticus*, have long been regarded as avirulent organisms. However, it is now known that the biofilm formation is one of their main virulence factors. In addition, enterotoxins and hemolysins have emerged over recent decades as important molecules involved in the pathogenesis of infections caused by these microorganisms. The objective of this study was to characterize *S. epidermidis* and *S. haemolyticus* isolates obtained from blood cultures regarding the presence of enterotoxin and hemolysin genes, biofilm formation, and the presence of the *ica* and *bhp* genes.

Results: The presence of at least one enterotoxin gene was observed in 95.3% of 85 *S. epidermidis* isolates studied and in 79.8% of 84 *S. haemolyticus* isolates. The most frequent enterotoxin genes were *sea* (53.3%), *seg* (64.5%), and *sei* (67.5%). The *seg* gene was positively associated with *S. epidermidis* (p=0.02), and this species was more enterotoxigenic than *S. haemolyticus*. The alpha-hemolysin gene (*hla*) was detected in 92.9% and 91.7% of *S. epidermidis* and *S. haemolyticus* isolates, respectively; *hlb* (beta-hemolysin) was detected in 92.9% of *S. epidermidis* and *hld* (delta-hemolysin) in 95.3%. The production of beta- and delta-hemolysin was observed in 81% and 40.5%. of *S. haemolyticus* isolates, respectively. Biofilm formation by the tube and plate tests was positive in 28.4% and 27.8% of all CoNS isolates, respectively, with high agreement between tests. The *icaA* and *icaD* genes were detected in 78.8% and 50.6% of *S. epidermidis* isolates, respectively, and in 45.2% and 84.5% of *S. haemolyticus*. The concomitant presence of the *icaAD* genes was observed in 46.7% of CoNS and was associated with the results of the tube and plates tests. The *bhp* gene was only detected in *S. epidermidis* isolates (15.3%). The *hld* gene was detected in all biofilm-positive isolates.

Conclusions: *S. epidermidis* was a better biofilm producer, a finding that seems to be related to the higher frequency of the *icaA* gene. The mechanisms responsible for biofilm

formation in *S. haemolyticus* seem to differ from the determinants of *S. epidermidis* and the *hld* gene was found to be associated with biofilm formation. *S. epidermidis* and *S. haemolyticus* found in the hospital environment exhibited a high toxigenic potential and should therefore be considered important infectious agents that require adequate control measures.

Introdução

Os estafilococos coagulase-negativa (ECN), representados principalmente por *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus*, têm sido bem estabelecidos como importantes patógenos nosocomiais, associados a infecções em dispositivos médicos invasivos [1]. A produção de biofilme por ECN é descrita como um dos fatores mais importantes na patogênese dessas infecções [2]. A formação deste permite a aderência e a persistência bacteriana em materiais e superfícies estranhos ao organismo, e as bactérias organizadas no biofilme estão protegidas da ação de antimicrobianos e do sistema imune do hospedeiro [3,4].

As etapas de formação do biofilme em *S. epidermidis* envolvem a fase de aderência, na qual proteínas ligadoras como autolisina e adesinas AtlE e Aae, Fbe/Sdrg, Embp e a lipase GehD têm importantes papéis [4], e a fase de acumulação, na qual o polissacarídeo intercelular de adesão (PIA), codificado pelo lócus *icaADBC* locus, consiste no seu maior componente [4,5,6]. Nas cepas que não possuem o lócus *icaADBC*, a formação do biofilme é mediada pela proteína associada à acumulação (Aap) ou pela proteína associada ao biofilme (Bap) e sua homóloga, Bhp, encontrada em *S. epidermidis* [7]. As semelhanças e diferenças entre o biofilme produzido por *S. haemolyticus* e por *S. epidermidis*, entretanto, permanecem não esclarecidas.

Importantes fatores de virulência, as enterotoxinas, primeiramente descritas em *S. aureus*, foram identificadas em ECN em alguns estudos [8,9,10], inclusive em ECN associados a infecções [11,12]. As enterotoxinas são consideradas superantígenos, associados com a ativação induzida de morte celular das células de defesa [13] e com a produção de citocinas pró-inflamatórias, responsáveis pelo início rápido de febre alta, perda de capilaridade e disfunção orgânica, sendo que a magnitude e a rapidez de surgimento das citocinas liberadas determinam a severidade e o desfecho [14].

O papel das hemolisinas, relevantes moléculas envolvidas na patogênese de *S. aureus*, ainda é pouco elucidado nas infecções por ECN, principalmente a atuação das hemolisinas alfa e

beta. A hemolisina ou toxina alfa possui efeitos hemolíticos, dermonecróticos e neurotóxicos [15], enquanto a hemolisina beta possui atividade de fosforilase, e apresenta alta afinidade pelas membranas plasmáticas de vários tipos celulares, [16], causando instabilidade na membrana plasmática [17].

Já a hemolisina delta causa lise em uma variedade de células de mamíferos, além de eritrócitos, e estruturas intracelulares, tais como organelas com envoltório celular [15]. Sabe-se que seu gene codificante, *hld*, está presente no RNAIII do locus *agr*, que regula o sistema de *quorum sensing* estafilocócico [18], mas seu papel específico no desenvolvimento das infecções estafilocócicas ainda não está claramente estabelecido [19]. Em *S. aureus*, a hemolisina delta é um polipeptídeo formado por 44 aminoácidos, enquanto em *S. epidermidis*, é composta de 26 aminoácidos [20].

A presença de genes codificantes de hemolisinas e sua produção são pouco descritas em ECN [21], apesar de *hla* e *hld*, correspondentes às hemolisinas alfa e delta, parecerem estar presentes em *S. epidermidis* [22], e as outras espécies de ECN, principalmente *S. haemolyticus*, demonstrarem hemólise moderada ou fraca em hemácias humanas, bovinas, e em sangue de carneiro ou coelho [23].

Este trabalho objetivou caracterizar isolados de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* isolados de hemoculturas, quanto à presença dos genes codificadores de enterotoxinas, hemolisinas e do biofilme, além de verificar a produção deste último, fenotipicamente.

Materiais e Métodos

Amostras

As amostras foram isoladas de hemoculturas provenientes de pacientes internados no Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu, no período de 2000 a 2011. O isolamento das amostras foi realizado conforme as normas descritas por Koneman et al [24].

Identificação

A identificação do gênero *Staphylococcus* foi realizada conforme as normas descritas por Baker [25] e Koneman et al [24]. A identificação das espécies *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* foi realizada utilizando-se o método simplificado proposto por Cunha et al [26], conforme esquema de provas bioquímicas, o qual estabelece a realização das provas de catalase, coagulase e de testes de utilização de açúcares: xilose, sacarose, trealose, manitol, maltose, e frutose, bem como da caracterização de hemolisinas, redução de nitrato, urease, ornitina descarboxilase, crescimento em anaerobiose e sensibilidade à novobiocina.

Extração do DNA

Para a extração foi utilizado o Kit Illustra (GE healthcare), que consiste na digestão das células de estafilococos com lisozima (10 mg/mL) e proteinase K (20 mg/ml).

Identificação genotípica de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*

A confirmação da identificação bioquímica foi realizada genotipicamente utilizando-se primers de sequências conservadas adjacentes aos genes 16S e 23S pela técnica ITS-PCR descrita por Barry et al [27] e Couto et al [28]. Para controle dos resultados, foram utilizadas as seguintes linhagens de referência internacional: *S. epidermidis* (ATCC 12228), *S. epidermidis* (ATCC 35983) e *S. haemolyticus* (ATCC 29970).

Detecção de genes de enterotoxinas por PCR

As reações de PCR para a detecção dos genes das enterotoxinas foram realizadas conforme os parâmetros descritos por Johnson et al [29] e Cunha et al [11]. Os *primers* utilizados estão descritos na Tabela 1. Linhagens de *S. aureus* toxigênicas de referência internacional foram utilizadas como controle positivo, incluindo ATCC 13565 (EEA), ATCC 14458 (EEB), ATCC 19095 (EEC), ATCC 23235 (EED), ATCC 27664 (EEE), ATCC 51811 (EEH), FRI 361 (EEG e EEI). Para controle negativo foi utilizada a amostra *S. xylosus* ATCC 29971. A sequência dos primers está descrita na Tabela 1.

Detecção dos genes de hemolisinas por PCR

O gene que codifica a hemolisina delta, *hld*, foi detectado conforme parâmetros e primers descritos por Marconi et al [30].

A presença do gene *hla* em *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* foi detectada pelos primers desenhados através do PrimerBlast com as sequências das cepas *S. epidermidis* W23144 [GenBank:ACJC01000124.1] (hla_epid) e *S. haemolyticus* JCSC1435 [NCBI: NC_007168.1] (hla_haem). Os primers para o gene *hlb* em *S. epidermidis* foram desenhados no PrimerBlast com a sequência da cepa *S. epidermidis* RP62A [NCBI:NC_002976.3] (hlb_epid). Não foi possível desenhar primers específicos de *hlb* para *S. haemolyticus*, já que não esse gene não é descrito em *S. haemolyticus* no banco de dados GenBank – NCBI. As reações de PCR incluíram 2,0 U de Taq polimerase, PCR Buffer 1x contendo 0,75 mM de MgCl2, 100 µM de desoxiribonucleotídeos trifosfatados e 150 ng de ácido nucléico 1M dos primers. As reações foram realizadas em termociclador apropriado, consistindo em uma etapa a 94°C por 4 minutos; 35 ciclos de 94° a 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min; e 72°C por 5 min para *hla*, enquanto para *hlb*, as etapas incluíram 94°C por 4 minutos; 35 ciclos de 94° a 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 1,5 min; e 72°C por 6 min. Os controles de referência utilizados foram para hla_epid:

S. epidermidis ATCC 12228; hla_haem: *S. haemolyticus* ATCC 29970; hlb_epid: *S. epidermidis* ATCC 12228. A sequência dos primers está descrita na Tabela 1.

Produção fenotípica de hemolisinas beta e delta

A presença de hemólise beta e delta nos isolados de *S. haemolyticus* foi verificada de acordo com a técnica descrita por Hébert e Hancock [31]. A produção de hemolisina beta foi determinada através de observação de halo com hemólise incompleta em sangue de carneiro com incubação a 37°C em 24 horas e então *overnight* a 4°C [32], e a hemolisina delta foi verificada através de sinergismo com hemolisina beta da cepa padrão *S. aureus* ATCC 25923, realizada por estriamento perpendicular em placa de ágar-sangue preparada com sangue de carneiro e incubada a 37°C em 24 horas, formando-se um halo de hemólise em forma de seta [31].

Detecção dos genes responsáveis pela produção de biofilme *icaA* e *icaD*.

Foi utilizado o protocolo segundo Vandecasteele et al [33] para detecção do gene *icaA* por PCR em tempo real, através do Sistema StepOnePlus® (Life), com reação contendo 2 µl de ácido nucleico, 12,5 µl de 2X TaqMan® Fast Advanced Master Mix (PE Applie Biosystems), 900nmol/L de cada primer e 200 nmol/L da sonda, em um volume total de 25 µl. A incubação foi realizada com desnaturação inicial a 50°C por 2 minutos, 20 s a 95 °C, 1 s a 95 °C, e 20 s a 60°C. Para pesquisa do gene *icaD*, foram utilizados os primers descritos por Tan et al [34], em uma reação contendo 4 µl de DNA, 0,3 µM de cada primer, 10µl de 2X Fast Syber Green® Master Mix, com volume final de 20 µl. Após desnaturação inicial de 95°C por 20 segundos, seguiram 40 ciclos de 95°C por 3 segundos, anelamento e extensão a 60°C por 30 segundos. Após o término do processo de amplificação, a análise da curva de dissociação foi realizada para verificar a especificidade das reações (*icaD* Tm = 69°C ± 2°C) (Figura 1). A sequência dos primers e da sonda TaqMan® está descrita na Tabela 1.

Detecção do gene associado à produção do biofilme *bhp*

As reações para detecção do gene *bhp* foram realizadas de acordo com os parâmetros descritos por Qin et al [35]. Os primers estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Sequências e tamanhos dos produtos amplificados dos primers e da sonda TaqMan® utilizados neste estudo.

Nome	Produto	Sequência	Referência	Tamanho do produto amplificado (pb)
sea-1 *sea-2*	Enterotoxina A	TTGGAAACGGTTAAAACGAA GAACCTTCCCATCAAAAACA	29	120
seb-1 *seb-2*	Enterotoxina B	TCGCATCAAACTGACAAACG GCAGGTACTCTATAAGTGCC	29	478
sec-1 *sec-2*	Enterotoxina C	GACATAAAAGCTAGGAATTT AAATCGGATTAACATTATCC	29	257
sed-1 *sed-2*	Enterotoxina D	CTA GTT TGG TAA TAT CTC CT TAA TGC TAT ATC TTA TAG GG	29	317
see-1 *see-2*	Enterotoxina E	CAAAGAAATGCTTTAAGCAATCTTAGGCCAC CTTACCGCCAAAGCTG	29	170
seg-1 *seg-2*	Enterotoxina G	AATTATGTGAATGCTCAACCCGATC AAACTTATATGGAACAAAAGGTACTAGTTC	36	642
seh-1 *seh-2*	Enterotoxina H	CAATCACATCATATGCGAAAGCAG CATCTACCCAAACATTAGCACC	36	376
sei-1 *sei-2*	Enterotoxina I	CTCAAGGTGATATTGGTGTAGG AAAAAACTTACAGGCAGTCCATCTC	36	576
hla_epid-1 *hla_epid-2*	Hemolisina alfa	TTTCKCCACTTACACCMCC GGAACAGGATCAAAGCCACCT	Este estudo	160
hlb_epid-1 *hlb_epid-2*	Hemolisina beta	TGGTGGCGTTGGTATTGTGA ACCCCAAGATTTCACGGACC	Este estudo	541
hla_haem-1 *hla-haem-2*	Hemolisina alfa	TGGGCCATAAACTTCAATCGC ACGCCACCTACATGCAGATTT	Este estudo	72
hld-epid-1 *hld-epid-2*	Hemolisina delta	ATGGCAGCAGATATCATTTC CGTGAGCTTGGGAGAGAC	30	444
icaA-1 *icaA-2* *icaA_sonda* TaqMan®	IcaA	AAAGATGTAGGTTATTGGGATACTGACA CATAGAGCACGTGGTTCGTACTTAA **FAM-5'**-TGCTGTTTCATGGAAACTCCATCTTTTTGATTA-**3'TAMRA**	33	-
icaD-1 *icaD-2*	IcaD	ATCGTTGTGATGATTGTTTA GATATGTCACGACCTTTCTT	34	-
Bhp-1 *Bhp-2*	Bhp	ATGAAAAATAAACAAGGATTTC GCCTAAGCTAGATAATGTTTG	35	1278

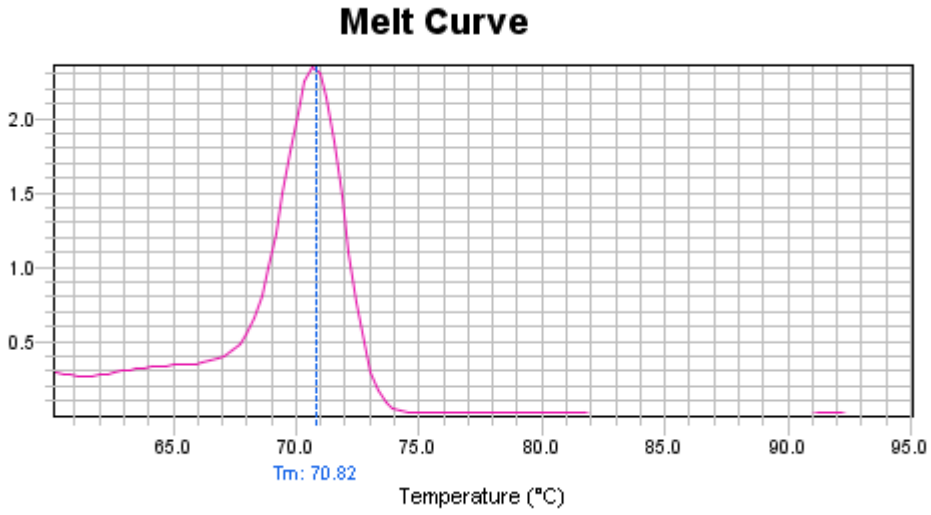


Figura 1. Curva de *melting* do gene *icaD* por PCR em tempo real.

Estudo da produção de biofilme

Pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em tubo de borossilicato

Na pesquisa da produção de biofilme efetuada pelo método de Christensen et al [37], as colônias isoladas de estafilococos coagulase-negativa em ágar sangue foram inoculadas em tubos de 12,0 x 75,0 mm contendo 2,0 ml de caldo Tripticase Soja (TSB - Difco), adicionados a 2% de glicose e incubadas a 37^{o}C por 48h, sem agitação. Posteriormente, o conteúdo foi desprezado e alíquotas de 1,0 ml de solução aquosa a 0,4% de azul de tripan (Sigma) foram adicionadas em cada tubo. Após suave agitação, para garantir a coloração do material aderido à superfície interna dos tubos, o corante foi desprezado. O resultado positivo foi indicado pela presença de uma camada de material corado aderido à parede interna dos tubos. A presença de um anel corado somente na superfície de contato líquido-ar não foi considerada como resultado positivo.

Pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em placa de poliestireno [38] modificado

O método da pesquisa da produção de biofilme em placas de cultura proposto por Christensen et al [38], foi utilizado com algumas modificações. Esta técnica apresenta bases espectrofotométricas, baseando-se na leitura da densidade óptica (DO) do material aderente

produzido pela bactéria. Foram utilizadas culturas em TSB, incubadas por 24 horas e posteriormente diluídas a 1:1 com TSB, preparado com 2% de glicose. Foram utilizadas placas previamente esterilizadas de 96 cavidades com fundo plano (Costar, modelo 3599 fabricado pela *Corning Incorporated*). Os poços foram preenchidos em quaduplicata com 200µl da cultura diluída, utilizando pipeta multicanal. Em todos os testes foram utilizados uma amostra como controle positivo, uma como controle negativo e uma com TSB estéril. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C e posteriormente o conteúdo de cada poço foi aspirado cuidadosamente utilizando-se pipeta multicanal, e então, as placas foram lavadas quatro vezes com 200µl de tampão fosfato salina (PBS), pH 7,2. A secagem da placa foi realizada em temperatura ambiente por 1 hora. A seguir, os poços foram corados com cristal violeta a 2% por um minuto, em seguida, o volume foi aspirado e o excesso de corante retirado através de uma lavagem das placas com água destilada utilizando-se de pipeta multicanal. A seguir, foi feita a secagem das placas em temperatura ambiente por 60 minutos e realizada a leitura da densidade óptica no leitor de Elisa, da marca Labsystem modelo Multiskan EX. O ponto de corte foi calculado de acordo com a fórmula envolvendo a média e o desvio padrão da placa seca (diluição 1:1) [35], com o filtro de 540 nm, resultando no valor de 0,111. As amostras foram classificadas em três categorias: Não aderentes (NA), DO igual ou menor que o ponto de corte (≤0,111); Fracos Aderentes (FA), DO maior que o ponto de corte ou igual ou menor que o dobro desse valor (entre 0,111 e 0,222); Fortes aderentes (FOA), DO maior que o dobro do ponto de corte (≥0,222).

Análise Estatística

Foi utilizado o teste χ^2 para verificar associações entre variáveis, o teste Kappa para verificar concordância entre os métodos e limite de significância de 0,05.

Resultados

Identificação dos Isolados

Foram estudados 169 isolados, 85 *S. epidermidis* e 84 *S. haemolyticus*. De todas as amostras identificadas como *S. epidermidis* pelo ITS-PCR, 98,8% (84) foram identificados como *S. epidermidis* pelo esquema de provas bioquímicas, enquanto 1,2% (1) foram identificados como *S. haemolyticus*. Já entre as amostras identificadas como *S. haemolyticus* pela técnica genotípica, 79,8% (67) demonstraram esquema de provas bioquímicas correspondente a *S. haemolyticus*, 1,2% (1) correspondente a *S. epidermidis*, 8,3% (7) a *S. hominis*, 3,6% (3) a *S. hominis* subsp. *hominis* e 7,1% (6) a *S. warneri*. O valor de concordância Kappa entre o esquema de provas bioquímicas e ITS-PCR foi de 0,787.

Detecção de genes codificantes de enterotoxinas

A figura 2 demonstra a positividade para os genes das enterotoxinas entre os isolados de *S. haemolyticus* e *S. epidermidis*. Este último apresentou maior proporção de isolados positivos para os genes de enterotoxinas, com exceção de *seb* e *seh* (34% e 15%, respectivamente), que estiveram presentes em maior proporção em *S. haemolyticus*. Os genes *sed* e *see* foram os menos frequentes nas amostras estudadas (2% e 3%, respectivamente), enquanto *sei*, *seg* e *sea* foram os que se apresentaram com maior frequência em ambas as espécies. A positividade para o gene *seg* esteve associada a *S. epidermidis* estatisticamente (p=0,02).

Os genes *sea* e *seb* concomitantes foram observados em 20% (34) dos isolados, sendo 17,6% de *S. epidermidis* e 21,4% de *S. haemolyticus*, enquanto os genes *seg* e *sei* estiveram presentes ao mesmo tempo em 52,7% (89) (61,2% dos *S. epidermidis* e 44% dos *S. haemolyticus*). Observou-se ainda que 4,1% (7) dos isolados foram positivos para *sea*, *seb*, *sec*, *seg* e *sei* concomitantemente (6% dos *S. haemolyticus* e 2,4% dos *S. epidermidis*). Foi verificado

que 87,6% (148) possuíam pelo menos um gene enterotoxigênico, compreendendo 95,3% (81) dos *S. epidermidis* e 79,8% (67) dos *S. haemolyticus*.

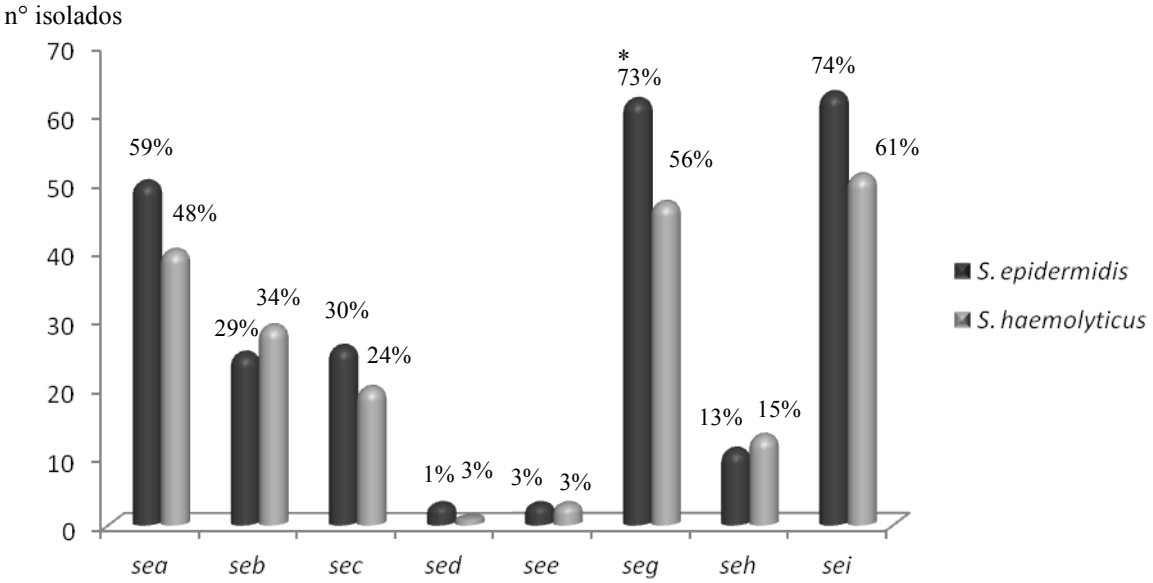


Figura 2. Positividade para os genes das enterotoxinas *sea-sei* nos isolados de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*. *associação positiva com *S. epidermidis*;

Detecção dos genes de hemolisinas e hemólise fenotípica

Os genes das hemolisinas *hla*, *hlb* e *hld* foram pesquisados nos isolados de *S. epidermidis*, através de PCR com primers específicos para essa espécie. Entretanto, em *S. haemolyticus*, somente foi possível realizar a identificação do gene *hla*, já que não há sequências disponíveis dos genes *hlb* e *hld* no banco de dados GenBank. Os primers desenhados nas sequências de *S. epidermidis* não amplificaram qualquer produto nos isolados de *S. haemolyticus* e na cepa padrão *S. haemolyticus* ATCC 29970. Desse modo, foi pesquisada a produção das hemolisinas beta e delta fenotipicamente para *S. haemolyticus*.

A positividade para o gene codificador da hemolisina alfa foi similar entre as espécies de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* (92,9 e 91,7%, respectivamente), e os genes *hlb* (92,9%) e *hld* (95,3%) também se apresentaram de forma muito frequente em *S. epidermidis*. Os genes *hla* e

hlb estiveram presentes de forma concomitante em 89,4% dos *S. epidermidis*. A hemolisina beta foi detectada na maior parte dos *S. haemolyticus* (81%), enquanto a hemolisina delta esteve presente em menos da metade dos isolados (40,5%), e 30,1% dos *S. haemolyticus* produziu hemolisina beta e delta.

Tabela 2. Número e porcentagem de isolados carreando genes de hemolisinas, *hla*, *hlb* e *hld*.

Organismos (n)	***hla***		***hlb***		***hld***		**β-hemólise**		**δ-hemólise**	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
S. epidermidis (85)	79	92,9	79	92,9	81	95,3	-	-	-	-
S. haemolyticus (84)	77	91,7	-	-	-	-	68	81	34	40,5
Total (169)	156	92,3	79	92,9	81	95,3	68	81	34	40,5

Detecção dos genes codificadores do biofilme e produção fenotípica

Os resultados relacionados à produção de biofilme estão descritos na Tabela 3, compreendendo a presença dos genes *icaAD*, sozinhos e concomitantes, do gene *bhp*, e a produção fenotípica de biofilme através dos testes de aderência em placa de poliestireno (Figura 3) e tubo de borossilicato. Os valores do teste de concordância Kappa entre os métodos fenotípicos foram de 0,9854 para todos os isolados, 1,0 para *S. epidermidis* e 0,9639 para *S. haemolyticus*.

A presença concomitante dos genes *icaAD* associou-se positivamente à aderência em placa de poliestireno (p=0,0004) e tubo de borossilicato (p=<0,0001), e essa associação também foi observada para *S. epidermidis* (p=0,0015 para o teste da placa e p= 0,0004), mas não para *S. haemolyticus* separadamente.

Enquanto a maior parte de *S. epidermidis* possuía o gene *icaA* (78,8%), *S. haemolyticus* se apresentou com maior positividade para *icaD* (84,5%). A presença do gene *icaA* isolado foi observada em 28,2 e 2,4% de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, respectivamente, enquanto que para *icaD* essas frequências foram de 0 e 45,7%. O gene *bhp* foi detectado apenas nos isolados

de *S. epidermidis* (15,3%). .Foi possível observar que 94,9% dos *S. haemolyticus* carreando o gene *icaA*, também possuíam o gene *icaD*, enquanto que em todos os isolados de *S. epidermidis* positivos para *icaD*, o gene *icaA* também esteve presente. Verificou-se que 11 dos 84 *S. haemolyticus*, e 18 dos 85 *S. epidermidis* foram negativos para os genes *ica*. Apenas 4 isolados (1 *S. haemolyticus* e 3 *S. epidermidis*) se mostraram produtores de biofilme, mas não possuíam *icaA* ou *icaD*. Ainda, 46 (26 *S. haemolyticus* e 20 *S. epidermidis*) isolados eram positivos para os genes *icaAD* e biofilme-negativos.

Tabela 3. Positividade para os genes *icaAD, bhp* e produção fenotípica do biofilme pelo teste de aderência em placa de poliestireno e em tubo de borossilicato nos isolados de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*.

	Presença dos genes de biofilme								**Produção de biofilme**									
	Genes polissacarídeo						**Gene proteína**		**Teste da placa**						**Teste do tubo**			
Isolados (n)	***icaA****		***icaD*** **		***icaAD***		***bhp***		**FOA**		**FA**		**NA**		**Pos**		**Neg**	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
S. epidermidis (85)	24	28,2	0	0	43	50,6	13	15,3	12	14,1	18	21,2	55	64,7	30	35,3	55	64,7
S. haemolyticus (84)	2	2,4	35	45,7	36	42,9	0	0	1	1,2	16	19	67	79,8	18	21,5	66	78,6
Total (169)	26	13,8	35	20,7	79	46,7	13	7,7	13	7,7	34	20,1	122	72,2	48	28,4	121	71,6

FOA= Forte Aderente
FA = Fraco Aderente
NA = Não Aderente
Pos= Positivo
Neg= Negativo
*icaA** = presença do *icaA* sozinho
*icaD*** = presença do *icaD* sozinho

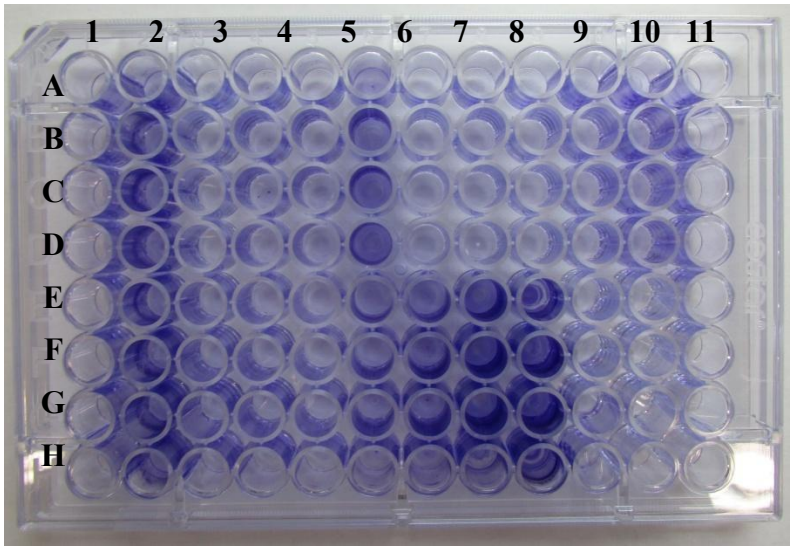


Figura 3. Teste de aderência em placa de poliestireno. 2A-2H; 6A-6H; 7F-7H: Fraco-aderentes. 8E-8H: Forte aderentes. 9E-9H: Controle Positivo. 10E-10H: Controle Negativo. 1A-1H; 3A-3H; 4A-4H; 5A-5H; 7A-7D; 8A-8D; 9A-9D; 10A-10D; 11A-11D; 12A-12D: Não aderentes.

De todos os isolados classificados como FOA (13 – 7,7%), apenas 1 (0,6%) não continha *icaA* nem *icaD* e 1 (0,6%) possuia apenas *icaA* mas era positivo para *bhp*. Foi possível observar que todos os isolados de *S. epidermidis* que produziram o biofilme pelos métodos fenotípicos possuíam o gene *hld*, assim como 88,8% dos *S. haemolyticus* produtores de biofilme continham a hemolisina beta. Além disso, 96,2% dos isolados de ECN positivos para *icaA* possuíam o gene *hla*, e 95,6% dos *icaD* positivos continham *hla*. Dos isolados de *S. haemolyticus* que possuíam o *sea*, 85% foram positivos para *icaD.* Observou-se que todos os isolados de *S. epidermidis* com o gene *sed* apresentaram concomitantemente os genes *sea*, *hla, hlb* e *hld*. Todos os isolados classificados como FOA pelo teste da placa de poliestireno possuíam os genes *hla, hlb* e *hld*.

Discussão

Dentro do grupo de estafilococos coagulase-negativa (ECN), *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* são as espécies mais prevalentes colonizando narinas humanas [39, 40], sendo as mais isoladas de hemoculturas [41] e associadas a infecções oportunistas associadas a cateteres [42,43]. As enterotoxinas estafilocócicas, além de intoxicação alimentar, possuem um papel importante em processos patológicos como sepse, osteomielites e síndrome da angústia respiratória [44]. Entretanto, ainda há controvérsia quanto à enterotoxigenicidade de ECN e sua capacidade de causar intoxicações e outras doenças associadas às toxinas [45].

O presente estudo revelou alta frequência de genes enterotoxigênicos nos isolados, sendo que 95,3% dos *S. epidermidis* e 79,8% dos *S. haemolyticus* possuíam pelo menos um gene de enterotoxina. Os genes que apareceram com mais frequência foram *sea*, *seb* e *sec*, entre as enterotoxinas clássicas; e *seg* e *sei*, os mais prevalentes. Freitas-Guimarães et al [46] relataram uma maior porcentagem dos genes *sea*, *seb* e *sec* em ECN isolados de leite bovino, sendo o primeiro o mais frequente, e a produção da enterotoxina A por isolados humanos de ECN também foi relatada [47]. Outros estudos revelam a produção das enterotoxinas clássicas SEA, SEB e SEC por isolados clínicos de *S. epidermidis*, enquanto *S. haemolyticus* produz SEC [12,48], sendo que alta porcentagem dos isolados produz combinações de duas ou mais enterotoxinas [49], e contém, inclusive, genes e toxinas SEE, SEG, SEH e SEI [50]. Já Rosec e Gigaud [51] relataram a ausência de quaisquer dos genes *se* em 74 isolados de ECN provenientes de alimentos, e Even et al [52] descreveram a ausência de genes das enterotoxinas clássicas (i.e., *sea* a *see*) e das toxinas descritas recentemente (i.e. *seIj*, *seIr*, *seIt*) em 98,9% dos ECN. Entretanto, Cunha et al [49], em amostras de ECN isoladas de recém-nascidos, encontraram 40% de positividade para os genes toxigênicos. Tais diferenças entre estudos podem ser devido a vieses na metodologia utilizada, nos isolados de ECN estudados, incluindo o número, a natureza e origem geográfica das cepas.

Neste estudo, observou-se que 20% das amostras foram positivas para os genes *sea* e *seb* concomitantemente. Em isolados de surtos alimentares, Veras et al [52] encontraram 33,3% de amostras de ECN com os genes *sea* e *seb*, além da produção *in vitro* das enterotoxinas A e B. A freqüente presença destes dois genes concomitantes em uma mesma bactéria é explicada pelo fato de ocuparem o mesmo locus cromossomal [53]. Verificou-se, inclusive, que 61,2% dos *S. epidermidis* e 44% dos *S. haemolyticus* foram positivos para *seg* e *sei*. Vários estudos [54,55] apontam uma associação sistemática entre *seg* e *sei* e sua alta incidência em *S. aureus*. A presença concomitante desses dois genes já é esperada, uma vez que os genes *seg* e *sei* estão ambos presentes no *cluster egc*, que também contém genes relacionados a outras enterotoxinas estafilocócicas [51,56].

S. epidermidis foi descrito como a espécie de ECN com maior potencial toxigênico em alguns estudos [57,49]. Cunha et al [11] encontraram 40,9% de *S. epidermidis* com a presença dos genes *sea*, *seb*, *sec* e *tst*, sozinhos ou combinados, e ainda observaram uma frequência maior de *S. epidermidis* toxigênicos isolados de hemoculturas em relação a outros materiais clínicos. O presente estudo mostrou porcentagem toxigênica de *S. epidermidis* ainda maior (95,3%), e de 79,8% para *S. haemolyticus*, o que demonstra o alto potencial da espécie *S. epidermidis* de produzir essas toxinas.

Alguns estudos relataram como principais causadores de intoxicações alimentares as enterotoxinas A (27%) e C [58,59]. A enterotoxina C é considerada a mais estável das enterotoxinas [60], portanto teria maiores chances de causar intoxicações e facilitar infecções estafilocócicas. A alta taxa e o crescimento da positividade para o gene produtor da enterotoxina A é preocupante, já que *sea* em *S. aureus* é o mais comumente envolvido em surtos de intoxicação veiculados por alimentos nos Estados Unidos, correspondendo a 77,7% [61], e a 81% – 90% na China [62].

Apesar das descrições na literatura de genes exterotoxigênicos nas espécies de ECN, alguns autores ainda questionam seu potencial toxigênico, sugerindo erros na identificação dos isolados; torna-se, assim, necessária a identificação genotípica para confirmação das espécies de ECN e excluir a possibilidade de erro [45]. O presente estudo utilizou a técnica de *Internal Transcribed Spacer* – PCR para a confirmação genotípica de ECN e observou concordância entre este e os testes bioquímicos de 98,8% para *S. epidermidis* e 79,8% para *S. haemolyticus*. O maior problema na identificação envolveu *S. haemolyticus*, que foi erroneamente identificado pelos testes bioquímicos como *S. hominis* e *S. warneri* em 19% dos casos. Os testes de produção de hemólise e urease, que pelo esquema de provas bioquímicas [26] devem apresentar resultados positivo e negativo, respectivamente, para *S. haemolyticus*, falharam na identificação de 19% dos isolados dessa espécie. A presença da urease em *S. haemolyticus* pode ser devida à aquisição de genes ou mutações do DNA, e demonstra um perfil bioquímico variável desta espécie. Desse modo, enfatiza-se a importância da identificação genotípica dos isolados de *S. haemolyticus*.

Em ECN, dados envolvendo a presença de genes codificadores de hemolisinas, proteínas que causam lise em uma variedade de células [24], ainda são escassos. O presente estudo buscou detectar estes genes nos isolados de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*; todavia, não foi possível detectar os genes *hlb* e *hld* em *S. haemolyticus*, já que não foi observada amplificação usando-se de primers específicos para *S. aureus* [36] e para *S. epidermidis* (primers deste estudo). Para detecção de tais genes, seria necessário desenhar primers específicos para *S. haemolyticus* e devido à ausência dos genes sequenciados no banco de dados (GenBank), não foi possível. Ainda, tentamos detectar *hld* em *S. haemolyticus* com primers desenhados sobre uma cepa de *Staphylococcus simulans* (GenBank n° acesso AJ223775.1; Fw: AAGGGGGCAATACACATGRC; Rv: CCGAACGCTTCATTTCCGAT), mas também não houve amplificação. Huseby et al [63] mostraram que entre *S. schleiferi* e *S. epidermidis* existem diferenças espécie-específicas na sequência da β-toxina, cuja proteína demonstrou 72% e 52% de

homologia com a β-toxina de *S. aureus*. De acordo com Dziewanowska et al [64], a diferença entre as β-toxinas de diferentes espécies de ECN pode ser resultado de adaptação bacteriana à ampla variedade de hospedeiros potenciais. Para fins de comparação, optamos por apresentar os resultados fenotípicos para produção de hemolisina beta e delta para *S. haemolyticus*.

Segundo nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a detectar os genes das hemolisinas *hla* com primers específicos para as espécies de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*. O gene codificante da hemolisina alfa (*hla*) foi detectado em 92,9% dos *S. epidermidis* e 91,7% dos *S. haemolyticus*, enquanto o gene da hemolisina beta *hlb* foi encontrado em 92,9% de *S. epidermidis*. Okee et al [22] por sua vez, observaram o gene *hla* em apenas 20% dos *S. epidermidis*, e nenhum dos isolados possuía o gene *hlb*. Segundo Morfeldt et al [65], o sistema RNAIII- *agr* está associado à tradução do gene *hla*. No presente estudo, a produção da hemolisina beta foi de 81% em *S. haemolyticus*. A discrepância na alta porcentagem do gene *hlb* em *S. epidermidis* e a menor produção da β-hemolisina em *S. haemolyticus* pode se dever à baixa expressão deste gene em alguns isolados. Zell et al [66] relataram a presença da β-hemólise em 59% de isolados de ECN, enquanto Bedidi-Madani et al [67] observaram a produção da hemolisina beta em 75% e da α-hemólise em 57% dos ECN. Já Nataro et al [68], encontraram 84% de cepas produzindo hemolisina alfa e 61% hemolisina beta. A importância do gene *hlb* e da hemolisina beta se dá devido à sua capacidade de promover o escape da bacteria do sistema imune do hospedeiro e auxiliar no processo de obtenção de nutrientes [69], permitindo a sobrevivência do patógeno.

Segundo Even et al [21], o gene *hld* é tão divergente entre as espécies que não consegue ser amplificado em algumas espécies de ECN. Tal diversidade é demonstrada pelo fato da identidade parcial entre o gene desta toxina entre *S. aureus* e *S. epidermidis* ser de 83% [21], o que pode ser também o caso de *S. haemolyticus*. A δ-hemolisina é codificada através do RNA regulatório RNAIII em *S. aureus* e associada ao sistema *agr* [70], sendo este já descrito em

diversas espécies de estafilococos, incluindo *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus* e *S. xylosus* [71,72,73,74]. No presente estudo, o gene *hld* foi encontrado em 95,3% dos *S. epidermidis* e a hemolisina delta foi produzida por 40,5% dos *S. haemolyticus*. De acordo com Gemmel [75], a δ-hemolisina é mais frequentemente expressa por ECN isolados de infecções clinicamente importantes do que infecções humanas inaparentes.

A patogênese de infecções causadas por ECN em dispositivos médicos é atribuída à sua capacidade de formar biofilmes [76], sendo este o principal fator de virulência observado em ECN [77]. A composição química desses biofilmes tem sido extensivamente estudada, sendo o PIA [42], o ácido teicóico [78] e algumas proteínas [79] considerados os principais componentes do biofilme estafilocócico.

A produção de biofilme em *S. epidermidis* foi determinada em 35,3% dos isolados, neste estudo. Outros trabalhos mostram taxas maiores [80,81,82] e menores [83] de produção de biofilme nessa espécie. O gene *bhp* foi encontrado em 13 (15,3%) isolados de *S. epidermidis*. O estudo de Bowden et al [84] observou o gene *bhp* em apenas 9%, 0%, e 13% dos isolados de, respectivamente, bacteremia, contaminantes de hemoculturas e microbiota cutânea. O produto de tal gene é importante na formação de um biofilme fortemente aderente [84,85]. Entretanto, esta associação não foi observada no presente estudo, já que apenas 3 dos 13 isolados carreando o *bhp* produziram um biofilme capaz de ser detectado pelos métodos fenotípicos. Desse modo, estudos futuros são necessários para determinar a função do *bhp* no estabelecimento de um biofilme maduro e funcional [86].

Enquanto determinamos a produção de biofilme em 21,5% dos *S. haemolyticus*, Fredheim et al [87], utilizando-se do método de aderência em placa de poliestireno, semelhante ao usado em nosso estudo observaram 74% de *S. haemolyticus* produzindo biofilme. Segundo esses autores, *S. haemolyticus* produz em sua maior parte biofimes PIA-independentes. Nossos resultados condizem com essa hipótese, já que a presença dos genes *ica* se correlacionou com a

produção de biofilme em *S. epidermidis*, mas não em *S. haemolyticus*. Assim como *S. haemolyticus*, a formação de biofilme PIA-independente foi também relatada em *S. epidermidis*, *S. aureus*, e *S. lugdunensis* [35,88,89,90,91]. O gene *bhp* também não foi detectado em nenhum dos isolados de *S. haemolyticus*, assim como por Fredheim et al [87], e a ausência deste gene nos isolados dessa espécie sugere que ele pode não contribuir relevantemente para os componentes protéicos do biofilme em *S. haemolyticus,* ao contrário de S. *epidermidis*.

Assume-se que estafilococos isolados de locais infectados devam ser capazes de formar biofilme, produzir PIA e conter o operon *ica* [92]. Entretanto, Fitzpatrick et al [89] sugerem que somente a presença do locus *ica* não é suficiente para a formação do biofilme. Observamos 62,1% dos isolados com o gene *icaA*, sendo 78,8% *S. epidermidis*, e 45,2% *S. haemolyticus*, enquanto o gene *icaD* esteve presente em 67,5% das cepas, correspondendo a 50,6% dos *S. epidermidis* e 84,5% dos *S. haemolyticus*. A presença isolada dos genes *icaA* e *icaD* foi encontrada em, respectivamente, 13,8 e 20,7% dos isolados. Já os genes *icaAD* estiveram presentes em, respectivamente, 50,6% dos *S. epidermidis* e 42,9% dos *S. haemolyticus*. Resultados semelhantes foram observados por Oliveira e Cunha [82], que relataram 40% de ECN com *icaAD*. Em outros estudos, o gene *icaD* foi detectado em 77% de ECN e *icaA* em 27,8%, a maior parte deles *S. epidermidis* [93]; e o *icaD* em apenas 4 de 72 isolados de *S. haemolyticus* [87].

Apesar de sua atividade ser fraca, a proteína IcaA possui o papel principal para a formação da N-acetilglicosaminiltransferase do PIA, já que IcaD ou os outros componentes do sistema Ica não possuem atividade de transferase sozinhos [94]. Podemos sugerir que a presença do gene *icaA* em maior parte dos *S. epidermidis*, a despeito de *S. haemolyticus*, esteja associada ao maior número de isolados de *S. epidermidis* produzindo o biofilme, apesar de não se ter encontrado associação entre estes fatores estatisticamente. Dos 13 isolados classificados como fortemente aderentes, 11 possuíam *icaAD*. De Silva et al [83] relataram associação entre o

operon *ica* e a produção quantitativa de biofilme, enquanto outros autores não observaram esta relação em isolados clínicos de *S. epidermidis* [81,83]. No presente estudo, *icaAD* concomitantes se associaram à produção de biofilme, confirmando o importante papel desses genes na formação do biofilme. Além disso, os genes envolvidos na produção de biofilme têm sido sugeridos como marcadores potenciais para cepas clinicamente relevantes [95], e acredita-se que isolados carreando genes *ica* possuem uma vantagem competitiva na colonização de dispositivos médicos, especialmente quando a cateterização é longa [81].

Neste trabalho, 4 isolados não se mostraram produtores de biofilme, mas continham os genes *icaA* e *icaD* concomitantemente. A expressão de mRNA *ica* já foi demonstrada em *S. epidermidis* não produtores de biofilme e em cepas que sob condições experimentais não produzem biofilme ou cuja presença é indetectável [96]. Aparentemente, a produção do PIA está sujeita à ativação/desativação de seus genes codificadores, que pode estar envolvida em uma variação de fases em *S. epidermidis*, a qual pode facilitar a sobrevivência e crescimento bacteriano sob mudanças nas condições ambientais *in vivo* [97]. Ainda, evidências suportam a disseminação de novos clones que são referidos como biofilme-negativos e possuem tanto *icaA* como *icaD* [98].

A avaliação da concordância (Kappa) das técnicas de aderência em placa e em tubo apresentou o valor de 0,9854, o que revela *quase perfeita concordância* [99] entre elas, resultado também observados por Oliveira e Cunha [82]. Entretanto, o teste de aderência em tubo não avaliou a produção de biofilme de maneira sensível em outros trabalhos [100,101]. Apesar disso, seu uso de maneira rotineira é justificado por sua alta eficácia em se detectar o biofilme, à sua facilidade e praticidade de execução, e aos resultados eficazes obtidos neste estudo [49,102]. Além disso, a adição de glicose ao meio TSB facilita a formação do biofilme, e é indicada na preparação destes testes, de modo que aumenta a sensibilidade na detecção [103,104,105].

Observou-se neste trabalho que todos os isolados de *S. epidermidis* produtores de biofilme continham o gene *hld*, produtor da hemolisina delta. Tal associação é de fato relevante devido ao fato de a δ-hemolisina possuir um papel de surfactante e, juntamente com as modulinas fenol-solúveis, atuar no processo de desenvolvimento do biofilme. Esta ação ocorre particularmente na fase de destacamento, de forma que as células bacterianas presentes no biofilme sejam liberadas no ambiente ou no sistema do hospedeiro [106,107,108].

Conclusões

Os resultados do presente estudo revelam grande potencial toxigênico nos isolados clínicos de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, sendo que os genes das enterotoxinas G e I e das hemolisinas alfa, beta e delta aparecem com maior frequência, sugerindo que estes se relacionam com o estabelecimento dessas cepas no ambiente hospitalar. A produção de biofilme em *S. epidermidis* parece estar associada à atividade do *icaA* e, com menor contribuição, o gene *bhp*. Já para *S. haemolyticus*, os genes *ica* parecem ter menos importância na formação do biofilme. Este também parece se associar ao gene *hld,* o que pode promover o destacamento do biofilme e a liberação das bactérias. Tais dados permitem enfatizar a importância dos ECN como importantes agentes de infecção, já que eles contêm relevantes fatores de virulência que auxiliam no desenvolvimento de infecções, e podem inclusive ser transferidos a organismos considerados mais importantes clinicamente, como *S. aureus*. Desse modo, medidas de controle desses agentes oportunistas no ambiente hospitalar são necessárias.

Lista de Abreviações

ECN- Estafilococos Coagulase-Negativa
TSB- Caldo Tripticase Soja
ITS-PCR - *Internal transcribed spacer – Polimerase Chain Reaction*
ATCC – *American Type Culture Collection*
PCR – Reação em cadeia da Polimerase
NCBI - *National Center for Biotechnology Information*
Tm: Temperatura de *melting*
DO: Densidade Óptica
PBS: Tampão fosfato salina
NA: Não-aderente
FA: Fraco-aderente
FOA: Forte-aderente
PIA: Adesina Polissacarídica Intercelular

Conflitos de Interesse

Nada a declarar.

Contribuição dos autores

LP: Participou da concepção da idéia do estudo, realizou os experimentos, analisou os dados e escreveu o artigo. CIB: Participou da concepção da idéia do estudo e auxiliou na realização dos experimentos. AO: participou da realização dos testes microbiológicos. PYFM: auxiliou no desenho dos *primers*. VCP: auxiliou na identificação dos isolados e realização dos experimentos. MLRSC: Responsável por conceber a idéia do trabalho, a coordenação do trabalho de laboratório, análise de dados e revisão do manuscrito.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro. Processo FAPESP n° 2011/15396-1.

Referências

1. Vuong C, Otto M. ***Staphylococcus epidermidis*** **infections.** *Microbes Infect* 2002, **4**: 481–489.

2. Huebner J, Goldmann DA: **Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens.** *Annu Rev Med* 1999, **50**: 223–236.

3. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP: **Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections.** *Science* 1999, **284**: 1318–1322.

4. Mack D, Davies AP, Harris LG, Rohde H, Horstkotte MA, Knobloch JK: **Microbial interactions in *Staphylococcus epidermidis* biofilms.** *Anal Bioanal Chem* 2007, **387**: 399–408.

5. von Eiff C, Peters G, Heilmann C: **Pathogenesis of infections due to coagulase negative staphylococci.** *Lancet Infect Dis* 2002, **2**: 677–685.

6. Mack D, Fischer W, Krokotsch A, Leopold K, Hartmann R, Egge H, Laufs R: **The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis.** *J Bacteriol* 1996, 178: **175**–183.

6. Arciola CR, Baldassarri L,Montanaro L: **Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections.** *J Clin Microbiol* 2001, **39**(6): 2151-2156.

7. Ziebuhr W, Hennig S, Eckart M, Kranzler H, Batzilla C, Kozitskaya S: **Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen.** *Int J Antimicrob Agents* 2006, **28**: S14–S20.

8. Irlinger F: **Safety assessment of dairy microorganisms: coagulase-negative staphylococci.** Int J Food Microbiol 2008, 126: 302–310.

9. Park JY, Fox LK, Seo KS, McGuire MA, Park YH, Rurangirwa FR, Sischo WM, Bohach GA: **Detection of classical and newly described staphylococcal superantigen genes in coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections.** *Vet Microbiol* 2001, **147**:149–154.

10. Podkowik M, Bystroń J, Bania J: **Genotypes, antibiotic resistance, and virulence factors of staphylococci from ready-to-eat food.** Foodborne Pathog Dis 2012, 9: 91–93.

11. Cunha MLRS, Calsolari RAO, Araújo Júnior 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.

12. Barretti P, Montelli AC, Batalha JE, Caramori JC, Cunha, MLRS: **The role of virulence factors in the outcome of staphylococcal peritonitis in CAPD patients.** *BMC Infect Dis* 2009, **9**: 212.

13. Taylor AL, Llewelyn MJ: **Superantigen-induced proliferation of human CD4+CD25− T cells is followed by a switch to a functional regulatory phenotype**. *J Immunol* 2010, **185**: 6591–6598.

14. Frase JD, Proft T: **The bacterial superantigen and superantigen-like proteins.** *Immunol Rev*, **225**: 226–243.

15. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM: **Exotoxins of *Staphylococcus aureus***. *Clin Microbiol Rev* 2000, **13**:16-34.

16. Coelho SMO, Reinoso E, Pereira IA, Soares LC; Demo M, Bogni C, Souza MMS: **Virulence factors and antimicrobial resistence of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro.** *Pesqui Vet Bras* 2009, **29**:369-374.

17. Sabini L, Torres C, Demo M, Sutil S, Lara L: **Effect of *Staphylacoccus* toxins isolated from dairy cow milk on vero cell monolayers.** *Rev Latinoam Microbiol* 2001, **43**:13-18.

18. Peng HL, Novick RP, Kreiswirth B, Kornblum J, Schlievert P: **Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*.** *J Bacteriol* 1988, **170**(9): 4365-4372.

19. Burnside K, Lmebo A, Reyes M, Iliuk A, Binhtran NT, Connelly JE, Lin WJ, Schmidt BZ, Richardson AR, Fang FC, *et al*: **Regulation of hemolysin expression and virulence of *Staphylococcus aureus* by a serine/threonine kinase and phosphatase.** *PLOS* 2010, **5**:1-16.

20. Vasconcelos NG, Cunha MLRS: ***Staphylococcal* enterotoxins: Molecular aspects and detection methods.** *J Public Health Epidemiol* 2010, **2**(3):70-74.

21. Even S, Leroy S, Charlier C, Zakour NB, Chacornac JP, Lebert I, Jamet E, Desmonts MH, Coton E, Pochet S, *et al*: **Low occurrence of safety hazards in coagulase negative staphylococci isolated from fermented food stuffs.** *Int J Food Microbiol* 2010, **139**:87–95

22. Okee MS, Joloba ML, Okello M, Najjuka FC, Katabazi FA, Bwanga F, Nanteza A, Kateete DP: **Prevalence of virulence determinants in *Staphylococcus epidermidis* from ICU patients in Kampala, Uganda.** *J Infect Dev Ctries* 2012, **6**(3):242-250.

23. Schleifer KH, Kloos WE: **Isolation and characterization of staphylococci from human skin.** *Int J Syst Bacteriol* 1975, **25**(1): 50-61.

24. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott; 1997.

25. Baker JS: **Comparison of various methods for differentiation of staphylococci and micrococci.** *J Clin Microbiol* 1984, **9**:875-9.

26. Cunha MLRS, Sinzato YK, Silveira LVA: **Comparision of methods for identification of Coagulase-negative Staphylococci.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; **99**:855-60.

27. 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.

28. Couto I, Pereira S, Miragaia M, Sanches IS, Lencastre H: **Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by Internal Transcribed Spacer PCR.** *J Clin Microbiol* 2001; **39**:3099–103.

29. 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.

30. Marconi C, Cunha MLRS, Araujo Jr JP, Rugolo LMSS. **Standardization of the PCR technique for the detection of delta toxin in *Staphylococcus spp.*** *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 2005;**11**(2):117-28.

31. Hébert GA, Hancock GA: **Synergistic hemolysis exhibited by species of Staphylococci.** *J Clin Microbiol* 1985, 22(3): 409-415.

32. Freer JH, Arbuthnott JP: **Toxins of *Staphylococcus aureus*.** *Pharmacol Therapy* 1983, **19**, 55-106.

33. Vandecasteele SJ, Peetermans WE, Merckx R, Van Eldere J: **Expression of Biofilm-Associated Genes and In Vivo Foreign Body Infections.** *J Infect Dis* 2003; **188**: 730–7.

34. Tan H, Peng Z, Li Q, Xu X, Guo S, Tang T. **The use of quaternised chitosan-loaded PMMA to inhibit biofilm formation and downregulate the virulence-associated gene expression of antibiotic-resistant *staphylococcus*.** *Biomaterials* 2012, **33**: 365-377.

35. Qin Z, Yang X, Yang L, Jiang J, Ou Y, Molin S, Qu D: **Formation and properties of in vitro biofilms of *ica*-negative*Staphylococcus epidermidis* clinical isolates.** *J Med Microbiol* 2007, **56**:83-93.

36. Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, Nesme, Etienne J, Vandenesch F: **Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease.** *Infec Immun* 2002, **70**(2):631-41.

37. Christensen GD, Bisno AL, Simpsom WA, Beachey EH: **Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces.** *Infect Immun* 1982, **37:**318-326.

38. Christensen GD, Simpson WA, Yonger JJ, Baddor LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH: **Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices.** *J Clin Microbiol* 1985, **22:**996-1006.

39. Becker K, Pagnier I, Schuhen B, Wenzelburger F, Friedrich AW, Kipp F, Peters G, von Eiff C: **Does nasal cocolonization by methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains occur frequently enough to represent a risk of false-positive methicillin-resistant *S. aureus*determinations by molecular methods?** *J Clin Microbiol* 2006, **44:**229-231.

40. Costa SF, Miceli MH, Anaissie EJ: **Mucosa or skin as source of coagulase-negative staphylococcal bacteraemia?** *Lancet Infect Dis* 2004, **4:**278-286.

41. Falcone M, Giannella M, Raponi G, Mancini C, Venditti M: **Teicoplanin use and emergence of *Staphylococcus haemolyticus*: is there a link?** *Clin Microbiol Infect* 2006, **12**: 96-97.

42. Mack D, Fischer W, Krokotsch A, Leopold K, Hartmann R, Egge H, Laufs R: **The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis.** *J Bacteriol* 1996, **178**(1):175-183.

43. Mack D, Rohde H, Harris LG, Davies AP, Horstkotte MA, Knobloch JK: **Biofilm formation in medical device-related infection.** *Int J Artif Organs* 2006, **29**:343-359.

44. Michelin AF, Carlos IZ: **Interaction of staphylococcal exterotoxins with the immmune system of the host.** *Rev Ciênc Farm* 2003, **24**:83.

45. Cunha MLRS, Calsolari, RAO: **Toxigenicity in *Staphylococcus* with emphasis on coagulase negative staphylococci.** In *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology.* Edited by Méndez-Vilas A. São Paulo: Formatex; 2007: 778-782.

46. de Freitas Guimarães F, Nóbrega DB, Richini-Pereira VB, Marson PM, de Figueiredo Pantoja JC, Langoni H: **Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk.** J Dairy Sci 2013, **96**(5):2866-72.

47. Rojas MB, Antonelli CM, Franchi EPLP, Cunha MLRS: **Detection of enterotoxin a in coagulase-negative staphylococci isolated from nutrition students.** *Arch Clin Microbiol* 2012, **3**(6).http://imedpub.com/ojs/index.php/acmicrob/article/view/414.

48. Crass B, Bergdoll MS: **Involvement of coagulase-negative staphylococci in toxic shock syndrome.** *J Clin Microbiol* 1986, **23**: 43–45.

49. Cunha MLRS, Rugolo LMSS, Lopes CAM: **Study of virulence factors in coagulase-negative staphylococci isolated from newborns.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006, **101**:661-668.

50. Vasconcelos NG, Pereira VC, Araújo Júnior 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 App Microbiol 2011, **111**: 749–762.

51. Rosec JP, Gigaud O: **Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France.** *J Food Microbiol* 2002, **77**:61–70.

52. Veras JF, Carmo LS, Tong LC, Shupp JW, Cummings C, Dos Santos DA, Cerqueira MM, Cantini A, Nicoli JR, Jett M, *et al*: **A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil.** *Int J Infec Dis* 2008, **12**: 410-415.

53. Jett M, Ionin B, Das R, Neill R: **The staphylococcal enterotoxins.** In: *Molecular medical microbiology*. Edited by Sussman M. San Diego, CA, USA: Academic Press; 2001: 1089—116.

54. Lammler C, Akineden O, Annemuller C, Wolter W, Zschock M: **Molecular analysis of virulence factors of Staphylococcusaureus isolated from bovine sub-clinical mastitis.** In *Proceeding of Symposium on Immunology of Ruminant Mammary Gland: 11-14 June 2002.* Edited by Zecconi A, Stresa; 2000: 226–330.

55. Akineden O, Annemuller C, Hassan AA, Lammler C, Wolter W, Zschock M: **Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis.** *Clin Diagn Lab Immunol* 2001, **8**: 959–964.

56. Jarraud S, Peyrat MA, Lim A, Tristan A, Bes M, Mougel C, Etienne J, Vandenesch F, Bonneville M, Lina G: ***egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*.** *J Immunol* 2001, **166:** 669–677. Erratum in *J Immunol* **166:** 4259.

57. Valle J, Vadillo S, Piriz S, Gomez-Lucia E: **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.

58. Huang TP, Lai YJ, Chang YC, Wang JY, Shih DYC: **Coagulase typing of *Staphylococcus aureus* by PCR-RFLP technique**: *Annual scientific report of National Laboratories of Food and Drugs.* Department of Health, Executive Yuan, Taiwan, R. O. C; 2000.

59. Wang JY, Huang TP, Chang YC, Shih DYC: **Subtyping of Enterotoxin C Strains Isolated from Food Poisoning Outbreaks in Taiwan**. *J Food Drug Anal* 2003, **11**(3): 239-245.

60. Tibana A, Rayman K, Akhtar M Szabo R: **Thermal stability of staphylococcal enterotoxins A, B, and C in a buffered system.** *J Food Prot* 1987, **50**: 239- 42.

61. Casman EP, Bennett RW: **Detection of staphylococcal enterotoxin in food.** *Appl Microbiol* 1965, **13**:181–9.

62. Ko HC, Chang TY: **Using reversed passive latex agglutination method to detect enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and enterotoxin in foods.** *J Food Drug Anal* 1995, **3**:57–63.

63. Huseby M, Shi K, Brown CK, Digre J, Mengistu F, Seo KS, Bohach GA, Schlievert PM, Ohlendorf DH, Earhart CA: **Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*.** *J Bacterial* 2007, **189**:8719-8726.

64. Dziewanowska K, Edwards VM, Deringer JR, Bohach GA, Guerra DJ: **Comparison of the beta-toxins from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius*.** *Arch Biochem Biophys* 1996, **335**: 102–108.

65. Morfeldt E, Taylor D, von Gabain A, Arvidson S: **Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans-encoded antisense RNA, RNAIII.** *EMBO J* 1995, **14**: 4569–4577.

66. Zell C, Resch M, Rosenstein R, Albrecht T, Hertel C, Götz F: **Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures.** *Int J Food Microbiol* 2008, **127**(3):246-51.

67. Bedidi-Madani N, Greenland T, Richard Y: **Exoprotein and slime production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk.** *Vet Microbiol* 1998, **59**(2-3):139-45.

68. Nataro JP, Corcoran L, Zirin S, Swink S, Taichman N, Goin J, Harris MC: **Prospective analysis of coagulase-negative staphylococcal infection in hospitalized infants.** *J Pediatr* 1994, **125**(5): 798–804.

69. Huseby M, Shi K, Brown CK, Digre J, Mengistu F, Seo KS, Bohach GA, Schlievert PM, Ohlendorf DH, Earhart CA: **Structure and biological activities of beta toxin from*Staphylococcus aureus*.** *J Bacteriol* 2007, **189**: 8719–8726.

70. Novick RP: **Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence.** *Mol Microbiol* 2003, **48**: 1429–1449.

71. Dordet-Frisoni E, Dorchies G, De AC, Talon R, Leroy S: **Genomic diversity in *Staphylococcus xylosus*.** *Appl Environ Microbiol* 2007, **73**: 7199–7209.

72. Wuster A, Babu MM: **Conservation and evolutionary dynamics of the agr cell-to- cell communication system across firmicutes.** *J Bacteriol* 2008, **190**: 743–746.

73. Yao Y, Vuong C, Kocianova S, Villaruz AE, Lai Y, Sturdevant DE, Otto M: **Characterization of the *Staphylococcus epidermidis* accessory-gene regulator response: quorum-sensing regulation of resistance to human innate host defense.** *J Infect Dis* 2006, **193**: 841–848.

74. Lina G, Boutite F, Tristan A, Bes M, Etienne J, Vandenesch F: **Bacterial competition for human nasal cavity colonization: role of Staphylococcal agr alleles.** *Appl Environ Microbiol* 2003, **69**:18–23.

75. Gemmel CG: **Coagulase-negative staphylococci.** *J Med Microbial* 1986, **22**: 285-295.

76. Lewis K: **Riddle of biofilm resistance**. Antimicrob Agents Chemother 2001, 45:999–1007.

77. Raad I, Alrahwan A, Rolston K: ***Staphylococcus epidermidis*: emerging resistance and need for alternative agents.** *Clin Infect Dis* 1998, **26**: 1182–1187.

78. Hussain M, Wilcox MH, White PJ: **The slime of coagulase-negative staphylococci: biochemistry and relation to adherence.** *FEMS Microbiol Rev* 1993, **10**: 191–207.

79. Hussain M, Herrmann M, von Eiff C, Perdreau-Remington F, Peters G: **A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces.** *Infect Immun* 1997, **65**: 519–524.

80. Eftekhar F, Mirmohamadi Z: **Evaluation of biofilm production by *Staphylococcus epidermidis* isolates from nosocomial infections and skin of healthy volunteers.** *Int J Med Med Sci* 2009, **1**(10), 438-441.

81. Ninin E, Caroff N, Espaze E, Maraillac J, Lepelletier D, Milpied N, Richet H: **Assessment of *ica* operon carriage and biofilm production in *Staphylococcus epidermidis* isolates causing bacteraemia in bone marrow transplant recipients.** *Clin Microbiol Infect* 2006, **12**(5): 446-52.

82. Oliveira A, Cunha MLRS. **Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci:** *BMC Res Notes* 2010, **3**:260. http://www.biomedcentral.com/1756-0500/3/260.

83. de Silva GD, Kantzanou M, Justice A, Massey RC, Wilkinson AR, Day NP, Peacock SJ: **The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative Staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit.** *J Clin Microbiol* 2002, **40**(2): 382-8.

84. Bowden MG, Chen W, Singvall J, Xu Y, Peacock SJ, Valtulina V, Speziale P, Höök M: **Identification and preliminary characterization of cell-wall-anchored proteins of *Staphylococcus epidermidis*.** *Microbiology* 2005, **151**: 1453–1464.

85. Tormo MA, Knecht E, Gotz F, Lasa I, Penades JR: **Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer?** *Microbiology* 2005, **151**: 2465–2475.

86. Fey PD, Olson ME: **Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis***. *Future Microbiol* 2010, **5**(6): 917-933.

87. Fredheim EGA, Klingenberg C, Rohde H, Frankenberger S, Gaustad P, Flægstad T, Sollid JE, **Biofilm Formation by *Staphylococcus haemolyticus*.** *J Clin Microbiol* 2009, **47**(4): 1172-1180.

88. Toledo-Arana A, Merino N, Vergara-Irigaray M, Debarbouille M, Penades JR, Lasa I: ***Staphylococcus aureus* develops an alternative, *ica*-independent biofilm in the absence of the *arlRS*two-component system.** *J Bacteriol* 2005, **187**:5318-5329.

89. Fitzpatrick F, Humphreys H, O'Gara JP: **Evidence for*icaADBC*-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates.** *J Clin Microbiol 2005*, **43**:1973-1976.

90. Frank KL, Patel R: **Poly-*N*-acetylglucosamine is not a major component of the extracellular matrix in biofilms formed by *icaADBC*-positive *Staphylococcus lugdunensis* isolates.** *Infect Immun* 2007, **75**:4728-4742.

91. Sadovskaya I, Vinogradov E, Flahaut S, Kogan G, Jabbouri S: **Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A.** *Infect Immun* 2005, **73**:3007-3017.

92. Chokr A, Watier D, Eleaume H, Pangon B, Ghnassia JC, Mack D, Jabbouri S: **Correlation between biofilm formation and production of polysaccharide intercellular adhesin in clinical isolates of coagulase-negative staphylococci.** *Int J Med Microbiol* 2006; **296**(6):381-8.

93. Hernández BD, Santos FS, Miranda BL, Bejarano LP, Novales GM: **Production of *icaADBC*-encoded polysaccharide intercellular adhesin and therapeutic failure in pediatric patients with staphylococcal device-related infections.** *BMC Infect Dis* 2010, **10**:68. doi:10.1186/1471-2334-10-68

94. Gerke C, Kraft A, Sussmuth R, Schweitzer O, Gotz F: **Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin.** *J Biol Chem* 1998, **273**: 18586–18593.

95. Klingenberg C, Aarag E, Ronnestad A, Sollid JE, Abrahamsen TG, Kjeldsen G, Flaegstad T: Coagulase-negative staphylococcal sepsis in neonates. **Association between antibiotic resistance, biofilm formation and the host inflammatory response.** *Pediatr Infect Dis J* 2005, **24**: 817-822.

96. Dobinsky S, Kiel K, Rohde H, Bartscht K, Knobloch JK, Horstkotte MA, Mack D: **Glucose-related dissociation between *icaADBC* transcription and biofilm expression by *Staphylococcus epidermidis*: evidence for an additional factor required for polysaccharide intercellular adhesin synthesis.** *J Bacteriol* 2003, **185**(9):2879-86.

97. Ziebuhr W, Krimmer V, Rachid S, Lössner I, Götz F, Hacker J: **A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256.** *Mol Microbiol* 1999, **32**(2):345-56.

98. Arciola CR, Collamati S, Donati E, Montanaro L: **A rapid PCR method for the detection of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* in periprosthesis infections.** *Diagn Mol Pathol* 2001, **10**: 130–137.

99. Landis JR, Koch GG: **The measurement of observer agreement for categorical data.** *Biometrics* 1977, **33**: 159-174.

100. Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Fatma T, Rattan A: **Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods.** *Indian J Med Microbiol* 2006, **24**(1):25-9.

101. Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, Iqbal M: **Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates.** *Braz J Infect Dis* 2011, 15 (4): 305-11.

102. Morales M, Mendez-Alvarez S, Martin-Lopes JV, Marreiro C, Freytes CO: **Biofilm: the microbial "bunker" for intravascular catheter-related infection.** *Support Care Cancer* 2004, **12**:701-707.

103. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M: **A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation.** *J Microbiol Methods* 2000, 40: **175**–179.

104. Kim L: **Riddle of biofilm resistance.** *Antimic Agents Chemother* 2001, **45**(4):999-1007.

105. Eftikhar F, Speert DP: **Biofilm formation by persistent and non-persistent isolates of *Staphylococcus epidermidis* from a neonatal intensive care unit.** *J Hosp Infect* 2009, **71**(2):112-6.

106. Vuong C, Gerke C, Somerville GA, Fischer ER, Otto M: **Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*.** *J Infect Dis* 2003, **188**(5):706-18.

107. Yao Y, Sturdevant DE, Otto M: **Genomewide analysis of gene expression in *Staphylococcus epidermidis* biofilms: insights into the pathophysiology of S. epidermidis biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms.** *J Infect Dis* 2005, **191**(2):289-98.

108. Periasamy S, Joo HS, Duong AC, Bach THL, Tan VY, Chatterjee SS, Cheung GYC, Otto M: **How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure.** *PNAS* 2012, **109**(4): 1281-1286.

Conclusões Gerais

Este estudo, analisando cepas de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* isolados de hemoculturas, em período de 12 anos, revelou:

- Eficiência dos testes bioquímicos na identificação de *S. epidermidis*; evidenciando-se a necessidade da confirmação genotípica de *S. haemolyticus,* devido à sua variabilidade fenotípica;
- Altas taxas de positividade para genes codificadores de enterotoxinas, em especial das toxinas não-clássicas, *seg* e *sei*, principalmente em *S. epidermidis*, enfatizando-se então seu potencial toxigênico;
- A inédita detecção dos genes das hemolisinas alfa e beta nessas espécies de ECN, cujas altas taxas demonstram possivelmente um papel relevante nos processos infecciosos desses agentes;
- Evidências de que os genes *icaAD* possuem importante participação no processo de formação do biofilme *in vitro*, sendo menos relevante no biofilme de *S. haemolyticus*;
- Os genes *ica* como potenciais marcadores para a produção de biofilme, associando-se à presença deste de forma positiva;
- A presença do gene da proteína associada ao biofilme (*bhp*) em *S. epidermidis*, mas aparentemente sem função em *S. haemolyticus*;
- *S. epidermidis* como melhor produtor do biofilme do que *S. haemolyticus*, detectados pelos métodos do tubo de borossilicato e da placa de poliestireno;
- Alta eficiência da metodologia de PCR em tempo real na detecção dos genes *icaA*, *icaD* e *mecA*;
- Elevadas taxas de resistência à oxacilina, principalmente em *S. haemolyticus*;

- A distribuição dos SCC*mec* tipos I e III tanto em *S. epidermidis* quanto em *S. haemolyticus*, cujos clones inclusive apresentaram grande diversidade de tipos de SCC*mec*;
- A redução da suscetibilidade a antimicrobianos anteriormente considerados totalmente eficazes, como a vancomicina, tigeciclina e dalfopristina/quinupristina;
- Total suscetibilidade à daptomicina e linezolida, embasando o uso destes antibióticos nas infecções oportunistas por essas espécies;
- O Etest® como uma técnica eficiente para aferição dos MICs de vancomicina, superestimando-os sutilmente, mas corretamente classificando os isolados dentro da faixa de sensibilidade/resistência;
- Ausência dos genes de resistência à vancomicina, *vanA* e *vanB*, mesmo nos isolados com suscetibilidade reduzida a esta;
- Clones de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* com suscetibilidade reduzida à vancomicina persistentes por vários anos;
- Evidências de que as vantagens evolutivas de *S. epidermidis* estão associadas aos seus fatores de virulência, como toxinas e biofilme, enquanto *S. haemolyticus* se apoia na resistência/redução da suscetibilidade antimicrobiana para obter sucesso como agente de infecções oportunista.