

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Epidemiologia molecular, susceptibilidade antimicrobiana e fatores de virulência em *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis* e *Staphylococcus lugdunensis* isolados de hemocultura por mais de uma década

LETÍCIA CALIXTO ROMERO

Discente

MARIA DE LOURDES RIBEIRO DE SOUZA DA CUNHA

Orientadora

VALÉRIA CATANELI PEREIRA

Coorientadora

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

Prof.^a Dra. Associada Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

**BOTUCATU – SP
2023**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Romero, Leticia Calixto.

Epidemiologia molecular, susceptibilidade antimicrobiana e fatores de virulência em *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis* e *Staphylococcus lugdunensis* isolados de hemocultura por mais de uma década / Leticia Calixto Romero. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha
Coorientador: Valéria Cataneli Pereira
Capes: 21201021

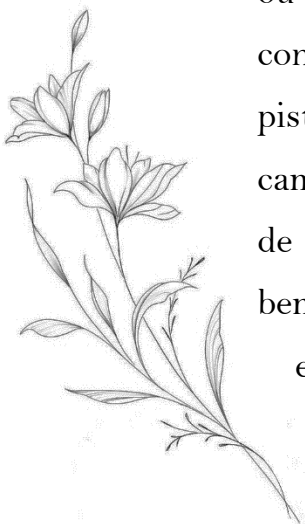
1. Biofilmes. 2. Estafilococos. 3. Patogenicidade.
4. Evolução Clonal. 5. Anti-infecciosos. 6. Hemocultura.

Palavras-chave: Biofilme; Estafilococos coagulase-negativa; Patogenicidade; Relação clonal; Resistência antimicrobiana.

Se você tem a coragem de deixar para trás tudo que lhe é familiar e confortável (pode ser qualquer coisa, desde a sua casa aos seus antigos ressentimentos) e embarcar numa jornada em busca da verdade (interna ou externa), e se você tem mesmo a vontade de considerar tudo que acontece nessa jornada como uma pista, e se você aceitar cada um que encontrar no caminho como professor, e se estiver preparada, acima de tudo, para encarar (e perdoar) algumas realidades bem difíceis sobre você mesma...

então a verdade não lhe será negada.

Elizabeth Gilbert





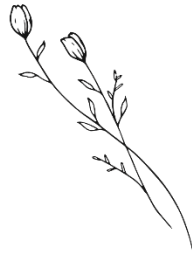
DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a quem sempre acreditou em mim,
mesmo quando eu mesma duvidei,
minha vó Áurea.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço à minha orientadora, **Prof.^a Dr.^a Maria de Lourdes**, por toda a confiança em mim e no meu trabalho, por ter me acolhido em seu laboratório e por fazer parte da minha história e do meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada por todos os ensinamentos valiosos, que levarei por toda a vida, e pelas palavras de incentivo que me fizeram acreditar que eu poderia chegar mais longe.

Foi um privilégio aprender com a senhora!



AGRADECIMENTOS

Começo expressando minha gratidão à **Deus** por me abençoar tanto e por constantemente me lembrar que os sonhos Dele são maiores que os meus.

Agradeço, de forma especial, à minha **vó Áurea**, minha maior incentivadora, que sempre apostou em mim, na minha educação e nunca mediu esforços para me ver conquistar o que eu quisesse. Por causa de você eu pude aprender com os melhores, mas com você eu aprendi o essencial!

Agradeço à minha família, especialmente minha mãe **Ednéia** por ser minha fortaleza, meu pai **André** e meus irmãos, **Gabriela** e **Rafael**, pelo apoio e amor incondicional durante todos esses anos, e minha tia **Bel** por todo o cuidado que sempre teve por mim!

Agradeço ao meu parceiro de vida, **Guilherme**, por cuidar de mim, por tornar os dias angustiantes e cansativos mais leves, por me arrancar sorrisos mesmo nos piores momentos e enxergar o melhor em mim. Obrigada por ser meu porto seguro!

Agradeço à **Arlete** e **Roberto**, pelo imenso carinho e cuidado!

Obrigada por me acolherem na vida de vocês!

Agradeço à minha companhia diária, **Jade**, por trazer tanta alegria na minha vida!

Agradeço à minha coorientadora **Prof.^a Dr.^a Valéria**, por todo o suporte, por me apresentar o mundo da microbiologia, pelos eternos ensinamentos e principalmente pelo encorajamento!

Agradeço à **Milena** e à **Karen** por serem o maior presente que a pós-graduação me deu. Obrigada por toda a ajuda, pela amizade inestimável, e por tornarem essa jornada mais divertida! Vocês moram no meu coração!

Agradeço aos colegas de laboratório, **Thais**, **Nathalia**, **Ana**, **Lucas**, **Guilherme** e **Julia** por toda a convivência no laboratório e pela disponibilidade em ajudar sempre que precisei! Muito obrigada!

Agradeço à **Elka**, por ter sido minha mentora no início dessa caminhada, mas principalmente por ter se tornado uma amiga incrível! Sinto sua falta!

Agradeço aos funcionários do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas do Instituto de Biociências de Botucatu, em especial à **Aline, Larissa e Luiz** por todo o suporte!

Agradeço aos professores do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas que de alguma forma contribuíram para a minha formação, em especial ao **Prof. Dr. Eduardo Bagagli**, por toda gentileza!

Agradeço à equipe do **Laboratório Clínico** do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas do Instituto de Biociências pela colaboração e disposição em separar as amostras essenciais para a realização deste trabalho!

Agradeço aos membros da banca de qualificação, **Prof. Dr. Alessandro Lia Mondelli, Prof. Dr. Rodrigo Tavanelli Hernandes e Dr.^a Luiza Hubinger** pelas valiosas contribuições para o trabalho!

Agradeço à **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, pelo fornecimento de toda estrutura física e humana necessária à minha formação e execução do experimento!

Agradeço à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo auxílio financeiro, essencial para a realização desse trabalho!

Finalmente, gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

Na impossibilidade de nomear cada um, deixo aqui meu reconhecimento e gratidão a todos!



Sumário

RESUMO GERAL	11
GENERAL ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	15
2. REFERÊNCIAS	29
3. OBJETIVOS	41
3.1. OBJETIVO GERAL	41
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4. APRESENTAÇÃO DA TESE	42
4.1. ARTIGO CIENTÍFICO I	43
4.2. ARTIGO CIENTÍFICO II.....	86
CONCLUSÕES	123
ANEXOS	125

Lista de siglas e abreviaturas

ECN	Estafilococos coagulase-negativa
DMIs	Dispositivos médicos implantáveis
UTIN	Unidades de terapia intensiva neonatal
MALDI-TOF MS	Sistema de ionização/dessorção a laser assistida por matriz acoplado a analisador de massas de tempo de voo
EPS	Substâncias poliméricas extracelulares
e-DNA	DNA extracelular
PIA	Adesina intercelular polissacarídica
PNAG	N-acetil glucosamina polimérica
vWbl	Proteína de ligação do fator de von Willebrand
Fbl	Proteína de ligação do fibrinogênio
Aap	Proteína associada ao acúmulo
Pls	Proteína sensível à plasmina
Embp	Proteína de ligação à matriz extracelular
Bap	Proteína associada a biofilme
MSCRAMM	Molécula de adesão a superfície da matriz adesiva
SLUSH	<i>Staphylococcus lugdunensis</i> synergistic haemolysin
TSST-1	Toxina 1 da síndrome do choque tóxico
SEs	Enterotoxinas estafilocócicas
<i>Sel</i>	Enterotoxinas estafilocócicas - <i>like</i>
SaPI	Ilhas de patogenicidade
PBP	Proteína de ligação à penicilina
PBP2a	Proteína de ligação à penicilina alterada
SCC _{mec}	Cassete Cromossômico Estafilocócico <i>mec</i>
ccr	Cassete chromosome recombinase
IWG-SCC	Grupo de Trabalho Internacional sobre a Classificação de Elementos Cromossômicos de Cassetes Estafilocócicos
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
BrCAST	Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
MLST	Multilocus Sequence Typing
Shh	<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>
Shn	<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i>
MRSA	<i>S. aureus</i> resistentes à meticilina
PCR	Polymerase Chain Reaction
CFO	Cefoxitina
OXA	Oxacilina
LNZ	Linezolida
SUT	Sulfametoxazol/trimetoprim
MSSC	<i>S. capitis</i> sensível à meticilina

MRSC	<i>S. capitis</i> resistente à meticilina
NT	Não tipável
S	Sensível
SSD	Sensível dose-dependente
R	Resistente
M-PCR	PCRs multiplex
TSB	Tryptic-Soy Broth
PBS	Solução tampão fosfato salina
NA	Não Aderente
FRA	Fraco Aderente
FOA	Forte Aderente
DO	Densidade óptica
UTI	Unidade de terapia intensiva
BORSA	Borderline Oxacillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>

RESUMO GERAL

Estafilococos coagulase-negativa (ECN) são micro-organismos oportunistas de patogenicidade múltipla, associados à uma ampla gama de infecções que, frequentemente, se manifestam em pacientes com imunossupressão ou com dispositivos médicos implantados, além de serem importantes agentes causais de sepse neonatal tardia em bebês prematuros. A produção de biofilme e a alta resistência a antimicrobianos compõem aspectos importantes da estratégia de persistência desses micro-organismos, além do notável potencial de atuarem como reservatórios de genes de resistência e virulência capazes de serem transferidos a outras espécies, como *Staphylococcus (S.) aureus*. No entanto, a caracterização minuciosa dos aspectos moleculares da epidemiologia e da patogênese de espécies clínicas emergentes como *S. hominis*, *S. capitis* e *S. lugdunensis* não são bem esclarecidos, apesar da evidente evolução do perfil de resistência e virulência relatada em clones clinicamente relevantes, dessas espécies. Dado o exposto, este estudo teve como objetivo caracterizar o perfil genético de virulência, a produção de biofilme, a evolução de resistência antimicrobiana e a epidemiologia molecular em isolados de *S. capitis*, *S. hominis* e *S. lugdunensis* provindos de hemoculturas coletadas entre 2009 e 2019, e no ano de 2021, de um hospital no interior do estado de São Paulo, com alta abrangência populacional. Ao todo foram estudados 141 isolados de *S. capitis*, 177 isolados de *S. hominis*, dos quais 17 (9,6%) foram caracterizados como *S. hominis* subsp. *novobiosepticus*, além de 13 isolados de *S. lugdunensis*, para a qual também foram inclusas amostras coletadas em 2022. Taxas elevadas de resistência à metilina mediada pelo gene *mecA* foram encontradas em *S. hominis* e *S. capitis*, chegando a 76,8% e 70,2%, respectivamente. Em contrapartida, isolados de *S. lugdunensis* se mostraram altamente suscetíveis, no entanto, frequentemente carreadores de genes de virulência. A diversidade genética foi acentuada em *S. hominis*, com SCC*mec* frequentemente não tipados, e genes *ccr* não caracterizados, além da prevalência de um novo elemento descrito recentemente, o SCC*mec* tipo XIV, majoritariamente detectado nos isolados de *S. hominis* subsp. *novobiosepticus*. Já amostras de *S. capitis* apresentaram perfil mais homogêneo, com predominância de SCC*mec* tipo III, tipo IV e tipo V, além de clones persistentes dispersos em diferentes unidades hospitalares e na UTI, principalmente a neonatal. Os isolados de *S. lugdunensis* se mostraram geneticamente relacionados, indicando baixa variabilidade genética nessa espécie. A produção de biofilme foi pouco prevalente, e sem correlação com a presença de genes do operon *icaADBC*. Ademais, isolados de *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* produziram biofilme com maior frequência e se mostraram mais resistentes à metilina do que *S. hominis* subsp. *hominis*. Dentre as três espécies, a produção de biofilme foi mais correlacionada à *S. capitis*, que também formou biofilmes mais forte aderentes do que as demais espécies, frequentemente associado à co-ocorrência de SCC*mec* tipo III e IV. Além disso, isolados de *S. capitis* provenientes de UTIs tiveram a produção de

biofilme favorecida em resposta ao estresse hiperosmótico, resultando em um aumento de 26,5% nessa taxa, semelhante ao já descrito para linhagens clonais de *S. capitis* isoladas de UTIs neonatais ao redor do mundo. A detecção de um ou mais genes associados a produção de enterotoxinas foi verificada em 68,6% das amostras, indicando o potencial enterotoxigênico dessas linhagens. Os resultados obtidos revelam resistência antimicrobiana elevada, produção de biofilme sem correlação com determinantes genéticos descritos, porém com expressão influenciável por condições ambientais, clones persistentes circulando no hospital e diversidade genética capaz de influenciar outras espécies estafilocócicas. Destacamos a diversidade e a complexidade que permeia a existência dessas espécies clinicamente relevantes, seja pela diversidade genética de *S. hominis*, pela clonalidade e persistência de *S. capitis* em UTIs, ou pela virulência atípica de *S. lugdunensis*. É de extrema importância investirmos no monitoramento desses e outros aspectos que impactam a ascensão dessas linhagens no cenário clínico atual.

Palavras-chave: Estafilococos coagulase-negativa, biofilme, relação clonal, resistência a β -lactâmicos, fator de virulência, PFGE, *mecA*, hemocultura.

GENERAL ABSTRACT

Coagulase-negative staphylococci (CoNS) are opportunistic microorganisms characterized by variable pathogenicity. These microorganisms are associated with a wide range of infections that often manifest in immunosuppressed patients and patients with implanted medical devices. In addition, CoNS are important causative agents of late-onset sepsis in preterm infants. Biofilm production and high antimicrobial resistance are important aspects of the persistence strategy of these microorganisms. Furthermore, CoNS possess a remarkable potential of acting as reservoirs of resistance and virulence genes that can be transferred to other species, such as *Staphylococcus aureus*. However, the molecular aspects of the epidemiology and pathogenesis of emerging clinical species such as *S. hominis*, *S. capitis* and *S. lugdunensis* are not well understood despite the evident evolution of the resistance and virulence profile reported for clinically relevant clones of these species. Given the above, this study aimed to characterize the genetic virulence profile, biofilm production, evolution of antimicrobial resistance, and molecular epidemiology of *S. capitis*, *S. hominis* and *S. lugdunensis* strains isolated from blood cultures collected between 2009 and 2019 and in 2021 at a hospital in the interior of the state of São Paulo. The hospital is characterized by high population coverage. A total of 141 *S. capitis* isolates, 177 *S. hominis* isolates, including 17 (9.6%) characterized as *S. hominis* subsp. *novobiosepticus*, and 13 *S. lugdunensis* isolates were studied. In the last case, samples collected in 2022 were also included. High rates of methicillin resistance mediated by the *mecA* gene were found in *S. hominis* and *S. capitis*, reaching 76.8% and 70.2%, respectively. In contrast, the *S. lugdunensis* isolates were highly susceptible but often carried virulence genes. Marked genetic diversity was observed in *S. hominis*, which frequently carried untypable SCC*mec* and uncharacterized *ccr* genes. In addition, a new recently described element, SCC*mec* type XIV, was mostly detected in *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* isolates. On the other hand, the *S. capitis* isolates exhibited a more homogeneous profile, with a predominance of SCC*mec* type III, type IV, and type V. In addition, persistent clones were distributed across different hospital units and the ICU, especially the neonatal ICU. Biofilm production was less prevalent and with the presence of *icaADBC* operon genes. Furthermore, *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* isolates produced biofilm more frequently and were more resistant to methicillin than *S. hominis* subsp. *hominis*. Among the three species, biofilm production was more correlated with *S. capitis*, which also formed stronger adherent biofilms than the other species, often associated with the co-occurrence of SCC*mec* types III and IV. Furthermore, *S. capitis* isolates collected from ICUs favored biofilm production in response to hyperosmotic stress, resulting in a 26.5% increase in this rate, similar to what has been described for clonal strains of *S. capitis* isolated from neonatal ICUs around the world. One or more genes associated with the production of enterotoxins were detected in 68.6% of the isolates, indicating the enterotoxigenic potential of these

strains. The results obtained reveal high antimicrobial resistance, biofilm production not correlated with described genetic determinants but whose expression is influenced by environmental conditions, persistent clones circulating in the hospital, and genetic diversity capable of influencing other staphylococcal species. We highlight the diversity and complexity of these clinically relevant species, whether due to the genetic diversity of *S. hominis*, the clonality and persistence of *S. capitis* in ICUs, or the atypical virulence of *S. lugdunensis*. It is extremely important that we invest in monitoring these and other characteristics that affect the rise of these strains in the current clinical scenario.

Keywords: Coagulase-negative staphylococci, biofilm, clonal relationship, β -lactam resistance, virulence factor, PFGE, *mecA*, blood culture.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A ascensão patogênica de estafilococos coagulase-negativa

Os estafilococos são cocos Gram-positivos imóveis, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos e catalase-positivos. Aparecem predominantemente em grupos semelhantes a cachos de uva e são capazes de crescer em meio contendo 10% de cloreto de sódio [1].

Pautada por diversas reclassificações taxonômicas e renomeações de espécies, a história da descoberta dos estafilococos teve origem com os primeiros relatos de micro-organismos isolados de feridas, quando o cirurgião Ogston propôs pela primeira vez o termo “*Staphylococcus*” no final do século XIX [2–4]. Já as primeiras referências às diferentes espécies de “*Staphylococcus*” em termos de patogenicidade foram atribuídas à Rosenbach, um cirurgião alemão, a partir do estudo de diferentes micro-organismos recuperados de abscessos [5].

Em 1940, Fairbrother propôs um esquema simplificado de diferenciação para espécies estafilocócicas, separando-as em (1) estafilococos coagulase-positiva, quase que exclusivamente representado por *Staphylococcus (S.) aureus*, e (2) Estafilococos Coagulase-Negativa (ECN), com base na produção da enzima coagulase, cuja função é promover a coagulação do plasma e fluidos ricos em fibrinogênio induzindo a formação de um coágulo nas imediações das células estafilocócicas [6,7].

Além de *S. aureus*, os estafilococos coagulase-positiva isolados de humanos também incluem *S. argenteus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. coagulans* e *S. hyicus*, primordialmente caracterizados como patógenos animais, embora já tenham sido associados à doenças humanas [8].

Por muitas décadas, espécies de ECN tiveram seu potencial patogênico subestimado dentro da prática clínica diária, devido à clássica e genérica compreensão da natureza comensal e raramente virulenta desses micro-organismos. Decerto, ECN são exímios colonizadores da microbiota normal humana e, por consequência, contaminantes em potencial para espécimes clínicas, tal como hemoculturas que, quando positivas para ECN, têm sua interpretação problematizada. Nesses casos, a fronteira entre infecção e contaminação é frequentemente nebulosa enquanto tentativas de identificar um ou mais marcadores discriminativos, até agora, não tiveram sucesso [9].

Ainda assim, ECN têm emergido como patógenos oportunistas com notório impacto na saúde humana, de forma adjacente à recente evolução da medicina moderna, a qual tem

favorecido importantes mudanças demográficas – como o aumento do número de pacientes vulneráveis, a prática de terapias imunomoduladoras ou imunossupressoras e, principalmente, o uso crescente de dispositivos médicos implantáveis (DMIs) – como dispositivos de acesso venoso central, substituições totais de articulações e enxertos vasculares [4,9]. É sabido que algumas espécies de ECN estão associadas à uma ampla gama de infecções, que frequentemente se manifestam em pacientes com imunossupressão, com DMIs ou naqueles com comorbidades relevantes, incluindo diabetes mellitus ou insuficiência renal [10]. Outro grupo particularmente vulnerável inclui recém-nascidos e prematuros, acometidos por taxas de morbidade e mortalidade decorrentes, sobretudo, de quadros de sepse neonatal tardia, nos quais algumas espécies de ECN se destacam entre os principais agentes causais, atuando em 30% a 50% dessas infecções, especialmente em unidades de terapia intensiva neonatal (UTIN) [9,11,12].

O perfil causal dessas infecções, embora ainda pouco esclarecido, se dá através de fatores de virulência que, em condições específicas, atuam viabilizando a patogenicidade bacteriana [13]. Do ponto de vista terapêutico, ECN passam a representar uma ameaça, principalmente devido à produção de biofilme e à multirresistência antimicrobiana, que compõem pilares centrais da estratégia patogênica desses micro-organismos. Infecções sanguíneas por ECN associadas à inserção de dispositivos médicos na corrente sanguínea estão fortemente relacionadas à capacidade de certas linhagens formarem biofilme [14]. Um estudo multicêntrico realizado em nove países da América Latina evidenciou taxas elevadas de infecção da corrente sanguínea relacionadas a cateteres, semelhantes ao descrito para países economicamente limitados da Ásia e Oriente Médio, com espécies de ECN representando a maioria dos isolados, com 75% de resistência à oxacilina [15]. Proporções semelhantes são reforçadas por outros estudos conduzidos em regiões geográficas distintas [16–18].

Algumas linhagens de ECN ainda têm sido descritas como detentoras de um extenso repertório de genes codificadores de fatores de adesão, hemolisinas, exoenzimas e superantígenos, ao passo que as altas taxas de resistência antimicrobiana entre espécies de ECN superam a resistência à oxacilina reportada para *S. aureus* [19,20]. Com efeito, o perfil genético de virulência e resistência dessas espécies não só desafia e limita as opções terapêuticas por si só, como também parecem favorecer, indiretamente, o perfil patogênico de outras espécies estafilocócicas. Afinal, ECN atuam como importantes reservatórios genéticos, capazes de compartilhar genes, contribuindo com o aumento da resistência antimicrobiana e do potencial patogênico em espécies mais significativas do ponto de vista médico, como *S. aureus* [4].

1.2. *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus capitis* e *Staphylococcus lugdunensis*

A descrição desse grupo denominado ECN é um desafio, dado à grande variedade de espécies pertencentes a ele, com características únicas que variam em sua relevância clínica, virulência e até suscetibilidade antimicrobiana, o que requer que as espécies potencialmente patogênicas sejam ponderadas levando em conta suas particularidades, a fim de auxiliar escolhas terapêuticas em tempo hábil. No entanto, o que se observa em estudos disponíveis na literatura é uma tendência a compilar diferentes espécies em uma discussão generalizada que desconsidera as singularidades de cada uma.

Atualmente existem mais de 50 espécies diferentes de ECN descritas, e seis espécies parecem ter significado clínico mais elevado, nomeadamente *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. capitis*, *S. hominis* e *S. lugdunensis* [9]. O que se observa nessas e nas demais espécies, é uma variação na preferência por determinados sítios de colonização e infecção, além de achados clínicos muito semelhantes à quadros de infecção por estafilococos coagulase-positiva [21]. *S. saprophyticus*, por exemplo, está presente na área inguinal, enquanto *S. haemolyticus* na axila, já *S. epidermidis* pode ser coletado de todos os locais do corpo. Vários fatores influenciam na colonização da pele e mucosas humanas, além da produção de diversas substâncias que permeiam a progressão de processos infecciosos, por exemplo a produção de urease observada em *S. saprophyticus*, um patógeno capaz de causar danos teciduais, com predileção pelo trato uropoiético, que a torna uma espécie potencialmente relevante quando isolada de infecções urinárias [8].

Apesar das inúmeras diferenças descritas, a identificação correta de ECN, a nível de espécie, permanece sendo um desafio diagnóstico em muitos laboratórios devido à homologia genética e fenotípica compartilhada entre espécies estafilocócicas [21,22]. A identificação conduzida por métodos bioquímicos convencionais leva dias e frequentemente está sujeita à interpretações subjetivas [23]. Por outro lado, apesar da boa acurácia, métodos moleculares ainda podem ser relativamente caros, trabalhosos e inviáveis para a identificação de rotina em larga escala, já sistemas automatizados requerem pelo menos quatro a 12 horas para a identificação de isolados bacterianos em nível de espécie [23]. Atualmente, os sistemas automáticos, semiautomáticos e miniaturizados são os métodos bioquímicos mais utilizados para a identificação de micro-organismos, incluindo o VITEK 2, um sistema comumente utilizado em laboratórios de microbiologia clínica que, no entanto, é incapaz de distinguir diferentes espécies de ECN com eficácia [22,24]. Taxas elevadas de identificação incorreta para isolados de ECN já foram descritas, estando associadas às falhas na diferenciação entre espécies devido à grande

variabilidade da expressão de características fenotípicas nestes micro-organismos, além do metabolismo lento de certas espécies que podem levar a resultados ambíguos [25–30]. Cepas diferentes podem apresentar variações em características consideradas específicas de uma espécie e isolados obtidos de culturas antigas ou de pacientes submetidos a terapia antimicrobiana prolongada podem apresentar padrões bioquímicos atípicos [22].

Mais recentemente o sistema de ionização/dessorção a laser assistida por matriz acoplado a analisador de massas de tempo de voo (MALDI-TOF MS) foi descrito como um método proteômico rápido e preciso para a identificação de bactérias em nível de espécie, particularmente espécies de ECN, e tem sido amplamente utilizado em laboratórios microbiológicos nos últimos anos [22,31]. Com menor taxa de erro de identificação, o MALDI-TOF MS apresenta melhor desempenho que o VITEK 2, como descrito anteriormente [22,32], produzindo espectros característicos e reprodutíveis tornando o MALDI-TOF MS uma prática padrão em muitos laboratórios de microbiologia clínica em todo o mundo [33].

Apesar disso, ainda existem muitas lacunas observadas na curadoria de espécies de ECN emergentes, o presente trabalho tem como proposta central esclarecer aspectos inerentes à patogênese de três espécies de ECN, incluindo *S. hominis*, *S. capitis* e *S. lugdunensis*, pouco priorizadas em estudos científicos, principalmente no Brasil. Ainda convém destacar a já mencionada patogenicidade multi-fatorial dessas espécies, que apresentam diferenças significativas inter e intraespecífica, a exemplo de *S. lugdunensis* que usufrui de uma virulência incomumente superior à das demais espécies de ECN, como pode ser observado na Tabela 1 [34].

As espécies de *S. capitis* e *S. hominis* foram inicialmente descritas por Kloos & Schleifer em 1975, a partir de isolados da pele de indivíduos saudáveis [35]. Semelhantemente ao observado para *S. epidermidis*, cepas de *S. hominis* podem ser isoladas da pele humana com mais frequência do que outros ECN [36]. Sua incidência como agente causal de infecções da corrente sanguínea tem aumentado, ocupando o terceiro lugar dentre as espécies de ECN mais isoladas dessas infecções [36–38]. No que concerne a *S. capitis*, algumas linhagens desempenham um papel proeminente como patógenos envolvidos na sepse neonatal, impulsionado pela disseminação de cepas pertencentes ao clone *S. capitis* NRCS-A, difundido em UTIN em todo o mundo, frequentemente multirresistente, exibindo resistência ou heterorresistência à vancomicina [39–41].

Tabela 1. Principais características clínicas de *S. hominis*, *S. capitis* e *S. lugdunensis*

Espécies	Local de detecção	Associação Clínica	Referência
<i>S. hominis</i>	Axilas, braços, pernas e região púbica e inguinal	Sepse neonatal; infecção da corrente sanguínea relacionada a cateter; infecções osteoarticulares relacionadas a dispositivo; meningite; endocardite infecciosa; endoftalmite; peritonite e osteomielite.	[4,38,42–45]
<i>S. capitis</i>	Testa, couro cabeludo, orelhas e braços	Sepse neonatal; infecção da corrente sanguínea relacionada a cateter; endocardite infecciosa; infecções osteoarticulares relacionadas a dispositivo; otite externa; celulite; infecção do trato urinário; pneumonia e meningite.	[4,42,46,47]
<i>S. lugdunensis</i>	Região pélvica e perínea, região da virilha, extremidades inferiores e axilas	Endocardite infecciosa agressiva e potencialmente letal; destruição agressiva da válvula com formação de abscesso; infecção associada a dispositivo de líquido cefalorraquidiano; infecções osteoarticulares relacionadas a dispositivo; abscesso cerebral e meningite.	[4,42,48,49]

Por outro lado, o isolamento de *S. lugdunensis* a partir de amostras clínicas humanas é bem mais incomum, com índices que variam na literatura entre 0,5% a 9% das amostras positivas para ECN [50]. Todavia, alguns sistemas automatizados comerciais como o Vitek 2, podem falhar ao identificar *S. lugdunensis*, com taxa de erro chegando à 23,5% [51].

Apesar de infrequente, *S. lugdunensis* é relatado como o segundo patógeno de ECN mais comum em causa de endocardite infecciosa (EI), no que tange à métricas globais, com taxas de mortalidade relevantes e necessidade de cirurgia muito maior do que o descrito para casos de EI por *S. aureus* (70% vs. 37%) [50,52]. De fato, há um consenso sobre o status único que *S. lugdunensis* possui, ocupando uma “posição intermediária” entre *S. aureus* e os demais ECN. Tal característica também se faz evidente nas infecções de pele e de tecidos moles que, quando causadas por *S. lugdunensis*, predispõe à evolução para um quadro clínico mais grave, diferente do pressuposto para as demais espécies de ECN, porém semelhante ao reconhecido para *S. aureus* [4,50].

Em suma, o avanço tecnológico e o advento de ferramentas de pesquisa modernas nas duas últimas décadas, tem contribuído com contínuas descobertas e atualizações sobre espécies e

subespécies de ECN descritas, incluindo *S. hominis*, *S. capitis* e *S. lugdunensis*, revelando níveis distintos de potencial de virulência e levantando questionamentos com desdobramentos na prática clínica que serão discutidos a seguir.

1.3. Produção de biofilme e fatores de virulência

Um aspecto relevante entre os ECN que suscita preocupação no âmbito médico é a produção de biofilme, descrito como uma comunidade microbiana de células imersas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares, como exopolissacarídeos (EPS), DNA extracelular (e-DNA) e proteínas [53,54]. Considerado o fator de virulência mais relevante em ECN, o biofilme facilita sua adesão e colonização em dispositivos médicos internos e, eventualmente, resulta em infecções da corrente sanguínea relacionadas a cateter, que é uma das complicações mais frequentes, letais e caras, tornando-se uma causa comum de bacteremia adquirida no hospital [55,56].

Através da capacidade de adesão e colonização de superfícies bióticas e abióticas, algumas cepas resistem à resposta imune do hospedeiro e ao tratamento antimicrobiano, demandando abordagens terapêuticas específicas, incluindo a remoção do dispositivo, terapia combinada e tratamento prolongado [14,57,58]. Estima-se que a produção de biofilme torne as células bacterianas cerca de 10 a 1000 vezes mais tolerantes contra antimicrobianos em virtude da baixa atividade metabólica, baixa permeabilidade celular, e outras particularidades do processo dinâmico dessas comunidades bacterianas heterogêneas, que parecem dispor de mecanismos de resistência distintos [53,54,59]. Além disso a alta densidade de células bacterianas proporcionada pelo biofilme garante condições ideais para a troca de material genético de várias origens, favorecendo a transferência de genes de resistência entre células bacterianas [60,61].

Na formação do biofilme, a adesão intercelular é frequentemente mediada por uma molécula denominada adesina intercelular polissacarídica (PIA), também conhecida como N-acetil glucosamina polimérica (PNAG), cuja síntese ocorre através de enzimas codificadas pelo operon *icaADBC* [55,62]. O produto da codificação do gene *icaA* é a N-acetil glucosamina transferase, cuja atividade catalítica atua na conformação dos componentes de PIA, já o produto do gene *icaD* é uma proteína chaperona de *icaA*, que eleva consideravelmente sua atividade enzimática aumentando assim, a produção de oligômeros de N-acetil glucosamina [4,36,63]. O gene *icaC* codifica uma proteína transmembrana envolvida na translocação da cadeia polissacarídica para a superfície celular, além de atuar na produção de cadeias de oligômeros mais longas [56]. No entanto, foi proposto que *icaAD* também pode contribuir com a codificação

de elementos mediadores da exportação de PIA, enquanto o gene *icaC* pode estar envolvido em modificações no polissacarídeo, catalisando uma reação de O-succinilação [64]. *IcaB* tem função na codificação de uma enzima localizada na superfície celular que catalisa a desacetilação parcial de resíduos de N-acetil glucosaminil, pela qual é introduzida uma carga líquida positiva no PIA, o que faz com que o polímero se ligue de forma estável à superfície bacteriana favorecendo a formação de biofilmes mais persistentes [4,36,64].

Essas comunidades microbianas são formadas através de uma sequência de eventos bem regulados: (i) a adesão de células estafilocócicas a superfícies abióticas ou bióticas, mediada por interações inespecíficas ou específicas, respectivamente; (ii) proliferação de células e adesão intercelular, viabilizando o desenvolvimento de aglomerados de células bacterianas em multicamadas; (iii) maturação do biofilme, evidenciada por uma matriz espessa e bem estruturada, composta por uma variedade de biopolímeros, e canais que asseguram o fornecimento de oxigênio e nutrientes às células bacterianas localizadas nas camadas mais profundas do biofilme; (iv) e o desprendimento de células únicas ou aglomerados celulares que podem se disseminar pela corrente sanguínea e iniciar a colonização e a formação do biofilme em um local diferente [4,54,65]. Essa sequência de eventos é ilustrada na Figura 1.

Cada etapa envolvida no processo de estruturação do biofilme estafilocócico é rigorosamente orquestrada por fatores regulatórios, em especial pelo sistema Quorum-Sensing via gene regulador acessório (*agr* - accessory gene regulator) que concede às bactérias a capacidade de coordenar seu comportamento em resposta à densidade populacional, através da produção de moléculas sinalizadoras e seu acúmulo no espaço extracelular [56,66].

Apesar do papel bem caracterizado do locus *icaADBC* e suas vias reguladoras na produção do biofilme estafilocócico, ao longo das últimas duas décadas, estudos têm destacado mecanismos alternativos, independentes de PIA/PNAG [67,68]. Tem sido demonstrado que a matriz extracelular dos biofilmes abriga uma variedade de componentes que também promovem o desenvolvimento do biofilme, e podem ser suficientes na ausência de PIA [69,55]. Biofilmes *ica*-independentes e quimicamente diversos têm sido frequentemente relatados em algumas espécies, incluindo *S. hominis*, *S. capitis* e *S. lugdunensis*, nas quais o biofilme é predominantemente mediado por fatores proteicos, mesmo quando o locus *ica* é identificado na espécie [4,57,70,71]. Logo, uma compreensão mais profunda dos mecanismos moleculares subjacentes à formação do biofilme é necessária para desenvolver métodos preventivos eficientes [65].

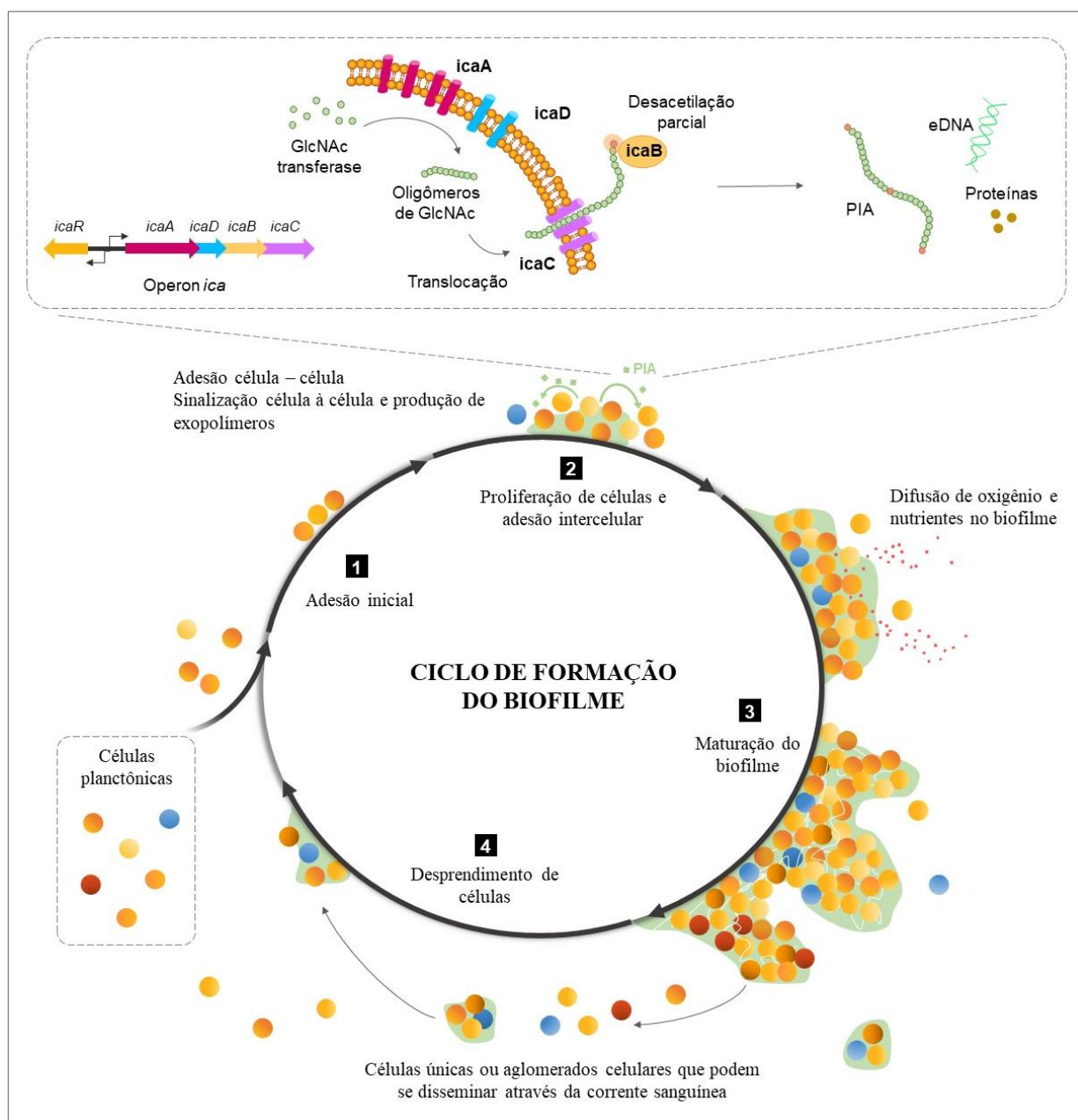


Figura 1. Ilustração do ciclo de formação do biofilme bacteriano. GlcNAc: N-acetilglucosamina (componente-chave do peptidoglicano da parede celular bacteriana); eDNA: DNA extracelular; PIA: adesina intercelular polissacarídica.

Em *S. hominis*, a produção de biofilme é comumente relatada como variável, com perfis diferentes encontrados em cepas oriundas de sítios de isolamento distintos, como pressuposto para isolados do sangue que podem se valer do carácter estratégico do biofilme no acesso à corrente sanguínea [57]. Em *S. capitis* também é relatado um fenótipo de biofilme de natureza heterogênea, frequentemente diferente da formação clássica de biofilme mediado por PIA [72]. Ademais, linhagens pertencentes ao clone *S. capitis* NRCS-A, difundido em UTINs em todo o

mundo, têm sido investigadas quanto à sua capacidade de expressar biofilme sob condições específicas encontradas em UTIN, favorecendo sua persistência no ambiente e tornando-se importantes ameaças de sepse neonatal tardia [73,74].

Dados disponíveis na literatura assumem que *S. lugdunensis* também é uma espécie produtora de biofilme, detentora de uma crescente lista de fatores proteicos que possuem papel importante no desenvolvimento e na integridade estrutural dessas comunidades microbianas, cujas implicações afetam diretamente no manejo clínico e cirúrgico de infecções ósseas e articulares [34,71,75–79]. Outrossim, foram caracterizados dois fatores de virulência envolvidos na adesão inicial de *S. lugdunensis* aos tecidos do hospedeiro, sendo eles (i) a proteína de ligação do fator de von Willebrand (vWbl) e (ii) a proteína de ligação do fibrinogênio (Fbl), que parecem atuar em conjunto à outras proteínas de superfície, para promover a adesão celular, além de estarem possivelmente associadas a tendências maiores de virulência [71,80–83].

A dinâmica por trás da estruturação do biofilme estafilocócico tem sido estudada, evidenciando novas proteínas suficientemente capazes de articularem a formação de biofilmes *in vitro* [72,84–86]. Rohde e colaboradores relataram cepas de *S. epidermidis* produtoras de biofilmes independentes de PIA, em parte mediados pela proteína associada ao acúmulo (Aap), ancorada à parede celular [86]. Apesar da notável proximidade filogenética entre *S. epidermidis* e *S. capitis*, o gene *aap* não é carregado por *S. capitis*, em vez disso, foi descrito o gene *pls* que codifica a proteína sensível à plasmina (Pls), provável contribuinte para a natureza proteica dos biofilmes dessa espécie, promovendo a interação célula-célula além de compartilhar domínio e homologia de sequência com o gene *aap* [87,88].

A formação de biofilmes de *S. epidermidis* ainda pode envolver muitas outras proteínas, como a proteína de ligação à matriz extracelular (Embp), proteína associada a biofilme (Bap), e a autolisina bifuncional, AtlE, que já demonstrou ser importante para a adesão inicial à superfícies poliméricas além de proteínas de ligação à fibronectina [87,88]. No entanto, os mecanismos moleculares ativos na adesão à superfície em *S. capitis* são menos compreendidos [88]. Um estudo descreveu a proteína associada à superfície celular, SdrX, como a primeira proteína MSCRAMM (molécula de adesão a superfície da matriz adesiva) identificada em *S. capitis*, atuando na adesão ao colágeno e fibrinogênio [89]. Ademais, homólogos de AtlE e de proteínas de ligação à fibronectina como Fbe e Ebh já foram descritos, no entanto, o papel dessas proteínas na adesão de *S. capitis* precisa ser melhor investigado [88].

Em *S. hominis* a matriz extracelular parece ser composta de um equilíbrio entre proteínas, eDNA e polissacarídeos, no entanto o estudo da caracterização dos fatores proteicos envolvidos na formação do biofilme dessa espécie é muito restrito, quase inexistente [57].

Em *S. lugdunensis* as proteínas Isd (iron-regulated surface determinant), assim como a autolisina AtlL, contribuem para a formação do biofilme, sendo essa última necessária também para a invasão de células epiteliais [90]. *S. lugdunensis* ainda coleciona uma somatória de outros fatores potencialmente capazes de contribuir com a patogênese de infecções invasivas mais graves, dentre eles as hemolisinas putativas, como β -hemolisina e a hemolisina III, além das hemolisinas sinérgicas citolíticas denominadas SLUSH (*Staphylococcus lugdunensis* synergistic haemolysin), que operam em ação combinada com os sistemas de transporte de heme, permitindo a obtenção de ferro nutricional a partir dos eritrócitos do hospedeiro [90–93]. Parte desse repertório de potenciais fatores de virulência em *S. lugdunensis* é resumido na Tabela 2.

Tabela 2. Fatores de virulência associados a *S. lugdunensis*

Fator associado à virulência	Comentário(s)	Referência
β -hemolisina	Homólogo à β -hemolisina, esfingomielinase de <i>S. aureus</i>	[94,95]
hemolisina III	Homólogo à hemolisina III de <i>Bacillus cereus</i>	[95,96]
SLUSH	Três peptídeos hemolíticos sinérgicos com atividade semelhante à delta-toxina; Pertence ao grupo das modulinas solúveis em fenol (PSMs); Atua em sinergia com a β -toxina para lisar eritrócitos	[95,97–99]
Fbl	Proteína ancorada à parede celular, da família MSCRAMM, intimamente relacionada com ClfA de <i>S. aureus</i> ; Expressão <i>in vitro</i> associada a isolados infecciosos	[95,100]
vWbl	MSCRAMM; Promoção de adesão ao fator de von Willebrand (vWF) não confirmado.	[81,95,101]

Os estafilococos podem ainda produzir um grupo de toxinas com propriedades superantigênicas, que incluem a toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) e enterotoxinas estafilocócicas (SEs) [102], capazes de induzir uma resposta policlonal inespecífica de células T, deflagrando em toxicidade sistêmica e supressão da resposta imune adaptativa [103–105].

As SEs foram nomeadas com base em suas atividades eméticas após a administração oral em modelo animal primata [103]. No entanto o Comitê Internacional de Nomenclatura dos Superantígenos Estafilocócicos determina que apenas superantígenos capazes de induzir êmese

sejam caracterizados como SEs [106]. Deste modo, várias SEs foram classificadas como enterotoxinas estafilocócicas - *like* (SEL), nas quais as propriedades eméticas *in vivo* são ausentes ou ainda não foram testadas [103,106,107]. No total, 24 tipos de enterotoxinas já foram reportadas, codificadas por uma família de genes que abrange: *sea, seb, sec, sed, see, seg, seh, sei, selj, sek, sel, sem, sen, seo, sep, seq, ser, ses, set, selu, selv, selw, selx* e *sely*. A Toxina da Síndrome do Choque Tóxico-1 (TSST-1) mediada pelo gene *tst* foi inicialmente denominada SEF (Enterotoxina Estafilocócica F) e mais tarde renomeada [108,109].

Todos os genes que codificam toxinas estão localizados em elementos genéticos móveis, incluindo bacteriófagos, ilhas de patogenicidade (SaPI) e plasmídeos favorecendo a transferência horizontal entre cepas estafilocócicas enterotoxigênicas [110]. No entanto, a estrutura desses elementos genéticos dentro dos genomas de ECN bem como a expressão desses genes carece de elucidação.

Outro componente relevante da virulência estafilocócica é a presença de algumas toxinas bacterianas citolíticas que formam poros na membrana celular do hospedeiro, levando ao efluxo de moléculas vitais e metabólitos [111]. Estas toxinas citolíticas produzidas por estafilococos, também descritas como hemolisinas, incluem as toxinas alfa (α), beta (β), delta (δ) e gama (γ). Entre ECN a capacidade de produção de toxinas α e β é pouco descrita, enquanto a hemolisina δ parece ser produzida pela maioria das espécies [112].

1.4. Resistência antimicrobiana

Isolados de ECN têm causado infecções clinicamente mais significativas principalmente quando associados à resistência a antibióticos β -lactâmicos semissintéticos, como a meticilina [113]. No Brasil, cerca de 70% a 90% dos ECN isolados apresentam resistência à oxacilina [114], a qual é, majoritariamente, mediada por uma proteína de ligação à penicilina alterada, denominada PBP2a (PBP2'), que exibe uma baixa afinidade para a maioria das penicilinas semi-sintéticas, como meticilina, nafcilina e oxacilina, bem como para a maioria das cefalosporinas [115]. A PBP2a é codificada pelo gene *mecA*, inserido em um cassete móvel dentro do DNA cromossômico, denominado Cassete Cromossômico Estafilocócico *mec* (SCC*mec*) [115]. A aquisição e inserção desses elementos genéticos móveis nos cromossomos de cepas suscetíveis é o que permite a ampla disseminação do gene *mecA* entre muitas espécies estafilocócicas constatada nos dias atuais [116].

O SCC*mec* é um elemento genético móvel de 21 a 60 kb, apresenta alta variabilidade em sua organização estrutural e em seu conteúdo genético, sendo classificado em tipos e subtipos,

de acordo com diferentes combinações dos componentes de suas sequências, incluindo três elementos básicos: (i) o complexo do gene *mec*, contendo o gene *mec* (*mecA*, *mecB*, *mecC* e/ou *mecD*), seus elementos reguladores que controlam sua expressão e as sequências de inserção associadas; (ii) o complexo do gene *ccr*, composto pelos genes *ccr*, codificantes de recombinases específicas (*ccr* - cassette chromosome recombinase) que mediam a integração e excisão de *SCCmec* no cromossomo; (iii) e as regiões de junção (regiões J), componentes não essenciais do cassette cromossômico, constituídos por pseudogenes, regiões não codificantes e elementos genéticos móveis que podem abrigar determinantes adicionais de resistência antimicrobiana. Regiões J variáveis dentro do mesmo complexo *mec-ccr* são definidoras dos subtipos de *SCCmec* [115,116]. A Figura 2 ilustra os componentes estruturais dos complexos *SCCmec*.

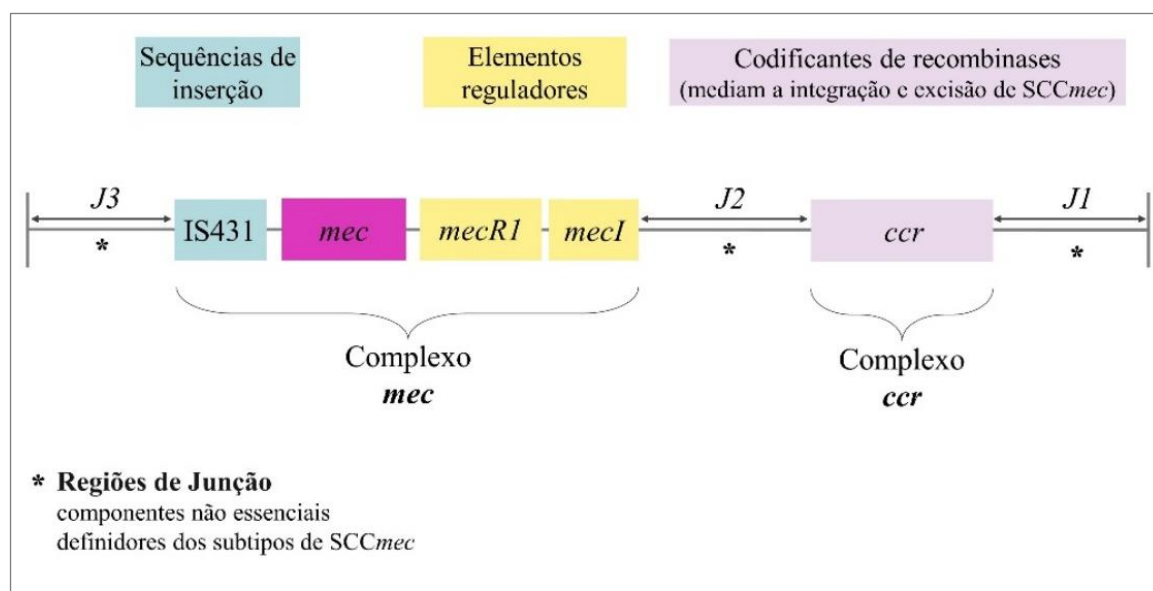


Figura 2. Ilustração da estrutura básica dos complexos *SCCmec* e seus elementos incluindo o complexo gênico *mec* composto pelo gene *mecA*, os genes reguladores (*mecR1* e *mecI*) e as sequências de inserção (IS) associadas, o complexo gênico *ccr* com codificantes de recombinases, e as regiões de junção (J1, J2 e J3).

Até o momento, 14 tipos de *SCCmec* foram oficialmente relatados e confirmados pelo Grupo de Trabalho Internacional sobre a Classificação de Elementos Cromossômicos de Cassetes Estafilocócicos (IWG-SCC) [20]. Pelo que se tem registro, os elementos *SCCmec* são mais diversos em cepas de ECN, com novas variantes de genes *ccr* sendo continuamente relatadas [38,117]. Nesse sentido, a tipagem dos elementos *SCCmec* é altamente recomendada por revelar a alta diversidade genética nesses isolados [4].

Frequentemente, a resistência à meticilina está associada à fenótipos de suscetibilidade reduzida a outros grupos de antibióticos, incluindo macrolídeos, lincosamidas, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e sulfonamidas, o que requer o uso de antibióticos de segunda linha, como vancomicina, daptomicina ou linezolida, ressaltando a importância de um monitoramento continuado desses isolados clínicos [118,119]. Não obstante, a resistência adicional à glicopeptídeos e oxazolidinonas têm sido relatadas em uma frequência crescente [118,120].

Em cepas de *S. lugdunensis* o perfil de sensibilidade antimicrobiana é mais conservado se comparada às demais espécies de ECN [121–123], no entanto, a proporção de suscetibilidade geral dessa espécie reduziu em 23% entre os anos de 1993 e 2010 [124].

As diretrizes mais utilizadas na interpretação dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos são as do documento M100 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), embora, em 2019, o governo brasileiro tenha definido as diretrizes do BrCAST/EUCAST (Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos) como padrão nacional [125]. Em estudo recente, Perez et al. (2020) [125] revelaram concordância aceitável entre CLSI e BrCAST/EUCAST para ECN, com concordância quase perfeita, exceto para cefoxitina e gentamicina. Foi relatado que a determinação da suscetibilidade à oxacilina em ECN tem muitas armadilhas nas duas diretrizes [125]. Para a determinação da resistência à oxacilina para *Staphylococcus* spp. ambas as metodologias indicam o uso do disco de cefoxitina, no entanto a adoção de uma diretriz em detrimento da outra, pode levar à certas mudanças relevantes nos perfis de suscetibilidade epidemiológica [125].

1.5. Epidemiologia molecular

Até o momento, estudos concentrados em elucidar a diversidade clonal em isolados clínicos de ECN são raros e, majoritariamente, direcionados às cepas de *S. epidermidis* [126–129]. É importante ressaltar a necessidade de compreender a distribuição de clones e as relações evolutivas de espécies estafilocócicas com relevância clínica, de modo a fortalecer as abordagens de diagnóstico e de controle de infecções locais [130].

A disseminação clonal de ECN, especialmente de cepas envolvidas em infecções relacionadas a cateteres, já foi documentada dentro de setores hospitalares específicos e entre setores diferentes [131–134]. Alguns clones podem ser endêmicos no ambiente hospitalar, nesses casos, múltiplas forças seletivas podem favorecer a persistência dessas linhagens, incluindo a resistência antimicrobiana e a produção de biofilme [133].

Ferramentas de epidemiologia molecular adequadas têm contribuído na busca por essas respostas. O Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) tem sido aplicado no estudo de clonalidade local de cepas bacterianas e tem se mostrado eficiente na identificação de perfis estafilocócicos [135]. Ademais, o Multilocus Sequence Typing (MLST) tem sido comumente usado na genotipagem bacteriana com base no sequenciamento de fragmentos internos de genes *housekeeping*, gerando resultados inequívocos diretamente comparáveis entre laboratórios [130]. Ambas as técnicas são úteis no acompanhamento da epidemiologia global e local, permitindo inferir a origem e o perfil das linhagens circulantes. No entanto, a execução dessas técnicas envolve alto custo, o que limita muito a sua utilização no estudo de surtos em hospitais.

Todo esse arsenal de técnicas, juntamente a outras ferramentas também necessárias, fornece dados essenciais para o rastreamento de surtos e auxiliam na identificação de fontes de colonização e na distinção entre cepas comunitárias e hospitalares.

Nesse sentido, destacamos a importância de análises mais profundas que caracterizem a evolução, bem como a atual conjuntura, do perfil epidemiológico molecular de resistência e virulência dessas espécies emergentes que, sem dúvida, fornecerão dados valiosos na projeção de novas estratégias de controle à disseminação dessas bactérias potencialmente nocivas que, em hospitais, representam uma questão clínica importante. As infecções oportunistas causadas por ECN, favorecidas pela prática médica moderna, aliadas ao conhecimento científico ainda raso sobre os seus aspectos patogênicos, suscitam consequências clínicas que podem determinar a rotina diária em hospitais, contribuir com a morbidade, mortalidade e custos socioeconômicos, além de representarem um problema médico não resolvido com tendência a continuar aumentando no futuro [65].

2. REFERÊNCIAS

1. Koneman, E.W., S.D.A.W.M.J.P.C.S. and W.C.W.J. *Diagnóstico Microbiológico / Texto e Atlas*; 7th ed.; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2018;
2. Billroth, T. Untersuchungen Über Die Vegetations formen von Coccobacteria Septica Und Den Antheil, Welchen Sie an Der Entstehung Und Verbreitung Der Accidentellen Wundkrankheiten Haben : Versuch Einer Wissenschaftlichen Kritik Der Verschiedenen Methoden Antiseptischer Wundbehandlung. **1874**.
3. Ogston, A. Micrococcus Poisoning. *J Anat Physiol* **1882**, *17*, 24.
4. Becker, K.; Heilmann, C.; Peters, G. Coagulase-Negative Staphylococci. **2014**, *27*, 870–926, doi:10.1128/CMR.00109-13.
5. Rosenbach, A.J.F. Mikroorganismen Bei Den Wundinfektionskrankheiten Des Menschen.
6. Fairbrother, R.W. Coagulase Production as a Criterion for the Classification of the Staphylococci. *J Pathol Bacteriol* **1940**, *50*, 83–88, doi:10.1002/PATH.1700500112.
7. Trabulsi, L.R.; Alterthum, F. Microbiologia - Trabulsi. *Microbiologia* **2015**, 577–584.
8. Fontana, C.; Favaro, M. Coagulase-Positive and Coagulase-Negative Staphylococci in Human Disease. In *Pet-to-Man Travelling Staphylococci: A World in Progress*; Elsevier, **2018**, 25–42, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813547-1.00003-0>.
9. Michels, R.; Last, K.; Becker, S.L.; Papan, C. Update on Coagulase-Negative Staphylococci—What the Clinician Should Know. *Microorganisms* **2021**, *9*, doi:10.3390/microorganisms9040830.
10. Piette, A.; Verschraegen, G. Role of Coagulase-Negative Staphylococci in Human Disease. *Vet Microbiol* **2009**, *134*, 45–54, doi: 10.1016/J.VETMIC.2008.09.009.
11. Escalante, M.J.; Ceriani-Cernadas, J.M.; D'Apremont, I.; Bancalari, A.; Webb, V.; Genes, L.; Villarroel, L.; Munoz, E.; Tapia, J.L.; Pedraza, A.; et al. Late Onset Sepsis in Very Low Birth Weight Infants in the South American NEOCOSUR Network. *Pediatric Infectious Disease Journal* **2018**, *37*, 1022–1027, doi:10.1097/INF.0000000000001958.
12. Wójkowska-Mach, J.; Chmielarczyk, A.; Strus, M.; Lauterbach, R.; Heczko, P. Neonate Bloodstream Infections in Organization for Economic Cooperation and Development Countries: An Update on Epidemiology and Prevention. *J Clin Med* **2019**, *8*, doi:10.3390/jcm8101750.
13. Argemi, X.; Hansmann, Y.; Prola, K.; Pr, G. Coagulase-Negative Staphylococci Pathogenomics. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, 1–19, doi:10.3390/ijms20051215.
14. Becker, K.; Both, A.; Weißelberg, S.; Heilmann, C.; Rohde, H. Emergence of Coagulase-Negative Staphylococci. *Expert Rev Anti Infect Ther* **2020**, *18*, 349–366, doi:10.1080/14787210.2020.1730813.

15. Rosenthal, V.D.; Chaparro, G.J.; Servolo-Medeiros, E.A.; Souza-Fram, D.; Escudero, D.V.D.S.; Gualtero-Trujillo, S.M.; Morfin-Otero, R.; Gonzalez-Diaz, E.; Rodriguez-Noriega, E.; Altuzar-Figueroa, M.A.; *et al.* An Eight-Year Multicenter Study on Short-Term Peripheral Intravenous Catheter-Related Bloodstream Infection Rates in 100 Intensive Care Units of 9 Countries in Latin America: Argentina, Brazil, Colombia, Costa Rica, Dominican Republic, Ecuador, Mexico, Pa. *Infect Control Hosp Epidemiol* **2021**, *42*, 1098–1104, doi:10.1017/ICE.2020.1373.
16. Wisplinghoff, H.; Bischoff, T.; Tallent, S.M.; Seifert, H.; Wenzel, R.P.; Edmond, M.B. Nosocomial Bloodstream Infections in US Hospitals: Analysis of 24,179 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. *Clinical Infectious Diseases* **2004**, *39*, 309–317, doi: 10.1086/421946/2/39-3-309-TBL003.GIF.
17. Ott, E.; Saathoff, S.; Graf, K.; Schwab, F.; Chaberny, I.F. The Prevalence of Nosocomial and Community Acquired Infections in a University Hospital: An Observational Study. *Dtsch Arztebl Int* **2013**, *110*, 533, doi:10.3238/ARZTEBL.2013.0533.
18. Marra, A.R.; Camargo, L.F.A.; Pignatari, A.C.C.; Sukiennik, T.; Behar, P.R.P.; Medeiros, E.A.S.; Ribeiro, J.; Girão, E.; Correa, L.; Guerra, C.; *et al.* Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Hospitals: Analysis of 2,563 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. *J Clin Microbiol* **2011**, *49*, 1866–1871, doi:10.1128/JCM.00376-11.
19. Argemi, X.; Hansmann, Y.; Prola, K.; Prévost, G. Molecular Sciences Coagulase-Negative Staphylococci Pathogenomics. **2019**, doi:10.3390/ijms20051215.
20. Saber, H.; Jasni, A.S.; Jamaluddin, T.Z.M.T.; Ibrahim, R. A Review of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) Types in Coagulase-Negative Staphylococci (CoNS) Species. *Malaysian Journal of Medical Sciences* **2017**, *24*, 7–18, doi:10.21315/mjms2017.24.5.2.
21. Natsis, N.E.; Cohen, P.R. Coagulase-Negative *Staphylococcus* Skin and Soft Tissue Infections. *Am J Clin Dermatol* **2018**, *19*, 671–677, doi:10.1007/s40257-018-0362-9.
22. Martins, K.B.; Ferreira, A.M.; Mondelli, A.L.; Rocchetti, T.T.; Lr De S Da Cunha, M. De Evaluation of MALDI-TOF VITEK®MS and VITEK® 2 System for the Identification of *Staphylococcus Saprophyticus*. *Future Microbiol* **2018**, *13*, 1603–1609, doi:10.2217/fmb-2018-0195.
23. Wattal, C.; Oberoi, J.K.; Goel, N.; Raveendran, R.; Khanna, S. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) for Rapid Identification of Micro-Organisms in the Routine Clinical Microbiology Laboratory. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **2017**, *36*, 807–812, doi:10.1007/s10096-016-2864-9.
24. Buszewski, B.; Rogowska, A.; Pomastowski, P.; Złoch, M.; Railean-Plugaru, V. Identification of Microorganisms by Modern Analytical Techniques. *JAOAC Int* **2017**, *100*, 1607–1623.

25. Monteiro, A.C.M.; Fortaleza, C.M.C.B.; Ferreira, A.M.; Cavalcante, R. de S.; Mondelli, A.L.; Bagagli, E.; Cunha, M. de L.R. de S. Comparison of Methods for the Identification of Microorganisms Isolated from Blood Cultures. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **2016**, *15*, doi:10.1186/s12941-016-0158-9.
26. Funke, G.; Funke-Kissling, P. Performance of the New VITEK 2 GP Card for Identification of Medically Relevant Gram-Positive Cocci in a Routine Clinical Laboratory. *J Clin Microbiol* **2005**, *43*, 84–88, doi:10.1128/JCM.43.1.84-88.2005.
27. Ligozzi, M.; Bernini, C.; Bonora, M.G.; De Fatima, M.; Zuliani, J.; Fontana, R. Evaluation of the VITEK 2 System for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Medically Relevant Gram-Positive Cocci. *J Clin Microbiol* **2002**, *40*, 1681–1686, doi:10.1128/JCM.40.5.1681-1686.2002.
28. Delmas, J.; Chacornac, J.P.; Robin, F.; Giammarinaro, P.; Talon, R.; Bonnet, R. Evaluation of the Vitek 2 System with a Variety of *Staphylococcus* Species. *J Clin Microbiol* **2008**, *46*, 311–313, doi:10.1128/JCM.01610-07.
29. Kim, M.; Heo, S.R.; Choi, S.H.; Kwon, H.; Park, J.S.; Seong, M.W.; Lee, D.H.; Park, K.U.; Song, J.; Kim, E.C. Comparison of the MicroScan, VITEK 2, and Crystal GP with 16S RRNA Sequencing and MicroSeq 500 v2.0 Analysis for Coagulase-Negative Staphylococci. *BMC Microbiol* **2008**, *8*, doi:10.1186/1471-2180-8-233.
30. Weinstein, M.P.; Mirrett, S.; Van Pelt, L.; Mckinnon, M.; Zimmer, B.L.; Kloos, W.; Barth Reller, A.L. Clinical Importance of Identifying Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Blood Cultures: Evaluation of MicroScan Rapid and Dried Overnight Gram-Positive Panels versus a Conventional Reference Method. *J Clin Microbiol* **1998**, *36*, doi: 10.1128/JCM.36.7.2089-2092.1998. PMID: 9650970; PMCID: PMC104986.
31. Alizadeh, M.; Yousefi, L.; Pakdel, F.; Ghotaslou, R.; Rezaee, M.A.; Khodadadi, E.; Oskouei, M.A.; Soroush Barhaghi, M.H.; Kafil, H.S. MALDI-TOF Mass Spectroscopy Applications in Clinical Microbiology. *Adv Pharmacol Pharm Sci* **2021**, *2021*, doi: 10.1155/2021/9928238.
32. Guo, L.; Ye, L.; Zhao, Q.; Ma, Y.; Yang, J.; Luo, Y. Comparative Study of MALDI-TOF MS and VITEK 2 in Bacteria Identification. *J Thorac Dis* **2014**, *6*, 534–538, doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2014.02.18.
33. Bourassa, L.; Butler-Wu, S.M. MALDI-TOF Mass Spectrometry for Microorganism Identification. In *Methods in Microbiology*; Academic Press Inc., **2015**, *42*, 37–85, <https://doi.org/10.1016/bs.mim.2015.07.003>
34. Argemi, X.; Hansmann, Y.; Riegel, P.; Prévost, G. Is *Staphylococcus lugdunensis* Significant in Clinical Samples? *J Clin Microbiol* **2017**, *55*, 3167, doi:10.1128/JCM.00846-17.
35. Schleifer, K.H.; Kloos, W.E. Isolation and Characterization of Staphylococci from Human Skin. *Int J Syst Bacteriol* **1975**, *25*, 50–61, doi:10.1099/00207713-25-1-62.

36. Szemraj, M.; Grazul, M.; Balcerzak, E.; Szewczyk, E.M. Staphylococcal Species Less Frequently Isolated from Human Clinical Specimens - Are They a Threat for Hospital Patients? *BMC Infect Dis* **2020**, *20*, 1–10, doi:10.1186/s12879-020-4841-2.
37. Villarreal-Salazar, V.; Bocanegra-Ibarias, P.; Villarreal-Treviño, L.; Salas-Treviño, D.; Morfin-Otero, R.; Camacho-Ortiz, A.; Flores-Treviño, S. Improvement of Antimicrobial Susceptibility Testing in Biofilm-Growing coagulase-Negative *Staphylococcus hominis*. *J Microbiol Methods* **2022**, *198*, doi: 10.1016/j.mimet.2022.106493.
38. Szczuka, E.; Krzyminska, S.; Bogucka, N.; Kaznowski, A. Multifactorial Mechanisms of the Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus hominis* Isolated from Bloodstream Infections. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2018**, *111*, 1259–1265, doi:10.1007/S10482-017-1007-3.
39. Laurent, F.; Butin, M. *Staphylococcus capitis* and NRCS-A Clone: The Story of an Unrecognized Pathogen in Neonatal Intensive Care Units. *Clinical Microbiology and Infection* **2019**, *25*, 1081–1085, doi: 10.1016/j.cmi.2019.03.009.
40. D’Mello, D.; Daley, A.J.; Rahman, M.S.; Qu, Y.; Garland, S.; Pearce, C.; Deighton, M.A. Vancomycin Heteroresistance in Bloodstream Isolates of *Staphylococcus capitis*. *J Clin Microbiol* **2008**, *46*, 3124–3126, doi:10.1128/JCM.00592-08.
41. Rasigade, J.P.; Raulin, O.; Picaud, J.C.; Tellini, C.; Bes, M.; Grando, J.; Saïd, M. Ben; Claris, O.; Etienne, J.; Tigaud, S.; et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus capitis* with Reduced Vancomycin Susceptibility Causes Late-Onset Sepsis in Intensive Care Neonates. *PLoS One* **2012**, *7*, doi: 10.1371/journal.pone.0031548.
42. Azimi, T.; Mirzadeh, M.; Sabour, S.; Nasser, A.; Fallah, F.; Pourmand, M.R. Coagulase-Negative Staphylococci (CoNS) Meningitis: A Narrative Review of the Literature from 2000 to 2020. *New Microbes New Infect* **2020**, *37*, doi: 10.1016/j.nmni.2020.100755.
43. Vanzato Palazzo, I.C.; d’Azevedo, P.A.; Secchi, C.; Pignatari, A.C.C.; da Costa Darini, A.L. *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* Strains Causing Nosocomial Bloodstream Infection in Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2008**, *62*, 1222–1226, doi:10.1093/jac/dkn375.
44. Uddin, O.; Hurst, J.; Alkayali, T.; Schmalzle, S.A. *Staphylococcus hominis* Cellulitis and Bacteremia Associated with Surgical Clips. *IDCases* **2022**, *27*, doi: 10.1016/j.idcr.2022.e01436.
45. Aykut, A.; Sevik, M.O.; Şan, B.; Şahin, Ö. *Staphylococcus hominis*: A Rare Cause of Endophthalmitis. *Arq Bras Oftalmol* **2022**, *86*, 1–3, doi:10.5935/0004-2749.20230035.
46. Al Hennawi, H.E.T.; Mahdi, E.M.; Memish, Z.A. Native Valve *Staphylococcus capitis* Infective Endocarditis: A Mini Review. *Infection* **2020**, *48*, 3–5, doi:10.1007/s15010-019-01311-8.
47. Tevell, S.; Baig, S.; Hellmark, B.; Martins Simoes, P.; Wirth, T.; Butin, M.; Nilsson-Augustinsson, Å.; Söderquist, B.; Stegger, M. Presence of the Neonatal *Staphylococcus*

- capitis* Outbreak Clone (NRCS-A) in Prosthetic Joint Infections. *Sci Rep* **2020**, *10*, 1–8, doi:10.1038/s41598-020-79225-x.
48. Anguera, I.; Del Río, A.; Miró, J.M.; Matínez-Lacasa, X.; Marco, F.; Gumá, J.R.; Quaglio, G.; Claramonte, X.; Moreno, A.; Mestres, C.A.; et al. *Staphylococcus lugdunensis* Infective Endocarditis: Description of 10 Cases and Analysis of Native Valve, Prosthetic Valve, and Pacemaker Lead Endocarditis Clinical Profiles. *Heart* **2005**, *91*, 1–7, doi:10.1136/hrt.2004.040659.
 49. Garoon, R.B.; Miller, D.; Flynn, H.W. Acute-Onset Endophthalmitis Caused by *Staphylococcus lugdunensis*. *Am J Ophthalmol Case Rep* **2018**, *9*, 28–30, doi: 10.1016/j.ajoc.2017.12.006.
 50. Parthasarathy, S.; Shah, S.; Raja Sager, A.; Rangan, A.; Durugu, S. *Staphylococcus lugdunensis*: Review of Epidemiology, Complications, and Treatment. *Cureus* **2020**, *12*, 6–13, doi:10.7759/cureus.8801.
 51. Mateo, M.; Maestre, J.R.; Aguilar, L.; Cafini, F.; Puente, P.; Sánchez, P.; Alou, L.; Giménez, M.J.; Prieto, J. Genotypic versus Phenotypic Characterization, with Respect to Susceptibility and Identification, of 17 Clinical Isolates of *Staphylococcus lugdunensis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2005**, *56*, 287–291, doi:10.1093/jac/dki227.
 52. Petti, C.A.; Simmon, K.E.; Miro, J.M.; Hoen, B.; Marco, F.; Chu, V.H.; Athan, E.; Bukovski, S.; Bouza, E.; Bradley, S.; et al. Genotypic Diversity of Coagulase-Negative Staphylococci Causing Endocarditis: A Global Perspective. *J Clin Microbiol* **2008**, *46*, 1780–1784, doi:10.1128/JCM.02405-07.
 53. Sharma, D.; Misba, L.; Khan, A.U. Antibiotics versus Biofilm: An Emerging Battleground in Microbial Communities. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* **2019**, *8*, 1–10, doi:10.1186/S13756-019-0533-3.
 54. Otto, M. Staphylococcal Biofilms. *Microbiology spectrum*, **2018**, *6*, doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0023-2018.
 55. França, A.; Gaio, V.; Lopes, N.; Melo, D.R. Virulence Factors in Coagulase-Negative Staphylococci. *Pathogens (Basel, Switzerland)* **2021**, *10* doi: 10.3390/pathogens10020170
 56. Schilcher, K.; Horswill, A.R. Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. *Microbiology and molecular biology reviews* **2020**, *84* doi: 10.1128/MMBR.00026-19
 57. Mendoza-Olazarán, S.; Morfin-Otero, R.; Villarreal-Trevino, L.; Rodriguez-Noriega, E.; Llaca-Diaz, J.; Camacho-Ortiz, A.; González, G.M.; Casillas-Vega, N.; Garza-González, E. Antibiotic Susceptibility of Biofilm Cells and Molecular Characterisation of *Staphylococcus hominis* Isolates from Blood. *PLoS One* **2015**, *10*, 1–13, doi: 10.1371/journal.pone.0144684.
 58. Costerton, J.W.; Stewart, P.S.; Greenberg, E.P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* **1999**, *284*, 1318–1322, doi:10.1126/SCIENCE.284.5418.1318.

59. Hogan, D.; Kolter, R. Why Are Bacteria Refractory to Antimicrobials? *Curr Opin Microbiol* **2002**, *5*, 472–477, doi:10.1016/S1369-5274(02)00357-0.
60. Águila-Arcos, S.; Álvarez-Rodríguez, I.; Garaiurrebaso, O.; Garbisu, C.; Grohmann, E.; Alkorta, I. Biofilm-Forming Clinical *Staphylococcus* Isolates Harbor Horizontal Transfer and Antibiotic Resistance Genes. *Front Microbiol* **2017**, *8*, 2018, doi:10.3389/FMICB.2017.02018/BIBTEX.
61. Savage, V.J.; Chopra, I.; O'Neill, A.J. *Staphylococcus aureus* Biofilms Promote Horizontal Transfer of Antibiotic Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **2013**, *57*, 1968, doi:10.1128/AAC.02008-12.
62. Suja, K.R.S.; Sheela, P.; Jyothis, S.; Radhakrishnan, E.K. Virulence Factors Associated with Coagulase Negative Staphylococci Isolated from Human Infections. *3 Biotech* **2017**, *7*, 1–10, doi:10.1007/s13205-017-0753-2.
63. Gerke, C.; Kraft, A.; Süßmuth, R.; Schweitzer, O.; Götz, F. Characterization of the N-Acetylglucosaminyltransferase Activity Involved in the Biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* Polysaccharide Intercellular Adhesin. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 18586–18593, doi:10.1074/jbc.273.29.18586.
64. Nguyen, H.T.T.; Nguyen, T.H.; Otto, M. The Staphylococcal Exopolysaccharide PIA – Biosynthesis and Role in Biofilm Formation, Colonization, and Infection. *Comput Struct Biotechnol J* **2020**, *18*, 3324–3334, doi: 10.1016/j.csbj.2020.10.027.
65. Heilmann, C.; Ziebuhr, W.; Becker, K. Are Coagulase-Negative Staphylococci Virulent? *Clin Microbiol Infect* **2019**, *25*, 1071–1080, doi: 10.1016/J.CMI.2018.11.012.
66. Vuong, C.; Kocianova, S.; Yao, Y.; Carmody, A.B.; Otto, M. Increased Colonization of Indwelling Medical Devices by Quorum-Sensing Mutants of *Staphylococcus epidermidis* in Vivo. *Journal of Infectious Diseases* **2004**, *190*, 1498–1505, doi:10.1086/424487.
67. Kogan, G.; Sadvovskaya, I.; Chaignon, P.; Chokr, A.; Jabbouri, S. Biofilms of Clinical Strains of *Staphylococcus* That Do Not Contain Polysaccharide Intercellular Adhesin. *FEMS Microbiol Lett* **2006**, *255*, 11–16, doi:10.1111/j.1574-6968.2005.00043. x.
68. Gara, J.P.O. Ica and beyond: Biofilm Mechanisms and Regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. **2007**, *270*, 179–188, doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00688.x.
69. Arciola, C.R.; Campoccia, D.; Speziale, P.; Montanaro, L.; Costerton, J.W. Biofilm Formation in *Staphylococcus* Implant Infections. A Review of Molecular Mechanisms and Implications for Biofilm-Resistant Materials. *Biomaterials* **2012**, *33*, 5967–5982, doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.05.031.
70. Szczuka, E.; Telega, K.; Kaznowski, A. Biofilm Formation by *Staphylococcus hominis* Strains Isolated from Human Clinical Specimens. *Folia Microbiol (Praha)* **2015**, *60*, 1–5, doi:10.1007/s12223-014-0332-4.

71. Frank, K.L.; 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, doi:10.1128/IAI.00640-07.
72. Greco-Stewart, V.S.; Ali, H.; Kumaran, D.; Kalab, M.; Rood, I.G.H.; de Korte, D.; Ramírez-Arcos, S. Biofilm Formation by *Staphylococcus capitis* Strains Isolated from Contaminated Platelet Concentrates. *J Med Microbiol* **2013**, *62*, 1051–1059, doi:10.1099/jmm.0.050500-0.
73. Cui, B.; Smooker, P.M.; Rouch, D.A.; Daley, A.J.; Deighton, M.A. Differences between Two Clinical *Staphylococcus capitis* Subspecies as Revealed by Biofilm, Antibiotic Resistance, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis Profiling. *J Clin Microbiol* **2013**, *51*, 9–14, doi:10.1128/JCM.05124-11.
74. Chavignon, M.; Coignet, L.; Bonhomme, M.; Bergot, M.; Tristan, A.; Verhoeven, P.; Josse, J.; Laurent, F.; Butin, M. Environmental Persistence of *Staphylococcus capitis* NRCS-A in Neonatal Intensive Care Units: Role of Biofilm Formation, Desiccation, and Disinfectant Tolerance. *Microbiol Spectr* **2022**, *10*, doi:10.1128/spectrum.04215-22.
75. Qian, W.; Wang, W.; Zhang, J.; Liu, M.; Fu, Y.; Li, M.; Jin, J.; Cui, W.; Wang, C. Equivalent Effect of Extracellular Proteins and Polysaccharides on Biofilm Formation by Clinical Isolates of *Staphylococcus lugdunensis*. *Biofouling* **2021**, *37*, 327–340, doi:10.1080/08927014.2021.1914021.
76. Argemi, X.; Prévost, G.; Riegel, P.; Provot, C.; Badel-Berchoux, S.; Jehl, F.; Olivares, E.; Hansmann, Y. Kinetics of Biofilm Formation by *Staphylococcus lugdunensis* Strains in Bone and Joint Infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2017**, *88*, 298–304, doi:10.1016/j.diagmicrobio.2017.05.002.
77. Rajendran, N.B.; Eikmeier, J.; Becker, K.; Hussain, M.; Peters, G.; Heilmann, C. Important Contribution of the Novel Locus ComEB to Extracellular DNA-Dependent *Staphylococcus lugdunensis* Biofilm Formation. *Infect Immun* **2015**, *83*, 4682–4692, doi:10.1128/IAI.00775-15.
78. Missineo, A.; Poto, A. Di; Geoghegan, J.A.; Rindi, S.; Heilbronner, S.; Gianotti, V.; Arciola, C.R.; Foster, T.J.; Speziale, P.; Pietrocola, G. IsdC from *Staphylococcus lugdunensis* Induces Biofilm Formation under Low-Iron Growth Conditions. *Infect Immun* **2014**, *82*, 2448, doi:10.1128/IAI.01542-14.
79. Hussain, M.; Steinbacher, T.; Peters, G.; Heilmann, C.; Becker, K. The Adhesive Properties of the *Staphylococcus lugdunensis* Multifunctional Autolysin AtlL and Its Role in Biofilm Formation and Internalization. *International Journal of Medical Microbiology* **2015**, *305*, 129–139, doi:10.1016/j.ijmm.2014.11.010.
80. Mitchell, J.; Tristan, A.; Foster, T.J. Characterization of the Fibrinogen-Binding Surface Protein Fbl of *Staphylococcus lugdunensis*. *Microbiology (Reading)* **2004**, *150*, 3831–3841, doi:10.1099/MIC.0.27337-0.

81. Nilsson, M.; Bjerketorp, J.; Wiebensjö, Å.; Ljungh, Å.; Frykberg, L.; Guss, B. A von Willebrand Factor-Binding Protein from *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiol Lett* **2004**, *234*, 155–161, doi: 10.1016/j.femsle.2004.03.024.
82. Nilsson, M.; Bjerketorp, J.; Guss, B.; Frykberg, L. A Fibrinogen-Binding Protein of *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiol Lett* **2004**, *241*, 87–93, doi:10.1016/j.femsle.2004.10.008.
83. Heilbronner, S.; Hanses, F.; Monk, I.R.; Speziale, P.; Foster, T.J. Sortase A Promotes Virulence in Experimental *Staphylococcus lugdunensis* Endocarditis. *Microbiology (United Kingdom)* **2013**, *159*, 2141–2152, doi:10.1099/mic.0.070292-0.
84. Khan, N.; Aslan, H.; Büttner, H.; Rohde, H.; Golbek, T.W.; Roeters, S.J.; Woutersen, S.; Weidner, T.; Meyer, R.L. The Giant Staphylococcal Protein Embp Facilitates Colonization of Surfaces through Velcro-like Attachment to Fibrillated Fibronectin. *Elife* **2022**, *11*, 1–22, doi:10.7554/elife.76164.
85. Cucarella, C.; Solano, C.; Valle, J.; Amorena, B.; Lasa, Í.; Penadés, J.R. Bap, a *Staphylococcus aureus* Surface Protein Involved in Biofilm Formation. *J Bacteriol* **2001**, *183*, 2888–2896, doi:10.1128/JB.183.9.2888-2896.2001.
86. Rohde, H.; Burandt, E.C.; Siemssen, N.; Frommelt, L.; Burdelski, C.; Wurster, S.; Scherpe, S.; Davies, A.P.; Harris, L.G.; Horstkotte, M.A.; et al. Polysaccharide Intercellular Adhesin or Protein Factors in Biofilm Accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* Isolated from Prosthetic Hip and Knee Joint Infections. *Biomaterials* **2007**, *28*, 1711–1720, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.11.046.
87. Alabdullatif, M.; Ramirez-Arcos, S. Biofilm-Associated Accumulation-Associated Protein (Aap): A Contributing Factor to the Predominant Growth of *Staphylococcus epidermidis* in Platelet Concentrates. *Vox Sang* **2019**, *114*, 28–37, doi:10.1111/vox.12729.
88. Cameron, D.R.; Jiang, J.H.; Hassan, K.A.; Elbourne, L.D.H.; Tuck, K.L.; Paulsen, I.T.; Peleg, A.Y. Insights on Virulence from the Complete Genome of *Staphylococcus capitis*. *Front Microbiol* **2015**, *6*, doi:10.3389/fmicb.2015.00980.
89. Liu, Y.; Ames, B.; Gorovits, E.; Prater, B.D.; Syribeys, P.; Vernachio, J.H.; Patti, J.M. SdrX, a Serine-Aspartate Repeat Protein Expressed by *Staphylococcus capitis* with Collagen VI Binding Activity. *Infect Immun* **2004**, *72*, 6237–6244, doi:10.1128/IAI.72.11.6237-6244.2004.
90. Heilbronner, S. *Staphylococcus lugdunensis*. *Trends Microbiol* **2021**, *29*, 1143–1145, doi:10.1016/j.tim.2021.07.008.
91. Frank, K.L.; Pozo, L.; Patel, R. From Clinical Microbiology to Infection Pathogenesis : How Daring To Be Different Works for *Staphylococcus lugdunensis*. *Clin Microbiol Rev* **2008**, *21*, 111–133, doi:10.1128/CMR.00036-07.
92. Didi, J.; Lemée, L.; Gibert, L.; Pons, J.L.; Pestel-Carona, M. Multi-Virulence-Locus Sequence Typing of *Staphylococcus lugdunensis* Generates Results Consistent with a Clonal

- Population Structure and Is Reliable for Epidemiological Typing. *J Clin Microbiol* **2014**, *52*, 3624, doi:10.1128/JCM.01370-14.
93. Szabados, F.; Nowotny, Y.; Marlinghaus, L.; Korte, M.; Neumann, S.; Kaase, M. Occurrence of Genes of Putative Fibrinogen Binding Proteins and Hemolysins, as Well as of Their Phenotypic Correlates in Isolates of *S. lugdunensis* of Different Origins. **2011**.
 94. Heilbronner, S.; Holden, M.T.G.; Tonder, A. Van; Geoghegan, J.A.; Foster, T.J.; Parkhill, J.; Bentley, S.D. Genome Sequence of *Staphylococcus lugdunensis* N920143 Allows Identification of Putative Colonization and Virulence Factors. *Federation of European Microbiological Societies* **2011**, *322*, 60–67, doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02339.x.
 95. Heilbronner, S.; Foster, T.J. *Staphylococcus lugdunensis*: A Skin Commensal with Invasive Pathogenic Potential. *Clin Microbiol Rev* **2020**, *34*, 1–18, doi:10.1128/CMR.00205-20.
 96. Ramarao, N.; Sanchis, V. The Pore-Forming Haemolysins of *Bacillus cereus*: A Review. *Toxins (Basel)* **2013**, *5*, 7492–7502, doi:10.3390/toxins5061119.
 97. Béatrice Donvito, Jerome Etienne, Timothy Greenland, Christiane Mouren, Viviane Delorme, F.V. Distribution of the Synergistic Haemolysin Genes *hld* and *slush* with Respect to *agr* in Human Staphylococci. **1997**, *151*, 139–144. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(97\)00149-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(97)00149-3).
 98. Donvito, B.; Etienne, J.; Denoroy, L.; Greenland, T.; Benito, Y.; Vandenesch, F. Synergistic Hemolytic Activity of *Staphylococcus lugdunensis* Is Mediated by Three Peptides Encoded by a Non-Agr Genetic Locus. *Infect Immun* **1997**, *65*, 95–100, doi:10.1128/iai.65.1.95-100.1997.
 99. Peschel, A.; Otto, M.; Division, M.M.; Section, M.G.; Diseases, I. Phenol-Soluble Modulins and Staphylococcal Infection. **2016**, *11*, 667–673, doi:10.1038/nrmicro3110.Phenol-soluble.
 100. Geoghegan, J.A.; Ganesh, V.K.; Smeds, E.; Liang, X.; Höök, M.; Foster, T.J. Molecular Characterization of the Interaction of Staphylococcal Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMM) ClfA and Fbl with Fibrinogen. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285*, 6208–6216, doi:10.1074/jbc.M109.062208.
 101. Liesenborghs, L.; Peetermans, M.; Claes, J.; Veloso, T.R.; Vandenbrielle, C.; Criel, M.; Lox, M.; Peetermans, W.E.; Heilbronner, S.; De Groot, P.G.; et al. Shear-Resistant Binding to von Willebrand Factor Allows *Staphylococcus lugdunensis* to Adhere to the Cardiac Valves and Initiate Endocarditis. *Journal of Infectious Diseases* **2016**, *213*, 1148–1156, doi:10.1093/infdis/jiv773.
 102. Vasconcelos, N.G.; Cunha, M.L.R.S. Staphylococcal Enterotoxins : Molecular Aspects and Detection Methods. *J. Public Health Epidemiol.* **2010**, *2*, 29–42.
 103. Podkowik, M.; Park, J.Y.; Seo, K.S.; Bystron, J.; Bania, J. Enterotoxigenic Potential of Coagulase-Negative Staphylococci. *Int J Food Microbiol*, **2013**, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.005.

104. Marrack, P.; Kappler, J. The Staphylococcal Enterotoxins and Their Relatives. *Science* **1990**, *248*, 705–711, doi:10.1126/SCIENCE.2185544.
105. Xu, S.X.; McCormick, J.K. Staphylococcal Superantigens in Colonization and Disease. *Front Cell Infect Microbiol* **2012**, *2*, 52, doi:10.3389/FCIMB.2012.00052/BIBTEX.
106. Omoe, K.; Imanishi, K.; Hu, D.; Kato, H.; Fugane, Y.; Abe, Y.; Hamaoka, S.; Watanabe, Y.; Nakane, A.; Uchiyama, T.; et al. Characterization of Novel Staphylococcal Enterotoxin-Like Toxin Type P. **2005**, *73*, 5540–5546, doi:10.1128/IAI.73.9.5540.
107. Lina, G.; Bohach, G.A.; Nair, S.P.; Hiramatsu, K.; Jouvin-marche, E.; Mariuzza, R. Standard Nomenclature for the Superantigens Expressed by Staphylococcus. *J Infect Dis.* **2004**, *189*, 2334–2336.
108. Dicks, J.; Turnbull, J.D.; Russell, J.; Parkhill, J.; Alexander, S. Genome Sequencing of a Historic *Staphylococcus aureus* Collection Reveals New Enterotoxin Genes and Sheds Light on the Evolution and Genomic Organization of This Key Virulence Gene Family. *J Bacteriol* **2021**, *203*, 1–18, doi:10.1128/JB.00587-20.
109. Fisher, E.L.; Otto, M.; Cheung, G.Y.C. Basis of Virulence in Enterotoxin-Mediated Staphylococcal Food Poisoning. *Front Microbiol* **2018**, *9*, 1–18, doi:10.3389/fmicb.2018.00436.
110. Cunha, M. de L.R.S. *Staphylococcus aureus* e Estafilococos Coagulase-Negativa : Virulência , Resistência Aos Antimicrobianos e Epidemiologia Molecular, 2012.
111. Otto, M. Staphylococcus Aureus Toxins. *Curr Opin Microbiol* **2015**, 32-37, doi:10.1016/J.MIB.2013.11.004.
112. Różalska, M.D.A.M.A. Synergistic Hemolysins of Coagulase-Negative Staphylococci (CoNS)*. *Acta Biochim Pol* **2015**, *62*, 757–764.
113. Rogers, K.L.; Fey, P.D.; Rupp, M.E. Coagulase-Negative Staphylococcal Infections. *Infect Dis Clin North Am* **2009**, *23*, 73–98, doi:10.1016/J.IDC.2008.10.001.
114. Perez, L.R.; D’Azevedo, P.A. Evaluation of the Accuracy of Various Phenotypic Tests to Detect Oxacillin Resistance in Coagulase-Negative Staphylococci. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* **2008**, *12*, 210–212, doi:10.1590/S1413-86702008000300009.
115. Uehara, Y. Current Status of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*). *Antibiotics* **2022**, *11*, 1–12, doi:10.3390/antibiotics11010086.
116. Lakhundi, S.; Zhang, K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. **2018**, *32*.
117. Zong, Z.; Peng, C.; Lü, X. Diversity of SCC*mec* Elements in Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci Clinical Isolates. *PLoS One* **2011**, *6*, 1–6, doi: 10.1371/journal.pone.0020191.
118. Decousser, J.W.; Desroches, M.; Bourgeois-Nicolaos, N.; Potier, J.; Jehl, F.; Lina, G.; Cattoir, V.; Vandenesch, F.; Doucet-Populaire, F. Susceptibility Trends Including Emergence of Linezolid Resistance among Coagulase-Negative Staphylococci and Methicillin-Resistant

- Staphylococcus aureus* from Invasive Infections. *Int J Antimicrob Agents* **2015**, *46*, 622–630, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2015.07.022.
119. Garbacz, K.; Wierzbowska, M.; Kwapisz, E.; Kosecka-Strojek, M.; Bronk, M.; Saki, M.; Międzobrodzki, J. Distribution and Antibiotic-Resistance of Different *Staphylococcus* Species Identified by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Isolated from the Oral Cavity. *J Oral Microbiol* **2021**, *13*, doi:10.1080/20002297.2021.1983322.
 120. Shen, W.; Chen, J.; Zhang, R.; Cai, J. An 11-Year Linezolid-Resistant *Staphylococcus capitis* Clone Dissemination with a Similar Cfr-Carrying Plasmid in China. *iScience* **2022**, *25*, 105644, doi: 10.1016/j.isci.2022.105644.
 121. Yeh, C.F.; Chang, S.C.; Cheng, C.W.; Lin, J.F.; Liu, T.P.; Lu, J.J. Clinical Features, Outcomes, and Molecular Characteristics of Community- and Health Care-Associated *Staphylococcus lugdunensis* Infections. *J Clin Microbiol* **2016**, *54*, 2051, doi:10.1128/JCM.00847-16.
 122. Seng, P.; Traore, M.; Lavigne, J.P.; Maulin, L.; Lagier, J.C.; Thiery, J.F.; Levy, P.Y.; Roger, P.M.; Bonnet, E.; Sotto, A.; et al. *Staphylococcus lugdunensis*: A Neglected Pathogen of Infections Involving Fracture-Fixation Devices. *International Orthopaedics* **2017** *41:6* **2017**, *41*, 1085–1091, doi:10.1007/S00264-017-3476-4.
 123. Tseng, S.P.; Lin, Y.T.; Tsai, J.C.; Hung, W.C.; Chen, H.J.; Chen, P.F.; Hsueh, P.R.; Teng, L.J. Genotypes and Phenotypes of *Staphylococcus lugdunensis* Isolates Recovered from Bacteremia. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* **2015**, *48*, 397–405, doi: 10.1016/J.JMIL.2013.11.006.
 124. Haley, K.P.; Janson, E.M.; Heilbronner, S.; Foster, T.J.; Skaar, E.P. *Staphylococcus lugdunensis* IsdG Liberates Iron from Host Heme. *J Bacteriol* **2011**, *193*, 4749–4757, doi:10.1128/JB.00436-11.
 125. Perez, V.P.; Carvalho, J.K.B.P.; de Oliveira, M.S.; Rossato, A.M.; Dani, C.; Corção, G.; d’Azevedo, P.A. Coagulase-Negative Staphylococci in Outpatient Routines: The Implications of Switching from CLSI to BrCAST/EUCAST Guidelines. *Brazilian Journal of Microbiology* **2020**, *51*, 1071–1078, doi:10.1007/s42770-020-00278-1.
 126. Iorio, N.L.P.; Caboclo, R.F.; Azevedo, M.B.; Barcellos, A.G.; Neves, F.P.G.; Domingues, R.M.C.P.; Dos Santos, K.R.N. Characteristics Related to Antimicrobial Resistance and Biofilm Formation of Widespread Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* ST2 and ST23 Lineages in Rio de Janeiro Hospitals, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2012**, *72*, 32–40, doi: 10.1016/J.DIAGMICROBIO.2011.09.017.
 127. de Almeida, L.M.; Lincopan, N.; de Araújo, M.R.E.; Mamizuka, E.M. Dissemination of the Linezolid-Resistant *Staphylococcus Epidermidis* Clone ST2 Exhibiting the G2576T Mutation in the 23S rRNA Gene in a Tertiary-Care Hospital, Brazil. *J Antimicrob Chemother* **2012**, *67*, 768–769, doi:10.1093/JAC/DKR538.

128. Martins, A.; Riboli, D.F.M.; Camargo, C.H.; Pereira, V.C.; De Almeida Sampaio, R.; De Souza da Cunha, M. de L.R. Antimicrobial Resistance and Persistence of *Staphylococcus epidermidis* Clones in a Brazilian University Hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2013**, *77*, 164–168, doi:10.1016/J.DIAGMICROBIO.2013.06.005.
129. De Oliveira, C.F.; Cavanagh, J.P.; Fredheim, E.G.A.; Reiter, K.C.; Rieger, A.; Klingenberg, C.; D’Azevedo, P.A.; Sollid, J.E. Coagulase-Negative Staphylococci in Southern Brazil: Looking toward Its High Diversity. *Rev Soc Bras Med Trop* **2016**, *49*, 292–299, doi:10.1590/0037-8682-0015-2016.
130. Song, M.; Li, Q.; He, Y.; Lan, L.; Feng, Z.; Fan, Y.; Liu, H.; Qin, F.; Chen, D.; Yang, M. A Comprehensive Multilocus Sequence Typing Scheme for Identification and Genotyping of *Staphylococcus* Strains. *Foodborne Pathog Dis* **2019**, *16*, 331–338, doi:10.1089/fpd.2018.2565.
131. Monsen, T.; Karlsson, C.; Wiström, J. Spread of Clones of Multidrug-Resistant, Coagulase-Negative Staphylococci within a University Hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* **2005**, *26*, 76–80, doi:10.1086/502490.
132. Tegnell, A.; Saeedi, B.; Isaksson, B.; Granfeldt, H.; Öhman, L. A Clone of Coagulase-Negative Staphylococci among Patients with Post-Cardiac Surgery Infections. *Journal of Hospital Infection* **2002**, *52*, 37–42, doi:10.1053/jhin.2002.1267.
133. Klingenberg, C.; Rønnestad, A.; Anderson, A.S.; Abrahamsen, T.G.; Zorman, J.; Villaruz, A.; Flægstad, T.; Otto, M.; Sollid, E.J. Persistent Strains of Coagulase-Negative Staphylococci in a Neonatal Intensive Care Unit: Virulence Factors and Invasiveness. *Clinical Microbiology and Infection* **2007**, *13*, 1100–1111, doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01818.x.
134. Saffari, F.; Widerström, M.; Gurram, B.K.; Edebro, H.; Hojabri, Z.; Monsen, T. Molecular and Phenotypic Characterization of Multidrug-Resistant Clones of *Staphylococcus epidermidis* in Iranian Hospitals: Clonal Relatedness to Healthcare-Associated Methicillin-Resistant Isolates in Northern Europe. *Microbial Drug Resistance* **2016**, *22*, 570–577, doi:10.1089/mdr.2015.0283.
135. Pinheiro-Hubinger, L.; Riboli, D.F.M.; Abraão, L.M.; Pereira Franchi, E.P.L.; Ribeiro de Souza da Cunha, M. de L. Coagulase-Negative Staphylococci Clones Are Widely Distributed in the Hospital and Community. *Pathogens* **2021**, *10*, 1–18, doi:10.3390/pathogens10070792.

3. OBJETIVOS

3.2. Objetivo geral

Descrever a relação clonal e caracterizar o perfil genético e fenotípico de virulência e resistência antimicrobiana de linhagens de *S. capitis*, *S. hominis* e *S. lugdunensis* isoladas a partir de hemoculturas coletadas ao longo de um período superior a 10 anos.

3.3. Objetivos específicos

- Identificar cepas de *S. capitis*, *S. hominis* e *S. lugdunensis* isoladas de hemoculturas de pacientes internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, nos períodos de 2009 à 2019 e 2021, incluindo amostras de *S. lugdunensis* pertencentes à 2022;
- Determinar o fenótipo de suscetibilidade antimicrobiana nos isolados;
- Detectar a presença do gene *mecA* e caracterizar o Cassete Cromossômico Estafilocócico *mec* (SCC*mec*) nas amostras positivas para o gene *mecA*;
- Detectar os genes codificadores de enterotoxinas estafilocócias (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* e *tst*), citotoxinas (α e δ), além de genes específicos envolvidos na virulência singular de *S. lugdunensis* (genes codificadores de Fbl, vWbl, SLUSH, β -Hemolisina e Hemolisina III);
- Detectar a presença dos genes *icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC*, envolvidos na formação de biofilme;
- Investigar, quantitativamente, a produção de biofilme nas amostras isoladas;
- Caracterizar a epidemiologia molecular por meio da análise da relação clonal entre os isolados de cada espécie.

4. APRESENTAÇÃO DA TESE

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

4.2. Artigo Científico I: Epidemiologia molecular, suscetibilidade antimicrobiana e perfil de virulência em *Staphylococcus hominis* e *Staphylococcus lugdunensis* isolados da corrente sanguínea

Revista: Pathogens

Fator de Impacto: 4.531

Status: A ser submetido

4.3. Artigo Científico II: *Staphylococcus capitis* isolados da corrente sanguínea: Investigação da relação clonal, perfil de resistência, virulência e formação de biofilme

Revista: International Journal of Molecular Sciences

Fator de Impacto: 6.208

Status: A ser submetido

Artigo Científico I

Epidemiologia molecular, suscetibilidade antimicrobiana e perfil de virulência em *Staphylococcus hominis* e *Staphylococcus lugdunensis* isolados da corrente sanguínea

Letícia Calixto Romero ^a, Lucas Porangaba da Silva ^a, Nathalia Bibiana Teixeira ^a, Karen Vilegas de Camargo ^a, Milena Aparecida Del Masso Pereira ^a, José Eduardo Corrente ^b, Valéria Cataneli Pereira ^c, Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha ^a

^a Departamento de Ciências Químicas e Biológicas, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu 18618-970, Brasil.

^b Departamento de Bioestatística, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu 18618-970, Brasil.

^c Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Laboratório de Microbiologia, Presidente Prudente, SP, Brasil

RESUMO

A crescente incidência de Estafilococos coagulase-negativa (ECN) em amostras clinicamente relevantes tem chamado a atenção, especialmente para espécies menos frequentes, porém emergentes, incluindo *Staphylococcus (S.) hominis* e *S. lugdunensis*. Considerando a complexidade e a versatilidade dessas espécies que apresentam diversidade genética e variações no seu perfil patogênico, nosso objetivo foi determinar o perfil de resistência antimicrobiana, a produção de biofilme, a distribuição de genes de virulência e descrever o perfil epidemiológico de *S. hominis* e *S. lugdunensis* isolados de hemoculturas coletadas por mais de uma década, no Hospital das Clínicas de Botucatu. Ao todo foram estudados 177 isolados de *S. hominis* e 13 de *S. lugdunensis*. Foi realizado teste de suscetibilidade antimicrobiana por disco-difusão, detecção do gene *mecA* por PCR convencional, e caracterização do SCC*mec* por PCR multiplex. A produção de biofilme foi verificada pelo método de aderência em placa de poliestireno. Os genes do operon *icaADBC* bem como os genes codificadores de enterotoxinas e citotoxinas também foram investigados. Adicionalmente, o perfil patogênico de *S. lugdunensis* foi mais extensamente avaliado, através da detecção de genes relacionados a hemolisinas e proteínas de superfície. Por fim a relação clonal foi analisada por Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE). Apesar da taxa elevada de resistência à meticilina em *S. hominis* (76,8%), houve resultados inconsistentes entre os testes fenotípicos e genotípicos, sugerindo que os pontos de corte sejam revistos para esta espécie. Em contrapartida, isolados de *S. lugdunensis* se mostraram altamente suscetíveis, no entanto, prevalentes na UTI neonatal e frequentemente carreadores de genes de virulência. A produção de biofilme foi constatada em 18,6% dos *S. hominis*, chegando à 41,2% em *S. hominis* subsp. *novobiosepticus*, já entre os isolados *S. lugdunensis* essa taxa foi 7,7%. Além de pouco prevalente, a produção de biofilme não teve correlação com os genes do operon *icaADBC*. A caracterização do tipo do SCC*mec* em *S. hominis* revelou alta frequência de complexos não tipáveis (69,1%) com relato de complexos *ccr* não caracterizados e amplificação recorrente de perfis *ccr-mec* semelhantes, além da caracterização de SCC*mec* XIV, recém descrito na literatura. Dentre os genes codificadores de enterotoxinas, o gene *seg* foi o mais detectado, em ambas as espécies. A análise do perfil clonal evidenciou mais homogeneidade entre *S. lugdunensis*, enquanto isolados de *S. hominis* foram geneticamente mais diversos entre si. Em conjunto, os resultados reforçam a importância do aprofundamento na complexidade dos aspectos de virulência e persistência que permeiam a ascensão dessas linhagens no cenário clínico atual.

Palavras chaves: Estafilococos coagulase-negativa; operon *icaADBC*; hemolisinas; *mecA*; hemocultura; SCC*mec*; subsp. *novobiosepticus*; PFGE.

ABSTRACT

The increasing incidence of coagulase-negative staphylococci (CoNS) in clinically relevant samples has drawn attention specifically to less frequent but emerging species, including *Staphylococcus (S.) hominis* e *S. lugdunensis*. In view of the complexity and versatility of these species that are characterized by genetic diversity and variable pathogenic profiles, the aim of this study was to determine the antimicrobial resistance profile, biofilm production and distribution of virulence genes, and to describe the epidemiological profile of *S. hominis* and *S. lugdunensis* isolated from blood cultures collected over a decade at the University Hospital in Botucatu. A total of 177 *S. hominis* isolates and 13 *S. lugdunensis* isolates were studied. Antimicrobial susceptibility testing by disk diffusion, detection of the *mecA* gene by conventional PCR, and characterization of SCC*mec* by multiplex PCR were performed. Biofilm production was evaluated using the polystyrene plate adherence method. Genes of the *icaADBC* operon, as well as genes encoding enterotoxins and cytotoxins, were also investigated. Additionally, the pathogenic profile of *S. lugdunensis* was studied more extensively based on the detection of genes encoding hemolysins and surface proteins. Finally, the clonal relationship was analyzed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Despite the high rate of methicillin resistance in *S. hominis* (76.8%), the results of the phenotypic and genotypic tests were inconsistent, suggesting revision of the cutoff points for this species. On the other hand, *S. lugdunensis* isolates were highly susceptible but were prevalent in the neonatal ICU and frequently carried virulence genes. Biofilm production was observed among 18.6% of the *S. hominis* isolates, reaching 41.2% in *S. hominis* subsp. *novobiosepticus*, whereas this rate was 7.7% among the *S. lugdunensis* isolates. In addition to its low rate, biofilm production was not correlated with the genes of the *icaADBC* operon. SCC*mec* typing in *S. hominis* revealed a high frequency of untypable complexes (69.1%), with the observation of uncharacterized *ccr* complexes and recurrent amplification of similar *ccr-mec* profiles. In addition, SCC*mec* XIV, recently described in the literature, was identified. Among the enterotoxin-coding genes, the *seg* gene was the most frequently detected in both species. Analysis of the clonal profile showed greater homogeneity among the *S. lugdunensis* isolates, while the *S. hominis* isolates were genetically more diverse. Taken together, the results reinforce the importance of more in-depth knowledge of the complex virulence and persistence characteristics that are responsible for the rise of these strains in the current clinical scenario.

Keywords: Coagulase-negative staphylococci; *icaADBC* operon; hemolysins; *mecA*; blood culture; SCC*mec*; subsp. *novobiosepticus*; PFGE.

1. INTRODUÇÃO

Membros permanentes da microbiota da pele e mucosas humanas, os Estafilococos Coagulase-Negativa (ECN) abrangem um grupo heterogêneo de bactérias do gênero *Staphylococcus* [1,2]. São mais de 50 espécies diferentes de ECN descritas, variando de espécies não patogênicas verdadeiras a espécies patogênicas facultativas com baixo, médio ou mesmo alto potencial de virulência, sendo esta última exemplificada, exclusivamente, por *Staphylococcus (S.) lugdunensis*, que usufrui de uma virulência incomumente superior à das demais espécies [3–5].

Outras espécies também possuem significado clínico elevado, incluindo *S. hominis*, uma das três espécies de ECN mais encontradas no sangue de pacientes hospitalizados, com mecanismos de patogenicidade ainda incertos, porém com potencial de desencadear infecções da corrente sanguínea, endocardite, peritonite, osteomielite, infecções ósseas e articulares [6]. Em 1998 a caracterização de uma subespécie de *S. hominis* a partir de amostras clínicas humanas, dividiu a espécie em *S. hominis* subsp. *hominis* (*Shh*) e *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* (*Shn*) [7,8]. Com um padrão de multirresistência, incluindo a resistência à novobiocina e à oxacilina, *Shn* tem sido relatado como agente causador de infecções e surtos em países ao redor do mundo, incluindo EUA, Espanha e Brasil [7–10].

Certamente, muitas espécies de ECN dispõem de um arsenal de fatores de virulência e estratégias suficientes para atuarem como patógenos oportunistas [11]. Fato este refletido na crescente incidência de ECN isolados de amostras clinicamente relevantes, em paralelo ao avanço da medicina, principalmente no que diz respeito à utilização de dispositivos médicos implantáveis (DMIs) [12].

A produção de biofilme é a base da patogênese de muitas espécies de ECN, facilitando a adesão e colonização bacteriana em dispositivos médicos internos e, eventualmente, resultando em infecções da corrente sanguínea relacionadas a cateter [13,14]. Na formação do biofilme estafilocócico, a adesão intercelular é frequentemente mediada por uma molécula denominada adesina intercelular polissacarídica (PIA), cuja síntese se dá através de enzimas codificadas pelo operon *icaADBC* [13,15]. No entanto, ao longo das últimas duas décadas, estudos têm destacado mecanismos alternativos, subsidiando a formação de biofilmes *ica*-independentes e quimicamente diversos em muitas espécies, incluindo *S. hominis* e *S. lugdunensis* [16–20].

Ademais, o tratamento de infecções estafilocócicas também se torna complicado pela alta prevalência de resistência à meticilina, majoritariamente, mediada por uma proteína de ligação à penicilina alterada, denominada PBP2a, codificada pelo gene *mecA*, resultando em baixa

afinidade para a maioria das penicilinas semi-sintéticas [21,22]. O gene *mecA* é carregado em um elemento genético móvel dentro do DNA cromossômico, designado Cassete Cromossômico Estafilocócico *mec* (SCC*mec*), cuja organização estrutural e conteúdo genético permite a sua classificação em tipos e subtipos, de acordo com diferentes combinações dos componentes de suas sequências, incluindo três elementos básicos: (i) o complexo do gene *mec*; (ii) o complexo do gene *ccr*; (iii) e as regiões de junção (regiões J) [21,23,24].

Pelo que se tem registro, os elementos SCC*mec* são mais diversos em cepas de ECN, que são reconhecidas como importantes reservatórios genéticos, e a troca de elementos genéticos móveis pode ocorrer entre várias espécies de estafilococos através da transferência horizontal [6,24,25]. Útil na caracterização epidemiológica de cepas estafilocócicas resistentes à meticilina, a caracterização dos tipos SCC*mec* lança luz para a compreensão da dinâmica e da evolução da resistência estafilocócica, podendo ser fundamental no surgimento de novas cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) [24,25].

Até o momento, estudos concentrados em elucidar a diversidade clonal em isolados clínicos de ECN são raros e, majoritariamente, direcionados a cepas de *S. epidermidis* [26–29]. Ainda assim, dados disponíveis na literatura indicam um perfil geneticamente diverso em *S. hominis*, além de taxas elevadas de resistência à meticilina [17,30–32]. Em contrapartida, em *S. lugdunensis* o perfil de sensibilidade antimicrobiana é reconhecidamente mais conservado se comparada às demais espécies de ECN [33–35].

Outro componente relevante da virulência estafilocócica é a presença de algumas toxinas bacterianas citolíticas formadoras de poros na membrana celular do hospedeiro [36]. Os estafilococos ainda podem produzir um grupo de toxinas com propriedades superantigênicas, que incluem a toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) e enterotoxinas estafilocócicas (SEs) [37], capazes de induzir uma resposta policlonal inespecífica de células T, deflagrando em toxicidade sistêmica e supressão da resposta imune adaptativa [38–40].

S. lugdunensis, por sua vez, coleciona uma somatória de outros fatores potencialmente capazes de contribuir com a patogênese de infecções invasivas mais graves, dentre eles as hemolisinas putativas, como β -hemolisina e a hemolisina III, além das hemolisinas sinérgicas citolíticas denominadas SLUSH (*Staphylococcus lugdunensis* synergistic haemolysin) [41–44]. Ademais, proteínas ancoradas na parede celular de *S. lugdunensis* e potencialmente envolvidas na adesão às válvulas cardíacas durante a patogênese da endocardite infecciosa, têm sido investigadas, particularmente a proteína de ligação ao fibrinogênio (Fbl) e a proteína de ligação ao fator de von Willebrand (vWbl) [45].

Neste estudo aplicamos técnicas moleculares e fenotípicas para elucidar aspectos epidemiológicos, de resistência e da patogênese multifatorial, brevemente descrita na literatura para isolados de *S. hominis* e *S. lugdunensis* provenientes de hemoculturas coletadas de indivíduos distintos, por mais de uma década. No decorrer do estudo destacamos perfis diferentes de resistência antimicrobiana e de variabilidade genética entre as espécies, e produção de biofilme sem correlação com determinantes genéticos descritos, evidenciando a diversidade e a complexidade que permeia a existência e a persistência dessas espécies clinicamente relevantes.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Declaração de ética

Este estudo foi realizado com a aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP (Certificado de Apresentação de Apreciação Ética nº 24139819.8.0000.5411). As informações dos pacientes foram anonimizadas, apenas os dados microbiológicos foram analisados. Portanto, o comitê de ética local autorizou dispensa do termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

2.2. Coleção de amostras

As cepas bacterianas avaliadas por este estudo são provenientes de hemoculturas coletadas de pacientes diferentes, de todas as faixas etárias, internados no Hospital das Clínicas de Botucatu, obtidas diretamente da coleção de culturas do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas do Instituto de Biociências da UNESP, na qual essas linhagens foram armazenadas após identificação prévia na rotina laboratorial, a nível de espécie, a partir de métodos automatizados. A partir de um levantamento do número total de isolados disponíveis pré-identificados como *S. hominis* e *S. lugdunensis*, as amostras foram selecionadas, aleatoriamente, de modo a atingir um número mínimo de cepas, definido pelo cálculo amostral com uma margem de erro de 10%, conforme a fórmula a seguir:

$$n = \left(\frac{z_{\alpha/2} \sqrt{p(1-p)}}{\varepsilon} \right)^2 = \left(\frac{1,96 \sqrt{p(1-p)}}{\varepsilon} \right)^2$$

Em que p é a incidência em cada espécie e ε é a margem de erro adotada

As amostras foram selecionadas seguindo critério de inclusão referente à coleta da hemocultura, realizada nos seguintes períodos: entre janeiro de 2009 a dezembro de 2019 e entre junho e dezembro de 2021. Ademais, foram incluídas amostras de *S. lugdunensis* coletadas em 2022.

2.3. Isolamento e identificação de *S. hominis* e *S. lugdunensis*

Os isolados selecionados tiveram sua identificação confirmada através de uma pré-triagem com provas de catalase e coagulase em tubo. Posteriormente, foi realizada a extração de DNA das amostras pelo Kit Illustra™ (GE healthcare) seguindo as recomendações dos fabricantes. Todas as amostras de DNA extraídas foram armazenadas a -20 °C até serem necessárias para experimentação.

Os isolados foram submetidos à identificação genotípica usando primers específicos para cada espécie, descritos na Tabela 1, pela técnica de Polymerase Chain Reaction (PCR) descrita por Hirota et al, 2011 [46]. A incubação foi realizada em termocicladores GenePro e LifePro. As linhagens de referência internacional ATCC 700237 (*S. hominis*) e ATCC 700328 (*S. lugdunensis*) foram utilizadas como controles positivos na validação das reações de amplificação.

2.4. Identificação de *S. hominis* subsp. *novobiosepticus*

A caracterização de *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* foi realizada por meio da determinação de suscetibilidade à novobiocina pelo método de disco difusão, usando ágar Mueller-Hinton, conforme descrito por Bannerman e Peacock (2007) [47]. Foram utilizados discos de novobiocina 5 µg (NOV) e a resistência foi verificada após incubação a 35°C por 24h, com halos de inibição ≤16 mm indicando isolados de *Shn*. A linhagem de referência internacional ATCC 700237 (*Shn*) foi utilizada como controle.

2.5. Teste fenotípico de susceptibilidade antimicrobiana

O teste de suscetibilidade antimicrobiana foi realizado pelo método de disco difusão, usando ágar Mueller-Hinton, conforme padrões de desempenho do Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) [48]. Para cada isolado, os inóculos tiveram turbidez ajustada de acordo com a escala 0,5 de McFarland. A suscetibilidade foi avaliada para os seguintes quatro antimicrobianos: antibióticos beta-lactâmicos incluindo cefoxitina 30µg (CFO) da classe das cefamicinas e oxacilina 1 µg (OXA) da classe das penicilinas; linezolida 30 µg (LNZ), pertencente à classe das oxazolidinonas; e sulfametoxazol/trimetoprim 25 µg (SUT) pertencente às classes das sulfonamidas/diaminopirimidinas. A atividade do antimicrobiano foi avaliada pelo diâmetro do halo de inibição através da interpretação preconizada pelas normas estabelecidas pelo CLSI. As cepas foram categorizadas como sensíveis (S), sensível dose-dependente (SDD) ou resistentes (R) às substâncias ativas testadas.

A resistência ao disco de linezolida 30 µg foi confirmada com fitas Etest® de linezolida com um gradiente de concentração correspondente a 0,016-256 µg/mL em ágar Mueller-Hinton

de acordo com as diretrizes do fabricante usando inóculo padrão 0,5 de McFarland, para a determinação da concentração inibitória mínima.

2.6. Detecção do gene *mecA* de resistência à metilina

Reações de PCR foram realizadas para detectar a presença do gene *mecA* em todas as amostras. Foram utilizados os primers apresentados na Tabela 1, e a incubação foi realizada em termocicladores GenePro e LifePro, empregando os parâmetros descritos por Murakami et al., 1991 [49], 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 55,5 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto. Após os 40 ciclos, os tubos foram incubados a 72 °C por 5 minutos antes de resfriar a 4 °C. Linhagens de referência internacional foram usadas como controles positivo (*S. aureus* ATCC 33591) e negativo (*S. aureus* ATCC 25923) em todos os testes.

2.7. Detecção de genes envolvidos na formação de biofilme

As reações de PCR para amplificação dos genes *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD*, seguiram parâmetros descritos por Arciola et al. (2005) [50] com primers apresentados na Tabela 1. A incubação foi realizada em termocicladores GenePro e LifePro empregando diferentes parâmetros para cada gene. Para a detecção do gene *icaA* as amostras foram submetidas a 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento dos primers a 49°C por 45 segundos e extensão a 72°C por um minuto. Para os genes *icaB*, *icaC* e *icaD* a incubação iniciou em temperatura de 94°C por 5 minutos seguidos de 50 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos primers a 54°C por 30 segundos e extensão a 72°C por um minuto. Em todas as reações realizadas, foram utilizadas linhagens de referência internacional como controle positivo e negativo, *S. epidermidis* ATCC 35985 (produtora de biofilme) e *S. epidermidis* ATCC 12228 (não produtora de biofilme) respectivamente.

2.8. Detecção de genes de hemolisinas e toxinas estafilocócicas

Todas as amostras foram submetidas à detecção de genes associados a produção das enterotoxinas SEA (*sea*), SEB (*seb*), SEC (*sec*), SED (*sed*), SEE (*see*), SEG (*seg*), SEH (*seh*), SEI (*sei*) e TSST (*tst*). A amplificação foi feita em termocicladores GenePro e LifePro, usando primers mencionados na Tabela 1 e seguindo parâmetros descritos por Johnson et al. (1991) [51] e Jarraud (2002) [52] com modificações propostas por Cunha et al. (2006) [53], que consistem em: um primeiro ciclo a 94°C por quatro minutos, desnaturação a 94°C por dois minutos, anelamento dos primers a 55°C e extensão a 72°C por um minuto e trinta segundos, seguidos por

um segundo ciclo de desnaturação a 94°C por 2 minutos, anelamento a 53°C e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos. No terceiro ciclo, a temperatura de anelamento foi reduzida para 51°C, seguido por mais 37 ciclos com estes mesmos parâmetros. Após os 40 ciclos, os tubos foram incubados a 72°C por 7 minutos e posteriormente resfriados a 4°C.

Todas as reações foram otimizadas utilizando linhagens de referência internacional como controles positivos incluindo *S. aureus* ATCC 13565 (*sea*), *S. aureus* ATCC 14458 (*seb*), *S. aureus* ATCC 19095 (*sec*), *S. aureus* ATCC 23235 (*sed* e *seg*), *S. aureus* ATCC 27664 (*see* e *sei*) ATCC 51811 (*seh*) e ATCC 51650 (*tst*), além de controles negativos a partir da substituição de DNA por água.

As reações de PCR para os genes das hemolisinas α e δ (*hla* e *hld*), foram realizadas de acordo com parâmetros propostos por Pinheiro (2014) [56] e Marconi et al. (2005) [57] respectivamente. Em todas as reações de amplificação de ambos os genes, a linhagem de referência *S. epidermidis* ATCC 12228, foi utilizada como controle positivo.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados nas técnicas de PCR para identificação genotípica, detecção do gene *mecA*, e genes associados a produção de biofilme, aderência, enterotoxinas e citotoxinas

Alvo	Primer	Sequência de nucleotídeos 5'a 3'	Pb	Ref.
<i>S. hominis</i> ^a	<i>SHo</i> _F	TACAGGGCCATTTAAAGACG	177	[46]
	<i>SHo</i> _R	GTTTCTGGTGTATCAACACC		
<i>S. lugdunensis</i> ^a	<i>SLu</i> _F	TCCAATGATGGTAACGAGGC	695	[46]
	<i>SLu</i> _R	TTTTGCGCCTCGTTTTGTGC		
<i>mecA</i>	<i>mecA</i> _F	AAAATCGAT GGT AAAGGTTGG	533	[49]
	<i>mecA</i> _R	AGTTCTGCAGTACCGGATTTG		
<i>icaA</i>	<i>icaA</i> _F	TCTCTTGCAGGAGCAATCAA	187	[50]
	<i>icaA</i> _R	TCAGGCACTAACATCCAGCA		
<i>icaB</i>	<i>icaB</i> _F	CTGATCAAGAATTTAAATCACAAA	302	[50]
	<i>icaB</i> _R	AAAGTCCCATAAAGCCTGTTT		
<i>icaC</i>	<i>icaC</i> _F	TAACCTTAGGCGCATATGTTT	400	[50]
	<i>icaC</i> _R	TTCCAGTTAGGCTGGTATTG		
<i>icaD</i>	<i>icaD</i> _F	ATGGTCAAGCCCAGACAGAG	198	[50]
	<i>icaD</i> _R	CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA		
<i>fbl</i>	<i>Fbl</i> _F	CGTATTATCCCAAGTAGCAACC	404	[44]
	<i>Fbl</i> _R	CTTCATCGATTGTCCCAGTAGC		
<i>vwbl</i>	<i>vwbl</i> _F	TGGCGGGATGATTTGGACGGG	858	[44]
	<i>vwbl</i> _R	TCGCCTTCTTGCCCTGATGGT		
<i>sea</i>	<i>sea</i> _F	TTGGAAACGGTTAAAAACGAA	120	[51]
	<i>sea</i> _R	GAACCTTCCCATCAAAAAACA		
<i>seb</i>	<i>seb</i> _F	TCGCATCAAACGACAAAACG	478	[51]
	<i>seb</i> _R	GCAGGTACTCTATAAGTGCC		
<i>sec</i>	<i>sec</i> _F	GACATAAAAGCTAGGAAATTT	257	[51]
	<i>sec</i> _R	AAATCGGATTAACATTATCC		
<i>sed</i>	<i>sed</i> _F	CTAGTTTGGTAATATCTCCT	317	[51]
	<i>sed</i> _R	TAATGCTATATCTTATAGGG		
<i>see</i>	<i>see</i> _F	CAAAGAAATGCTTTAAGCAATCTTAGGCCAC	482	[54]
	<i>see</i> _R	CTTACCGCCAAAAGCTG		
<i>seg</i>	<i>seg</i> _F	AATTATGTGAATGCTCAACCCGATC	642	[52]
	<i>seg</i> _R	AAACTTATATGGAACAAAAGGTAAGTTC		
<i>seh</i>	<i>seh</i> _F	CAATCACATCATATGCGAAAGCAG	375	[52]
	<i>seh</i> _R	CATCTACCCAAACATTAGCACC		
<i>sei</i>	<i>sei</i> _F	GGTGATTATGTAGATGCTTGGG	576	[54]
	<i>sei</i> _R	TCGGGTGTTACTTCTGTTTGC		
<i>tsst1</i>	<i>tst</i> _F	ATGGCAGCATCAGCTTGATA	350	[54]
	<i>tst</i> _R	TTTCCAATAACCACCCGTTT		
SCC <i>mec</i> I	<i>CIF2</i> _{F2}	TTCGAGTTGCTGGATGAAGAAGG	495	[30]
	<i>CIF2</i> _{R2}	ATTTACCACAAGGACTACCAGC		
SCC <i>mec</i> II	<i>KDP</i> _{F1}	AATCATCTGCCATTGGTGATGC	284	[30]
	<i>KDP</i> _{R1}	CGAATGAAGTGAAAAGAAAGTGG		
SCC <i>mec</i> I, II, IV	<i>DCS</i> _{F2}	CATCCTATGATAGCTTGGTC	342	[30]
	<i>DCS</i> _{R1}	CTAAATCATAGCCATGACCG		
SCC <i>mec</i> III	<i>RIF4</i> _{F3}	GTGATTGTTTCGAGATATGTGG	414	[30]
	<i>RIF4</i> _{R9}	CGCTTTATCTGTATCTATCGC		
<i>mecA</i> (<i>mA1</i> - <i>mA2</i>)	<i>mA1</i>	TGCTATCCACCCTCAAACAGG	286	[55]
	<i>mA2</i>	AACGTTGTAACCACCCCAAGA		
<i>ccrA1-ccrB</i> ($\alpha 1$ - βc)	<i>$\alpha 1$</i>	AACCTATATCATCAATCAGTACGT	695	[55]
<i>ccrA2-ccrB</i> ($\alpha 2$ - βc)	<i>$\alpha 2$</i>	TAAAGGCATCAATGCACAAACACT	937	[55]
<i>ccrA3-ccrB</i> ($\alpha 3$ - βc)	<i>$\alpha 3$</i>	AGCTCAAAAAGCAAGCAATAGAAT	1.791	[55]

	<i>βc</i>	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT		
<i>ccrA4-ccrB4 (α4.2-β4.2)</i>	<i>α4.2</i>	GTATCAATGCACCAGAACTT	1,287	[55]
	<i>β4.2</i>	TTGCGACTCTCTTGGCGTTT		
<i>ccrC (γR-γF)</i>	<i>γR</i>	CCTTTATAGACTGGATTATTCAAAAATAT	518	[55]
	<i>γF</i>	CGTCTATTACAAGATGTTAAGGATAAT		
<i>mI6</i>	<i>mecA-mecI (mA7-mI6)</i>	CATAACTTCCCATTCTGCAGATG	1,963	[55]
<i>IS7</i>	<i>mecA-IS1272 montante de mecA (mA7-IS7)</i>	ATGCTTAATGATAGCATCCGAATG	2,827	[55]
<i>IS2(iS-2)</i>	<i>mecA-IS431 montante de mecA (mA7-IS2 [iS-2])</i>	TGAGGTTATTCAGATATTTTCGATGT	804	[55]
<i>mA7</i>		ATATACCAAACCCGACA ACTACA		
<i>hla</i>	<i>hla_F</i>	CTGATTACTATCCAAGAAATTTCGATTG	209	[56]
	<i>hla_R</i>	CTTCCAGCCTACTTTTTTATCAGT		
<i>hld</i>	<i>hld_F</i>	ATGGCAGCAGATATCATTTC	357	[57]
	<i>hld_R</i>	CGTGAGCTTGGGAGAGAC		
SLUSH	<i>slush_F</i>	TTTCGTCTTTGCACACACATTTCCA	977	[44]
	<i>slush_R</i>	ACAGCACAAAAGCCTTA ACTATCTCA		
β-Hemolisina	<i>βhemolisyn_F</i>	TGGTCAAGGTACAGAAGGTTGGCA	449	[44]
	<i>βhemolisyn_R</i>	TATCCCAACTATACGCGTTGCCCT		
Hemolisina III	<i>hemolisynIII_F</i>	TAATGCTGTTTCGCACGGAGTTGC	407	[44]
	<i>hemolisynIII_R</i>	GACGCCTACCCATCCCATTACAA		

a Identificação genotípica das espécies; Primer Forward (*F*); Primer Reverse (*R*); Pb – tamanho do amplicon, em pares de bases; Ref. Referências.

2.9. Detecção de genes relacionados às hemolisinas e proteínas de superfície específicas de *S. lugdunensis*

A detecção de genes codificadores de β-Hemolisina, Hemolisina III, SLUSH e proteínas Fbl e vWbl, seguiu parâmetros descritos por Szabados et al. [44], com desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de anelamento a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 60 segundos e uma etapa de desnaturação a 94°C por 30 segundos. As reações foram otimizadas utilizando a linhagem de referência internacional ATCC 700328 como controle positivo.

2.10. Classificação do Cassete Cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*)

Para a classificação do SCC*mec* as amostras foram submetidas a reações de PCR multiplex, utilizados os primers descritos na Tabela 1 para os locus específicos de cada tipo. As reações foram realizadas em termocicladores GenePro e LifePro, conforme os parâmetros descritos por Oliveira & Lencastre (2002) e Machado et al. (2007) [30, 58], com desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 53°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Após os 30 ciclos, os tubos foram incubados a 72°C por 4 minutos antes de resfriar a 4°C.

Devido à grande diversidade de SCC*mec* relatada em ECN, um segundo protocolo, descrito por Kondo et al. [55] foi aplicado aos isolados não tipados pela metodologia inicial. Nesse

protocolo a tipagem *SCCmec* baseou-se em um conjunto de PCRs multiplex (M-PCRs), no qual, as reações M-PCRs 1 e 2 foram utilizadas para atribuição do tipo *SCCmec*, através da identificação dos genes do complexo *ccr* e *mec*. Na M-PCR 1 a amplificação se deu com uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 2 minutos, anelamento a 57°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos e uma etapa final de alongamento a 72°C por 2 minutos. A M-PCR 2 seguiu os mesmos parâmetros, exceto pela temperatura de anelamento, que foi aumentada para 60°C por 1 minuto, para evitar a geração de fragmentos de DNA não específicos.

2.11. Pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em placa de poliestireno

A produção de biofilme foi avaliada em placas de poliestireno conforme técnica proposta por Christensen et al (1985) [59] e modificada por Oliveira & Cunha (2010) [60], utilizando leituras de densidade óptica do material aderente produzido pelas bactérias.

As cepas foram cultivadas em TSB (Tryptic-Soy Broth) e incubadas por 24 horas a 37°C. Posteriormente foram diluídas em proporção 1:1 em TSB com 2% de glicose e inoculadas em placas esterilizadas de 96 poços com fundo plano (SPL – Life Sciences). Adicionalmente, os isolados de *S. lugdunensis* também foram diluídos em TSB com 5% de glicose e submetidos ao mesmo protocolo. Os poços foram preenchidos com 200 µl de cultura diluída, com as amostras em quadruplicata. Em todos os testes foram utilizados controles, incluindo poços com TSB estéril, uma linhagem de referência internacional produtora de biofilme (*S. epidermidis* ATCC 35984) e uma linhagem não produtora (*S. epidermidis* ATCC 12228). As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C, posteriormente, o meio foi removido e os biofilmes aderidos foram lavados quatro vezes com solução tampão fosfato salina (PBS, pH 7,2). Após secagem das placas, as mesmas foram coradas com cristal violeta a 2% por um minuto, em seguida, o excesso de corante foi retirado e duas lavagens com água destilada foram feitas. As placas secas foram submetidas a leitura de densidade óptica (DO), em comprimento de onda de 540nm, em leitor de placa de Elisa (BioTek, Powerwave XS2, Gen5 software).

A partir da DO média dos biofilmes aderidos nos poços, os isolados foram classificados em três categorias, sendo elas: Não Aderente (NA), Fraco Aderente (FRA) e Forte Aderente (FOA). Essa classificação foi definida considerando o ponto de corte estabelecido.

O ponto de corte foi definido seguindo procedimento recomendado por Christensen et al (1985) [59], valendo-se do resultado da densidade óptica de poços com TSB estéril. Desse modo o valor adotado como ponto de corte para as amostras diluídas em TSB com 2% de glicose foi

0,145, e a classificação das amostras respeitou as seguintes regras: $DO \leq 0,145$ para amostras NA; $DO > 0,145$ ou $\leq 0,290$ (dobro do ponto de corte) para amostras FRA; $DO > 0,290$ para amostras FOA. Para as amostras diluídas em TSB com 5% de glicose o ponto de corte foi 0,162 e a classificação das amostras respeitou as seguintes regras: $DO \leq 0,162$ para amostras NA; $DO > 0,162$ ou $\leq 0,324$ (dobro do ponto de corte) para amostras FRA; $DO > 0,324$ para amostras FOA.

2.12. Identificação do perfil clonal por Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

Amostras foram selecionadas de acordo com o padrão de sensibilidade, através da comparação dos halos obtidos em mm pelo método de disco difusão. Essa seleção foi aleatória, de modo à selecionar isolados com diferentes padrões fenotípicos de suscetibilidade. Para tal, as amostras foram agrupadas de acordo com o padrão dos diâmetros dos halos obtidos, gerando grupos com perfis de resistência fenotípica semelhantes. Para cada um desses grupos uma amostra foi selecionada para ser submetida à análise do perfil clonal pela técnica de Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE). A tipagem foi realizada como descrito no protocolo modificado de McDougal et al., 2003 [61].

As amostras foram cultivadas em caldo BHI para o crescimento durante 24 horas. Em um microtubo, foram adicionados 150 μ l da amostra que foi centrifugada à 11.000 rpm por 1 minuto. Depois de desprezado o sobrenadante, foram adicionados 150 μ l de solução TE (10mM de Tris, 1mM EDTA [pH 8,0]). As amostras foram deixadas em banho-maria por 10 minutos à 37°C. Após agitação em vortex, foram adicionados 2,5 μ l de lisostafina (1mg/ml em 20mM de acetato de sódio [pH 4,5]) e 150 μ l de agarose *lowmelt*.

As amostras foram distribuídas nos moldes para plugues, após a solidificação foram colocadas em placa de 24 poços com 2 ml de solução EC (6mM Tris-HCl, 1M NaCl, 100mM EDTA, 0,5% Brij-58, 0,2% deoxicolato de sódio, 0,5% laurilsarcosil sódico) e, posteriormente, incubadas à 37°C por 18h. O EC foi retirado e os plugues lavados com 2 ml de TE quatro vezes à temperatura ambiente com intervalos de meia hora.

Para a restrição do DNA genômico de *S. lugdunensis* foi utilizada a enzima *SmaI* ((FastDigest™ *SmaI*, Thermo Scientific™). A eletroforese foi executada em aparelho CHEF-DR III System (Bio Rad Laboratories, EUA) em gel de agarose a 1% preparado com TBE 0,5M (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad Laboratories, EUA) sob as seguintes condições: intervalos de tempo de pulso de 5 a 40 segundos por 21h; em rampa linear; 6V/cm; ângulo de 120°; 14°C; 0,5M TBE como tampão de corrida. Foi utilizado Lambda Ladder PFG Marker

(New England BioLabs) como marcador molecular. O gel foi corado com GelRed (10.000X em água, Biotium, EUA) por 1 hora, e fotografado sob transiluminação UV.

A análise de similaridade foi realizada utilizando-se o software BioNumerics (versão 7.6; Applied Maths, Bélgica). A criação do dendrograma foi realizada pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) com tolerância da posição das bandas e a otimização ajustada para 1,25 e 1% respectivamente. O coeficiente de similaridade de Dice $\geq 80\%$ foi escolhido para determinação dos clusters.

Para a restrição do DNA genômico de *S. hominis* foi utilizado protocolo de Bouchami et al. [62] com a enzima *XhoI* (FastDigest™ *XhoI*, Thermo Scientific™). As condições de execução foram as seguintes: bloco 1 – intervalos de tempo de pulso de 2 a 20 segundos, por 11 h; bloco 2 — intervalos de tempo de pulso de 2 a 7 segundos por 15 h; em rampa linear; 6V/cm; ângulo de 120°. Para *S. hominis* foi utilizado UPGMA/Dice, com 1% de tolerância e 0,8% de otimização, utilizando um valor de corte de similaridade de 80%. Os dados foram analisados com o software Bionumerics 7.6.

2.13. Visualização dos produtos amplificados

A eficiência das amplificações foi confirmada por eletroforese em gel de agarose a 2%, preparado em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5M. Como padrão foi utilizado um marcador de peso molecular (Sinapse Inc) de 100 pb em cada gel. O DNA foi corado com *Syber Safe* e posteriormente fotografado sob transiluminação ultravioleta (Syngen Imagine, Syngen Biotech, Wrocław, Polônia).

2.14. Análise estatística

As comparações de médias para as variáveis quantitativas foram feitas utilizando teste t-Student para o caso de duas comparações ou ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Tukey para os casos de mais de duas comparações. Associações foram obtidas para variáveis categorizadas considerando faixas etárias, sexo e unidade para espécies através do teste Qui-quadrado. Comparações entre proporções para variáveis com mais de duas categorias foram feitas utilizando o teste apropriado para diferença entre proporções, análogo a Qui-quadrado.

Em todos os testes foi considerado o nível de significância de 5% com a ocorrência de um valor $p < 0,05$. Todas as análises foram feitas utilizando o programa SAS for Windows, v.9.4. e o programa R v.4.2.1.

3. RESULTADOS

Ao todo, 282 isolados mantidos na Coleção de Culturas e pré-identificados como *S. hominis* ou *S. lugdunensis* foram selecionados e submetidos a confirmação de espécie, destes, 92 cepas foram excluídas por não corresponderem à espécie de interesse ou por ausência de crescimento em meio de cultura sólido ou líquido, resultando em 190 amostras compatíveis que foram incluídas no estudo. A Figura 1 retrata a estratégia utilizada na seleção dos isolados. Ao todo, foram identificadas 177 cepas de *S. hominis* coletadas de pacientes distintos, em todos os anos entre 2009 e 2019 e no ano de 2021, além de 13 cepas de *S. lugdunensis* coletadas entre 2009 e 2019, 2021 e 2022. Os dados demográficos dos pacientes e das respectivas amostras são descritos na Tabela 2.

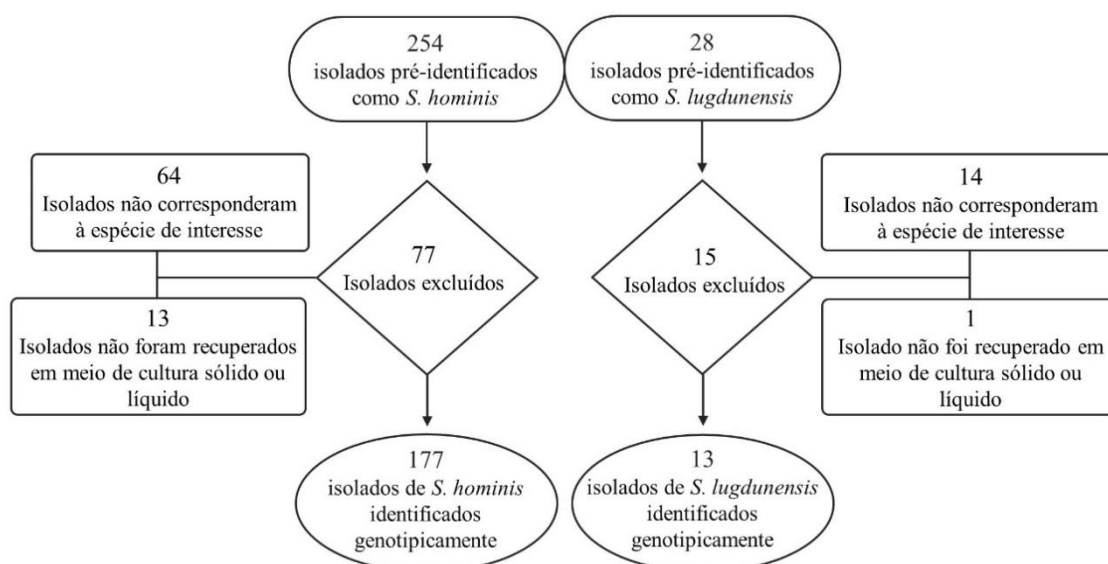


Figura 1. Fluxograma ilustrando a confirmação genotípica dos isolados pré-identificados para inclusão destes no estudo.

A idade dos pacientes variou de 0 (recém-nascidos) a 93 anos, e a faixa etária que predominou foi de 60 a 97 anos (55,8%), classificada como grupo etário de pacientes idosos. Apesar da prevalência de isolados oriundos de pacientes idosos observada em ambas as espécies, a distribuição das amostras de *S. lugdunensis* chama a atenção com 6 isolados (46,1%) provenientes de pacientes entre 0 e 14 anos, sendo confirmada uma associação significativa dessa espécie com pacientes neonatais.

Tabela 2. Caracterização demográfica dos pacientes e unidade de origem das amostras coletadas de cada espécie.

Dados demográficos gerais	Espécies					Total (n = 190)	P valor ^b	
	S. hominis (n = 177)			P valor ^a	S. lugdunensis (n = 13)			
	Total (n = 177)	Shh (n = 160)	Shn (n = 17)					
Idade (média ± DV (intervalo de anos))	55 ± 27,7 (0–93)	54 ± 27,7 (0–93)	58 ± 28,7 (0–91)	0,6134	36 ± 36,6 (0–88)	55 ± 27,2 (0–93)	0,0259	
Grupos etários, n (%)	Neonatal	5 (2,8)	3 (1,9)	2 (11,8)	0,7061	4 (30,8)	9 (4,7)	<0,0001
	Pediátrico	24 (13,6)	23 (14,4)	1 (5,9)	<0,0001	2 (15,4)	26 (13,7)	1
	Adulto	48 (27,1)	46 (28,8)	2 (11,8)	<0,0001	1 (7,7)	49 (25,8)	0,2236
	Idoso	100 (56,5)	88 (55,0)	12 (70,6)	<0,0001	6 (46,1)	106 (55,8)	0,6632
Gênero, n (%)	Feminino	85 (48,0)	79 (49,4)	6 (35,3)	0,2692	8 (61,5)	93 (48,9)	0,3467
	Masculino	92 (52,0)	81 (50,6)	11 (64,7)		5 (38,5)	97 (51,1)	
Setor hospitalar de origem, n (%)								
Pronto socorro adulto	72 (40,7)	67 (41,9)	5 (29,4)	0,4624	4 (30,8)	76 (40,0)	0,6814	
Pronto socorro pediátrico	10 (5,6)	8 (5,0)	2 (11,8)	0,5511	1 (7,7)	11 (5,8)	1	
SeTI	23 (13,0)	20 (12,5)	3 (17,6)	0,8253	1 (7,7)	24 (12,6)	0,9022	
UTI neonatal	2 (1,1)	2 (1,3)	0 (0,0)	0,6754	3 (23,1)	5 (2,6)	0,0001	
UTI pediátrica	3 (1,7)	3 (1,9)	0 (0,0)	1	0 (0,0)	3 (1,6)	1	
Berçário	1 (0,6)	0 (0,0)	1 (5,9)	0,1692	1 (7,7)	2 (1,1)	0,3066	
Pediatria	12 (6,8)	12 (7,5)	0 (0,0)	0,5079	0 (0,0)	12 (6,3)	0,7045	
Clínica Médica	16 (9,0)	15 (9,4)	1 (5,9)	0,9739	2 (15,4)	18 (9,5)	0,7923	
Cirurgia	2 (1,1)	1 (0,6)	1 (5,9)	0,4574	0 (0,0)	2 (1,1)	1	
Unidade de AVC	6 (3,4)	4 (2,5)	2 (11,8)	1	0 (0,0)	6 (3,2)	1	
Dermatologia	4 (2,2)	4 (2,5)	0 (0,0)	1	0 (0,0)	4 (2,1)	1	
Gastroenterologia	8 (4,5)	8 (5,0)	0 (0,0)	0,7417	0 (0,0)	8 (4,2)	0,946	
Neurologia	2 (1,1)	2 (1,3)	0 (0,0)	0,6754	0 (0,0)	2 (1,1)	1	
Cuidados paliativos	1 (0,6)	1 (0,6)	0 (0,0)	1	0 (0,0)	1 (0,5)	1	
Enfermaria cardiorábrica	2 (1,1)	2 (1,3)	0 (0,0)	1	0 (0,0)	2 (1,1)	1	
Enfermaria Moléstias Infecciosas	3 (1,7)	2 (1,3)	1 (5,9)	0,6754	0 (0,0)	3 (1,6)	1	
Hemodiálise	1 (0,6)	1 (0,6)	0 (0,0)	1	0 (0,0)	1 (0,5)	1	
Nefrologia	1 (0,6)	0 (0,0)	1 (5,9)	0,1692	0 (0,0)	1 (0,5)	1	
Ortopedia	2 (1,1)	2 (1,3)	0 (0,0)	0,6754	0 (0,0)	2 (1,1)	1	
Urologia	2 (1,1)	2 (1,3)	0 (0,0)	0,6754	0 (0,0)	2 (1,1)	1	
Obstetrícia	1 (0,6)	1 (0,6)	0 (0,0)	1	0 (0,0)	1 (0,5)	1	
Enfermaria não especificada	1 (0,6)	1 (0,6)	0 (0,0)	1	0 (0,0)	1 (0,5)	1	
Enfermaria de convênios	1 (0,6)	1 (0,6)	0 (0,0)	1	0 (0,0)	1 (0,5)	1	
Não informado	1 (0,6)	1 (0,6)	0 (0,0)	1	1 (7,7)	2 (1,1)	0,3065	

Grupos etários classificados em: Neonatal (0 a 28 dias); Pediátrico (29 dias a 14 anos); Adulto (15 a 59 anos); Idoso (idade igual ou superior a 60 anos). n = número de amostras. SeTI – Serviço de Terapia Intensiva – fornece cuidado à pacientes críticos, em quatro unidades de internação: UTI Cardiológica, UTI Cirúrgica, UTI Clínica e UTI Neurológica. UTI – Unidade de Terapia Intensiva. Unidade de AVC – unidade especializada no atendimento integral de pacientes vítimas de AVC (Acidente Vascular Cerebral). P valor^a: Significância estatística calculada para Shh e Shn; P valor^b: Significância estatística calculada para S. hominis e S. lugdunensis.

Dentre as amostras de *S. hominis*, 17 (9,6%) isolados foram caracterizados como *Shn*, pela resistência à novobiocina. *Shh* foi significativamente mais prevalente em pacientes adultos e pediátricos, enquanto amostras de *Shn* estiveram mais correlacionados à pacientes idosos.

Em relação a origem das amostras, para *S. hominis*, o setor hospitalar predominante foi o Pronto socorro adulto, no qual foram registrados 72 (40,7%) isolados, seguido do Serviço de Terapia Intensiva (SeTI) e do setor de Clínica médica com 23 (13,0%) e 16 (9,0%) isolados, respectivamente. Já os isolados de *S. lugdunensis* embora também tenham se originado predominantemente do Pronto socorro adulto (30,8%), apresentaram uma distribuição distinta, com prevalência significativa entre pacientes da UTI neonatal (23,1%) ao invés do Serviço de Terapia Intensiva (SeTI), como observado para *S. hominis*.

O gene *mecA* foi detectado em 136 (76,8%) isolados de *S. hominis*, chegando a 100% entre isolados de *Shn*, porém não foi encontrado entre as amostras de *S. lugdunensis*. Os testes fenotípicos por disco-difusão também não indicaram perfil de resistência a nenhum antimicrobiano testado em amostras de *S. lugdunensis*. Já para *S. hominis*, 112 (63,3%) amostras foram fenotipicamente resistentes à meticilina, dentre as quais a ausência do gene *mecA* foi verificada em um isolado. Enquanto a resistência ao disco de oxacilina foi constatada em 115 (66,7%) amostras, sendo três isolados negativos para o gene *mecA*. A presença do gene *mecA* foi mais frequente em amostras de *S. hominis* isoladas de UTIs neonatais e pediátricas chegando a 100%. A relação das taxas de resistência à meticilina e aos demais antimicrobianos em amostras de *S. hominis mecA* positivas e negativas está descrita na Tabela 3.

Tabela 3. Distribuição do gene *mecA* e resistência antimicrobiana por disco-difusão entre os isolados de *S. hominis*.

Espécies	Gene <i>mecA</i>	n (%)	Antimicrobianos				Sulfametoxazol/ trimetoprim	
			Cefoxitina n (%)	Oxacilina n (%)	Linezolida n (%)	R	SDD	
			<i>S. hominis</i> (n = 177)	Detectado	136 (76,8)	111 (81,6)	115 (84,5)	0 (0,0)
	Não detectado	41 (23,2)	1 (2,4)	3 (7,3)	0 (0,0)	2 (4,9)	2 (4,9)	

n = número de amostras. R: Resistente; SDD: Sensível dose-dependente.

A resistência à sulfametoxazol/trimetoprim foi observada apenas em *S. hominis*, principalmente em cepas carreadoras do gene *mecA*. Já a resistência ao disco de linezolida foi verificada em um isolado de *Shh* da Dermatologia, no entanto, após verificação com Etest® a amostra foi definida como sensível, apresentando uma concentração inibitória mínima equivalente à 2,0 µg/mL.

Os genes relacionados à formação de biofilme foram pesquisados nas 190 amostras, sendo 94 (49,5%) positivas para a presença de um ou mais genes do operon *ica*. Em *S. hominis* foi constatada aderência em 33 (18,6%) amostras de *S. hominis*, nas quais a presença de um ou mais genes *ica* foi encontrada em apenas 13 (39,4%) amostras. A detecção do genótipo *icaAD*, foi verificada em 26 (13,7%) amostras, correspondendo aos genes mais frequentemente encontrados, sozinhos ou em combinação. Já a presença dos genes *icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC*, concomitantemente, foi detectada em três isolados de *S. hominis*, todos não aderentes.

Não houve correlação entre a detecção de genes do operon *ica* e a formação de biofilme sob as condições descritas, para nenhuma das espécies. A distribuição desses genes em relação às espécies e à produção de biofilme pode ser visualizada na Tabela 4. Somente uma amostra de *S. lugdunensis* produziu biofilme em meio de cultura com glicose a 2%, sendo ele desprovido dos genes *ica*. O meio suplementado com 5% de glicose não aumentou a produção de biomassa nessa espécie, todavia, suprimiu a produção de biofilme da cepa fraca aderente a 2% de glicose, enquanto favoreceu a formação de um biofilme fraco aderente em outro isolado, anteriormente não aderente.

Na definição dos complexos SCC*mec* dos isolados de *S. hominis* resistentes apenas 18 (13,2%) amostras foram devidamente caracterizadas pelo método proposto por Machado et al. (2007) [63], as demais foram submetidas à metodologia descrita por Kondo et al. [55]. Apesar disso, a caracterização do tipo do SCC*mec* revelou alta frequência de complexos não tipáveis em *S. hominis*, totalizando 94 (69,1%) amostras, dentre os quais 61 (64,9%) isolados apresentaram complexos *ccr* não caracterizados. Ademais, foi observada a amplificação recorrente do complexo *ccr* tipo 1 (*A1B1*) juntamente ao complexo *mec* classe A, em 33 (24,3%) isolados não tipados, não correspondendo a nenhum dos tipos de SCC*mec* descritos até o momento. Ainda entre os isolados não caracterizados, também houve recorrência da amplificação da região do locus A, específico do SCC*mec* tipo I, porém com ausência do gene *dcs* (locus D), cuja amplificação é preconizada para a sua devida identificação, de acordo com a interpretação proposta pelo método de Machado et al. (2007) [63].

Dentre os complexos caracterizados, o SCC*mec* tipo XIV e tipo III foram os mais prevalentes, encontrados em 19 (14,0%) e 16 (11,7%) isolados de *S. hominis*, respectivamente. Ademais, amostras de *Shn* foram mais associadas ao SCC*mec* tipo XIV, enquanto isolados de *Shh* se correlacionaram à SCC*mec* NT. A distribuição dos tipos de SCC*mec* está descrita na Tabela 5.

Tabela 4. Distribuição de genes e formação de biofilme por aderência em placa de poliestireno para cada espécie.

Aderência	n (%)	Detecção de genes por PCR															ica-n (%)
		icaA + n (%)	icaD + n (%)	icaB + n (%)	icaC + n (%)	icaAB + n (%)	icaAC + n (%)	icaAD + n (%)	icaBC + n (%)	icaBD + n (%)	icaDC + n (%)	icaABC + n (%)	icaADB + n (%)	icaACD + n (%)	icaDBC + n (%)	icaADBC + n (%)	
<i>S. hominis</i>	177 (100,0)	45 (25,4)	62 (35,0)	15 (8,5)	17 (9,6)	12 (6,8%)	11 (6,2)	23 (13,0)	7 (3,9)	8 (4,5)	11 (6,2)	5 (2,8)	6 (3,4)	8 (4,5)	4 (2,3)	3 (1,7)	90 (50,8)
Forte	4 (2,3)	0 (0,0)	1 (25,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (75,0)
Fraca	29 (16,4)	7 (24,1)	7 (24,1)	0 (0,0)	1 (3,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (10,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	17 (58,6)
Não aderente	144 (81,3)	38 (26,4)	54 (37,5)	15 (10,4)	16 (11,1)	12 (8,3)	11 (7,6)	20 (13,9)	7 (3,9)	8 (4,5)	11 (7,6)	5 (3,5)	6 (4,2)	8 (5,6)	4 (2,8)	3 (2,1)	70 (48,6)
P valor		0,482	0,354 4	0,152 9	0,355 7	0,2288	0,2608	0,6422	0,4478	0,5829	0,2608	0,5546	0,4908	0,3829	0,6257	0,7049	0,3823
<i>S. lugdunensis</i>	13 (100,0)	3 (23,1)	4 (30,8)	1 (7,7)	3 (23,1)	0 (0,0)	1 (7,7)	3 (23,1)	1 (7,7)	1 (7,7)	2 (15,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (7,7)	1 (7,7)	0 (0,0)	7 (53,8)
Forte	0 (0,0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fraca	1 (7,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)
Não aderente	12 (92,3)	3 (25,0)	4 (33,3)	1 (8,3)	3 (25,0)	0 (0,0)	1 (8,3)	3 (100,0)	1 (8,3)	1 (8,3)	2 (16,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (8,3)	1 (8,3)	0 (0,0)	6 (50,0)
P valor		0,399 7	0,224 2	0,657 2	0,521 8	-	1	1	1	1	1	-	-	1	1	-	1

n = número de amostras.

Tabela 5. Distribuição dos tipos SCCmec caracterizados em relação às faixas etárias, unidades de origem, produção de biofilme e detecção de genes de enterotoxinas.

Variáveis	Tipos SCCmec, n(%)							P valor
	NT	I	III	IV	V	VIII	XIV	
subsp. <i>hominis</i> (n = 119)	88 (73,9)	1 (0,8)	14 (11,8)	2 (1,7)	2 (1,7)	2 (1,7)	10 (8,40)	
subsp. <i>novobiosepticus</i> (n = 17)	6 (35,3)	0 (0,0)	2 (11,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	9 (52,9)	
<i>P valor</i>	0,002716	1	1	1	1	1	<0.0001	
<i>S. hominis</i> (n = 136)	94 (69,1)	1 (0,7)	16 (11,7)	2 (1,5)	2 (1,5)	2 (1,5)	19 (14,0)	
Faixa etária								
Neonatal	4 (4,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,9370
Pediátrico	14 (14,9)	1 (100,0)	2 (12,5)	1 (50,0)	1 (50,0)	0 (0,0)	1 (5,3)	0,0698
Adulto	27 (28,7)	0 (0,0)	5 (31,3)	0 (0,0)	1 (50,0)	2 (100,0)	3 (15,8)	0,6996
Idoso	49 (52,1)	0 (0,0)	9 (56,3)	1 (50,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	15 (78,9)	0,1328
Setor hospitalar de origem								
Pronto socorro adulto	32 (34,0)	0 (0,0)	8 (50,0)	1 (50,0)	1 (50,0)	0 (0,0)	5 (26,3)	0,6305
Pronto socorro pediátrico	6 (6,4)	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (5,3)	0,0071
SeTI	9 (9,6)	0 (0,0)	3 (18,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (50,0)	3 (15,8)	0,6123
UTI neonatal	2 (2,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,9895
UTI pediátrica	2 (2,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (50,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,0001
Berçário	1 (1,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,9985
Pediatria	7 (7,4)	0 (0,0)	2 (12,5)	0 (0,0)	1 (50,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,2402
Clínica Médica	10 (10,6)	0 (0,0)	1 (6,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (21,1)	0,7756
Cirurgia	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (10,5)	0,0478
Unidade de AVC	3 (3,2)	0 (0,0)	1 (6,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (10,5)	0,8632
Dermatologia	4 (4,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,9370
Gastroenterologia	5 (5,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,8402
Neurologia	2 (2,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,9895
Cuidados paliativos	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (5,3)	0,3895
Enfermaria cardiotorácica	2 (2,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,9895
Enfermaria Moléstias Infecciosas	2 (2,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (5,3)	0,9678
Hemodiálise	1 (1,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,9985
Nefrologia	1 (1,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,9985
Ortopedia	1 (1,1)	0 (0,0)	1 (6,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,7993
Urologia	2 (2,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,9895
Obstetrícia	1 (1,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,9985
Enfermaria não especificada	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (50,0)	0 (0,0)	<0.0001
Enfermaria de convênios	1 (1,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,9985
Produção de Biofilme								
Não aderente	81 (86,2)	1 (100,0)	8 (50,0)	2 (100,0)	2 (100,0)	1 (50,0)	14 (73,7)	0,2706
Aderente	13 (13,8)	0 (0,0)	8 (50,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (50,0)	5 (26,3)	

n = número de amostras. NT = Não tipável. Unidade de AVC – unidade especializada no atendimento integral de pacientes vítimas de AVC (Acidente Vascular Cerebral). Enfermarias: inclui unidades de internação cardiotorácica, moléstias infecciosas e enfermaria de convênios. Especialidades: inclui dermatologia, ginecologia, gastroenterologia, nefrologia, neurologia, urologia, obstetrícia, ortopedia, oftalmologia e otorrinolaringologia. Cirurgia: inclui cirurgia cardíaca, cirurgia vascular, gastroenterologia cirúrgica e cirurgia geral

Amostras com SCCmec não tipados se mostraram dispersas em grande parte dos setores hospitalares analisados, porém com predominância entre isolados do pronto socorro pediátrico. Já cepas carreadoras de SCCmec tipo XIV foram massivamente isoladas de pacientes idosos, com 15 (78,9%) amostras oriundas dessa faixa etária.

Não houve nenhuma correlação confirmada entre os tipos SCCmec e a formação de biofilme, embora a taxa de produção de biofilme tenha sido mais frequente entre isolados SCCmec tipo III. Já entre isolados de *Shn* a produção de biofilme foi significativamente maior do que a descrita entre amostras de *Shh*, assim como a resistência à metilicina, como visualizado na Figura 2.

O perfil de suscetibilidade antimicrobiana das amostras de *S. hominis* apresentou variações nos diferentes tipos SCCmec. As menores taxas de resistência aos discos de cefoxitina e oxacilina foram verificadas entre isolados carreadores de SCCmec tipo IV e V, embora o reduzido número de isolados não permita estabelecer essa correlação. Nos isolados caracterizados com SCCmec tipo III e SCCmec tipo XIV, o fenótipo de resistência ao disco de oxacilina se assimilou mais ao genótipo de resistência do que o observada para cefoxitina, no entanto a correlação não foi significativa (SCCmec tipo III: $p=0,3624$; SCCmec tipo XIV: $p=0,5971$). Ademais, a resistência a sulfametoxazol/trimetoprim foi verificada em oito (50,0%) isolados carreadores de SCCmec tipo III, enquanto nos isolados com SCCmec tipo XIV o padrão de resistência a sulfametoxazol/trimetoprim foi predominantemente sensível dose-dependente. A frequência de resistência fenotípica entre os diferentes perfis de SCCmec é descrita na Figura 3.

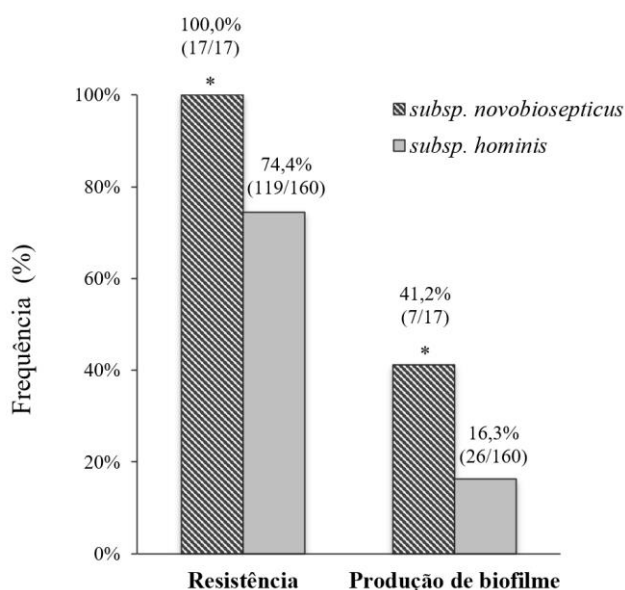


Figura 2. Comparação do perfil de resistência à metilicina ($P\text{ valor}=0,0173$) e da produção de biofilme ($P\text{ valor}=0,0121$) entre isolados de *Shn* e *Shh*.

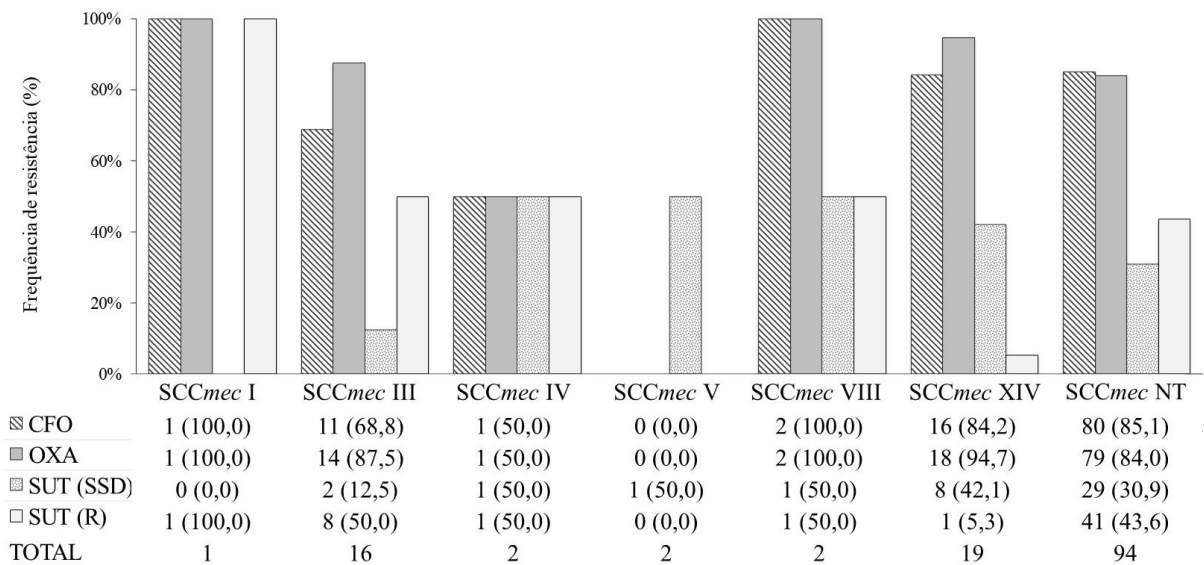


Figura 3. Frequência de resistência fenotípica aos antimicrobianos cefoxitina (CFO), oxacilina (OXA), linezolida (LNZ) e sulfametoxazol/trimetoprim (SUT) por tipo SCCmec.

O gene *seg* foi o mais detectado dentre todos os genes de enterotoxinas, em ambas as espécies, seguido dos genes *sei* e *sea*, como demonstrado na Figura 4. No entanto não houve diferença significativa na detecção de genes enterotoxigênicos entre as espécies. A presença concomitante de genes de enterotoxinas foi verificada em alguns isolados, como é possível visualizar na Figura 5. Os genes codificadores de SEE e TSST-1 não foram encontrados em nenhum isolado.

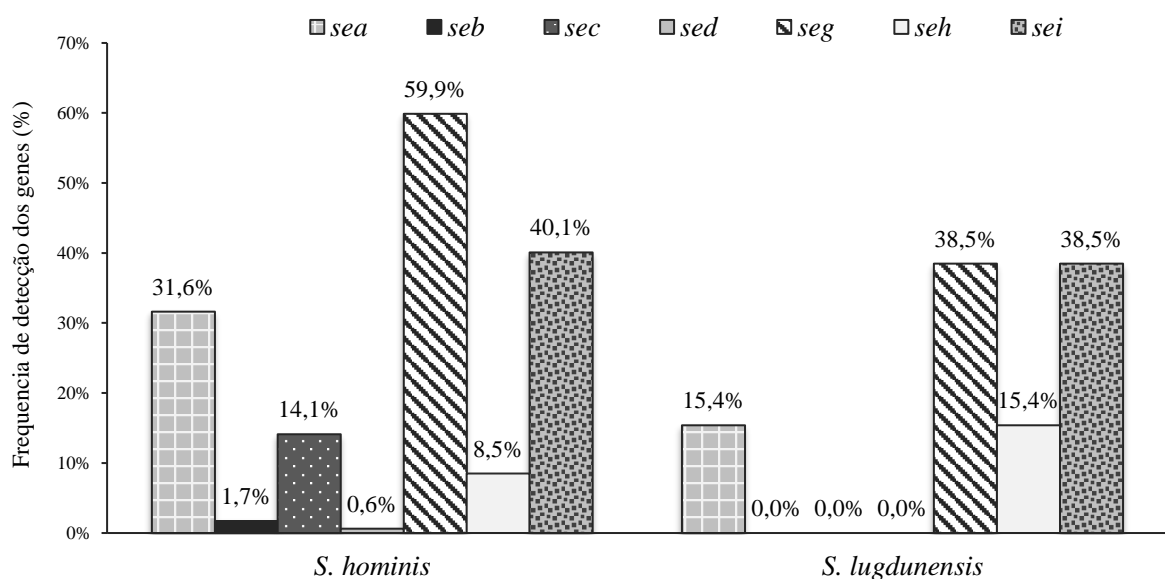


Figura 4. Frequência de detecção de genes codificadores de enterotoxinas por espécie.

S. hominis

<i>sea</i>	56								
<i>seb</i>	3	3							
<i>sec</i>	16	1	25						
<i>sed</i>	0	0	0	1					
<i>see</i>	0	0	0	0	0				
<i>seg</i>	47	3	20	1	0	106			
<i>seh</i>	7	0	3	0	0	14	15		
<i>sei</i>	35	3	15	0	0	56	9	71	
<i>tst</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>	<i>seg</i>	<i>seh</i>	<i>sei</i>	<i>tst</i>

S. lugdunensis

<i>sea</i>	2								
<i>seb</i>	0	0							
<i>sec</i>	0	0	0						
<i>sed</i>	0	0	0	0					
<i>see</i>	0	0	0	0	0				
<i>seg</i>	1	0	0	0	0	5			
<i>seh</i>	0	0	0	0	0	1	2		
<i>sei</i>	1	0	0	0	0	3	1	5	
<i>tst</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>	<i>seg</i>	<i>seh</i>	<i>sei</i>	<i>tst</i>

Figura 5. Combinações entre os genes de enterotoxinas estafilocócicas e TSST-1 detectados entre as amostras de *S. hominis* e *S. lugdunensis*. As lacunas sombreadas representam o número total de genes detectados entre os ECN.

O gene *hld* não foi encontrado em nenhum dos isolados, enquanto o gene *hla* foi constatado em três isolados, dois *S. lugdunensis* e um *S. hominis*. O perfil dessas amostras é listado na Tabela 6.

Tabela 6. Caracterização dos isolados positivos para a presença do gene *hla* codificador da hemolinina α .

Isolado	Espécie	Ano	Unidade	Perfil operon <i>ica</i> /produção de biofilme	Perfil de resistência
114pc	<i>S. hominis</i>	2021	Clínica Médica	<i>icaADBC</i> / Não aderente	<i>mecA</i> + / NT
201	<i>S. lugdunensis</i>	2019	Pronto socorro adulto	<i>icaAD</i> / Não aderente	<i>mecA</i> -
204	<i>S. lugdunensis</i>	2022	Pronto socorro adulto	<i>icaAD</i> / Não aderente	<i>mecA</i> -

Perfil operon *ica* / produção de biofilme: Detecção de genes do operon *ica* / Aderência em placa de poliestireno; Perfil de resistência: Detecção do gene *mecA* (+/-) / Caracterização do tipo SCC*mec*

Os isolados de *S. lugdunensis* incluídos neste estudo correspondem à totalidade das amostras dessa espécie identificadas de hemoculturas desde o ano de 2009, totalizando 13 linhagens coletadas nos anos de 2011 (1), 2014 (1), 2015 (2) a 2016 (3), 2019 (2), 2021 (1) e 2022 (3).

Dentre os isolados de *S. lugdunensis* a detecção do gene *fbl* e do gene codificador de hemolisina III, foi confirmada em todas as 13 amostras analisadas. Os demais genes de virulência também foram verificados com alta prevalência, como descrito na Figura 6.

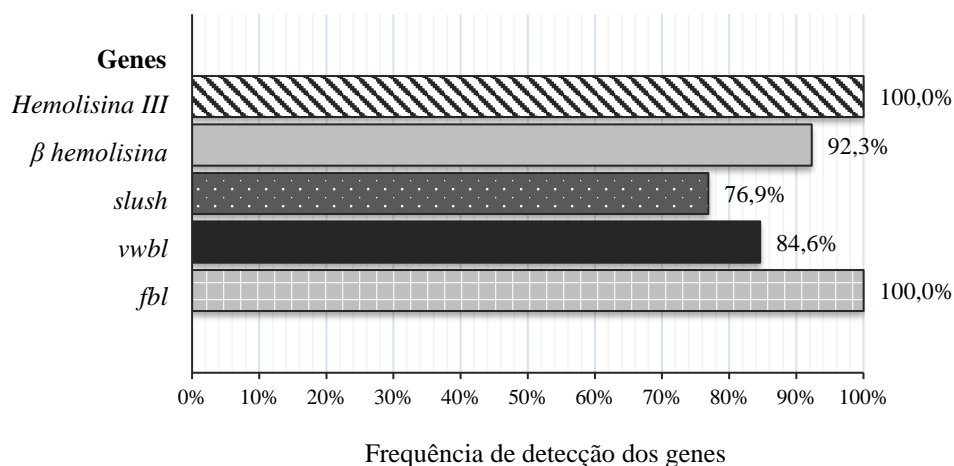


Figura 6. Frequência de detecção de genes associados ao perfil de virulência de isolados de *S. lugdunensis*. Gene codificante da hemolisina III (13/13), gene codificante da β hemolisina (12/13), gene *slush* (10/13), gene *vwbl* (11/13) e gene *fbl* (13/13).

Em *S. lugdunensis*, a análise de macrorrestrição do DNA cromossômico, utilizando um coeficiente estabelecido de 80% de similaridade, permitiu identificar a presença de três clusters, designados A, B e C, agrupando 3, 4 e 2 isolados respectivamente, como descrito na Figura 7. O cluster A reuniu isolados coletados em 2019 e 2022, do pronto socorro adulto e UTI neonatal. Já o cluster maior, denominado B, agrupou isolados de 2015 a 2021 de diferentes unidades incluindo pronto socorro adulto, pronto socorro pediátrico, uma amostra do SeTI, mais precisamente da ala de UTI coronariana, e um isolado de origem desconhecida, porém coletado de um paciente neonatal. O cluster C agrupou isolados de anos anteriores, 2014 e 2016, provenientes de Clínica Médica e UTI neonatal. Ao todo 9 (69,2%) isolados agruparam por similaridade genética.

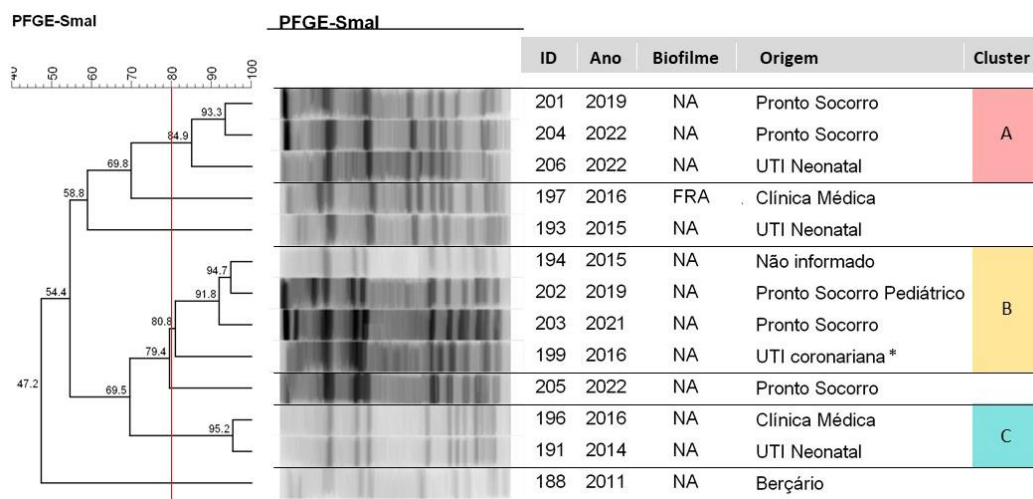


Figura 7. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics Applied Maths), dos perfis de PFGE – SmaI de *S. lugdunensis*, indicando o perfil de resistência à metilina (S: Sensível; R: Resistente), a produção de biofilme (FOA: Forte aderente; FRA: Fraco aderente; NA: Não aderente) e a unidade de origem. As letras destacadas evidenciam os clusters (>80% de similaridade) denominados A, B e C.

Dentre os isolados de *S. hominis* submetidos à análise de macrorrestrrição do DNA foram identificados seis clusters, designados por letras alfabéticas de A a F, como descrito na Figura 8. Todos os agrupamentos foram compostos de duas amostras apenas, majoritariamente formados por isolados provindos do Pronto socorro.

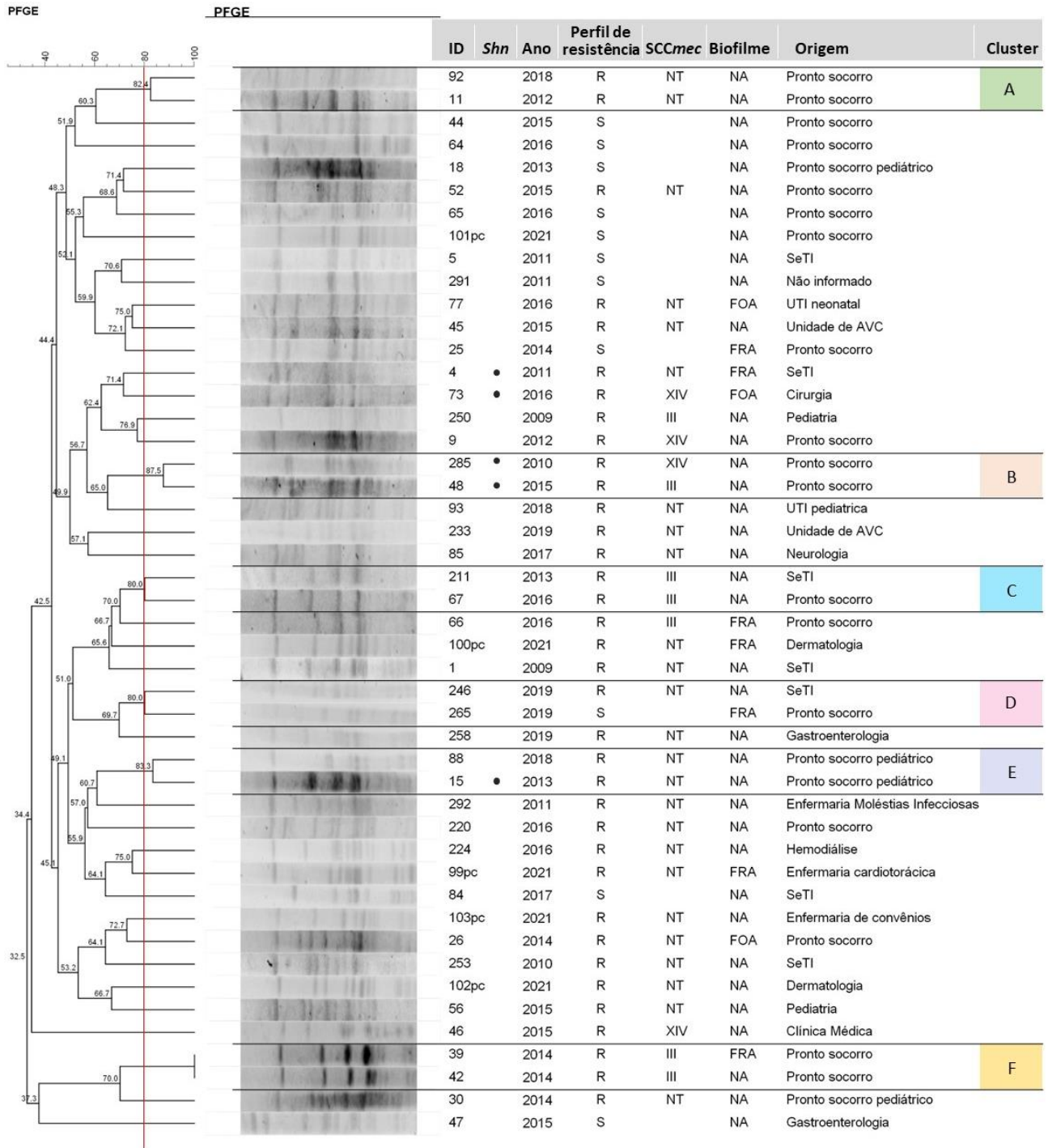


Figura 8. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics Applied Maths), dos perfis de PFGE – *XhoI* de *S. hominis*, indicando a classificação de resistência a novobiocina (•) indicadora de *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* (*Shn*), o perfil de resistência a meticilina (S: Sensível; R: Resistente), a caracterização do tipo *SCCmec*, a produção de biofilme (FOA: Forte aderente; FRA: Fraco aderente; NA: Não aderente) e a unidade de origem. As letras destacadas evidenciam os clusters (>80% de similaridade) denominados A, B, C, D, E e F.

4. DISCUSSÃO

Taxas elevadas de resistência à meticilina mediada pelo gene *mecA* já foram descritas em *S. hominis*, chegando a 80% [17,30,31], semelhante ao encontrado no presente estudo, no qual resistência à meticilina foi constatada em 76,8% dos isolados de *S. hominis*. Em contrapartida, o perfil altamente suscetível de *S. lugdunensis* à maioria dos antibióticos permanece notável, com prevalência de resistência à meticilina variando de 0 a 8,3% [64], coerente à ausência de detecção do gene *mecA* observada nas 13 amostras de *S. lugdunensis* analisadas neste estudo.

Estudos filogenéticos evidenciaram um genoma altamente conservado em *S. lugdunensis*, sugerindo inúmeras barreiras genéticas à transferência horizontal de genes que podem explicar a persistência da alta suscetibilidade antimicrobiana tão discordante do relatado para as demais espécies de ECN [65]. De forma consoante, foi verificada relação clonal em nove (69,2%) amostras de *S. lugdunensis* nesse trabalho, com formação de três clusters diversos em termos de origem e ano de coleta. O cluster maior, denominado cluster B, que reuniu linhagens isoladas entre 2015 e 2021, evidenciou isolados clonais persistentes por 6 anos em diferentes unidades hospitalares. No entanto não houve distinção do perfil de virulência ou de resistência entre isolados desse agrupamento com os demais, podendo indicar, mais uma vez, a distribuição de linhagens geneticamente correlacionadas, possível fruto do aspecto conservado do genoma dessa espécie. No entanto, é curioso até que ponto a existência de um pan-genoma fechado, em uma espécie recentemente descrita e considerada emergente, pode ser vantajosa em termos evolutivos [65].

Um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa, a partir de espécies de ECN isoladas nos 20 anos precedentes ao período estudado no atual trabalho, no mesmo hospital, destacou uma alta taxa de bacteremia causada por ECN nas unidades neonatais e pediátricas, incluindo isolados de *S. lugdunensis* e *S. hominis*, nos quais o gene *mecA* foi encontrado em 2 (22,2%) e 16 (69,6%) amostras, respectivamente [66]. Alinhado aos resultados passados, as UTIs neonatais e pediátricas também se destacaram neste trabalho, nas quais a resistência à meticilina observada em *S. hominis* chegou a 100%. Enquanto amostras de *S. lugdunensis* foram massivamente isoladas de pacientes neonatais (30,8%), que juntamente aos pacientes pediátricos somaram 6 (46,2%) isolados. Tais resultados chamam a atenção para a alta resistência antimicrobiana nessas unidades e para a frequência do isolamento de *S. lugdunensis*, considerando que infecções causadas por *S. lugdunensis* são cada vez mais frequentes na população pediátrica, com destaque para infecções de tecidos moles e otite média além de infecções invasivas da corrente sanguínea [67,68].

Apesar da relevância clínica desse patógeno, o estudo dos seus aspectos patogênicos ainda é limitado devido à dificuldade de identificação dessa espécie, que torna a frequência de infecções por *S. lugdunensis* subestimada em muitos laboratórios [69]. Esse desafio ainda se estende às demais espécies de ECN, cuja identificação laboratorial correta é problematizada devido à homologia genética e fenotípica compartilhada entre espécies [70,71]. De fato, a identificação molecular, incluída na metodologia deste trabalho, verificou falha de identificação em *S. hominis* e *S. lugdunensis*, mais precisamente em 64 (25,2%) e 14 (50,0%) isolados, respectivamente, que foram identificados incorretamente na rotina laboratorial, por métodos automatizados e semiautomatizados.

A diferenciação entre as subespécies de *S. hominis*, *Shh* e *Shn*, quando é feita, também enfrenta desafios. Isolados de *Shn* são geralmente descritos como multirresistentes e frequentemente associados a casos de bacteremia e surtos, ainda assim, a diversidade genômica dessa subespécie é pouco compreendida [72]. Em nosso estudo, uma identificação presuntiva caracterizou 17 (9,6%) isolados de *Shn*, todos resistentes à meticilina, majoritariamente coletados de pacientes idosos, e com taxas maiores de produção de biofilme se comparados aos isolados de *Shh*. Esses resultados indicam resistência à meticilina e produção de biofilme elevada nessa subespécie, embora a literatura ainda careça de dados principalmente a respeito da formação de biofilme em *Shn*.

A relação clonal entre os isolados de *Shn* não se distinguiu das amostras de *Shh* analisados no presente trabalho, embora um cluster de amostras de *Shn* tenha sido caracterizado. Todavia, Pereira et al. (2019) [72] descreveram perfis distintos entre as subespécies, que agruparam de forma independente, sem relação clonal direta entre os isolados de cada uma. O mesmo estudo ainda relatou falha na identificação de *Shn* por teste de resistência à novobiocina, com taxa de erro chegando a 38,8%, se comparada à identificação por métodos automatizados de alta acurácia, incluindo MALDI-TOF MS (sistema de ionização/dessorção a laser assistida por matriz acoplado a analisador de massas de tempo de voo) [72]. O potencial de falha de identificação destaca a possibilidade de haver mais isolados de *Shn* dentre as amostras de *S. hominis* analisadas neste trabalho, apesar da sensibilidade à novobiocina.

Outro achado importante a ser mencionado envolve a resistência fenotípica à cefoxitina, que foi inferior à taxa de detecção do gene *mecA* em *S. hominis*, observação que remete à complexidade por trás dos determinantes genéticos que suportam a resistência a β -lactâmicos, que é multifatorial e não exclusivamente dependente da expressão de PBP2a. Atualmente se tem conhecimento de uma variedade de fatores acessórios referidos como genes *fem* (fatores essenciais para resistência à meticilina), genes *aux* (fatores auxiliares), genes *hmt* (alta

resistência à meticilina) e outros genes sem ligação ao *mecA*, que influenciam na resistência. Muitos desses fatores viabilizam a resistência garantindo o fornecimento de níveis adequados de precursores para as PBPs completarem a síntese adequada da parede celular, mesmo na presença de β -lactâmicos[73].

Decerto, a detecção do gene *mecA* é o método mais definitivo para confirmação da resistência à meticilina, e o teste fenotípico com disco de cefoxitina é preditivo para o perfil de resistência, como preconizado pelo CLSI. No entanto, um trabalho recente sugeriu que o fenótipo de resistência a discos de cefoxitina são incertos na definição de resistência em algumas espécies estafilocócicas não especificadas pela normativa do CLSI, incluindo *S. hominis*, que frequentemente se mostram fenotipicamente sensíveis apesar da presença do gene *mecA* [74]. Muito semelhante ao descrito neste trabalho, no qual foi observado que 25 (14,1%) isolados de *S. hominis* tiveram resultados inconsistentes entre os testes fenotípicos e genotípicos, indicando a necessidade de rever os pontos de corte para esta espécie.

Taxas similares de fenótipo sensível ao disco de oxacilina foram encontradas entre os isolados resistentes. Esse perfil de resistência heterogêneo de cepas carreadoras do gene *mecA* porém suscetíveis à oxacilina, têm sido relatado em MRSA, com taxas que variam de 1.25% a 52%, entre diversos estudos [75].

Apesar da detecção do gene *mecA* inferir sua presença intrínseca em todas as células daquela população microbiana, o gene pode ser expresso em uma subpopulação ou várias subpopulações que, conseqüentemente, exibem aumento dos níveis de resistência aos antibióticos em comparação com a população principal [76,77]. Esse fenômeno é chamado de heteroresistência e prejudica a interpretação dos testes para detecção de resistência [76].

Portanto, os laboratórios devem estar cientes de que os testes fenotípicos podem não se correlacionar bem em todas as espécies estafilocócicas, como preconizado pelo CLSI. A detecção de resistência à meticilina em laboratórios clínicos pode ser erroneamente inferior à real prevalência e induzir a tratamentos clínicos inadequados de infecções estafilocócicas. A escolha de antibióticos β -lactâmicos para tratar infecções decorrentes de cepas resistentes, porém fenotipicamente sensíveis, podem promover a seleção de subpopulações resistentes, levando à falha do tratamento.

Em um isolado foi constatada resistência à meticilina não mediada pelo gene *mecA*. Nessa amostra o perfil resistente deve estar associado a outro mecanismo, no entanto a explicação por trás desse fenômeno ainda é incerta. Em cepas de *S. aureus* a sensibilidade reduzida à oxacilina combinada ao genótipo *mecA* negativo é descrito como resistência *borderline* à oxacilina (Borderline Oxacillin Resistant *Staphylococcus aureus* – BORSA), determinada por vários

mecanismos bioquímicos incluindo a hiperprodução de beta-lactamase, a síntese de novas beta-lactamases codificadas em plasmídeos e a modificação de genes PBP [78]. Todavia, esse fenômeno é pouco discutido para ECN. Pesquisadores apontam a pressão seletiva pelo uso de antimicrobianos como o principal fator de risco para o desenvolvimento desse fenótipo [78]. Ademais, a identificação errônea desses isolados pode implicar no uso excessivo de agentes antimicrobianos e comprometer a triagem de infecções hospitalares.

Outro antimicrobiano avaliado nesse estudo que se mostrou pouco eficaz para muitos isolados foi sulfametoxazol/trimetoprim, para o qual são relatadas evidências de uma resistência em ascensão [79,80]. Esse fenótipo de resistência foi exclusivamente verificado nos isolados positivos para o gene *mecA*, estando ausente entre as amostras de *S. lugdunensis*. De fato, a baixa suscetibilidade a esse antimicrobiano é mais prevalente entre isolados de ECN meticilina-resistentes, levantando questionamentos a respeito de pressão seletiva e da possibilidade de resistência induzível [81–83].

A caracterização molecular de isolados resistentes de *S. hominis*, destacou achados de valor epidemiológico. Foi verificada prevalência de SCC*mec* NT, mais precisamente em 94 (69,1%) isolados, seguido de SCC*mec* tipo XIV e SCC*mec* tipo III, com 19 (14,0%) e 16 (11,7%) amostras, respectivamente. A predominância de SCC*mec* não tipável também foi descrita em amostras de *S. hominis* coletadas entre 1990 e 2012, no mesmo hospital do presente trabalho, em um estudo complementar a este, feito por Pinheiro-Hubinger et al. (2021) [84]. Semelhante ao observado no Hospital das Clínicas de Porto Alegre, onde Pinheiro Machado et al. (2007) também descreveram a prevalência de complexos não tipados predominando em *S. hominis* [30]. Achados muito semelhantes entre si e com o relatado aqui, e coerentes ao já descrito em outras partes do mundo em trabalhos recentes, embora também existam divergências perceptíveis entre regiões geográficas e em decorrência de limitações metodológicas [85,86].

A diversidade genética observada em *S. hominis* já foi relatada em vários estudos, e pode estar associada à múltiplas transposases e integrases no genoma dessas bactérias que ainda podem contribuir com a evolução e perpetuação de novos tipos de SCC*mec* em outras espécies [62,87]. A baixa relação clonal sinalizada pela análise de PFGE foi coerente ao resultado anterior, indicando alta diversidade de *S. hominis* dentro do hospital, com algumas amostras clonais, muito frequentemente isoladas do Pronto socorro.

A tipagem de SCC*mec* em ECN é desafiadora, principalmente por dois motivos, (i) devido à presença de elementos “não tipáveis”, que com frequência está associada a novas variantes de genes *ccr*, com mutações ou deleções que os tornam irreconhecíveis, e (ii) a identificação de SCC*mec* coexistentes que, na verdade, podem constituir um composto único em vez de duas

unidades independentes [24]. Neste trabalho não foram detectados complexos co-ocorrentes, no entanto, dentre os SCC*mec* NT, 61 (64,9%) isolados apresentaram complexos *ccr* não definidos, que pode indicar alteração nas sequências-alvo dos primers. Além disso, e a amplificação incompleta de genes também dificultou a caracterização de muitas amostras. Ademais, foi observada a amplificação recorrente do complexo *ccr* tipo 1 (*AIB1*) juntamente ao complexo *mec* classe A, sugerindo um complexo SCC*mec* novo, inicialmente relatado em *S. hominis* na Noruega e Finlândia [88,89] e posteriormente por Bouchami et al. [62] que propôs que essas cepas podem servir como reservatórios *mec-ccr* e atuarem como prováveis doadores de *ccr* tipo 1 (*ccrAIB1*) e *mec* complexo A para outras espécies bacterianas, contribuindo com o desenvolvimento de novas variantes de SCC*mec*, o que é alarmante para o desenvolvimento de nova resistência antimicrobiana [90]. Os isolados carreadores de desse perfil, *ccr* tipo 1 e complexo *mec* classe A, ainda se mostraram amplamente diversos pela análise de PFGE, reforçando o aspecto genético altamente diversificado nesses isolados.

A caracterização do complexo SCC*mec* XIV, ocorreu em 19 (14,0%) isolados de *S. hominis*, e se mostrou correlacionado à *Shn*. Esse elemento foi recém descrito por Urushibara et al. (2019) [91] em isolados de MRSA coletados no Japão, e desde então foi descrito esporadicamente em cepas de *S. aureus* [92]. No entanto, esse parece ser o primeiro relato de isolados de *S. hominis* carreadores de SCC*mec* XIV, que parece ser mais frequente em *Shn*, reforçando a complexidade epidemiológica dessa espécie que pode ter um papel relevante no surgimento de novos tipos de SCC*mec* em MRSA. Porém, futuros estudos devem explorar esse novo perfil e ajudar a compreender as possíveis interações entre essas cepas estafilocócicas.

Outro fator propulsor da resistência antimicrobiana é a habilidade de produzir biofilme que foi verificada em 18,6% das amostras de *S. hominis* e em um isolado de *S. lugdunensis*, e não foi correlacionada aos genes do operon *icaADBC*. A prevalência de cepas de *S. hominis* produtoras de biofilme constatada por Mendoza-Olazarán et al. (2015) foi significativamente superior à relatada neste estudo, atingindo uma frequência de 91%, com alta frequência, porém baixa expressão do gene *icaD*, em amostras devidamente confirmadas como agentes causais de infecção da corrente sanguínea, caracterização inexistente nas amostras analisadas no presente estudo [17]. Outro estudo analisou cepas clínicas de *S. hominis* isoladas a partir de sangue, feridas pós-cirúrgicas e líquido cefalorraquidiano e, embora a maioria tenha apresentado o locus *icaADBC* em seu genoma, apenas metade dessas cepas formaram biofilme *in vitro*, cuja estrutura se revelou altamente diversa, porém predominantemente composta por proteínas e polissacarídeos [18].

Apesar do papel bem caracterizado do *locus icaADBC* e suas vias reguladoras na produção do biofilme estafilocócico, os resultados encontrados neste estudo se alinham à achados de outros trabalhos e reforçam o potencial de mecanismos alternativos, independentes de PIA, suficientemente capazes de articularem a formação de biofilmes *in vitro*. Por outro lado, a expressão *in vitro*, do gene *ica* é altamente variável e induzida pela composição do meio [93].

Dados disponíveis na literatura assumem que *S. lugdunensis* também é uma espécie produtora de biofilme, detentora de uma crescente lista de fatores proteicos que possuem papel importante no desenvolvimento e na integridade estrutural dessas comunidades microbianas, cuja implicações afetam diretamente no manejo clínico e cirúrgico de infecções ósseas e articulares [3,19,94–98]. No entanto, apenas uma amostra de *S. lugdunensis* analisada neste trabalho foi produtora de biofilme, não apresentando nenhum gene do operon *ica*, apesar da técnica de PCR ter encontrado um ou mais genes em outras cinco cepas. Essa única amostra fraca aderente revela um índice reduzido de produção de biofilme não consistente com o descrito em outros estudos nos quais a prevalência chega próximo à 90% [94,95].

Certamente, a capacidade de formação de biofilme varia entre as cepas, no entanto, a composição do meio parece influenciar consideravelmente a biomassa do biofilme produzido por *S. lugdunensis* [94]. Em estudo recente, Qian et al. (2021) destacaram a suplementação do meio com glicose a 5% como estimuladora da produção de biofilme em *S. lugdunensis* [94]. No entanto, a suplementação de glicose não aumentou a produção de biofilme nos isolados de *S. lugdunensis* descritos nesta pesquisa, confirmando o perfil não aderente dessas amostras, que ao contrário das amostras frequentemente descritas na literatura, não tiveram significado clínico confirmado.

Coletivamente, esses resultados evidenciam baixa prevalência de produção de biofilme nesses isolados, ao passo em que destacam a complexidade e a versatilidade que permeiam a existência e a sobrevivência de cada uma dessas espécies, sob diferentes condições fisiológicas.

A detecção dos genes *hla* e *hld* foi verificada em apenas três isolados. De fato, poucos estudos descrevem a presença de genes codificadores de citotoxinas em ECN, principalmente *S. hominis* e *S. lugdunensis*. Além disso há uma grande diversidade na identidade dos genes codificadores dessas citotoxinas entre as espécies, dificultando muito a determinação genética eficiente das hemolisinas α e δ [56].

Em *S. lugdunensis* o que se observa são características de virulência típicas de patógenos bacterianos, incluindo toxinas hemolíticas, sistemas de aquisição de heme e moléculas de adesão [42]. Neste estudo, foi detectado alta frequência de genes envolvidos na codificação de proteínas de superfície ancoradas à parede celular, mais especificamente os genes *fbI* e *vwbl*

que foram detectados em 13 (100%) e em 11 (84,6%) isolados, respectivamente. O gene *fbl* codifica a proteína Fbl que parece promover adesão ao fibrinogênio, já a proteína de superfície vWbl foi inicialmente proposta como intermediadora da interação de *S. lugdunensis* com plaquetas através do fator de von Willebrand, ambas foram postuladas como fatores de virulência envolvidos na progressão de casos de endocardite infecciosa [42,99]. Embora estudos realizados *in vitro* não tenham conseguido confirmar o real papel dessas proteínas na promoção da adesão bacteriana, já foi relatada tendência de virulência reduzida em cepas mutantes sem essas proteínas, indicando que várias proteínas de superfície possam atuar em conjunto para promover a adesão e a sobrevivência dessas cepas na corrente sanguínea [45,100,101].

O genoma de *S. lugdunensis* também abriga vários loci codificadores de toxinas citolíticas [45]. As hemolisinas sinérgicas SLUSH são peptídeos relacionados às modulinas fenol solúveis de *S. aureus* e possuem atividade hemolítica sinérgica com a toxina β atuando na lise de eritrócitos [45]. Os genes precursores dessas hemolisinas foram detectados em 10 (76,9%) amostras de *S. lugdunensis* no presente estudo, enquanto Pereira et al. (2012) encontraram o gene *slush* em todas as 23 cepas clínicas analisadas de um hospital do Rio de Janeiro [102]. No entanto uma prevalência inferior a 50% já foi relatada em outras partes do mundo [44,103].

Os genes envolvidos na codificação da hemolisina III, homóloga à hemolisina III de *Bacillus cereus*, foram identificados em 13 (100%) amostras. Já os genes associados à β -hemolisina, homóloga à β -hemolisina de *S. aureus*, foram identificados em 12 (92,3%) cepas. A prevalência de ambas as hemolisinas foi semelhante a alta frequência desses genes descrita por Szabados et al. (2011) [44]. Trabalhos anteriores ainda evidenciaram que hemolisinas produzidas por *S. lugdunensis* parecem ser mais ativas contra hemácias humanas do que contra eritrócitos murinos, indicando um possível tropismo por células humanas [104].

Em relação ao perfil enterotoxigênico das cepas analisadas, um ou mais genes foram encontrados em 73,2% das amostras, os genes determinantes de SEG e SEI se mostraram prevalentes, com destaque para o gene *seg*, encontrado em 106 (59,9%) isolados de *S. hominis*, e em 5 (38,5%) de *S. lugdunensis*, porém sem diferença significativa na distribuição de qualquer um dos genes entre as espécies.

Em estudo anterior, a prevalência de genes de SEs foi menor, com 32,2% dos isolados positivos para algum gene, com predominância dos genes *sei* e *see*, em ECN obtidos de diferentes amostras clínicas coletadas de recém-nascidos. No mesmo estudo, isolados de *S. lugdunensis* apresentaram genótipo *sei/seg*, com expressão de toxina confirmada [105]. Alinhado a isso, no presente trabalho a co-ocorrência de *sei* e *seg* foi a mais prevalente em *S.*

lugdunensis e *S. hominis*. De fato, esses genes pertencem a um elemento genético denominado cluster de genes de enterotoxinas (*egc*), arrançados em uma orientação em tandem e co-expressos, juntamente com os genes *sem*, *sen* e *seo*. O *egc* fica localizado na ilha genômica *vSaβ*, sendo incorporado ao cromossomo como um profago e, frequentemente, está associado a surtos de intoxicação alimentar estafilocócica, além de ser encontrado em cerca de 50% das cepas de *S. aureus* [106].

Todos os genes que codificam toxinas estão localizados em elementos genéticos móveis, incluindo bacteriófagos, ilhas de patogenicidade (SaPI) e plasmídeos favorecendo a transferência horizontal entre cepas estafilocócicas enterotoxigênicas [107].

Já foi relatada expressão reduzida de genes de SEs em ECN, quando comparada à *S. aureus* [105]. De fato, pesquisadores têm observado uma possível instabilidade nos genes de SEs em algumas cepas de ECN, evidenciada por variações a até perda gradual ou completa do sinal dos amplicons de PCR [108]. Banaszkiwicz et al. (2022) demonstraram um número reduzido de cópias dos genes de SEs em cepas de ECN enterotoxigênicas, quando comparado à isolados de *S. aureus*, provavelmente resultante de uma transferência transitória de DNA entre estafilococos co-ocorrentes. Enquanto a expressão de SEs a nível de proteína se revelou favorecida pelo alto número de cópias desses genes [108].

Existem algumas limitações em nosso estudo. Não tivemos acesso ao desfecho clínico dos pacientes e não houve diferenciação entre amostras contaminantes e clinicamente relevantes. Outro ponto foi o número reduzido de amostras disponíveis de *S. lugdunensis*, apesar de todas as amostras isoladas no período do estudo terem sido incluídas nas análises, a seleção inicial de isolados esteve sujeita à erros de identificação laboratorial na época em que foram coletados, indicando possível perda de amostras, devido ao desenho retrospectivo deste estudo. E por fim, a análise de relação clonal por PFGE não pôde ser aplicada a todos os isolados.

5. CONCLUSÃO

No geral, o conjunto de dados fenotípicos e genotípicos deste estudo fornecem recursos valiosos para o aprofundamento em aspectos complexos que circundam o perfil de patógenos oportunistas em ascensão, porém ainda pouco explorados. Foi verificada alta suscetibilidade antimicrobiana em *S. lugdunensis* além de reduzida produção de biofilme, potencial patogênico significativo, prevalência na UTI neonatal, e baixa variabilidade gênica entre os isolados coerente à descrição de um genoma altamente conservado nessa espécie. Clones de *S. lugdunensis* foram destacados, dispersos em diferentes unidades hospitalares, por até 6 anos, no entanto sem indício de fatores contribuintes para tal persistência, podendo estar relacionado a baixa variabilidade do perfil genético dessa espécie. Em *S. hominis* foi relatado um perfil de resistência mais acentuado principalmente em UTIs neonatais e pediátricas, com prevalência de SCCmec não tipados, além da detecção de um SCCmec recém descrito denominado SCCmec XIV, que se mostrou mais associado à *Shn*. Ademais, a baixa relação clonal sinalizada pela análise de PFGE apontou a alta diversidade genética de *S. hominis* dentro do hospital. Tais achados reforçam a complexidade e versatilidade de *S. hominis*, e seu potencial como reservatório genético contribuinte da evolução de novos tipos SCCmec. A produção de biofilme em ambas as espécies não se correlacionou à presença dos genes do operon *ica*. Além disso genes de enterotoxinas foram detectados, com destaque para os genes *seg* e *sei*, chamando atenção para o potencial enterotoxigênico desses isolados, que não deve ser ignorado.

REFERÊNCIAS

1. Fairbrother, R.W. Coagulase Production as a Criterion for the Classification of the Staphylococci. *J Pathol Bacteriol* **1940**, *50*, 83–88, doi:10.1002/PATH.1700500112.
2. Trabulsi, L.R.; Alterthum, F. Microbiologia - Trabulsi. *Microbiologia* **2015**, 577–584.
3. Argemi, X.; Hansmann, Y.; Riegel, P.; Prévost, G. Is *Staphylococcus lugdunensis* Significant in Clinical Samples? *J Clin Microbiol* **2017**, *55*, 3167, doi:10.1128/JCM.00846-17.
4. Heilmann, C.; Ziebuhr, W.; Becker, K. Are Coagulase-Negative Staphylococci Virulent? *Clin Microbiol Infect* **2019**, *25*, 1071–1080, doi:10.1016/J.CMI.2018.11.012.
5. Freney, J.; Brun, Y.; Bes, M.; Meugnier, H.; Grimont, F.; Grimont, P.A.D.; Nerv1, C.; Fleurette', J. *Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus Schleiferi* sp. nov., Two Species from Human Clinical Specimens; 1988.
6. Szczuka, E.; Krzywińska, S.; Bogucka, N.; Kaznowski, A. Multifactorial Mechanisms of the Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus hominis* Isolated from Bloodstream Infections. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2018**, *111*, 1259–1265, doi:10.1007/S10482-017-1007-3.
7. Kloos, W.E.; George, C.G.; Van Pelt, L.; McKinnon, M.L.; Zimmer, B.L.; Weinstein, M.P.; Mirrett, S.; Wood Johnson, R. *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus*, an emerging multidrug-resistant bacterium, as a causative agent of septicemia in cancer patients. *Indian J Med* **2017**, *48*, 420–425. doi: 10.4103/ijmr.IJMR_1362_15.
8. Ahmed, N.H.; Baruah, F.K.; Grover, R.K. *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus*, an emerging multidrug-resistant bacterium, as a causative agent of septicemia in cancer patients. *Indian Journal of Medical Research* **2017**, *146*, 420–425, doi:10.4103/ijmr.IJMR_1362_15.
9. D'Azevedo, P.A.; Trancesi, R.; Sales, T.; Monteiro, J.; Gales, A.C.; Pignatari, A.C. Outbreak of *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* Bloodstream Infections in São Paulo City, Brazil. *J Med Microbiol* **2008**, *57*, 256–257, doi: 10.1099/jmm.0.47345-0.
10. Vanzato Palazzo, I.C.; d'Azevedo, P.A.; Secchi, C.; Pignatari, A.C.C.; da Costa Darini, A.L. *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* Strains Causing Nosocomial Bloodstream Infection in Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2008**, *62*, 1222–1226, doi:10.1093/jac/dkn375.
11. Bogut, A.; Magryś, A. The Road to Success of Coagulase-Negative Staphylococci: Clinical Significance of Small Colony Variants and Their Pathogenic Role in Persistent Infections. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **2021**, *40*, 2249–2270. doi: 10.1007/s10096-021-04315-1.
12. Michels, R.; Last, K.; Becker, S.L.; Papan, C. Update on Coagulase-Negative Staphylococci—What the Clinician Should Know. *Microorganisms* **2021**, *9*, doi:10.3390/microorganisms9040830.

13. França, A.; Gaio, V.; Lopes, N.; Melo, D.R. Virulence Factors in Coagulase-Negative Staphylococci. *Pathogens* **2021**. doi: 10.3390/pathogens10020170. PMID: 33557202
14. Schilcher, K.; Horswill, A.R. Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. *Microbiol Mol Biol Rev* **2020**, *84*, doi: 10.1128/MMBR.00026-19.
15. Soumya, K.R.; Suja, P.; Jyothis, M.; Radhakrishnan, E.K. Virulence Factors Associated with Coagulase Negative Staphylococci Isolated from Human Infections. *3 Biotech* **2017**, *7*, 1–10, doi:10.1007/s13205-017-0753-2.
16. Becker, K.; Heilmann, C.; Peters, G.; Becker, K.; Heilmann, C.; Peters, G. Coagulase-Negative Staphylococci Coagulase-Negative Staphylococci. **2014**, *27*, doi:10.1128/CMR.00109-13.
17. Mendoza-Olazarán, S.; Morfín-Otero, R.; Villarreal-Treviño, L.; Rodríguez-Noriega, E.; Llaca-Díaz, J.; Camacho-Ortiz, A.; González, G.M.; Casillas-Vega, N.; Garza-González, E.; Horsburgh, M.J. Antibiotic Susceptibility of Biofilm Cells and Molecular Characterisation of *Staphylococcus hominis* Isolates from Blood. **2015**, doi:10.1371/journal.pone.0144684.
18. Szczuka, E.; Telega, K.; Kaznowski, A. Biofilm Formation by *Staphylococcus hominis* Strains Isolated from Human Clinical Specimens. *Folia Microbiol (Praha)* **2015**, *60*, 1–5, doi:10.1007/s12223-014-0332-4.
19. Frank, K.L.; 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, doi:10.1128/IAI.00640-07.
20. Arciola, C.R.; Campoccia, D.; Speziale, P.; Montanaro, L.; Costerton, J.W. Biofilm Formation in Staphylococcus Implant Infections. A Review of Molecular Mechanisms and Implications for Biofilm-Resistant Materials. *Biomaterials* **2012**, *33*, 5967–5982, doi:10.1016/j.biomaterials.2012.05.031.
21. Uehara, Y. Current Status of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*). *Antibiotics* **2022**, *11*, 1–12, doi:10.3390/antibiotics11010086.
22. Garbacz, K.; Wierzbowska, M.; Kwapisz, E.; Kosecka-Strojek, M.; Bronk, M.; Saki, M.; Międzobrodzki, J. Distribution and Antibiotic-Resistance of Different *Staphylococcus* Species Identified by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Isolated from the Oral Cavity. *J Oral Microbiol* **2021**, *13*, doi:10.1080/20002297.2021.1983322.
23. Lakhundi, S.; Zhang, K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. **2018**, *32*.
24. Zong, Z.; Peng, C.; Lü, X. Diversity of SCC*mec* Elements in Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci Clinical Isolates. *PLoS One* **2011**, *6*, 1–6, doi:10.1371/journal.pone.0020191.
25. Svensson, K.; Hellmark, B.; Söderquist, B. Characterization of SCC*mec* Elements in Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Isolated from Blood Cultures from

- Neonates during Three Decades. *APMIS* **2011**, *119*, 885–893, doi:10.1111/j.1600-0463.2011.02801.x.
26. Iorio, N.L.P.; Caboclo, R.F.; Azevedo, M.B.; Barcellos, A.G.; Neves, F.P.G.; Domingues, R.M.C.P.; Dos Santos, K.R.N. Characteristics Related to Antimicrobial Resistance and Biofilm Formation of Widespread Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* ST2 and ST23 Lineages in Rio de Janeiro Hospitals, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2012**, *72*, 32–40, doi:10.1016/J.DIAGMICROBIO.2011.09.017.
 27. de Almeida, L.M.; Lincopan, N.; de Araújo, M.R.E.; Mamizuka, E.M. Dissemination of the Linezolid-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Clone ST2 Exhibiting the G2576T Mutation in the 23S rRNA Gene in a Tertiary-Care Hospital, Brazil. *J Antimicrob Chemother* **2012**, *67*, 768–769, doi:10.1093/JAC/DKR538.
 28. Martins, A.; Riboli, D.F.M.; Camargo, C.H.; Pereira, V.C.; De Almeida Sampaio, R.; De Souza da Cunha, M. de L.R. Antimicrobial Resistance and Persistence of *Staphylococcus epidermidis* Clones in a Brazilian University Hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2013**, *77*, 164–168, doi:10.1016/J.DIAGMICROBIO.2013.06.005.
 29. De Oliveira, C.F.; Cavanagh, J.P.; Fredheim, E.G.A.; Reiter, K.C.; Rieger, A.; Klingenberg, C.; D’Azevedo, P.A.; Sollid, J.E. Coagulase-Negative Staphylococci in Southern Brazil: Looking toward Its High Diversity. *Rev Soc Bras Med Trop* **2016**, *49*, 292–299, doi:10.1590/0037-8682-0015-2016.
 30. Machado, A.B.M.P.; Reiter, K.C.; Paiva, R.M.; Barth, A.L. 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, doi:10.1099/JMM.0.47294-0.
 31. Mendoza-Olazarán, S.; Morfin-Otero, R.; Rodríguez-Noriega, E.; Llaca-Díaz, J.; Flores-Treviño, S.; González-González, G.M.; Villarreal-Treviño, L.; Garza-González, E. Microbiological and Molecular Characterization of *Staphylococcus hominis* Isolates from Blood. *PLoS One* **2013**, *8*, 1–6, doi:10.1371/journal.pone.0061161.
 32. Zhang, L.; Thomas, J.C.; Miragaia, M.; Bouchami, O.; Chaves, F.; d’Azevedo, P.A.; Aanensen, D.M.; de Lencastre, H.; Gray, B.M.; Robinson, D.A. Multilocus Sequence Typing and Further Genetic Characterization of the Enigmatic Pathogen, *Staphylococcus hominis*. *PLoS One* **2013**, *8*, doi:10.1371/journal.pone.0066496.
 33. Yeh, C.F.; Chang, S.C.; Cheng, C.W.; Lin, J.F.; Liu, T.P.; Lu, J.J. Clinical Features, Outcomes, and Molecular Characteristics of Community- and Health Care-Associated *Staphylococcus lugdunensis* Infections. *J Clin Microbiol* **2016**, *54*, 2051, doi:10.1128/JCM.00847-16.
 34. Seng, P.; Traore, M.; Lavigne, J.P.; Maulin, L.; Lagier, J.C.; Thiery, J.F.; Levy, P.Y.; Roger, P.M.; Bonnet, E.; Sotto, A.; et al. *Staphylococcus lugdunensis*: A Neglected Pathogen of Infections Involving Fracture-Fixation Devices. *International Orthopaedics* **2017**, *41*:6 **2017**, *41*, 1085–1091, doi:10.1007/S00264-017-3476-4.

35. Tseng, S.P.; Lin, Y.T.; Tsai, J.C.; Hung, W.C.; Chen, H.J.; Chen, P.F.; Hsueh, P.R.; Teng, L.J. Genotypes and Phenotypes of *Staphylococcus lugdunensis* Isolates Recovered from Bacteremia. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* **2015**, *48*, 397–405, doi:10.1016/J.JMII.2013.11.006.
36. Otto, M. *Staphylococcus aureus* Toxins. *Curr Opin Microbiol* **2014**, *0*, 32, doi:10.1016/J.MIB.2013.11.004.
37. Vasconcelos, N.G.; Lourdes, M. De; Souza, R. De Staphylococcal Enterotoxins : Molecular Aspects and Detection Methods. *J. Public Health Epidemiol.* **2010**, *2*, 29–42.
38. Podkowik, M.; Park, J.Y.; Seo, K.S.; Bystroń, J.; Bania, J. Enterotoxigenic Potential of Coagulase-Negative Staphylococci. *Int J Food Microbiol* **2013**, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.005.
39. Marrack, P.; Kappler, J. The Staphylococcal Enterotoxins and Their Relatives. *Science (1979)* **1990**, *248*, 705–711, doi:10.1126/SCIENCE.2185544.
40. Xu, S.X.; McCormick, J.K. Staphylococcal Superantigens in Colonization and Disease. *Front Cell Infect Microbiol* **2012**, *2*, 52, doi:10.3389/FCIMB.2012.00052/BIBTEX.
41. Frank, K.L.; Pozo, L.; Patel, R. From Clinical Microbiology to Infection Pathogenesis : How Daring To Be Different Works for *Staphylococcus lugdunensis*. *Clin Microbiol Rev* **2008**, *21*, 111–133, doi:10.1128/CMR.00036-07.
42. Heilbronner, S. *Staphylococcus lugdunensis*. *Trends Microbiol* **2021**, *29*, 1143–1145, doi:10.1016/j.tim.2021.07.008.
43. Didi, J.; Lemée, L.; Gibert, L.; Pons, J.L.; Pestel-Carona, M. Multi-Virulence-Locus Sequence Typing of *Staphylococcus lugdunensis* Generates Results Consistent with a Clonal Population Structure and Is Reliable for Epidemiological Typing. *J Clin Microbiol* **2014**, *52*, 3624, doi:10.1128/JCM.01370-14.
44. Szabados, F.; Nowotny, Y.; Marlinghaus, L.; Korte, M.; Neumann, S.; Kaase, M. Occurrence of Genes of Putative Fibrinogen Binding Proteins and Hemolysins , as Well as of their Phenotypic Correlates in Isolates of *S. Lugdunensis* of Different Origins. **2011**.
45. Heilbronner, S.; Foster, T.J. *Staphylococcus lugdunensis*: A Skin Commensal with Invasive Pathogenic Potential. *Clin Microbiol Rev* **2020**, *34*, 1–18, doi:10.1128/CMR.00205-20.
46. Hirota, S.; Sasaki, T.; Kuwahara-Arai, K.; Hiramatsu, K. Rapid and Accurate Identification of Human-Associated Staphylococci by Use of Multiplex PCR. *J Clin Microbiol* **2011**, *49*, 3627, doi:10.1128/JCM.00488-11.
47. de la Maza, L.M.; Pezzlo, M.T.; Bittencourt, C.E.; Peterson, E.M. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and Other Catalase-Positive Cocci . In *Color Atlas of Medical Bacteriology*; John Wiley & Sons, Inc., 2020; pp. 1–10.
48. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M100: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. *CLSI supplement M100* **2020**, Ed. 29.

49. Murakami, K.; Minamide, W.; Wada, K.; Nakamura, E.; Teraoka, H.; Watanabe, S. Identification of Methicillin-Resistant Strains of Staphylococci by Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol* **1991**, *29*, 2240–2244, doi:10.1128/JCM.29.10.2240-2244.1991.
50. Arciola, C.R.; Gamberini, S.; Campoccia, D.; Visai, L.; Speziale, P.; Baldassarri, L.; Montanaro, L. A Multiplex PCR Method for the Detection of All Five Individual Genes of Ica Locus in *Staphylococcus epidermidis*. A Survey on 400 Clinical Isolates from Prosthesis-Associated Infections. *J Biomed Mater Res A* **2005**, *75A*, 408–413, doi:10.1002/JBM.A.30445.
51. Johnson, W.M.; Tyler, S.D.; Ewan, E.P.; Ashton, F.E.; Pollard, D.R.; Rozee, K.R. 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, doi:10.1128/JCM.29.3.426-430.1991.
52. Jarraud, S.; Mougel, C.; Thioulouse, J.; Lina, G.; Meugnier, H.; Forey, F.; Nesme, X.; Etienne, J.; Vandenesch, F. Relationships between *Staphylococcus aureus* Genetic Background, Virulence Factors, agr Groups (Alleles), and Human Disease. *Infect Immun* **2002**, *70*, 631–641, doi:10.1128/IAI.70.2.631-641.2002.
53. Da Cunha, M.D.L.R.D.S.; Peresi, E.; Oliveira Calsolari, R.A.; Araújo, J.P. Detection of Enterotoxins Genes in Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Foods. *Brazilian Journal of Microbiology* **2006**, *37*, 70–74, doi:10.1590/S1517-83822006000100013.
54. Jarraud, S.; Cozon, G.; Vandenesch, F.; Bes, M.; Etienne, J.; Lina, G. Involvement of Enterotoxins G and I in Staphylococcal Toxic Shock Syndrome and Staphylococcal Scarlet Fever. *J Clin Microbiol* **1999**, *37*, 2446, doi:10.1128/JCM.37.8.2446-2449.1999.
55. Kondo, Y.; Ito, T.; Ma, X.X.; Watanabe, S.; Kreiswirth, B.N.; 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*, 264–274, doi:10.1128/AAC.00165-06.
56. Pinheiro, L.; Brito, C.I.; de Oliveira, A.; Martins, P.Y.F.; Pereira, V.C.; da Cunha, M. de L.R. de S. *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*: Molecular Detection of Cytotoxin and Enterotoxin Genes. *Toxins (Basel)* **2015**, *7*, 3688–3699, doi:10.3390/toxins7093688.
57. Marconi, C.; Cunha, M.L.R.S.; Araújo Jr, J.P.; Rugolo, L.M.S.S. Standardization of the PCR Technique for the Detection of Delta Toxin in *Staphylococcus* Spp. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* **2005**, *11*, 117–128, doi:10.1590/S1678-91992005000200004.
58. Oliveira, D.C.; 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*, 2155–2161, doi:10.1128/AAC.46.7.2155-2161.2002.
59. Christensen, G.D.; Simpson, W.A.; Younger, J.J.; Baddour, L.M.; Barrett, F.F.; Melton, D.M.; Beachey, E.H.; Christensen, [G D; Simpson, W.A.; Beachey, E.H.; et al. Adherence

- of Coagulase-Negative Staphylococci to Plastic Tissue Culture Plates: A Quantitative Model for the Adherence of Staphylococci to Medical Devices. *J Clin Microbiol* **1985**, *22*, 996, doi:10.1128/JCM.22.6.996-1006.1985.
60. Oliveira, A.; Cunha, M.D.L.R.S. Comparison of Methods for the Detection of Biofilm Production in Coagulase-Negative Staphylococci. *BMC Res Notes* **2010**, *3*, 1–8, doi:10.1186/1756-0500-3-260/TABLES/2.
 61. McDougal, L.K.; Steward, C.D.; Killgore, G.E.; Chaitram, J.M.; McAllister, S.K.; Tenover, F.C. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the United States: Establishing a National Database. *J Clin Microbiol* **2003**, *41*, 5113–5120, doi:10.1128/JCM.41.11.5113-5120.2003.
 62. Bouchami, O.; Hassen, A. Ben; de Lencastre, H.; Miragaia, M. Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus hominis* (MRSHo): Low Clonality and Reservoirs of SCCmec Structural Elements. *PLoS One* **2011**, *6*, doi:10.1371/journal.pone.0021940.
 63. Machado, A.B.M.P.; Reiter, K.C.; Paiva, R.M.; Barth, A.L. Distribution of Staphylococcal Cassette Chromosome Mec (SCCmec) Types I, II, III and IV in Coagulase-Negative Staphylococci from Patients Attending a Tertiary Hospital in Southern Brazil. *J Med Microbiol* **2007**, *56*, 1328–1333, doi:10.1099/jmm.0.47294-0.
 64. Taha, L.; Stegger, M.; Söderquist, B. Staphylococcus Lugdunensis: Antimicrobial Susceptibility and Optimal Treatment Options. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **2019**, *38*, 1449–1455, doi:10.1007/s10096-019-03571-6.
 65. Argemi, X.; Matelska, D.; Ginalska, K.; Riegel, P.; Hansmann, Y.; Bloom, J.; Pestel-caron, M.; Dahyot, S.; Lebeurre, J.; Prévost, G. Comparative Genomic Analysis of *Staphylococcus lugdunensis* Shows a Closed Pan-Genome and Multiple Barriers to Horizontal Gene Transfer. *BMC Genomics* **2018**, *19*, 1–16.
 66. Pereira, V.C.; Romero, L.C.; Pinheiro-Hubinger, L.; Oliveira, A.; Martins, K.B.; Cunha, M. de L.R. de S. da Coagulase-Negative Staphylococci: A 20-Year Study on the Antimicrobial Resistance Profile of Blood Culture Isolates from a Teaching Hospital. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* **2020**, *24*, 160–169, doi:10.1016/J.BJID.2020.01.003.
 67. Böcher, S.; Tønning, B.; Skov, R.L.; Prag, J. *Staphylococcus lugdunensis*, a Common Cause of Skin and Soft Tissue Infections in the Community. *J Clin Microbiol* **2009**, *47*, 946–950, doi:10.1128/JCM.01024-08.
 68. Hurvitz, N., Cahan, L. O. S., Gross, I., Grupel, D., Megged, O., Pasternak, Y., Temper, V., Levy, R., Weiser, G., & Hashavya, S. The Role of *Staphylococcus Lugdunensis* as a Pathogen in Children: A Multicentre Retrospective Study. *J Med Microbiol* **2021**, *70*. doi: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001357>
 69. Mateo, M.; Maestre, J.R.; Aguilar, L.; Cafini, F.; Puente, P.; Sánchez, P.; Alou, L.; Giménez, M.J.; Prieto, J. Genotypic versus Phenotypic Characterization, with Respect to Susceptibility and Identification, of 17 Clinical Isolates of *Staphylococcus lugdunensis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2005**, *56*, 287–291, doi:10.1093/jac/dki227.

70. Natsis, N.E.; Cohen, P.R. Coagulase-Negative Staphylococcus Skin and Soft Tissue Infections. *Am J Clin Dermatol* **2018**, *19*, 671–677, doi:10.1007/s40257-018-0362-9.
71. Martins, K.B.; Ferreira, A.M.; Mondelli, A.L.; Rocchetti, T.T.; Lr De S Da Cunha, M. De Evaluation of MALDI-TOF VITEK®MS and VITEK® 2 System for the Identification of *Staphylococcus saprophyticus*. *Future Microbiol* **2018**, *13*, 1603–1609, doi:10.2217/fmb-2018-0195.
72. Pereira, E.M.; de Mattos, C.S.; dos Santos, O.C.; Ferreira, D.C.; de Oliveira, T.L.R.; Laport, M.S.; de Oliveira Ferreira, E.; dos Santos, K.R.N. *Staphylococcus hominis* Subspecies Can Be Identified by SDS-PAGE or MALDI-TOF MS Profiles. *Sci Rep* **2019**, *9*, doi:10.1038/s41598-019-48248-4.
73. Roemer, T.; Schneider, T.; Pinho, M.G. Auxiliary Factors: A Chink in the Armor of MRSA Resistance to β -Lactam Antibiotics. *Curr Opin Microbiol* **2013**, *16*, 538–548.
74. Humphries, R.M.; Magnano, P.; Burnham, C.-A.D.; Bard, J.D.; Dingle, T.C.; Callan, K.; Westblade, L.F. Evaluation of Surrogate Tests for the Presence of *mecA*-Mediated Methicillin Resistance in *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus Haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus warneri*. **2020**, doi:10.1128/JCM.02290.
75. Liu, R.; Zhang, J.; Du, X.; Lv, Y.; Gao, X.; Wang, Y.; Wang, J. Clonal Diversity, Low-Level and Heterogeneous Oxacillin Resistance of Oxacillin Sensitive Mrsa. *Infect Drug Resist* **2021**, *14*, 661–669, doi:10.2147/IDR.S288991.
76. Ferreira, A.M.; Bonesso, M.F.; Mondelli, A.L.; Camargo, C.H.; Cunha, M.D.L.R.S. Oxacillin Resistance and Antimicrobial Susceptibility Profile of *Staphylococcus saprophyticus* and Other Staphylococci Isolated from Patients with Urinary Tract Infection. *Chemotherapy* **2013**, *58*, 482–491, doi:10.1159/000346529.
77. Andersson, D.I.; Nicoloff, H.; Hjort, K. Mechanisms and Clinical Relevance of Bacterial Heteroresistance. *Nat Rev Microbiol* **2019**, *17*, 479–496.
78. Hryniewicz, M.M.; Garbacz, K. Borderline Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA) - a More Common Problem than Expected? *J Med Microbiol* **2017**, *66*, 1367–1373.
79. Nurjadi, D.; Chanthalangsy, Q.; Zizmann, E.; Stuermer, V.; Moll, M.; Klein, S.; Boutin, S.; Heeg, K.; Zanger, P. Phenotypic Detection of Hemin-Inducible Trimethoprim-Sulfamethoxazole Heteroresistance in *Staphylococcus aureus*. **2021**, doi:10.1128/Spectrum.
80. Nurjadi, D.; Klein, S.; Hannesen, J.; Heeg, K.; Boutin, S.; Zanger, P. Molecular Analysis of an Increase in Trimethoprim/ Sulfamethoxazole-Resistant MRSA Reveals Multiple Introductions into a Tertiary Care Hospital, Germany 2012–19. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2022**, *77*, 38–48, doi:10.1093/jac/dkab341.
81. Carender, C.N.; Sekar, P.; Prasadthratsint, K.; DeMik, D.E.; Brown, T.S.; Bedard, N.A. Rates of Antimicrobial Resistance With Extended Oral Antibiotic Prophylaxis After Total Joint Arthroplasty. *Arthroplast Today* **2022**, *18*, 112–118, doi:10.1016/j.artd.2022.09.007.

82. Koksal, F.; Yasar, H.; Samasti, M. Antibiotic Resistance Patterns of Coagulase-Negative *Staphylococcus* Strains Isolated from Blood Cultures of Septicemic Patients in Turkey. *Microbiol Res* **2009**, *164*, 404–410, doi:10.1016/j.micres.2007.03.004.
83. Diekema, D. J. A. Pfaller, F. J. Schmitz, J. Smayevsky, J. Bell, R. N. Jones, M. Beach, and the SENTRY Participants Group 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.
84. Pinheiro-Hubinger, L.; Riboli, D.F.M.; Abraão, L.M.; Pereira Franchi, E.P.L.; Ribeiro de Souza da Cunha, M. de L. Coagulase-Negative Staphylococci Clones Are Widely Distributed in the Hospital and Community. *Pathogens* **2021**, *10*, 1–18, doi:10.3390/pathogens10070792.
85. Mendoza-Olazarán, S.; Morfin-Otero, R.; Villarreal-Trevino, L.; Rodriguez-Noriega, E.; Llaca-Diaz, J.; Camacho-Ortiz, A.; González, G.M.; Casillas-Vega, N.; Garza-González, E. Antibiotic Susceptibility of Biofilm Cells and Molecular Characterisation of *Staphylococcus hominis* Isolates from Blood. *PLoS One* **2015**, *10*, 1–13, doi:10.1371/journal.pone.0144684.
86. Al-Haqan, A.; Boswihi, S.S.; Pathan, S.; Udo, E.E. Antimicrobial Resistance and Virulence Determinants in Coagulase-Negative Staphylococci Isolated Mainly from Preterm Neonates. *PLoS One* **2020**, *15*, e0236713, doi:10.1371/journal.pone.0236713.
87. Katayama, Y.; Takeuchi, F.; Ito, T.; Ma, X.X.; Ui-Mizutani, Y.; Kobayashi, I.; Hiramatsu, K. Identification in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus hominis* of an Active Primordial Mobile Genetic Element for the Staphylococcal Cassette Chromosome Mec of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **2003**, *185*, 2711–2722, doi:10.1128/JB.185.9.2711-2722.2003.
88. Ibrahim, S.; Salmenlinna, S.; Virolainen, A.; Kerttula, A.M.; Lyytikäinen, O.; Jägerroos, H.; Broas, M.; Vuopio-Varkila, J. Carriage of Methicillin-Resistant Staphylococci and Their SCCmec Types in a Long-Term-Care Facility. *J Clin Microbiol* **2009**, *47*, 32–37, doi:10.1128/JCM.01085-08.
89. Hanssen, A.M.; Ericson Sollid, J.U. Multiple Staphylococcal Cassette Chromosomes and Allelic Variants of Cassette Chromosome Recombinases in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci from Norway. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**, *51*, 1671–1677, doi:10.1128/AAC.00978-06.
90. Ghotaslou, R.; Aghazadeh, M.; Ahangarzadeh Rezaee, M.; Moshafi, M.H.; Forootanfar, H.; Hojabri, Z.; Saffari, F. The Prevalence of Aminoglycoside-Modifying Enzymes among Coagulase Negative Staphylococci in Iranian Pediatric Patients. *Journal of Infection and Chemotherapy* **2014**, *20*, 569–573, doi:10.1016/J.JIAC.2014.05.004.
91. Urushibara, N.; Aung, M.S.; Kawaguchiya, M.; Kobayashi, N. Novel Staphylococcal Cassette Chromosome Mec (SCCmec) Type XIV (5A) and a Truncated SCCmec Element

- in SCC Composite Islands Carrying SpeG in ST5 MRSA in Japan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2020**, *75*, 46–50, doi:10.1093/jac/dkz406.
92. Youssef, C. R. B., Kadry, A. A., & El-Ganiny, A. M. Investigating the Relation between Resistance Pattern and Type of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (*SCCmec*) in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*; *Iranian journal of microbiology* **2022**, *14* doi:10.18502/ijm.v14i1.8802.
 93. Manandhar, S.; Singh, A.; Varma, A.; Pandey, S.; Shrivastava, N. Evaluation of Methods to Detect in Vitro Biofilm Formation by Staphylococcal Clinical Isolates. *BMC Res Notes* **2018**, *11*, doi:10.1186/s13104-018-3820-9.
 94. Qian, W.; Wang, W.; Zhang, J.; Liu, M.; Fu, Y.; Li, M.; Jin, J.; Cui, W.; Wang, C. Equivalent Effect of Extracellular Proteins and Polysaccharides on Biofilm Formation by Clinical Isolates of *Staphylococcus lugdunensis*. *Biofouling* **2021**, *37*, 327–340, doi:10.1080/08927014.2021.1914021.
 95. Argemi, X.; Prévost, G.; Riegel, P.; Provot, C.; Badel-Berchoux, S.; Jehl, F.; Olivares, E.; Hansmann, Y. Kinetics of Biofilm Formation by *Staphylococcus lugdunensis* Strains in Bone and Joint Infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2017**, *88*, 298–304, doi:10.1016/j.diagmicrobio.2017.05.002.
 96. Rajendran, N.B.; Eikmeier, J.; Becker, K.; Hussain, M.; Peters, G.; Heilmann, C. Important Contribution of the Novel Locus ComEB to Extracellular DNA-Dependent *Staphylococcus lugdunensis* Biofilm Formation. *Infect Immun* **2015**, *83*, 4682–4692, doi:10.1128/IAI.00775-15.
 97. Missineo, A.; Poto, A. Di; Geoghegan, J.A.; Rindi, S.; Heilbronner, S.; Gianotti, V.; Arciola, C.R.; Foster, T.J.; Speziale, P.; Pietrocola, G. IsdC from *Staphylococcus lugdunensis* Induces Biofilm Formation under Low-Iron Growth Conditions. *Infect Immun* **2014**, *82*, 2448, doi:10.1128/IAI.01542-14.
 98. Hussain, M.; Steinbacher, T.; Peters, G.; Heilmann, C.; Becker, K. The Adhesive Properties of the *Staphylococcus lugdunensis* Multifunctional Autolysin AtlL and Its Role in Biofilm Formation and Internalization. *International Journal of Medical Microbiology* **2015**, *305*, 129–139, doi:10.1016/j.ijmm.2014.11.010.
 99. Nilsson, M.; Bjerketorp, J.; Wiebensjö, Å.; Ljungh, Å.; Frykberg, L.; Guss, B. A von Willebrand Factor-Binding Protein from *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiol Lett* **2004**, *234*, 155–161, doi:10.1016/j.femsle.2004.03.024.
 100. Lin, L.C.; Cheng, C.W.; Chang, S.C.; Lu, J.J. Molecular Epidemiological Survey of *Staphylococcus lugdunensis* Isolates With Variable Number of Repeats in the von Willebrand Factor-Binding Protein Gene. *Front Cell Infect Microbiol* **2021**, *11*, doi:10.3389/fcimb.2021.748640.
 101. Heilbronner, S.; Hanses, F.; Monk, I.R.; Speziale, P.; Foster, T.J. Sortase A Promotes Virulence in Experimental *Staphylococcus lugdunensis* Endocarditis. *Microbiology (United Kingdom)* **2013**, *159*, 2141–2152, doi:10.1099/mic.0.070292-0.

102. Pereira, E.M.; Teixeira, C.A.A.; Alvarenga, A.L.M.; Schuenck, R.P.; Giambiagi-deMarval, M.; Holandino, C.; Mattos-Guaraldi, A.L.; dos Santos, K.R.N. A Brazilian Lineage of *Staphylococcus lugdunensis* Presenting Rough Colony Morphology May Adhere to and Invade Lung Epithelial Cells. *J Med Microbiol* **2012**, *61*, 463–469, doi:10.1099/jmm.0.033001-0.
103. Giormezis, N.; Kolonitsiou, F.; Makri, A.; Vogiatzi, A.; Christofidou, M.; Anastassiou, E.D.; Spiliopoulou, I. Virulence Factors among *Staphylococcus lugdunensis* Are Associated with Infection Sites and Clonal Spread. **2014**, doi:10.1007/s10096-014-2291-8.
104. Jochim, A.; Adolf, L.; Belikova, D.; Schilling, N.A.; Setyawati, I.; Chin, D.; Meyers, S.; Verhamme, P.; Heinrichs, D.E.; Slotboom, D.J.; et al. An ECF-Type Transporter Scavenges Heme to Overcome Iron-Limitation in *Staphylococcus lugdunensis*. *Elife* **2020**, *9*, 1–20, doi:10.7554/eLife.57322.
105. Vasconcelos, N. G.; Pereira, V. C.; Araujo Junior, J. P.; da Cunha, M. de L. R. S. Molecular Detection of Enterotoxins E, G, H and I in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Clinical Samples of Newborns in Brazil. *J Appl Microbiol* **2011**, 749–762, doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05076.x.
106. Schwendimann, L.; Merda, D.; Berger, T.; Denayer, S.; Feraudet-Tarisse, C.; Kläui, A.J.; Messio, S.; Mistou, M.Y.; Nia, Y.; Hennekinne, J.A.; et al. Staphylococcal Enterotoxin Gene Cluster: Prediction of Enterotoxin (SEG and SEI) Production and of the Source of Food Poisoning on the Basis of *VSaβ* Typing. *Appl Environ Microbiol* **2021**, *87*, 1–15, doi:10.1128/AEM.02662-20.
107. Cunha, M. de L.R.S. *Staphylococcus aureus* e Estafilococos Coagulase-Negativa: Virulência, Resistência Aos Antimicrobianos e Epidemiologia Molecular, 2012.
108. Banaszkiwicz, S.; Wałęcka-zacharska, E.; Schubert, J.; Tabiś, A.; Król, J.; Stefaniak, T.; Węsierska, E.; Bania, J. Staphylococcal Enterotoxin Genes in Coagulase-Negative Staphylococci—Stability, Expression and Genomic Context. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*, 1–16, doi:10.3390/ijms23052560.

Artigo Científico II

Staphylococcus capitis isolados da corrente sanguínea: Investigação da relação clonal, perfil de resistência, virulência e formação de biofilme

Letícia Calixto Romero ^a, Lucas Porangaba da Silva ^a, Nathalia Bibiana Teixeira ^a, Karen Vilegas de Camargo ^a, José Eduardo Corrente ^b, Valéria Cataneli Pereira ^c, Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha ^a

^a Departamento de Ciências Químicas e Biológicas, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu 18618-970, Brasil.

^b Departamento de Bioestatística, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu 18618-970, Brasil.

^c Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Laboratório de Microbiologia, Presidente Prudente, SP, Brasil

RESUMO

Staphylococcus capitis já foi associado a uma série de doenças em adultos, mas tem se destacado como agente causal de sepse neonatal tardia, com isolados multirresistentes e altamente clonais disseminados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) Neonatal ao redor do mundo. *S. capitis* pode carrear genes que codificam importantes fatores de virulência envolvidos na produção de biofilme, persistência e evasão do sistema imune, que ainda não são completamente compreendidos. Logo, o objetivo deste estudo foi descrever o perfil epidemiológico de isolados clínicos de *S. capitis*, e caracterizar aspectos envolvidos na persistência e na patogênese dessas linhagens provenientes de um hospital no interior do estado de São Paulo, Brasil. Para tal, 141 isolados de *S. capitis*, provenientes de hemoculturas coletadas entre 2009 e 2019 e no ano de 2021, de pacientes neonatais, pediátricos, adultos e idosos, foram submetidas a detecção do gene *mecA* e caracterização do tipo SCC*mec* por PCR multiplex. A detecção de genes envolvidos na produção de biofilme, enterotoxinas e hemolisinas foi realizada por PCR convencional. A produção de biofilme foi verificada pelo teste de aderência em placa de poliestireno e a resistência fenotípica foi constada pela técnica de disco-difusão. Por fim a relação clonal foi analisada por Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE). A detecção do gene *mecA* foi verificada em 99 (70,2%) isolados, chegando à 100,0% na UTI neonatal. Por outro lado, isolados sensíveis foram significativamente prevalentes no pronto socorro adulto. Foi observada prevalência de SCC*mec* tipo III em 31 (31,3%) isolados, seguido de SCC*mec* IV e tipo V que foram descritos em 23 (23,2%) e 20 (20,2%) cepas respectivamente. SCC*mec* coocorrentes foram verificados, com destaque para SCC*mec* tipos III & IV. A formação de biofilme *in vitro* foi verificada em 46 (32,6%) isolados, porém sem correlação com a presença dos genes do operon *ica*. Ademais, a produção de biofilme em isolados da UTI se mostrou favorecida por condições hiperosmóticas, comuns nesses ambientes onde a nutrição parenteral é frequente. Isolados de *S. capitis* sensíveis a meticilina foram significativamente mais forte aderentes do que isolados resistentes. A detecção de genes associados a produção de enterotoxinas revelou alta prevalência dos genes *seg* e *sei*. A análise da relação clonal entre os isolados investigados no presente estudo confirma um perfil homogêneo de *S. capitis*, bem como a persistência de clones prevalentes, na UTI neonatal e dispersos pelo hospital. Este estudo contribui para o conhecimento mais amplo a respeito do perfil molecular de linhagens de *S. capitis*, evidenciando isolados bem adaptados a ambientes hospitalares específicos e elevada clonalidade.

Palavras chaves: Estafilococos coagulase-negativa, hemocultura, clones, PFGE, biofilme, UTI neonatal, SCC*mec*, *mecA*.

ABSTRACT

Staphylococcus capitis has been associated with a range of diseases but has gained particular importance as a causal agent of late-onset sepsis in neonates, with multidrug-resistant and highly clonal isolates being disseminated in neonatal intensive care units (ICU) around the world. This species can carry genes that encode important virulence factors involved in biofilm production, persistence, and immune evasion, mechanisms that are still not completely understood. Therefore, the aim of this study was to describe the epidemiological profile of clinical isolates of *S. capitis* and to characterize the factors involved in the persistence and pathogenesis of these strains isolated at a hospital in the interior of the state of São Paulo, Brazil. For this purpose, 141 *S. capitis* strains isolated from blood cultures collected between 2009 and 2019 and in 2021 from neonatal, pediatric, adult, and elderly patients were submitted to the detection of the *mecA* gene and SCC*mec* typing by multiplex PCR. Genes involved in biofilm production and genes encoding enterotoxins and hemolysins were detected by conventional PCR. Biofilm formation was evaluated by the polystyrene plate adherence test and phenotypic resistance was investigated by the disk diffusion method. Finally, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was used to analyze the clonal relationship between isolates. The *mecA* gene was detected in 99 (70.2%) isolates, with this percentage reaching 100% in the neonatal ICU. On the other hand, susceptible isolates were significantly more prevalent in the adult emergency room. SCC*mec* type III was the most prevalent type, detected in 31 (31.3%) isolates, followed by SCC*mec* types IV and V detected in 23 (23.2%) and 20 (20.2%) strains, respectively. Co-occurrence of SCC*mec* was also observed, particularly SCC*mec* types III and IV. *In vitro* biofilm formation was detected in 46 (32.6%) isolates but was not correlated with the presence of the *ica* operon genes. Furthermore, biofilm production in ICU isolates was favored by hyperosmotic conditions, which are common in ICUs because of the frequent parenteral nutrition. Methicillin-susceptible *S. capitis* isolates were significantly more often classified as strongly adherent than resistant isolates. Regarding genes associated with enterotoxin production, there was a high prevalence of the *seg* and *sei* genes. Analysis of the clonal relationship between the isolates investigated in the present study confirms a homogeneous profile of *S. capitis* and the persistence of clones that are prevalent in the neonatal ICU and disseminated across the hospital. This study contributes to a broader understanding of the molecular profile of *S. capitis* strains, demonstrating isolates that are well adapted to specific hospital environments and high clonality.

Keywords: Coagulase-negative staphylococci, blood culture, clones, PFGE, biofilm, neonatal ICU, SCC*mec*, *mecA*

1. INTRODUÇÃO

Inicialmente descrita por Kloos & Schleifer em 1975 [1], *Staphylococcus (S.) capitis* pertencem ao amplo grupo estafilocócico denominado Estafilococos Coagulase-Negativa (ECN), que por muito tempo tiveram seu potencial patogênico subestimado dentro da prática clínica diária, devido à clássica e genérica compreensão da natureza comensal e raramente virulenta desses micro-organismos. Para *S. capitis* não foi diferente, sendo tradicionalmente considerado um micro-organismo comensal, no entanto seu reconhecimento como patógeno oportunista relevante tem sido mais frequente.

São comumente encontrados no couro cabeludo humano e na testa, onde glândulas sebáceas são abundantes [2]. *S. capitis* já foram associados a uma série de doenças humanas, incluindo infecções articulares protéticas [3,4], endocardite de prótese valvar [5–7] e meningite em adultos [8]. No entanto, relatos sobre *S. capitis* são predominantemente direcionados ao seu papel como agente causal de sepse neonatal tardia em recém-nascidos em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) neonatal [9–12], bem como sua persistência em UTIs neonatais ao redor do mundo, onde isolados com alta relação clonal e baixa suscetibilidade à vancomicina têm emergido como patógenos em casos persistentes [13]. Em particular, um clone de *S. capitis*, denominado NRCS-A, tem emergido em todo o mundo, especificamente em UTIs neonatais, ambiente no qual essas linhagens parecem ter se adaptado muito bem, de modo a colonizar superfícies inertes, como incubadoras neonatais, e persistir no ambiente, promovendo a disseminação ambiental e a transmissão inter-paciente [11,14,15]

S. capitis codifica importantes fatores de virulência envolvidos na produção de biofilme, persistência e evasão do sistema imune [16]. Ademais, a multirresistência tem emergido, principalmente em cepas clínicas [16,17]. A resistência à meticilina em estafilococos é majoritariamente mediada pela expressão do gene *mecA* que codifica uma proteína de ligação à penicilina alterada, denominada PBP2a (PBP2'), que exibe uma baixa afinidade para a maioria das penicilinas semi-sintéticas, como meticilina, nafcilina e oxacilina, bem como para a maioria das cefalosporinas [18]. O gene *mecA* é carregado em um elemento genético móvel dentro do DNA cromossômico, designado Cassete Cromossômico Estafilocócico *mec* (SCC*mec*) [18,19], o qual é classificado em tipos e subtipos de acordo com a organização estrutural e diferenças de sequência em três elementos básicos: (i) o complexo do gene *mec*; (ii) o complexo do gene *ccr*; (iii) e as regiões de junção (regiões J) [18,20].

De acordo com a literatura, ECN apresentam SCC*mec* altamente diversificados em seu conteúdo gênico [21], indicando troca frequente de material genético entre espécies através da transferência desses elementos móveis [22,23]. Embora SCC*mec* tipos III, IV e V sejam os mais

prevalentes entre espécies de ECN, a tipagem dos elementos *SCCmec* é altamente recomendada por revelar a alta diversidade genética nesses isolados [24].

A multirresistência em *S. capitis* foi recentemente descrita particularmente em linhagens pertencentes ao clone NRCS-A, carreadores de um elemento *SCCmec-SCCcad/ars/cop* com alto grau de similaridade estrutural com o elemento *SCCmec* tipo V, conferindo resistência a β -lactâmicos e menor suscetibilidade aos agentes antimicrobianos comumente usados em unidades de terapia intensiva neonatal, incluindo aminoglicosídeos e resistência ou heteroresistência à vancomicina [11,14,25]. Linhagens desse clone, com alta conservação genômica, foram isolados em unidades de terapia intensiva neonatal (UTIN) em 17 países em todo o mundo, incluindo o Brasil, todavia, a disseminação e a caracterização desses isolados no país raramente são abordadas na literatura [14].

Outro aspecto relevante da patogenicidade de espécies de ECN é a produção de biofilme, tipicamente mediada por uma molécula denominada adesina intercelular polissacarídica (PIA), codificada no operon *icaADBC*, que auxilia na adesão intercelular [26]. Embora biofilmes *ica*-independentes já tenham sido descritos, mesmo em isolados carreadores do locus *ica* [27]. Essas comunidades microbianas de células imersas em matriz de substâncias poliméricas extracelulares, designadas biofilmes, permitem a sua adesão e colonização em superfícies bióticas e abióticas, conferindo proteção contra condições ambientais de estresse, como o uso de desinfetantes ou antibióticos, e contra a ação do sistema imune do hospedeiro [28–31]. De fato, a produção de biofilme em *S. capitis* parece favorecer a progressão de situações clínicas como endocardite, bacteremia relacionada a cateteres e infecções de próteses articulares [32].

Muitos fatores de virulência, originalmente descritos em *S. aureus* hoje são reconhecidos também no genoma de espécies de ECN, incluindo enterotoxinas estafilocócicas (SEs) e hemolisinas [33]. Além disso, a posse de genes associados a fatores de virulência em ECN também pode contribuir significativamente para a evolução da enterotoxigenicidade estafilocócica através da transferência inter e intra-espécie desses genes [33].

Já foi relatado que enterotoxinas derivadas de ECN podem exercer efeitos superantigênicos, tóxicos e pirogênicos com maior poder de influenciar a evolução de casos de peritonite do que a resistência antimicrobiana [34]. As SEs atuam induzindo uma resposta policlonal inespecífica de células T, deflagrando em toxicidade sistêmica e supressão da resposta imune adaptativa [33,35,36]. Enquanto toxinas citolíticas produzidas por estafilococos, também descritas como hemolisinas, atuam formando poros na membrana celular do hospedeiro, levando ao efluxo de moléculas vitais e metabólitos [32].

No geral, a estrutura populacional de *S. capitis* parece ser mais homogênea, se comparada à descrita em outras espécies de ECN, embora ainda seja pouco compreendida, exceto pelo clone multirresistente NRCS-A [9,13,37]. Logo, entender o perfil de linhagens circulantes é de extrema importância para o acompanhamento da epidemiologia local [38].

Nesse sentido, destacamos a importância de análises mais profundas que caracterizem a evolução, bem como a atual conjuntura, do perfil epidemiológico molecular de resistência e virulência dessa espécie oportunista frequentemente negligenciada, que consiste em um problema médico não resolvido com consequências práticas para a vigilância de infecções hospitalares. Em virtude disso, o objetivo deste estudo foi descrever o perfil epidemiológico de isolados clínicos de *S. capitis*, e caracterizar aspectos envolvidos na persistência e na patogênese dessas linhagens provenientes de um hospital no interior do estado de São Paulo, com alta abrangência populacional.

2. RESULTADOS

Inicialmente, 277 amostras armazenadas na Coleção de Culturas e pré-identificadas como *S. capitis*, foram selecionadas e submetidas a confirmação genotípica da espécie. Ao todo, 136 (49,1%) isolados foram excluídos por não corresponderem à espécie pré-identificada ou por ausência de crescimento em meio de cultura sólido ou líquido. A Figura 1 retrata a estratégia utilizada na seleção dos isolados. Ao todo, foram identificadas 141 isolados de *S. capitis* coletadas de pacientes distintos, em todos os anos entre 2009 e 2019 e no ano de 2021.

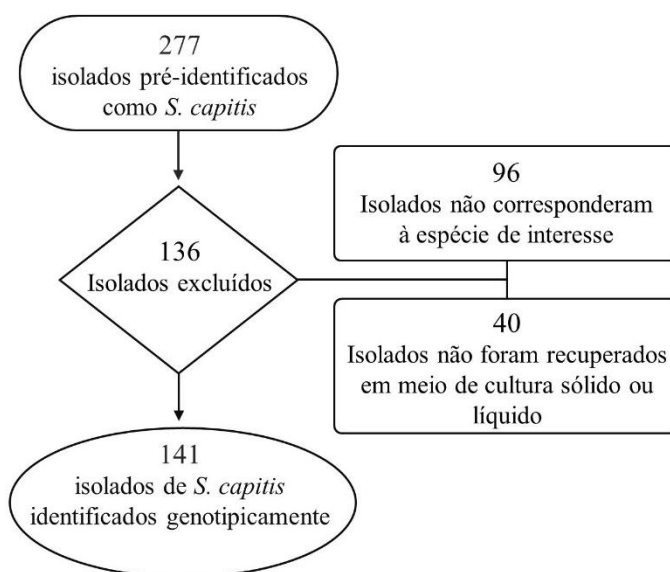


Figura 1. Fluxograma ilustrando a inclusão e exclusão dos isolados pré-identificados submetidos à confirmação genotípica.

A idade dos pacientes variou de 0 (recém-nascidos) a 97 anos, e a faixa etária que predominou foi de 60 a 97 anos com (56,0%), classificada como grupo etário de pacientes idosos. As amostras foram predominantemente isoladas do Pronto socorro adulto, do setor de Clínica médica e do Serviço de Terapia Intensiva (SeTI) como descrito na Tabela 1. Ademais, isolados provenientes da UTI neonatal e do setor de neurologia também chamaram a atenção.

A detecção do gene *mecA* foi verificada em 99 (70,2%) isolados, denominados *S. capitis* resistentes à meticina (MRSC), enquanto 97 (68,8%) amostras apresentaram resistência à metilina pelo método de disco-difusão, nas quais o gene *mecA* não foi detectado em um isolado como evidenciado na Tabela 2. Além disso, a presença do gene *mecA* foi mais frequente em amostras isoladas de unidades de terapia intensiva, chegando à 100,0% na UTI neonatal. Em contrapartida, no Pronto socorro adulto, isolados de *S. capitis* sensíveis à metilina (MSSC), foram prevalentes ($p < 0.0001$).

A caracterização do tipo SCC*mec* pelo método de Machado et al. (2007) [23] não permitiu a determinação de 32 (32,3%) isolados, os quais foram submetidos ao protocolo descrito por Kondo et al. [39]. Por fim, 24 (24,2%) amostras foram caracterizadas pelo método alternativo e a relação dos SCC*mec* tipados nas amostras analisadas é decorrida na Tabela 1. Foi observada prevalência de SCC*mec* tipo III em 31 (31,3%) isolados, seguido de SCC*mec* IV e tipo V que foram descritos em 23 (23,2%) e 20 (20,2%) cepas, respectivamente.

A co-ocorrência de dois SCC*mec* distintos no mesmo genoma foram detectadas em 10 (10,1%) isolados, nove deles contendo o SCC*mec* III na combinação, com destaque para o SCC*mec* tipos III & IV, encontrados juntos em seis (6,1%) isolados. A co-ocorrência foi mais predominante em isolados da UTI neonatal, com q amostras coletadas desse setor.

A caracterização de SCC*mec* tipo III foi frequente em isolados pertencentes ao SeTI, sendo encontrado em oito (44,4%) amostras. Os complexos SCC*mec* tipo III e tipo V dividiram a predominância em isolados da Clínica médica, UTI neonatal e Neurologia. No Pronto socorro adulto seis (37,5%) isolados foram caracterizados com SCC*mec* tipo IV, evidenciando a sua predominância nas amostras dessa unidade hospitalar, juntamente ao SCC*mec* tipo III & IV.

O fenótipo de suscetibilidade antimicrobiana avaliado por disco-difusão evidenciou um padrão de resistência à metilina bem correlacionado à detecção do gene *mecA* como evidenciado na Tabela 2. No entanto, a menor taxa de resistência fenotípica ao disco de cefoxitina (90,3%) foi observada entre isolados carreadores de SCC*mec* tipo III, com três amostras fenotipicamente suscetíveis apesar do gene *mecA*. Ademais, não foi constatada resistência a linezolida ou sulfametoxazol/trimetoprim em *S. capitis*. A frequência de resistência fenotípica entre os diferentes perfis de SCC*mec* também é descrita na Tabela 2.

Tabela 1. Distribuição dos isolados de *S. capitis*, MSSC e MRSC, caracterização demográfica dos pacientes, unidades de origem e caracterização dos tipos SCCmec das amostras resistentes.

	<i>S. capitis</i> (n = 141)	MSSC (n=42)	MRSC (n=99)	<i>P</i> valor ^a	Caracterização SCCmec em MRSC										<i>P</i> valor ^b	
					I (n=6)	I & III (n=1)	II & III (n=2)	III (n=31)	III & IV (n=6)	IV (n=23)	V (n=20)	V & XIV (n=1)	VI (n=1)	NT (n=8)		
Dados demográficos gerais																
Idade (média ± DV (intervalo de anos))	57 ± 25,0 (0–97)	65 ± 25,0 (2–97)	53 ± 25,3 (0–91)	-	59 ± 26,0 (38–82)	0	0	54 ± 25,0 (0–81)	61 ± 20,2 (0–89)	57 ± 25,3 (0,1–89)	50 ± 26 (0–91)	43	83	59 ± 26 (0–90)	-	
Grupos etários, n (%)	Neonatal	9 (6,4)	0 (0,0)	9 (9,1)	0,104	0 (0,0)	1 (100,0)	2 (6,5)	1 (16,7)	0 (0,0)	2 (10,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (12,5)	0,8735	
	Pediátrico	5 (3,6)	2 (4,8)	3 (3,0)	0,9915	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (8,7)	1 (5,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,8735	
	Adulto	48 (34,0)	11 (26,2)	37 (37,4)	0,3188	3 (50,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	15 (48,4)	1 (16,7)	8 (34,8)	7 (35,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	2 (25,0)	0,5529
	Idoso	79 (56,0)	29 (69,0)	50 (50,5)	0,0653	3 (50,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	14 (45,2)	4 (66,7)	13 (56,5)	10 (50,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	5 (62,5)	0,3983
Sector hospitalar de origem, n (%)																
Pronto socorro adulto	40 (28,4)	24 (57,1)	16 (16,2)	<0,0001	1 (16,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (6,5)	2 (33,3)	6 (26,1)	2 (10,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	2 (25,0)	0,2068	
Pronto socorro pediátrico	3 (2,1)	2 (4,8)	1 (1,0)	0,439	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (4,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,9494	
SeTI	24 (17,0)	6 (14,3)	18 (18,2)	0,7505	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	8 (25,8)	1 (16,7)	5 (21,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (12,5)	0,8998	
UTI neonatal	10 (7,1)	0 (0,0)	10 (10,1)	0,0743	0 (0,0)	1 (100,0)	2 (100,0)	2 (6,5)	1 (16,7)	1 (4,3)	2 (10,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (12,5)	0,000593	
Berçário	1 (0,7)	0 (0,0)	1 (1,0)	1	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (5,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,912	
Clínica Médica	27 (19,1)	5 (11,9)	22 (22,2)	0,2341	3 (50,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	6 (19,4)	0 (0,0)	5 (21,7)	6 (30,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	1 (12,5)	0,3249	
Cirurgia	4 (2,8)	0 (0,0)	4 (4,0)	0,4431	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (6,5)	0 (0,0)	1 (4,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (12,5)	0,9409	
Unidade de AVC	1 (0,7)	0 (0,0)	1 (1,0)	1	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (3,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,9876	
Dermatologia	3 (2,1)	1 (2,4)	2 (2,0)	1	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (3,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (5,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,9895	
Gastroenterologia	1 (0,7)	1 (2,4)	0 (0,0)	0,6574	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	-	
Neurologia	8 (5,7)	0 (0,0)	8 (8,1)	0,1339	1 (16,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (9,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (15,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (12,5)	0,8174	
Cuidados paliativos	3 (2,1)	1 (2,4)	2 (2,0)	1	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (16,7)	1 (4,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,4774	
Enfermaria cardiotorácica	1 (0,7)	0 (0,0)	1 (1,0)	1	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (3,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,9876	
Enfermaria Moléstias Infeciosas	1 (0,7)	0 (0,0)	1 (1,0)	1	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (5,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,912	
Hemodiálise	2 (1,4)	1 (2,4)	1 (1,0)	1	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (12,5)	0,2435	
Ginecologia	3 (2,1)	0 (0,0)	3 (3,0)	0,6155	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (3,2)	1 (16,7)	0 (0,0)	1 (5,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,8002	
Nefrologia	1 (0,7)	0 (0,0)	1 (1,0)	1	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (3,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,9876	
Ortopedia	2 (1,4)	0 (0,0)	2 (2,0)	0,8815	1 (16,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (4,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,4774	
Quimioterapia	1 (0,7)	1 (2,4)	0 (0,0)	0,6574	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	-	
Enfermaria de oftalmologia e otorrinolaringologia	1 (0,7)	0 (0,0)	1 (1,0)	1	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (3,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,9876	
Não informado	4 (2,8)	0 (0,0)	4 (4,0)	0,4431	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (6,5)	0 (0,0)	2 (8,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,9332	

número de amostras. NT = Não tipável. MSSC = *S. capitis* sensível à metilina. MRSC = *S. capitis* resistente à metilina. Unidade de AVC – unidade especializada no atendimento integral de pacientes vítimas de AVC (Acidente Vascular Cerebral). Enfermarias: inclui unidades de internação cardiotorácica, moléstias infecciosas e enfermaria de convênios. Especialidades: inclui dermatologia, ginecologia, gastroenterologia, nefrologia, neurologia, urologia, obstetrícia, ortopedia, oftalmologia e otorrinolaringologia. Cirurgia: inclui cirurgia cardíaca, cirurgia vascular, gastroenterologia cirúrgica e cirurgia geral. *P* valor^a Significância estatística para MSSC e MRSC; *P* valor^b Significância estatística para os tipos SCCmec

Tabela 2. Distribuição do gene *mecA* e tipos *SCCmec* em relação ao perfil fenotípico de resistência antimicrobiana em isolados de *S. capitis*.

<i>S. capitis</i> (n=141)		Antimicrobianos			
Gene <i>mecA</i>	n (%)	Cefoxitina n (%)	Oxacilina n (%)	Linezolida n (%)	Sulfametoxazol/ Trimetoprim, n (%)
Não detectado	42 (29,8)	1 (2,4)	2 (4,8)	0 (0,0)	0 (0,0)
Detectado	99 (70,2)	96 (97,0)	93 (93,9)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>SCCmec</i>					
I	6 (6,1)	6 (100,0)	5 (83,3)	0 (0,0)	0 (0,0)
I & III	1 (1,0)	1 (100,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
II & III	2 (2,0)	2 (100,0)	2 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
III	31 (31,3)	28 (90,3)	29 (93,5)	0 (0,0)	0 (0,0)
III & IV	6 (6,1)	6 (100,0)	6 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
IV	23 (23,2)	23 (100,0)	22 (95,7)	0 (0,0)	0 (0,0)
V	20 (20,2)	20 (100,0)	19 (95,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
V & XIV	1 (1,0)	1 (100,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
VI	1 (1,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
NT	8 (8,1)	8 (100,0)	8 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

n = número de amostras. NT: Não tipável.

Ao longo do período avaliado percebeu-se uma oscilação da prevalência de tipos diferentes de *SCCmec* ao longo dos anos, com predominância de *SCCmec* tipo III, tipo V e tipo IV na maior parte do período estudado, além de um aumento de amostras contendo *SCCmec* tipo III & IV, em 2021, devido à detecção de seis isolados carregando esse padrão nesse ano analisado. Curiosamente, o *SCCmec* tipo I só foi detectado em isolados coletados em 2013 e 2014 em indivíduos atendidos no Pronto socorro adulto, Clínica médica, Ortopedia e Neurologia.

A formação de biofilme *in vitro* foi verificada em 46 (32,6%) isolados, dentre os quais apenas 18 (39,13%) amostras apresentaram positividade para um ou mais genes do operon *ica*. A amplificação dos genes *icaA* e *icaD*, juntos ou isolados, se destacou nas amostras analisadas, no entanto não houve associação entre a presença de cada um dos genes com a produção de biofilme (*icaA* $p=0,2755$, *icaB* $p=0,2973$, *icaC* $p=0,1174$ e *icaD* $p=0,3106$), como mostrado na Tabela 3.

Tabela 3. Detecção de genes do operon *ica* e formação de biofilme por aderência em placa de poliestireno.

Aderência	n (%)	Detecção de genes por PCR															
		<i>icaA</i> + n (%)	<i>icaD</i> + n (%)	<i>icaB</i> + n (%)	<i>icaC</i> + n (%)	<i>icaAB</i> + n (%)	<i>icaAC</i> + n (%)	<i>icaAD</i> + n (%)	<i>icaBC</i> + n (%)	<i>icaBD</i> + n (%)	<i>icaDC</i> + n (%)	<i>icaABC</i> + n (%)	<i>icaADB</i> + n (%)	<i>icaACD</i> + n (%)	<i>icaDBC</i> + n (%)	<i>icaADBC</i> + n (%)	<i>ica-</i> n (%)
Forte	27 (19,1)	9 (33,3)	7 (25,9)	3 (11,1)	8 (29,6)	3 (11,1)	5 (18,5)	6 (22,2)	3 (11,1)	3 (11,1)	5 (18,5)	3 (11,1)	3 (11,1)	4 (14,8)	3 (11,1)	3 (11,1)	15 (55,6)
Fraca	19 (13,5)	4 (21,1)	3 (15,8)	0 (0,0)	1 (5,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	11 (5,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (5,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	13 (68,42)
Não aderente	95 (67,4)	38 (40,0)	31 (32,6)	11 (11,6)	18 (18,9)	6 (6,3)	12 (12,6)	15 (15,8)	6 (6,3)	7 (7,4)	10 (10,5)	4 (4,2)	5 (5,3)	9 (9,5)	4 (4,2)	4 (4,2)	35 (36,8)
Total	141	51 (36,2)	41 (29,1)	14 (9,9)	27 (19,1)	9 (6,4)	17 (12,1)	22 (15,6)	9 (6,4)	10 (7,1)	16 (11,3)	7 (5,0)	8 (5,7)	13 (9,2)	7 (5,0)	7 (5,0)	63 (44,7)

n = número de amostras. NT: Não tipável. *ica-*: ausência de genes do operon *ica*

Ademais, 18 (52,9%) dos 34 isolados coletados dos setores de terapia intensiva, incluindo SeTI e UTI neonatal, tiveram a produção de biofilme favorecida por condições hiperosmóticas, como é possível visualizar na Figura 2. Ao todo, 11 (32,4%) isolados não produtores de biofilme em glicose passaram a produzir biofilmes fraco ou forte aderentes em concentrações elevadas de NaCl, indicando aumento significativo da produção de biofilme em condições hiperosmóticas ($p = 0,003$).

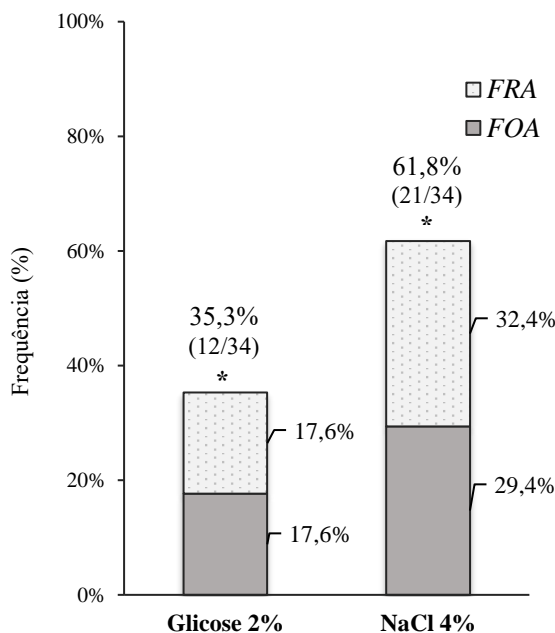


Tabela 2. Frequência de produção de biofilme (FRA: Fraco aderente; FOA: Forte aderente) em meio de cultura suplementado com 2% de glicose e 4% de NaCl, em isolados do SeTI e da UTI neonatal (34 amostras). * p valor < 0,05.

Isolados de *S. capitis* sensíveis à meticilina (MSSC) foram significativamente mais forte aderentes do que isolados resistentes ($p=0,0025$). Já entre as amostras de MRSC a produção de biofilme forte aderente se correlacionou mais com aquelas carreadoras de SCCmec tipo III & IV, além de isolados com SCCmec tipo III e tipo IV, isoladamente, também terem formado biofilme com frequência, como descrito na Tabela 4.

A detecção de genes associados a produção de enterotoxinas revelou alta prevalência do gene *seg*, seguido do gene *sei*, que frequentemente foi encontrado associado ao gene *seg*. Todos os isolados carreadores de SCCmec tipo I apresentaram positividade para o genótipo *seg/sei*, evidenciando um perfil de genes enterotoxigênicos que se diferenciou dos demais tipos SCCmec ($p=0,0001$). Em segundo plano, a amplificação dos genes *seh* e *sec* se destacou como é descrito na Tabela 4. Os genes *sed* e *see* foram os menos detectados em todas as amostras, enquanto os genes *seb* e *tst* não foram encontrados.

Tabela 4. Frequência dos genes de virulência e aderência entre *S. capitis* de cada perfil de SCCmec descrito.

	Genes de virulência															Produção de biofilme n (%)		
	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>	<i>seg</i>	<i>seh</i>	<i>sei</i>	<i>tst</i>	<i>sea & seg</i>	<i>seg & sei</i>	<i>seg, seh & sei</i>	<i>sec, seg & sei</i>	<i>sea, seg & sei</i>	<i>hla</i>	<i>hld</i>	FRA	FOA
<i>S. capitis</i> (n = 141)	14 (9,9)	0 (0,0)	16 (11,3)	1 (0,7)	2 (1,4)	61 (43,3)	27 (19,1)	50 (35,5)	0 (0,0)	13 (9,2)	38 (27,0)	11 (7,8)	5 (3,5)	8 (5,7)	2 (1,4)	1 (0,7)	19 (13,5)	27 (19,1)
MSSC (n=42)	3 (7,1)	-	6 (14,3)	1 (2,4)	0 (0,0)	13 (31,0)	5 (11,9)	12 (28,6)	-	2 (4,8)	9 (21,4)	1 (2,4)	2 (4,8)	2 (4,8)	1 (2,4)	1 (2,4)	7 (16,7)	15 (35,7)
MRSC (n=99)	11 (11,1)	-	10 (10,1)	0 (0,0)	2 (2,0)	48 (48,5)	22 (22,2)	38 (38,4)	-	11 (11,1)	29 (29,3)	10 (10,1)	3 (3,0)	6 (6,1)	1 (1,0)	0 (0,0)	12 (12,1)	12 (12,0)
<i>P valor</i>	0,4712	-	0,4737	0,1234	0,3535	0,0546	0,1545	0,2643	-	0,3824	0,4503	0,2225	0,9915	1	1	0,6574	0,6504	0,0025
SCCmec (n)																		
I (6)	1 (16,7)	-	1 (16,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	6 (100,0)	1 (16,7)	6 (100,0)	-	1 (16,7)	6 (100,0)	1 (16,7)	1 (16,7)	1 (16,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (16,7)	0 (0,0)
I & III (1)	0 (0,0)	-	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	1 (100,0)	1 (100,0)	-	0 (0,0)	1 (100,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
II & III (2)	0 (0,0)	-	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (50,0)	0 (0,0)	-	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (50,0)	0 (0,0)
III (31)	4 (12,9)	-	3 (9,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	17 (54,8)	9 (29,0)	17 (54,8)	-	4 (12,9)	14 (45,2)	6 (19,4)	1 (3,2)	3 (9,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (12,9)	2 (6,5)
III & IV (6)	0 (0,0)	-	1 (16,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	-	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (66,7)
IV (23)	3 (13,0)	-	3 (13,0)	0 (0,0)	1 (4,34)	10 (43,5)	3 (13,0)	5 (21,7)	-	3 (13,0)	3 (13,0)	0 (0,0)	1 (4,34)	1 (4,34)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (13,0)	5 (21,7)
V (20)	2 (10,0)	-	1 (5,0)	0 (0,0)	1 (5,0)	12 (60,0)	4 (20,0)	6 (30,0)	-	2 (10,0)	4 (20,0)	1 (5,0)	0 (0,0)	1 (5,0)	1 (5,0)	0 (0,0)	2 (10,0)	1 (5,0)
V & XIV (1)	0 (0,0)	-	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	-	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
VI (1)	0 (0,0)	-	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	-	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
NT (8)	1 (12,5)	-	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (25,0)	3 (37,5)	2 (25,0)	-	1 (12,5)	1 (12,5)	1 (12,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (12,5)	0 (0,0)
<i>P valor</i>	0,9944	-	0,2358	-	0,2358	0,0155	0,3606	0,0002	-	0,9944	0,0001	0,0582	0,8205	0,9521	0,912	-	0,8996	0,0056

n = número de amostras. MSSC: *S. capitis* sensíveis à meticilina. MRSC: *S. capitis* resistentes à meticilina NT: Não tipável. FRA: Biofilme fraco aderente em meio suplementado com glicose a 2%; FOA: Biofilme forte aderente em meio suplementado com glicose a 2%.

Os genes codificadores das hemolisinas α e δ também foram encontrados em uma frequência muito baixa, o gene *hla* foi verificado em dois isolados, dos quais uma amostra também amplificou o gene *hld*. O perfil dessas amostras é listado na Tabela 5.

Tabela 5. Caracterização dos isolados positivos para a presença dos genes *hla* e *hld* codificadores das hemolininas α e δ .

Isolado	Genes de hemolisinas	Ano	Unidade	Perfil operon <i>ica</i> /produção de biofilme	Perfil de resistência
161	<i>hla</i> / <i>hld</i>	2016	SeTI	<i>ica</i> - / Não aderente	<i>mecA</i> -
239	<i>hla</i>	2017	Clínica Médica	<i>icaADBC</i> / Não aderente	<i>mecA</i> + / SCC <i>mec</i> V

Perfil operon *ica* / produção de biofilme: Detecção de genes do operon *ica* / Aderência em placa de poliestireno; Perfil de resistência: Detecção do gene *mecA* (+/-) / Caracterização do tipo SCC*mec*

Ao todo, 45 isolados de *S. capitis* foram submetidos à análise de macrorrestrrição do DNA cromossômico, utilizando um coeficiente estabelecido de 80% de similaridade, que permitiu a identificação de onze clusters, designados de A a K, agrupando 35 (77,8%) isolados no total. Nos dois clones principais, A e J, foram agrupadas 6 amostras em cada, com predominância de isolados sensíveis, porém produtores de biofilme no cluster J, enquanto o cluster A reuniu isolados sensíveis e resistentes com SCC*mec* prevalentemente tipo III. Ademais, o cluster A persistiu entre 2009 e 2016 em unidades hospitalares diversas, já o cluster A agrupou amostras isoladas entre 2016 e 2021, principalmente do Pronto socorro e SeTi. Esses e os demais agrupamentos são descritos na Figura 3.

Os cluster B e D foram inteiramente compostos de isolados provenientes de UTI, neonatal e SeTi, com prevalência de perfil SCC*mec* tipo III, com destaque para o cluster B, que reuniu isolados de 2013 e 2019.

Foi verificada tipos distintos de SCC*mec* em isolados clonais, todavia, muitos clusters evidenciaram um padrão de SCC*mec* recorrente em suas amostras, a exemplo do cluster C, predominantemente composto de isolados SCC*mec* tipo V, ou os clusters menores, F, I e K, nos quais os SCC*mec* III & IV, I e IV dominaram, respectivamente. Dentre todas as linhagens de *S. capitis* submetidas ao PFGE cuja origem de coleta foi a UTI, apenas um isolado não foi agrupado em nenhum cluster.

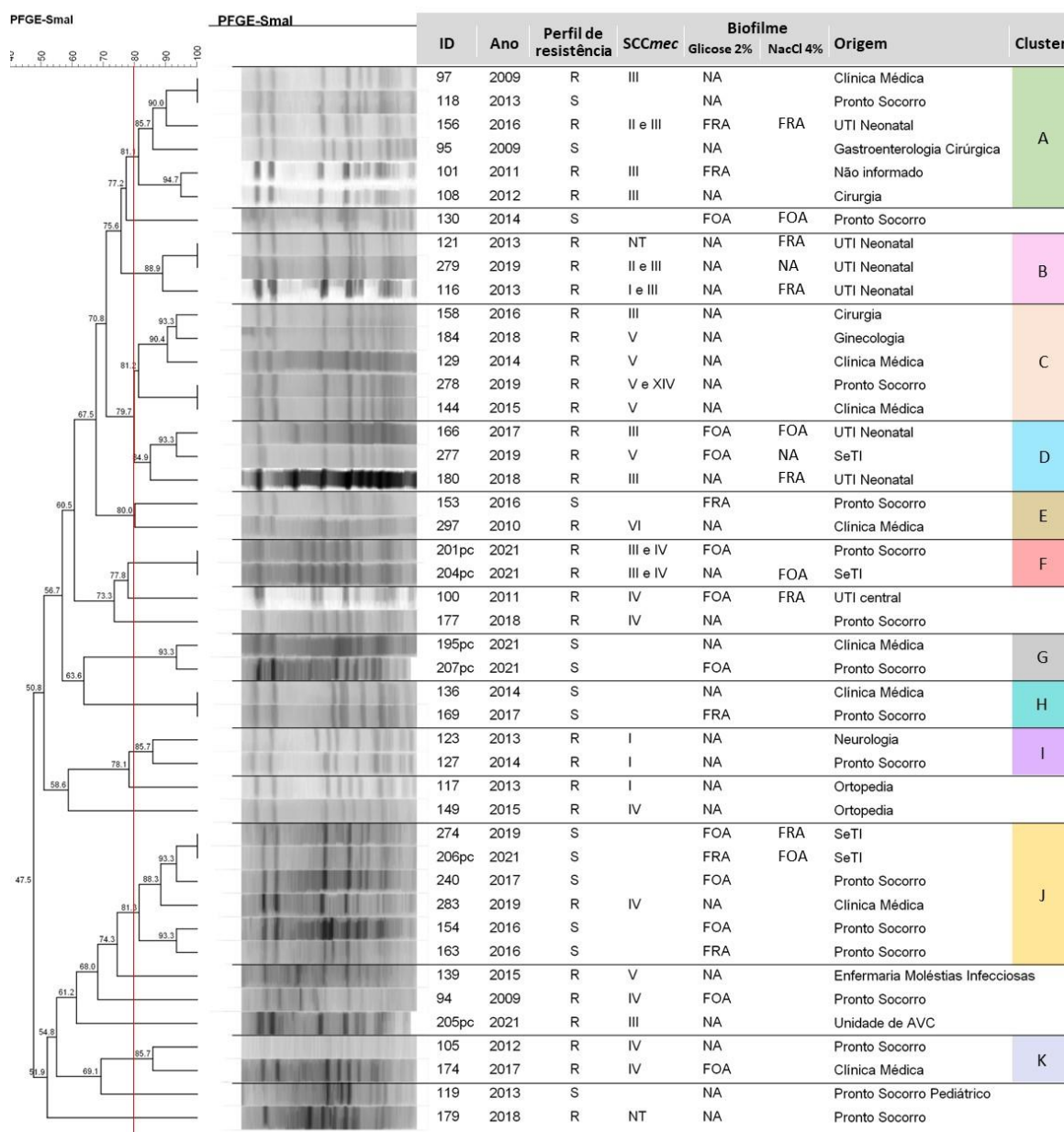


Figura 3. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics Applied Maths), dos perfis de PFGE – *SmaI* de *S. capitis*, indicando o perfil de resistência à metilina pela detecção do gene *mecA* (R: Resistente; S: Sensível) a caracterização do SCCmec, produção de biofilme em meio com glicose e NaCl (FOA: Forte aderente; FRA: Fraco aderente; NA: Não aderente) e unidade de origem. As letras destacadas evidenciam os clusters (>80% de similaridade) denominados A, B, C D, E, F, G, H, I, J e K.

3. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, estudos têm destacado a versatilidade e o potencial de adaptação de *S. capitis*, cujo repertório genético confere vantagens sob condições ambientais particulares e sustentam infecções relevantes em ambientes clínicos [2]. Ainda assim, a identificação de *S. capitis* ainda enfrenta desafios. A triagem inicial deste trabalho evidenciou divergência de identificação em 96 (34,7%) isolados de *S. capitis* armazenados na coleção de culturas e previamente caracterizados por métodos automatizados e semiautomatizados. De forma similar, estudos tem relatado divergências de identificação para espécies estafilocócicas, como descrito para sistemas fenotípicos, como Vitek 2, que em estudo anterior teve taxa de sucesso de 67% para espécies de ECN [40]. Outro trabalho recente comparou métodos moleculares e fenotípicos para identificação de ECN, incluindo isolados de *S. capitis*, relatando índice de sucesso de 100,0% no sistema MALDI-TOF MS, ao passo em que o sistema Vitek 2 identificou 90,3% dos isolados corretamente, já a identificação bioquímica identificou 76,8% [41].

De fato, taxas elevadas de identificação incorreta para isolados de ECN já foram descritas, estando associadas a falhas na diferenciação entre espécies devido à grande variabilidade da expressão de características fenotípicas entre cepas, aliado à homologia genética e fenotípica compartilhada entre espécies estafilocócicas [42,43]. Tal como a alta similaridade de sequência observada entre *S. capitis*, *S. caprae* e *S. epidermidis*, espécies filogeneticamente correlacionadas [44]. Em conjunto esses resultados sinalizam a falha na identificação de muitas espécies de ECN, incluindo *S. capitis*, que pode prejudicar o real monitoramento desses micro-organismos no ambiente hospitalar e impedir que medidas de controle sejam implementadas em tempo hábil.

Um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa, a partir de espécies de ECN isoladas nos 20 anos precedentes ao período estudado no atual trabalho, no mesmo hospital, detectou isolados de *S. capitis* apenas em pacientes adultos, com resistência à meticilina verificada em 80% das amostras, similar ao já descrito na literatura em outras partes do mundo [45,46]. Já os resultados encontrados nos últimos 10 anos neste trabalho, indicaram a presença do gene *mecA* em 70,2% dos isolados. A frequência de resistência nessa espécie parece reduzir muito mais quando provenientes da colonização da pele de indivíduos saudáveis e de ambientes não relacionados à saúde, variando em torno de 3 a 8% [47,48].

Essa multiplicidade nos resultados indica diferenças significativas no perfil de suscetibilidade entre linhagens de uma mesma espécie, porém de origens distintas, até mesmo se tratando de unidades de enfermarias diferentes, consoante ao relatado por Rasigade et al.

(2012), que constatarem uma frequência de resistência significativamente maior entre isolados de *S. capitis* de UTIs neonatais (95,6%) se comparada aos de UTI de pacientes adultos (53,3%) [9]. Similar ao verificado neste trabalho, no qual a resistência à meticilina foi verificada em 10 (100,0%) amostras coletadas na UTI neonatal, e em 18 (75,0%) isolados do SeTI, indicando a aquisição de resistência como uma vantagem adaptativa na disseminação de cepas de *S. capitis* na UTI neonatal, possivelmente associada à alta pressão seletiva nessa unidade. Por outro lado, isolados sensíveis foram significativamente prevalentes no Pronto socorro adulto, no qual a dinâmica do atendimento difere, consideravelmente, da UTI, remetendo a isolados possivelmente de origem comunitária.

Curiosamente, os resultados do estudo anterior não identificaram cepas de *S. capitis* em unidades neonatais dentre as amostras coletadas entre 1990 e 2009, e sim isolados de *S. capitis* causadores de bacteremia em adultos, sugerindo uma mudança no perfil dessas linhagens ou apenas um viés decorrente do número reduzido de amostras analisadas [45]. Certamente, casos de infecções por *S. capitis* em adultos são esporadicamente relatados [3,27], todavia, *S. capitis* tem se revelado um patógeno significativo no ambiente da UTI neonatal, com perpetuação do clone NRCS-A em todo o mundo, cujo perfil multirresistente, tanto para antibióticos quanto antissépticos, pode favorecer infecções graves em recém-nascidos [13]. Apesar disso, informações disponibilizadas pelo serviço de controle de infecção hospitalar do hospital analisado, não permitiram afirmar a ocorrência de um surto por *S. capitis* na UTI neonatal, a partir de 2009, que explique essa mudança de perfil.

Ainda assim, essa afinidade pela UTI neonatal chama a atenção. Investigações epidemiológicas relataram que, uma vez presente na UTI neonatal, o clone tem grande propensão a persistir e atingir alta prevalência no ambiente [9,49]. Butin et al. (2019) apontaram a ineficácia dos procedimentos de desinfecção possivelmente associada à redução da susceptibilidade de *S. capitis* à desinfetantes utilizados, o que remete à um alerta de que neonatos podem estar sendo alojados em incubadoras ainda colonizadas por *S. capitis* NRCS-A [49].

A análise da relação clonal entre os isolados investigados no presente estudo confirma um perfil homogêneo de *S. capitis*, bem como a persistência de clones prevalentes. Na UTI neonatal foi evidenciado a existência de dois clones relevantes, no cluster B foram detectados isolados MRSC coletados em 2013 e 2019, enquanto o cluster D agrupou amostras da UTI neonatal e SeTI coletadas entre 2017 e 2019, ambos os clones foram predominantemente SCCmec tipo III. De fato, as amostras de UTI neonatal mostraram uma tendência em agruparem entre si nesses clusters, sugerindo a presença de linhagens clonais persistentes nessa unidade.

Além disso, o cluster B, persistente na UTI neonatal, mostrou correlação de 75,6% com o cluster A, igualmente SCCmec tipo III prevalente, porém amplamente disperso em diferentes setores hospitalares entre 2009 e 2016, incluindo a UTI neonatal. Já os clusters C e D apresentaram 79,7% de similaridade, com isolados SCCmec tipos III e IV, também dispersos na UTI neonatal e em diferentes setores hospitalares entre 2014 e 2019. Esse resultado indica um perfil genético semelhante entre os clones mencionados, que podem estar correlacionados entre si.

Vale ressaltar que, os SCCmec tipos I, II e III, que são significativamente maiores que os outros tipos, são comumente associados às infecções estafilocócicas nosocomiais, enquanto o SCCmec tipo IV por muito tempo esteve relacionado principalmente a infecções adquiridas na comunidade, principalmente pelo seu tamanho pequeno e baixo custo adaptativo [45,50]. Em contrapartida, o SCCmec tipo III é o maior de todos, codificando resistência adicional, particularmente em espécimes hospitalares [45]. Outrossim, foi notada uma variação na distribuição de SCCmec identificados nos diferentes setores hospitalares, como no pronto socorro adulto e pediátrico, onde sete (41,2%) isolados foram caracterizados SCCmec tipo IV, enquanto nas unidades de terapia intensiva, SeTI e UTI neonatal, 10 (35,7%) cepas carregaram o SCCmec tipo III, que também foi recorrente nos clones, B e D, prevalentes nas UTIs, bem como no cluster A, correlacionado ao B.

No geral, a caracterização de SCCmec nos isolados MRSC evidenciou a predominância de SCCmec tipo III, IV e V. Um estudo complementar a este, realizado pelo nosso grupo de pesquisa, no mesmo hospital, porém entre 1990 e 2009, também detectou prevalência do SCCmec tipo III em *S. capitis*, com SCCmec tipo I sendo o segundo mais identificado, além de tipos SCCmec não tipáveis também terem sido encontrados [45]. Tais achados divergem parcialmente do nosso estudo, no qual o SCCmec tipo I foi verificado em apenas seis (6,1%) isolados. Já a prevalência de SCCmec tipo III em *S. capitis* parece ser um consenso em hospitais brasileiros estudados, como no Hospital das Clínicas de Porto Alegre, onde Pinheiro Machado et al. (2007) também descreveram a prevalência de SCCmec tipo III [23]. Achados muito semelhantes entre si e com o relatado aqui, e coerentes ao já descrito em outras partes do mundo em trabalhos recentes, embora também existam divergências perceptíveis entre regiões geográficas e em decorrência de limitações metodológicas [51,52].

Ademais, dentre os isolados da UTI neonatal, seis (60,0%) amostras foram caracterizadas com SCCmec III isoladamente ou coexistindo com SCCmec I (SCCmec I & III), SCCmec II (SCCmec II & III) ou SCCmec IV (SCCmec III & IV). Evidenciando a disseminação de linhagens portadoras de SCCmec tipo III, reconhecidamente relacionado à ambientes

nosocomiais, porém destacando a recorrência de elementos coocorrentes em um mesmo genoma.

Neste trabalho, a coexistência de dois tipos de SCCmec foi descrita em 10 (10,1%) linhagens, em nove delas o SCCmec tipo III foi o fator em comum, no entanto o padrão mais frequente foi SCCmec III & IV, com seis (6,1%) amostras. Nesse ponto, algumas características chamam atenção. Todos os isolados SCCmec III & IV foram, exclusivamente, detectados em 2021, a partir de amostras coletadas em UTI, Pronto socorro e outras enfermarias. Além disso, 83,3% dessas amostras produziram biofilme forte aderente em meio com glicose ou NaCl, e os dois isolados submetidos à análise de macrorrestrrição do DNA genômico por PFGE foram idênticos (100,0% de similaridade), indicando um perfil altamente clonal nessas amostras, circulantes em 2021. Esses achados podem sugerir um clone associado à produção de biofilme forte aderente, carreador de tipos SCCmec, epidemiologicamente distintos, no seu genoma.

Em anos anteriores, no mesmo hospital, a co-existência de SCCmec tipo III & IV também foi verificada, porém exclusivamente em *S. epidermidis* isolados da corrente sanguínea, assim como descrito em outro hospital brasileiro [23,53]. De modo semelhante, SCCmec múltiplos envolvendo o elemento tipo III se destacam em vários outros relatos [22,50], no entanto, a razão pela qual o SCCmec III é o mais frequentemente encontrado em isolados carreadores de elementos múltiplos ainda não está clara.

Esses achados evidenciam que múltiplos tipos de SCCmec, antes considerados fundamentais na categorização epidemiológica entre cepas de origem hospitalar e comunitária, hoje podem dividir o genoma, formando um mosaico de elementos SCCmec de ambas as categorias. Adicionalmente, a amplificação do complexo *ccr* tipo 5 (*ccrC*) também foi encontrada em isolados SCCmec III & IV e SCCmec IV [54,55]. Essa recombinase, *ccrC*, oficialmente associada ao SCCmec V e SCCmec XIV, já foi descrita em isolados estafilocócicos com outros tipos SCCmec, assim como polimorfismos são frequentemente relatados [54,55]. Certamente, isso é fruto de mudanças epidemiológicas substanciais, com processos de recombinação e rearranjo nos genomas de ECN, pelos quais novos tipos e subtipos de SCCmec são gerados incessantemente, embora apenas uma fração deles sejam transferidos a cepas de *S. aureus* [55].

A relação clonal entre os isolados avaliados evidenciou alguns clusters reunindo amostras caracterizadas com diferentes tipos SCCmec, no entanto houve um padrão de tipos SCCmec semelhantes dentro de cada cluster, refletindo a homogeneidade genética relacionada à classificação SCCmec.

Isolados carreadores de SCC*mec* tipo III & IV foram mais frequentemente produtores de biofilme, principalmente forte aderente (66,7%). A formação de biofilme também foi encontrada em amostras com SCC*mec* tipo III e IV separadamente. Curiosamente, o SCC*mec* tipo III já foi descrito como um possível preditor genético para forte produção de biofilme em cepas clínicas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) [56,57]. Enquanto cepas portadoras de SCC*mec* tipo III e tipo IV foram relatadas como mais fracamente hidrofílicas e, portanto, mais aderentes ao poliestireno, que possui natureza hidrofóbica [57]. Essa correlação parece não ter sido descrita para espécies de ECN, até o momento, no entanto, pode ajudar a entender como a produção de biofilme pode potencializar a persistência e a gravidade de infecções causadas por *S. capitis* e outras espécies estafilocócicas carreadoras de SCC*mec* III, IV ou ambos.

Certamente, a capacidade de formar biofilme é um fator propulsor da persistência microbiana, aumentando a tolerância aos antimicrobianos em cerca de 10 a 1000 vezes [58]. Esse fenômeno está relacionado à mecanismos independentes e parcialmente sinérgicos que incluem a baixa atividade metabólica, baixa permeabilidade celular e interferência dos componentes da matriz do biofilme sobre a difusão de antibióticos [59].

A produção de biofilme foi verificada em 46 (32,6%) amostras de *S. capitis*, dentre as quais apenas 18 (39,13%) amostras apresentaram um ou mais genes do operon *ica*, com predominância dos genes *icaA* e *icaD*. Não foi encontrada correlação entre a detecção de genes do operon *ica* e a aderência, coerente a outros relatos que indicam um biofilme de natureza heterogênea, frequentemente diferente da formação clássica de biofilme mediado por PIA, com indícios de matriz composta principalmente por proteínas [27].

Por outro lado, a expressão *in vitro*, do gene *ica* é altamente variável e induzida pela composição do meio [60]. Qu et al. (2020), demonstraram que linhagens pertencentes ao clone *S. capitis* NRCS-A, isoladas de UTIs neonatais, tiveram a produção de biofilme aumentada em resposta ao estresse hiperosmótico que parece estimular a expressão do operon *icaADBC* [61]. O mesmo resultado foi encontrado neste estudo, no qual isolados provenientes do SeTI e da UTI neonatal, tiveram a produção de biofilme significativamente favorecida por condições hiperosmóticas. Esse fato pode ser explicado pela utilização frequente de nutrição parental total (NPT) em ambientes como a UTI neonatal, que deve ser a principal fonte de hiperosmolaridade [61].

A formação do biofilme estafilocócico é mediado por incontáveis fatores regulatórios, que frequentemente são influenciados pelo meio externo. O meio TSB suplementado com glicose é comumente usado na investigação e quantificação da produção de biofilme, uma vez que reprime o sistema quórum sensing *agr*, devido à excreção de ácidos graxos de cadeia curta

que resultam do metabolismo da glicose, que reduz o pH do meio circundante, reprimindo a produção de proteases extracelulares que, por fim, promove a formação do biofilme [62]. Já condições hiperosmóticas parecem ativar a expressão do operon *icaADBC* em *S. capitis*, resultando na produção de PIA [62,63]. No entanto, no presente trabalho, a concentração elevada de NaCl favoreceu a produção de biofilme em isolados desprovidos de genes do operon *ica*, sugerindo a existência de mecanismos alternativos também influenciados pela hiperosmolaridade do meio.

A produção de biofilme também chamou a atenção em um clone de isolados, prevalentemente sensíveis à meticilina, o cluster J, no qual cinco (83,3%) amostras foram aderentes. Esse clone, disperso inicialmente no Pronto socorro e posteriormente no SeTI, mostrou ter grande capacidade de produção de biofilme apesar do perfil sensível, sendo isolados repetidas vezes entre 2016 e 2021. Tais resultados sugerem que a capacidade de formação de biofilme pode ter sido suficiente para favorecer a persistência desse clone no hospital.

Semelhantemente, cepas clínicas de *S. aureus* sensíveis à meticilina (MSSA), frequentemente são produtoras de biofilme, e os mecanismos genéticos por trás desse perfil têm sido investigados. Inicialmente, MSSA foi muito associada a formação de biofilmes dependentes de PIA, no entanto, a ausência de gene *ica* já foi verificada nesses isolados [64]. Um estudo do transcriptoma do biofilme formado por MSSA, sugeriu que o mecanismo de formação de biofilme pode ser diferente entre linhagens MSSA e MRSA, com cepas de MSSA formando biofilmes mais aderentes, possivelmente associados à mecanismos relacionados ao controle do sistema *agr* e outras moléculas de adesão [63,64]. Claramente, o fenótipo de produção de biofilme está diretamente relacionado à fatores regulatórios amplamente variáveis entre espécies e cepas. Não foram encontradas discussões aprofundadas sobre linhagens de *S. capitis* sensíveis com fenótipo produtor de biofilme, no entanto, diante dos resultados aqui apresentados, destacamos a relevância de estudos direcionados a esclarecer as bases genóticas e as interações por trás da regulação da formação de biofilme nessas cepas potencialmente clonais.

A detecção dos genes *hla* e *hld* foi verificada em duas amostras e, de forma conjunta, foram encontrados em apenas um isolado de *S. capitis*. Poucos estudos descrevem a presença de genes codificadores de citotoxinas em ECN, isso se deve a uma grande diversidade na identidade dos genes codificadores dessas citotoxinas entre as espécies estafilocócicas, dificultando muito a determinação genética eficiente das hemolisinas α e δ [65].

Foi verificada uma discordância entre o perfil fenotípico de resistência e a presença do gene *mecA* em quatro (2,8%) isolados de *S. capitis*, com perfil suscetível à meticilina em três MRSC,

e resistência fenotípica encontrada em um isolado MSSC. De fato, a expressão heterogênea de *mecA* por estafilococos pode desafiar o desempenho de testes fenotípicos de resistência [66]. Certamente, existem algumas explicações plausíveis para essa disparidade entre fenótipo e genótipo, como a resistência induzível, presença do gene homólogo *mecC*, presença de um gene *mecA* não funcional ou então pode estar relacionado a genes conhecidos como fatores essenciais para a resistência à meticilina (*fem*) ou fatores auxiliares [67,68]. Ademais, o gene *mecA* pode ser expresso apenas em uma subpopulação ou várias subpopulações em um fenômeno designado heteroresistência, no qual é observado um aumento dos níveis de resistência antimicrobiana em comparação com a população principal [69,70].

Como preconizado pelo CLSI, o teste fenotípico com disco de cefoxitina é preditivo para o perfil de resistência à meticilina, no entanto, alguns estudos mostram que, quando apenas os discos de cefoxitina são interpretados, cepas resistentes podem ser relatadas como suscetíveis, e essa classificação errônea pode induzir a tratamentos clínicos inadequados [71].

Ademais, a detecção de um isolado MRSC com o genótipo *mecA* negativo pode indicar uma resistência mediada por vários mecanismos bioquímicos incluindo a hiperprodução de β -lactamase, a síntese de novas β -lactamases codificadas em plasmídeos e a modificação de genes PBP [72], no entanto a explicação por trás desse fenômeno ainda é nebulosa.

A investigação do perfil genético de virulência revelou o potencial enterotoxigênico desses isolados, com frequência elevada dos genes *seg* e *sei*, envolvidos na codificação de enterotoxinas SEG e SEI, porém, sem detecção de *seb* e *tst*. O perfil *seg* & *sei* foi verificado em 38 (27,0%) isolados, sendo encontrado em todas as amostras caracterizadas com SCC*mec* tipo I. A coocorrência dos genes *seg* e *sei* remete a um elemento genético denominado cluster de genes de enterotoxinas (*egc*), abrigando os genes *seg*, *sei*, *sem*, *sen* e *seo*. Esse cluster tem sido, frequentemente, associado a surtos de intoxicação alimentar estafilocócica, além de ser encontrado em cerca de 50% das cepas de *S. aureus*[73].

Certamente, análises geoespaciais e temporais que rastreiem o perfil de virulência e resistência em cepas relevantes de *S. capitis* são de extrema importância para respaldar a compreensão mais profunda sobre as dinâmicas que têm favorecido a ascensão desse patógeno.

Existem algumas limitações em nosso estudo. Não tivemos acesso ao desfecho clínico dos pacientes e não houve diferenciação entre amostras contaminantes e clinicamente relevantes. Além disso a análise de relação clonal por PFGE não pôde ser aplicada a todos os isolados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Declaração de ética

Este estudo foi realizado com a aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP (Certificado de Apresentação de Apreciação Ética nº 24139819.8.0000.5411). As informações dos pacientes foram anonimizadas, apenas os dados microbiológicos foram analisados. Portanto, o comitê de ética local autorizou dispensa do termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.2. Coleção de amostras

As cepas bacterianas avaliadas por este estudo são provenientes de hemoculturas coletadas de pacientes diferentes internados no Hospital das Clínicas de Botucatu, obtidas diretamente da coleção de culturas do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas do Instituto de Biociências da UNESP, na qual essas linhagens foram armazenadas após identificação prévia na rotina laboratorial, a nível de espécie, a partir de métodos automatizados. Nenhum dos isolados aqui analisados foram incluídos em estudos anteriores. A partir de um levantamento do número total de isolados disponíveis pré-identificados como *S. capitis*, as amostras foram selecionadas, aleatoriamente, de modo a atingir um número mínimo de cepas, definido pelo cálculo amostral com uma margem de erro de 10%, conforme a fórmula a seguir:

$$n = \left(\frac{z_{\alpha/2} \sqrt{p(1-p)}}{\varepsilon} \right)^2 = \left(\frac{1,96 \sqrt{p(1-p)}}{\varepsilon} \right)^2$$

Em que p é a incidência em cada espécie e ε é a margem de erro adotada

As amostras foram selecionadas seguindo critério de inclusão referente à coleta da hemocultura, realizada nos seguintes períodos: entre janeiro de 2009 a dezembro de 2019 e entre junho e dezembro de 2021.

4.3. Isolamento e identificação de *S. capitis*

Cada isolado selecionado foi confirmado a nível de espécie através de uma pré-triagem com provas de catalase e coagulase em tubo. Posteriormente, foi realizada a extração de DNA das amostras pelo Kit Illustra™ (GE healthcare) seguindo as recomendações dos fabricantes. Todas as amostras de DNA extraídas foram armazenadas a -20 °C até serem necessárias para experimentação.

Os isolados foram submetidos à identificação genotípica usando primers específicos descritos na Tabela 6, pela técnica de Polymerase Chain Reaction (PCR) descrita por Hirota et

al, 2011 [74]. A incubação foi realizada em termocicladores GenePro e LifePro. A linhagem de referência internacional ATCC 49325 (*S. capitis*) foi utilizada como controle positivo na validação das reações de amplificação.

4.4. Teste fenotípico de susceptibilidade antimicrobiana

O método de disco difusão foi aplicado para verificação da suscetibilidade antimicrobiana, usando ágar Mueller-Hinton, conforme padrões de desempenho do Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) [75]. Os inóculos tiveram turbidez ajustada de acordo com a escala 0,5 de McFarland. A suscetibilidade foi avaliada para os seguintes quatro antimicrobianos: antibióticos beta-lactâmicos incluindo cefoxitina 30µg (CFO) da classe das cefamicinas e oxacilina 1 µg (OXA) da classe das penicilinas; linezolida 30 µg (LNZ), pertencente à classe das oxazolidinonas; e sulfametoxazol/trimetoprim 25 µg (SUT) pertencente às classes das sulfonamidas/diaminopirimidinas. A susceptibilidade antimicrobiana foi avaliada pelo diâmetro do halo de inibição através da interpretação preconizada pelas normas estabelecidas pelo CLSI. As cepas foram categorizadas como sensíveis (S) ou resistentes (R) às substâncias ativas testadas.

A resistência ao disco de linezolida 30 µg foi confirmada com fitas Etest® de linezolida com um gradiente de concentração correspondente a 0,016-256 µg/mL em ágar Mueller-Hinton de acordo com as diretrizes do fabricante usando inóculo padrão 0,5 de McFarland, para a determinação da concentração inibitória mínima.

Tabela 6. Oligonucleotídeos utilizados nas técnicas de PCR para identificação genotípica, detecção do gene *mecA*, caracterização do SCC*mec* e genes associados a enterotoxinas e citotoxinas

Alvo	Primer	Sequência de nucleotídeos 5'a 3'	Pb	Ref.
<i>S. capitis</i> ^a	<i>SCap</i> _F	ACTACGCCTATGATTATTGC	525	[74]
	<i>SCap</i> _R	GAGCTTCTTTACCATAGGG		
<i>mecA</i>	<i>mecA</i> _F	AAAATCGAT GGT AAAGGTTGG	533	[76]
	<i>mecA</i> _R	AGTTCTGCAGTACCGGATTTG		
<i>icaA</i>	<i>icaA</i> _F	TCTCTTGCAAGCAATCAA	187	[77]
	<i>icaA</i> _R	TCAGGCACTAACATCCAGCA		
<i>icaB</i>	<i>icaB</i> _F	CTGATCAAGAATTTAAATCACAAA	302	[77]
	<i>icaB</i> _R	AAAGTCCCATAAGCCTGTTT		
<i>icaC</i>	<i>icaC</i> _F	TAACCTTAGGCGCATATGTTT	400	[77]
	<i>icaC</i> _R	TTCCAGTTAGGCTGGTATTG		
<i>icaD</i>	<i>icaD</i> _F	ATGGTCAAGCCCAGACAGAG	198	[77]
	<i>icaD</i> _R	CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA		
<i>Sea</i>	<i>sea</i> _F	TTGGAAAACGGTTAAAACGAA	120	[78]
	<i>sea</i> _R	GAACCTTCCCATCAAAAACA		
<i>seb</i>	<i>seb</i> _F	TCGCATCAAACGACAAACG	478	[78]
	<i>seb</i> _R	GCAGTACTCTATAAGTGCC		
<i>sec</i>	<i>sec</i> _F	GACATAAAAAGCTAGGAATTT	257	[78]
	<i>sec</i> _R	AAATCGGATTAACATTATCC		
<i>sed</i>	<i>sed</i> _F	CTAGTTTGGTAATATCTCCT	317	[78,79]
	<i>sed</i> _R	TAATGCTATATCTTATAGGG		
<i>see</i>	<i>see</i> _F	CAAAGAAATGCTTTAAGCAATCTTAGGCCAC	482	[79]
	<i>see</i> _R	CTTACCGCCAAAGCTG		
<i>seg</i>	<i>seg</i> _F	AATTATGTGAATGCTCAACCCGATC	642	[80]
	<i>seg</i> _R	AAACTTATATGGAACAAAAGGTACTAGTTC		
<i>Seh</i>	<i>seh</i> _F	CAATCACATCATATGCGAAAGCAG	375	[80]
	<i>seh</i> _R	CATCTACCCAAACATTAGCACC		
<i>Sei</i>	<i>sei</i> _F	GGTGATTATGTAGATGCTTGGG	576	[79]
	<i>sei</i> _R	TCGGGTGTTACTTCTGTTTGC		
<i>Tst</i>	<i>tsst</i> _F	ATGGCAGCATCAGCTTGATA	350	[79]
	<i>tsst</i> _R	TTCCAATAACCACCCGTTT		
SCC <i>mec</i> I	<i>CIF2</i> _{F2}	TTCGAGTTGCTGGATGAAGAAGG	495	[23]
	<i>CIF2</i> _{R2}	ATTTACCACAAGGACTACCAGC		
SCC <i>mec</i> II	<i>KDP</i> _{F1}	AATCATCTGCCATTGGTGATGC	284	[23]
	<i>KDP</i> _{R1}	CGAATGAAGTGAAAGAAAAGTGG		
SCC <i>mec</i> I, II, IV	<i>DCS</i> _{F2}	CATCCTATGATAGCTTGGTC	342	[23]
	<i>DCS</i> _{R1}	CTAAATCATAGCCATGACCG		
SCC <i>mec</i> III	<i>RIF4</i> _{F3}	GTGATTGTTGAGATATGTGG	414	[23]
	<i>RIF4</i> _{R9}	CGCTTTATCTGTATCTATCGC		
<i>mecA</i> (<i>mA1-mA2</i>)	<i>mA1</i>	TGCTATCCACCCTCAAACAGG	286	[39]
	<i>mA2</i>	AACGTTGTAACCACCCCAAGA		
<i>ccrA1-ccrB</i> (<i>a1-βc</i>)	<i>a1</i>	AACCTATATCATCAATCAGTACGT	695	[39]
<i>ccrA2-ccrB</i> (<i>a2-βc</i>)	<i>a2</i>	TAAAGGCATCAATGCACAAAACACT	937	[39]
<i>ccrA3-ccrB</i> (<i>a3-βc</i>)	<i>a3</i>	AGCTCAAAGCAAGCAATAGAAT	1.791	[39]
	<i>βc</i>	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT		
<i>ccrA4-ccrB4</i> (<i>a4.2-β4.2</i>)	<i>a4.2</i>	GTATCAATGCACCAGAACTT	1,287	[39]
	<i>β4.2</i>	TTGCGACTCTCTTGGCGTTT		
<i>ccrC</i> (<i>γR-γF</i>)	<i>γR</i>	CCTTTATAGACTGGATTATTCAAAATAT	518	[39]
	<i>γF</i>	CGTCTATTACAAGATGTTAAGGATAAT		
<i>mecA-mecI</i> (<i>mA7-mI6</i>)	<i>mI6</i>	CATAACTTCCATTCTGCAGATG	1,963	[39]
<i>mecA-IS1272</i> (<i>mA7-IS7</i>)	<i>IS7</i>	ATGCTTAATGATAGCATCCGAATG	2,827	[39]
<i>mecA-IS431</i> (<i>mA7-IS2</i> [<i>iS-2</i>])	<i>IS2</i> (<i>iS-2</i>)	TGAGGTTATTGAGATATTTTCGATGT	804	[39]
	<i>mA7</i>	ATATACCAAACCCGACAACACTACA		[39]
<i>hla</i>	<i>hla</i> _F	CTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTG	209	[65]
	<i>hla</i> _R	CTTCCAGCCTACTTTTTTATCAGT		
<i>hld</i>	<i>hld</i> _F	ATGGCAGCAGATATCATTC	357	[81]
	<i>hld</i> _R	CGTGAGCTTGGGAGAGAC		

(^a) Identificação genotípica da espécie; (F) Primer Forward; (R) Primer Reverse; Pb – tamanho do amplicon, em pares de bases; Ref. Referências.

4.5. Detecção do gene *mecA* de resistência à meticilina

Para a detecção do gene *mecA* as amostras foram submetidas às reações de PCR, utilizando os primers apresentados na Tabela 6, e a incubação foi realizada em termocicladores GenePro e LifePro, empregando os parâmetros descritos por Murakami et al., 1991 [76], 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55,5°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Após os 40 ciclos, os tubos foram incubados a 72°C por 5 minutos antes de resfriar a 4°C. Linhagens de referência internacional foram usadas como controles positivo (*S. aureus* ATCC 33591) e negativo (*S. aureus* ATCC 25923) em todos os testes.

4.6. Classificação do Cassete Cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*)

Para a classificação do SCC*mec* as amostras foram submetidas a reações de PCR multiplex, utilizados os primers descritos na Tabela 6 para os locus específicos de cada tipo. As reações foram realizadas em termocicladores GenePro e LifePro, conforme os parâmetros descritos por Oliveira & Lencastre (2002) e Machado et al. (2007) [23,82], com desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 53°C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto. Após os 30 ciclos, os tubos foram incubados a 72°C por 4 minutos antes de resfriar a 4 °C.

Devido à grande diversidade de SCC*mec* relatada em ECN, um segundo protocolo, descrito por Kondo et al. [39] foi aplicado aos isolados não tipados pela metodologia inicial. Nesse protocolo a tipagem SCC*mec* baseou-se em um conjunto de PCRs multiplex (M-PCRs), no qual, as reações M-PCRs 1 e 2 são utilizadas para atribuição do tipo SCC*mec*. Na M-PCR 1 a amplificação se deu com uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 2 minutos, anelamento a 57°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos e uma etapa final de alongamento a 72°C por 2 minutos. A M-PCR 2 seguiu os mesmos parâmetros, exceto pela temperatura de anelamento, que foi aumentada para 60°C por 1 minuto, para evitar a geração de fragmentos de DNA não específicos.

4.7. Detecção de genes de hemolisinas e toxinas estafilocócicas

Todas as amostras foram submetidas à detecção de genes associados a produção das enterotoxinas SEA (*sea*), SEB (*seb*), SEC (*sec*), SED (*sed*), SEE (*see*), SEG (*seg*), SEH (*seh*), SEI (*sei*) e TSST (*tst*). A amplificação foi feita em termocicladores GenePro e LifePro, usando primers mencionados na Tabela 6 e seguindo parâmetros descritos por Johnson et al. (1991) [78] e Jarraud (2002) [80] com modificações propostas por Cunha et al. (2006)[83], que consistem em: um primeiro ciclo a 94 °C por quatro minutos, desnaturação a 94 °C por dois minutos,

anelamento dos primers a 55 °C e extensão a 72 °C por um minuto e trinta segundos, seguidos por um segundo ciclo de desnaturação a 94 °C por 2 minutos, anelamento a 53 °C e extensão a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos. No terceiro ciclo, a temperatura de anelamento foi reduzida para 51 °C, seguido por mais 37 ciclos com estes mesmos parâmetros. Após os 40 ciclos, os tubos foram incubados a 72 °C por 7 minutos e posteriormente resfriados a 4°C.

Todas as reações foram otimizadas utilizando linhagens de referência internacional como controles positivos incluindo *S. aureus* ATCC 13565 (*sea*), *S. aureus* ATCC 14458 (*seb*), *S. aureus* ATCC 19095 (*sec*), *S. aureus* ATCC 23235 (*sed* e *seg*), *S. aureus* ATCC 27664 (*see* e *sei*) ATCC 51811 (*seh*) e ATCC 51650 (*tst*), além de controles negativos a partir da substituição de DNA por água.

As reações de PCR para os genes das hemolisinas α e δ (*hla* e *hld*), foram realizadas de acordo com parâmetros propostos por Pinheiro (2014) [65] e Marconi et al. (2005) [81] respectivamente. Em todas as reações de amplificação de ambos os genes, a linhagem de referência *S. epidermidis* ATCC 12228, foi utilizada como controle positivo.

4.8. Detecção de genes envolvidos na formação de biofilme

As reações de PCR para amplificação dos genes *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD*, seguiram parâmetros descritos por Arciola et al. (2005) [77] com primers apresentados na Tabela 6. A incubação foi realizada em termocicladores GenePro e LifePro empregando diferentes parâmetros para cada gene. Para a detecção do gene *icaA* as amostras foram submetidas a 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento dos primers a 49°C por 45 segundos e extensão a 72°C por um minuto. Para os genes *icaB*, *icaC* e *icaD* a incubação iniciou em temperatura de 94°C por 5 minutos seguidos de 50 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos primers a 54°C por 30 segundos e extensão a 72°C por um minuto. Em todas as reações realizadas, foram utilizadas linhagens de referência internacional como controle positivo e negativo, *S. epidermidis* ATCC 35985 (produtora de biofilme) e *S. epidermidis* ATCC 12228 (não produtora de biofilme) respectivamente.

4.9. Pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em placa de poliestireno

A produção de biofilme foi avaliada em placas de poliestireno conforme técnica proposta por Christensen et al (1985) [84] e modificada por Oliveira & Cunha (2010) [85], utilizando leituras de densidade óptica do material aderente produzido pelas bactérias.

As cepas foram cultivadas em TSB (Tryptic-Soy Broth) e incubadas por 24 horas a 37°C. Posteriormente foram diluídas em proporção 1:1 em TSB com 2% de glicose e inoculadas em

placas esterilizadas de 96 poços com fundo plano (SPL – Life Sciences). Adicionalmente, os isolados de *S. capitis* provenientes de UTI (Serviço de Terapia Intensiva e UTI neonatal) também foram diluídos em TSB com 4% de NaCl e submetidos ao mesmo protocolo. Os poços foram preenchidos com 200 µl de cultura diluída, com as amostras em quadruplicata. Em todos os testes foram utilizados controles, incluindo poços com TSB estéril, uma linhagem de referência internacional produtora de biofilme (*S. epidermidis* ATCC 35984) e uma linhagem não produtora (*S. epidermidis* ATCC 12228). As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C, posteriormente, o meio foi removido e os biofilmes aderidos foram lavados quatro vezes com solução tampão fosfato salina (PBS, pH 7,2). Após secagem das placas, as mesmas foram coradas com cristal violeta a 2% por um minuto, em seguida, o excesso de corante foi retirado e duas lavagens com água destilada foram feitas. As placas secas foram submetidas a leitura de densidade óptica (DO), em comprimento de onda de 540nm, em leitor de placa de Elisa (BioTek, Powerwave XS2, Gen5 software).

A partir da DO média dos biofilmes aderidos nos poços, os isolados foram classificados em três categorias, sendo elas: Não Aderente (NA), Fraco Aderente (FRA) e Forte Aderente (FOA). Essa classificação foi definida considerando o ponto de corte estabelecido.

O ponto de corte foi definido seguindo procedimento recomendado por Christensen et al (1985) [84], valendo-se do resultado da densidade óptica de poços com TSB estéril. Desse modo o valor adotado como ponto de corte para as amostras diluídas em TSB com 2% de glicose foi 0,145, e a classificação das amostras respeitou as seguintes regras: $DO \leq 0,145$ para amostras NA; $DO > 0,145$ ou $\leq 0,290$ (dobro do ponto de corte) para amostras FRA; $DO > 0,290$ para amostras FOA. Para as amostras diluídas em TSB com 4% de NaCl o ponto de corte foi 0,127 e a classificação das amostras respeitou as seguintes regras: $DO \leq 0,127$ para amostras NA; $DO > 0,127$ ou $\leq 0,254$ (dobro do ponto de corte) para amostras FRA; $DO > 0,254$ para amostras FOA.

4.10. Identificação do perfil clonal por Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

Amostras foram selecionadas de acordo com o padrão de sensibilidade, através da comparação dos halos obtidos em mm pelo método de disco difusão. Essa seleção foi aleatória, de modo a selecionar isolados com diferentes padrões fenotípicos de suscetibilidade. Para tal, as amostras foram agrupadas de acordo com o padrão dos diâmetros dos halos obtidos, gerando grupos com perfis de resistência fenotípica semelhantes. Para cada um desses grupos uma amostra foi selecionada para ser submetida à análise do perfil clonal pela técnica de Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE). A tipagem foi realizada como descrito no protocolo modificado de McDougal et al., 2003 [86].

As amostras foram cultivadas em caldo BHI para o crescimento durante 24 horas. Em um microtubo, foram adicionados 150µl da amostra que foi centrifugada à 11.000 rpm por 1 minuto. Depois de desprezado o sobrenadante, foram adicionados 150µl de solução TE (10mM de Tris, 1mM EDTA [pH 8,0]). As amostras foram deixadas em banho-maria por 10 minutos à 37°C. Após agitação em vortex, foram adicionados 2,5µl de lisostafina (1mg/ml em 20mM de acetato de sódio [pH 4,5]) e 150µl de agarose *lowmelt*.

As amostras foram distribuídas nos moldes para plugues, após a solidificação foram colocadas em placa de 24 poços com 2 ml de solução EC (6mM Tris-HCl, 1M NaCl, 100mM EDTA, 0,5% Brij-58, 0,2% deoxicolato de sódio, 0,5% laurilsarcosil sódico) e, posteriormente, incubadas à 37°C por 18h. O EC foi retirado e os plugues lavados com 2 ml de TE quatro vezes à temperatura ambiente com intervalos de meia hora.

Para a restrição do DNA genômico foi utilizada a enzima *SmaI* ((FastDigest™ *SmaI*, Thermo Scientific™). A eletroforese foi executada em aparelho CHEF-DR III System (Bio Rad Laboratories, EUA) em gel de agarose a 1% preparado com TBE 0,5M (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad Laboratories, EUA) sob as seguintes condições: intervalos de tempo de pulso de 5 a 40 segundos por 21h; em rampa linear; 6V/cm; ângulo de 120°; 14°C; 0,5M TBE como tampão de corrida. Foi utilizado Lambda Ladder PFG Marker (New England BioLabs) como marcador molecular. O gel foi corado com GelRed (10.000X em água, Biotium, EUA) por 1 hora, e fotografado sob transiluminação UV.

A análise de similaridade foi realizada utilizando-se o software BioNumerics (versão 7.6; Applied Maths, Bélgica). A criação do dendrograma foi realizada pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) com tolerância da posição das bandas e a otimização ajustada para 1,25 e 1% respectivamente. O coeficiente de similaridade de Dice $\geq 80\%$ foi escolhido para determinação dos clusters.

4.11. Visualização dos produtos amplificados

A eficiência das amplificações foi confirmada por eletroforese em gel de agarose a 2%, preparado em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5M. Como padrão foi utilizado um marcador de peso molecular (Sinapse Inc) de 100 pb em cada gel. O DNA foi corado com Syber Safe e posteriormente fotografado sob transiluminação ultravioleta (Syngen Imagine, Syngen Biotech, Wrocław, Polônia).

4.12. Análise estatística

As comparações de médias para as variáveis quantitativas foram feitas utilizando teste t-Student para o caso de duas comparações ou ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Tukey para os casos de mais de duas comparações. Associações foram obtidas para variáveis categorizadas considerando faixas etárias, sexo e unidade para espécies através do teste Qui-quadrado. Comparações entre proporções para variáveis com mais de duas categorias foram feitas utilizando o teste apropriado para diferença entre proporções, análogo a Qui-quadrado.

Em todos os testes foi considerado o nível de significância de 5% com a ocorrência de um valor $p < 0,05$. Todas as análises foram feitas utilizando o programa a SAS for wincows, v.9.4. e o programa R v.4.2.1.

5. CONCLUSÃO

Amostras de *S. capitis* apresentaram tipos SCCmec múltiplos, com predominância de SCCmec III, diferentes linhagens clonais persistindo no hospital, cepas sensíveis mais produtoras de biofilme e produção de biofilme não correlacionada ao determinante genético do operon *ica*, porém influenciável por condições hiperosmóticas na UTI. Tais achados evidenciam a capacidade adaptativa desses isolados em ambientes hospitalares, podendo desempenhar papel significativo na dinâmica hospitalar expressando patogenicidade oportunista em populações vulneráveis específicas.

REFERÊNCIAS

1. Kloos, W.E.; Schleifer, K.H. Isolation and Characterization of Staphylococci from Human Skin II. Descriptions of Four New Species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus horninis*, and *Staphylococcus simulans*. *Int J Syst Bacteriol* **1975**; *25*, 62-79, doi: 10.1099/00207713-25-1-62
2. Chong, C.E.; Bengtsson, R.J.; Horsburgh, M.J. Comparative genomics of *Staphylococcus capitis* reveals species determinants. *Front. Microbiol* **2022**, *13*, 10.3389/fmicb.2022.1005949
3. Tevell, S.; Baig, S.; Hellmark, B.; Martins Simoes, P.; Wirth, T.; Butin, M.; Nilsson-Augustinsson, Å.; Söderquist, B.; Stegger, M. Presence of the Neonatal *Staphylococcus capitis* Outbreak Clone (NRCS-A) in Prosthetic Joint Infections. *Sci Rep* **2020**, *10*, 1–8, doi:10.1038/s41598-020-79225-x.

4. Flurin, L.; Greenwood-Quaintance, K.E.; Patel, R. Microbiology of Polymicrobial Prosthetic Joint Infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2019**, *94*, 255–259, doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2019.01.006.
5. Al Hennawi, H.E.T.; Mahdi, E.M.; Memish, Z.A. Native Valve *Staphylococcus capitis* Infective Endocarditis: A Mini Review. *Infection* **2020**, *48*, 3–5, doi:10.1007/s15010-019-01311-8.
6. Nalmas, S.; Bishburg, E.; Meurillio, J.; Khoobiar, S.; Cohen, M. *Staphylococcus capitis* Prosthetic Valve Endocarditis: Report of Two Rare Cases and Review of Literature. *Heart and Lung: Journal of Acute and Critical Care* **2008**, *37*, 380–384, doi:10.1016/j.hrtlng.2007.09.005.
7. Cone, L.A.; Sontz, E.M.; Wilson, J.W.; Mitruka, S.N. *Staphylococcus capitis* Endocarditis Due to a Transvenous Endocardial Pacemaker Infection: Case Report and Review of *Staphylococcus capitis* Endocarditis. *International Journal of Infectious Diseases* **2005**, *9*, 335–339, doi:10.1016/j.ijid.2004.08.004.
8. Azimi, T.; Mirzadeh, M.; Sabour, S.; Nasser, A.; Fallah, F.; Pourmand, M.R. Coagulase-Negative Staphylococci (CoNS) Meningitis: A Narrative Review of the Literature from 2000 to 2020. *New Microbes New Infect* **2020**, *37*.
9. Rasigade, J.P.; Raulin, O.; Picaud, J.C.; Tellini, C.; Bes, M.; Grando, J.; Saïd, M. Ben; Claris, O.; Etienne, J.; Tigaud, S.; et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus capitis* with Reduced Vancomycin Susceptibility Causes Late-Onset Sepsis in Intensive Care Neonates. *PLoS One* **2012**, *7*, doi:10.1371/journal.pone.0031548.
10. Cui, B.; Smooker, P.M.; Rouch, D.A.; Daley, A.J.; Deighton, M.A. Differences between Two Clinical *Staphylococcus capitis* Subspecies as Revealed by Biofilm, Antibiotic Resistance, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis Profiling. *J Clin Microbiol* **2013**, *51*, 9–14, doi:10.1128/JCM.05124-11.
11. Carter, G.P.; Ussher, J.E.; Da Silva, A.G.; Baines, S.L.; Heffernan, H.; Riley, T. V.; Broadbent, R.; Van Der Linden, A.; Lee, J.; Monk, I.R.; et al. Genomic Analysis of Multiresistant *Staphylococcus capitis* Associated with Neonatal Sepsis. *Antimicrob Agents Chemother* **2018**, *62*, 1–10, doi:10.1128/AAC.00898-18.
12. Wirth, T.; Bergot, M.; Rasigade, J.P.; Pichon, B.; Barbier, M.; Martins-Simoes, P.; Jacob, L.; Pike, R.; Tissieres, P.; Picaud, J.C.; et al. Niche Specialization and Spread of *Staphylococcus capitis* Involved in Neonatal Sepsis. *Nat Microbiol* **2020**, *5*, 735–745, doi:10.1038/s41564-020-0676-2.
13. Laurent, F.; Butin, M. *Staphylococcus capitis* and NRCS-A Clone: The Story of an Unrecognized Pathogen in Neonatal Intensive Care Units. *Clinical Microbiology and Infection* **2019**, *25*, 1081–1085, doi:10.1016/j.cmi.2019.03.009.
14. Butin, M.; Rasigade, J.; Meugnier, H.; Lemriss, H.; Goering, R. V; Kearns, A.; Deighton, M.A. Wide Geographical Dissemination of the Multiresistant *Staphylococcus capitis* NRCS-A Clone in Neonatal Intensive-Care Units. *Clinical Microbiology and Infection* **2016**, *22*, 46–52, doi:10.1016/j.cmi.2015.09.008.

15. Chavignon, M.; Reboux, M.; Tasse, J.; Tristan, A.; Claris, O.; Laurent, F.; Butin, M. Persistent Microbial Contamination of Incubators despite Disinfection. *Pediatr Res* **2021**, *90*, 1215–1220, doi:10.1038/s41390-021-01407-8.
16. Cameron, D.R.; Jiang, J.H.; Hassan, K.A.; Elbourne, L.D.H.; Tuck, K.L.; Paulsen, I.T.; Peleg, A.Y. Insights on Virulence from the Complete Genome of *Staphylococcus capitis*. *Front Microbiol* **2015**, *6*, doi:10.3389/fmicb.2015.00980.
17. Ma, X.X.; Wang, E.H.; Liu, Y.; Luo, E.J. Antibiotic Susceptibility of Coagulase-Negative staphylococci (CoNS): Emergence of Teicoplaninnon-Susceptible CoNS Strains with Inducible Resistance to Vancomycin. *J Med Microbiol* **2011**, *60*, 1661–1668, doi:10.1099/jmm.0.034066-0.
18. Uehara, Y. Current Status of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*). *Antibiotics* **2022**, *11*, 1–12, doi:10.3390/antibiotics11010086.
19. Zong, Z.; Peng, C.; Lü, X. Diversity of SCC*mec* Elements in Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci Clinical Isolates. *PLoS One* **2011**, *6*, 1–6, doi:10.1371/journal.pone.0020191.
20. Lakhundi, S.; Zhang, K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. **2018**, *32*.
21. Szczuka, E.; Krzysińska, S.; Bogucka, N.; Kaznowski, A. Multifactorial Mechanisms of the Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus hominis* Isolated from Bloodstream Infections. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* **2018**, *111*, 1259–1265, doi:10.1007/s10482-017-1007-3.
22. Chen, X.P.; Li, W.G.; Zheng, H.; Du, H.Y.; Zhang, L.; Zhang, L.; Che, J.; Wu, Y.; Liu, S.M.; Lu, J.X. Extreme Diversity and Multiple SCC*mec* Elements in Coagulase-Negative *Staphylococcus* Found in the Clinic and Community in Beijing, China. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* **2017**, *16*, 1–11, doi:10.1186/s12941-017-0231-z.
23. Machado, A.B.M.P.; Reiter, K.C.; Paiva, R.M.; Barth, A.L. 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, doi:10.1099/jmm.0.47294-0.
24. Becker, K.; Heilmann, C.; Peters, G. Coagulase-Negative Staphylococci. **2014**, *27*, 870–926, doi:10.1128/CMR.00109-13.
25. Simões, P.M.; Lemriss, H.; Dumont, Y.; Lemriss, S.; Rasigade, J.P.; Assant-Trouillet, S.; Ibrahimi, A.; El Kabbaj, S.; Butin, M.; Laurent, F. Single-Molecule Sequencing (PacBio) of the *Staphylococcus capitis* NRCS-A Clone Reveals the Basis of Multidrug Resistance and Adaptation to the Neonatal Intensive Care Unit Environment. *Front Microbiol* **2016**, *7*, doi:10.3389/FMICB.2016.01991/FULL.

26. Suja, K.R.S.; Sheela, P.; Jyothis, S.; Radhakrishnan, E.K. Virulence Factors Associated with Coagulase Negative Staphylococci Isolated from Human Infections. *3 Biotech* **2017**, *7*, 1–10, doi:10.1007/s13205-017-0753-2.
27. Greco-Stewart, V.S.; Ali, H.; Kumaran, D.; Kalab, M.; Rood, I.G.H.; de Korte, D.; Ramírez-Arcos, S. Biofilm Formation by Staphylococcus Capitis Strains Isolated from Contaminated Platelet Concentrates. *J Med Microbiol* **2013**, *62*, 1051–1059, doi:10.1099/jmm.0.050500-0.
28. Otto, M. Staphylococcal Biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* **2009**, *19*, doi: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0023-2018>.
29. França, A.; Gaio, V.; Lopes, N.; Melo, D.R. Virulence Factors in Coagulase-Negative Staphylococci. **2021**, *10*, doi:10.3390/pathogens10020170
30. Chavignon, M.; Coignet, L.; Bonhomme, M.; Bergot, M.; Tristan, A.; Verhoeven, P.; Josse, J.; Laurent, F.; Butin, M. Environmental Persistence of *Staphylococcus capitis* NRCS-A in Neonatal Intensive Care Units: Role of Biofilm Formation, Desiccation, and Disinfectant Tolerance. *Microbiol Spectr* **2022**, *10*, doi:10.1128/spectrum.04215-22.
31. Sharma, D.; Misba, L.; Khan, A.U. Antibiotics versus Biofilm: An Emerging Battleground in Microbial Communities. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* **2019** *8:1* **2019**, *8*, 1–10, doi:10.1186/S13756-019-0533-3.
32. Argemi, X.; Hansmann, Y.; Prola, K.; Pr, G. Coagulase-Negative Staphylococci Pathogenomics. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, 1–19, doi:10.3390/ijms20051215.
33. Podkowik, M.; Park, J.Y.; Seo, K.S.; Bystro, J.; Bania, J. Enterotoxigenic Potential of Coagulase-Negative Staphylococci. *Int J Food Microbiol* **2013**, *163*, 34–40, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.005.
34. Barretti, P.; Montelli, A.C.; Batalha, J.E.N.; Caramori, J.C.T.; Cunha, M.D.L.R. The Role of Virulence Factors in the Outcome of Staphylococcal Peritonitis in CAPD Patients. *BMC Infect Dis* **2009**, *9*, doi:10.1186/1471-2334-9-212.
35. Marrack, P.; Kappler, J. The Staphylococcal Enterotoxins and Their Relatives. *Science (1979)* **1990**, *248*, 705–711, doi:10.1126/SCIENCE.2185544.
36. Xu, S.X.; McCormick, J.K. Staphylococcal Superantigens in Colonization and Disease. *Front Cell Infect Microbiol* **2012**, *2*, 52, doi:10.3389/FCIMB.2012.00052/BIBTEX.
37. D’Mello, D.; Daley, A.J.; Rahman, M.S.; Qu, Y.; Garland, S.; Pearce, C.; Deighton, M.A. Vancomycin Heteroresistance in Bloodstream Isolates of *Staphylococcus capitis*. *J Clin Microbiol* **2008**, *46*, 3124–3126, doi:10.1128/JCM.00592-08.
38. Song, M.; Li, Q.; He, Y.; Lan, L.; Feng, Z.; Fan, Y.; Liu, H.; Qin, F.; Chen, D.; Yang, M. A Comprehensive Multilocus Sequence Typing Scheme for Identification and Genotyping of *Staphylococcus* Strains. *Foodborne Pathog Dis* **2019**, *16*, 331–338, doi:10.1089/fpd.2018.2565.

39. Kondo, Y.; Ito, T.; Ma, X.X.; Watanabe, S.; Kreiswirth, B.N.; 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*, 264–274, doi:10.1128/AAC.00165-06.
40. Heath, V.; Cloutman-Green, E.; Watkin, S.; Karlikowska, M.; Ready, D.; Hatcher, J.; Pearce-Smith, N.; Brown, C.; Demirjian, A. *Staphylococcus capitis*: Review of Its Role in Infections and Outbreaks. *Antibiotics* **2023**, *12*.
41. Trevisoli, L.E.; Bail, L.; Rodrigues, L.S.; Conte, D.; Palmeiro, J.K.; Dalla-Costa, L.M. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight: A Promising Alternative Method of Identifying the Major Coagulase-Negative Staphylococci Species. *Rev Soc Bras Med Trop* **2018**, *51*, 85–87, doi:10.1590/0037-8682-0026-2017.
42. Martins, K.B.; Ferreira, A.M.; Mondelli, A.L.; Rocchetti, T.T.; Lr De S Da Cunha, M. De Evaluation of MALDI-TOF VITEK®MS and VITEK® 2 System for the Identification of *Staphylococcus saprophyticus*. *Future Microbiol* **2018**, *13*, 1603–1609, doi:10.2217/fmb-2018-0195.
43. Delmas, J.; Chacornac, J.P.; Robin, F.; Giammarinaro, P.; Talon, R.; Bonnet, R. Evaluation of the Vitek 2 System with a Variety of *Staphylococcus* Species. *J Clin Microbiol* **2008**, *46*, 311–313, doi:10.1128/JCM.01610-07.
44. Watanabe, S.; Aiba, Y.; Tan, X.E.; Li, F.Y.; Boonsiri, T.; Thitiananpakorn, K.; Cui, B.; Sato’O, Y.; Kiga, K.; Sasahara, T.; et al. Complete Genome Sequencing of Three Human Clinical Isolates of *Staphylococcus caprae* Reveals Virulence Factors Similar to Those of *S. epidermidis* and *S. capitis*. *BMC Genomics* **2018**, *19*, doi:10.1186/s12864-018-5185-9.
45. Pereira, V.C.; Romero, L.C.; Pinheiro-Hubinger, L.; Oliveira, A.; Martins, K.B.; Cunha, M.L.R.S. Coagulase-Negative Staphylococci: A 20-Year Study on the Antimicrobial Resistance Profile of Blood Culture Isolates from a Teaching Hospital. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* **2020**, *24*, 160–169, doi:10.1016/J.BJID.2020.01.003.
46. Cui, J.; Liang, Z.; Mo, Z.; Zhang, J. The Species Distribution, Antimicrobial Resistance and Risk Factors for Poor Outcome of Coagulase-Negative Staphylococci Bacteraemia in China. *Antimicrob Resist Infect Control* **2019**, *8*, doi:10.1186/s13756-019-0523-5.
47. Hirose, M.; Aung, M.S.; Fujita, Y.; Kato, T.; Hirose, Y.; Yahata, S.; Fukuda, A.; Saitoh, M.; Urushibara, N.; Kobayashi, N. Genetic Characterization of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus argenteus*, and Coagulase-Negative Staphylococci Colonizing Oral Cavity and Hand of Healthy Adults in Northern Japan. *Pathogens* **2022**, *11*, doi:10.3390/pathogens11080849.
48. Xu, Z.; Shah, H.N.; Misra, R.; Chen, J.; Zhang, W.; Liu, Y.; Cutler, R.R.; Mkrtychyan, H. V. The Prevalence, Antibiotic Resistance and *mecA* Characterization of Coagulase Negative Staphylococci Recovered from Non-Healthcare Settings in London, UK. *Antimicrob Resist Infect Control* **2018**, *7*, doi:10.1186/s13756-018-0367-4.

49. Butin, M.; Dumont, Y.; Monteix, A.; Raphard, A.; Roques, C.; Martins Simoes, P.; Picaud, J.C.; Laurent, F. Sources and Reservoirs of *Staphylococcus capitis* NRCS-A inside a NICU. *Antimicrob Resist Infect Control* **2019**, *8*, doi:10.1186/s13756-019-0616-1.
50. Montazeri, E.A.; Seyed-Mohammadi, S.; Dezfuli, A.A.; Khosravi, A.D.; Dastoorpoor, M.; Roointan, M.; Saki, M. Investigation of SCCmec Types I–IV in Clinical Isolates of Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci in Ahvaz, Southwest Iran. *Biosci Rep* **2020**, *40*, 1–9, doi:10.1042/BSR20200847.
51. Mendoza-Olazarán, S.; Morfin-Otero, R.; Villarreal-Trevino, L.; Rodriguez-Noriega, E.; Llaca-Diaz, J.; Camacho-Ortiz, A.; González, G.M.; Casillas-Vega, N.; Garza-González, E. Antibiotic Susceptibility of Biofilm Cells and Molecular Characterisation of *Staphylococcus hominis* Isolates from Blood. *PLoS One* **2015**, *10*, 1–13, doi:10.1371/journal.pone.0144684.
52. Al-Haqan, A.; Boswihi, S.S.; Pathan, S.; Udo, E.E. Antimicrobial Resistance and Virulence Determinants in Coagulase-Negative Staphylococci Isolated Mainly from Preterm Neonates. *PLoS One* **2020**, *15*, e0236713, doi:10.1371/journal.pone.0236713.
53. Pinheiro-Hubinger, L.; Riboli, D.F.M.; Abraão, L.M.; Pereira Franchi, E.P.L.; Ribeiro de Souza da Cunha, M. de L. Coagulase-Negative Staphylococci Clones Are Widely Distributed in the Hospital and Community. *Pathogens* **2021**, *10*, 1–18, doi:10.3390/pathogens10070792.
54. Urushibara, N.; Aung, M.S.; Kawaguchiya, M.; Kobayashi, N. Novel Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCCmec) Type XIV (5A) and a Truncated SCCmec Element in SCC Composite Islands Carrying SpeG in ST5 MRSA in Japan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2020**, *75*, 46–50, doi:10.1093/jac/dkz406.
55. Ito, T.; Ma, X.X.; 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*, 2637–2651, doi:10.1128/AAC.48.7.2637-2651.2004.
56. Lim, Y.; Shin, H.J.; Kwon, A.S.; Reu, J.H.; Park, G.; Kim, J. Predictive Genetic Risk Markers for Strong Biofilm-Forming *Staphylococcus aureus*: FnbB Gene and SCCmec Type III. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2013**, *76*, 539–541, doi:10.1016/j.diagmicrobio.2013.04.021.
57. Da Fonseca Batista, D.W.; de Campos, P.A.; Camilo, N.C.; Royer, S.; Araújo, B.F.; Naves, K.S.C.; Martins, M.; Pereira, M.O.; Henriques, M.; Gontijo-Filho, P.P.; et al. Biofilm Formation of Brazilian Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains: Prevalence of Biofilm Determinants and Clonal Profiles. *J Med Microbiol* **2016**, *65*, 286–297, doi:10.1099/jmm.0.000228.
58. Silva, V.; Correia, E.; Pereira, J.E.; González-Machado, C.; Capita, R.; Alonso-Calleja, C.; Igrejas, G.; Poeta, P. Exploring the Biofilm Formation Capacity in S.

- Pseudintermedius and Coagulase-Negative Staphylococci Species. *Pathogens* **2022**, *11*, doi:10.3390/pathogens11060689.
59. Becker, K.; Both, A.; Weißelberg, S.; Heilmann, C.; Rohde, H. Emergence of Coagulase-Negative Staphylococci. *Expert review of anti-infective therapy* **2020**, *18*, 349–366, doi:10.1080/14787210.2020.1730813.
 60. Becker, K.; Both, A.; Weißelberg, S.; Heilmann, C.; Rohde, H. Emergence of Coagulase-Negative Staphylococci. *Expert review of anti-infective therapy* **2020**, *18*, 349–366, doi:10.1080/14787210.2020.1730813.
 78. Manandhar, S.; Singh, A.; Varma, A.; Pandey, S.; Shrivastava, N. Evaluation of Methods to Detect in Vitro Biofilm Formation by Staphylococcal Clinical Isolates. *BMC Res Notes* **2018**, *11*, doi:10.1186/s13104-018-3820-9.
 61. Qu, Y.; Li, Y.; Cameron, D.R.; Easton, C.D.; Zhu, X.; Zhu, M.; Salwiczek, M.; Muir, B.W.; Thissen, H.; Daley, A.; et al. Hyperosmotic Infusion and Oxidized Surfaces Are Essential for Biofilm Formation of *Staphylococcus capitis* From the Neonatal Intensive Care Unit. *Front Microbiol* **2020**, *11*, doi:10.3389/fmicb.2020.00920.
 62. Lade, H.; Park, J.H.; Chung, S.H.; Kim, I.H.; Kim, J.M.; Joo, H.S.; Kim, J.S. Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates Is Differentially Affected by Glucose and Sodium Chloride Supplemented Culture Media. *J Clin Med* **2019**, *8*, doi:10.3390/jcm8111853.
 63. Jones, S.U.; Chew, C.H.; Yeo, C.C.; Abdullah, F.H.; Othman, N.; Kee, B.P.; Chua, K.H.; Puah, S.M. The Phenotypes and Genotypes Associated with Biofilm Formation among Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) Isolates Collected from a Tertiary Hospital in Terengganu, Malaysia. *International Microbiology* **2023**, doi:10.1007/s10123-023-00335-3.
 64. Tan, X.; Qin, N.; Wu, C.; Sheng, J.; Yang, R.; Zheng, B.; Ma, Z.; Liu, L.; Peng, X.; Jia, A. Transcriptome Analysis of the Biofilm Formed by Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep* **2015**, *5*, doi:10.1038/srep11997.
 65. Pinheiro, L.; Brito, C.I.; de Oliveira, A.; Martins, P.Y.F.; Pereira, V.C.; da Cunha, M. de L.R. de S. *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*: Molecular Detection of Cytotoxin and Enterotoxin Genes. *Toxins (Basel)* **2015**, *7*, 3688–3699, doi:10.3390/toxins7093688.
 66. Yang, C.; Anahtar, M.N.; Pierce, V.M. It's Not You, It's SOSA: A Case Study on Breaking Up With an FDA-Cleared Susceptibility Testing System's Oxacillin Results for *Staphylococcus* spp. other than *S. aureus* and *S. lugdunensis*. *Open Forum Infect Dis* **2022**, *9*, doi:10.1093/ofid/ofac421.
 67. Andrade-Figueiredo, M.; Leal-Balbino, T.C. Clonal Diversity and Epidemiological Characteristics of *Staphylococcus aureus*: High Prevalence of Oxacillin-Susceptible *mecA*-Positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) Associated with Clinical Isolates in Brazil. *BMC Microbiol* **2016**, *16*, doi:10.1186/s12866-016-0733-4.

68. Williams, M.C.; Dominguez, S.R.; Prinzi, A.; Lee, K.; Parker, S.K. Reliability of *mecA* in Predicting Phenotypic Susceptibilities of Coagulase-Negative Staphylococci and *Staphylococcus aureus*. *Open Forum Infect Dis* **2020**, *7*, doi:10.1093/ofid/ofaa553.
69. Ferreira, A.M.; Bonesso, M.F.; Mondelli, A.L.; Camargo, C.H.; Cunha, M.D.L.R.S. Oxacillin Resistance and Antimicrobial Susceptibility Profile of *Staphylococcus saprophyticus* and Other Staphylococci Isolated from Patients with Urinary Tract Infection. *Chemotherapy* **2013**, *58*, 482–491, doi:10.1159/000346529.
70. Andersson, D.I.; Nicoloff, H.; Hjort, K. Mechanisms and Clinical Relevance of Bacterial Heteroresistance. *Nat Rev Microbiol* **2019**, *17*, 479–496.
71. Pinheiro, L.; Mello, P.L.; Abraão, L.M.; Corrente, J.E.; Cunha, M.D.L.R.S. Evaluation of Reference Values for Phenotypic Tests to Detect Oxacillin Resistance in Coagulase-Negative Staphylococci. *Future Microbiol* **2018**, *13*, 565–575, doi:10.2217/fmb-2017-0221.
72. Hryniewicz, M.M.; Garbacz, K. Borderline Oxacillin-Resistant Staphylococcus Aureus (BORSA) - a More Common Problem than Expected? *J Med Microbiol* **2017**, *66*, 1367–1373.
73. Schwendimann, L.; Merda, D.; Berger, T.; Denayer, S.; Feraudet-Tarisse, C.; Kläui, A.J.; Messio, S.; Mistou, M.Y.; Nia, Y.; Hennekinne, J.A.; et al. Staphylococcal Enterotoxin Gene Cluster: Prediction of Enterotoxin (SEG and SEI) Production and of the Source of Food Poisoning on the Basis of VSaß Typing. *Appl Environ Microbiol* **2021**, *87*, 1–15, doi:10.1128/AEM.02662-20.
74. Hirota, S.; Sasaki, T.; Kuwahara-Arai, K.; Hiramatsu, K. Rapid and Accurate Identification of Human-Associated Staphylococci by Use of Multiplex PCR. *J Clin Microbiol* **2011**, *49*, 3627, doi:10.1128/JCM.00488-11.
75. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M100: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. *CLSI supplement M100* **2019**, Ed. 29.
76. Murakami, K.; Minamide, W.; Wada, K.; Nakamura, E.; Teraoka, H.; Watanabe, S. Identification of Methicillin-Resistant Strains of Staphylococci by Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol* **1991**, *29*, 2240–2244, doi:10.1128/JCM.29.10.2240-2244.1991.
77. Arciola, C.R.; Gamberini, S.; Campoccia, D.; Visai, L.; Speziale, P.; Baldassarri, L.; Montanaro, L. A Multiplex PCR Method for the Detection of All Five Individual Genes of Ica Locus in Staphylococcus Epidermidis. A Survey on 400 Clinical Isolates from Prosthesis-Associated Infections. *J Biomed Mater Res A* **2005**, *75A*, 408–413, doi:10.1002/JBM.A.30445.
78. Johnson, W.M.; Tyler, S.D.; Ewan, E.P.; Ashton, F.E.; Pollard, D.R.; Rozee, K.R. 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, doi:10.1128/JCM.29.3.426-430.1991.

79. Jarraud, S.; Cozon, G.; Vandenesch, F.; Bes, M.; Etienne, J.; Lina, G. Involvement of Enterotoxins G and I in Staphylococcal Toxic Shock Syndrome and Staphylococcal Scarlet Fever. *J Clin Microbiol* **1999**, *37*, 2446, doi:10.1128/JCM.37.8.2446-2449.1999.
80. Jarraud, S.; Mougel, C.; Thioulouse, J.; Lina, G.; Meugnier, H.; Forey, F.; Nesme, X.; Etienne, J.; Vandenesch, F. Relationships between *Staphylococcus aureus* Genetic Background, Virulence Factors, Agr Groups (Alleles), and Human Disease. *Infect Immun* **2002**, *70*, 631–641, doi:10.1128/IAI.70.2.631-641.2002.
81. Marconi, C.; Cunha, M.L.R.S.; Araújo Jr, J.P.; Rugolo, L.M.S.S. Standardization of the PCR Technique for the Detection of Delta Toxin in *Staphylococcus* Spp. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* **2005**, *11*, 117–128, doi:10.1590/S1678-91992005000200004.
82. Oliveira, D.C.; 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*, 2155–2161, doi:10.1128/AAC.46.7.2155-2161.2002.
83. Da Cunha, M.D.L.R.D.S.; Peresi, E.; Oliveira Calsolari, R.A.; Araújo, J.P. Detection of Enterotoxins Genes in Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Foods. *Brazilian Journal of Microbiology* **2006**, *37*, 70–74, doi:10.1590/S1517-83822006000100013.
84. Christensen, G.D.; Simpson, W.A.; Younger, J.J.; Baddour, L.M.; Barrett, F.F.; Melton, D.M.; Beachey", E.H.; Christensen, G.D.; Simpson, W.A.; Beachey, E.H.; et al. Adherence of Coagulase-Negative Staphylococci to Plastic Tissue Culture Plates: A Quantitative Model for the Adherence of Staphylococci to Medical Devices. *J Clin Microbiol* **1985**, *22*, 996, doi:10.1128/JCM.22.6.996-1006.1985.
85. Oliveira, A.; Cunha, M.D.L.R.S. Comparison of Methods for the Detection of Biofilm Production in Coagulase-Negative Staphylococci. *BMC Res Notes* **2010**, *3*, 1–8, doi:10.1186/1756-0500-3-260/TABLES/2.
86. McDougal, L.K.; Steward, C.D.; Killgore, G.E.; Chaitram, J.M.; McAllister, S.K.; Tenover, F.C. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the United States: Establishing a National Database. *J Clin Microbiol* **2003**, *41*, 5113–5120, doi:10.1128/JCM.41.11.5113-5120.2003.

CONCLUSÕES

- ❖ *S. lugdunensis* foram mais frequentemente isolados da UTI neonatal, enquanto amostras de *S. hominis* foram mais correlacionadas ao setor de Pediatria. Já em relação às subespécies de *S. hominis*, *S. hominis* subsp. *hominis* foi mais recorrente em pacientes adultos e pediátricos, em contrapartida, *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* foi mais encontrado em idosos;
- ❖ Taxas elevadas de resistência à meticilina mediada pelo gene *mecA* foram encontradas em *S. hominis* e *S. capitis*, particularmente em isolados provenientes de UTIs neonatais e pediátricas. A taxa de detecção do gene *mecA* foi mais frequente em isolados de *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* do que em *S. hominis* subsp. *hominis*. Já isolados de *S. lugdunensis* se mostraram altamente suscetíveis, sem detecção do gene *mecA*;
- ❖ O fenótipo de resistência à cefoxitina e/ou oxacilina foi encontrado em amostras *mecA* negativas. Ademais, o perfil fenotípico de resistência aos discos de cefoxitina e/ou oxacilina foi inferior à taxa de detecção do gene *mecA* em ambas as espécies resistentes, com destaque para *S. hominis*, a qual apresentou mais resultados inconsistentes entre os testes fenotípicos e genotípicos de resistência, evidenciando o desempenho desigual entre os dois métodos, podendo induzir a falhas no tratamento em laboratórios clínicos que só utilizam testes fenotípicos;
- ❖ Foi evidenciada resistência a sulfametoxazol/trimetoprim apenas em *S. hominis*, majoritariamente resistentes à meticilina, sem detecção de resistência à linezolida em nenhuma das espécies;
- ❖ A detecção dos genes de hemolisinas α e δ e dos genes *seb*, *sed* e *see* associados à produção de enterotoxinas, foi verificada em poucos isolados das três espécies estudadas, enquanto o gene *tst* não foi encontrado. A prevalência do gene *sec* também foi reduzida, e os genes codificadores de fatores de virulência mais comumente encontrados foram *seg*, *seh* e *sea*, revelando o potencial enterotoxigênico desses isolados. Ademais, em *S. hominis* o perfil de genes de enterotoxinas foi predominantemente *seg* & *sea* enquanto nas demais espécies foi *seg* & *sei*;

- ❖ Isolados de *S. lugdunensis* se revelaram, frequentemente, carreadores de genes codificadores de hemolisinas e proteínas associadas ao perfil de virulência dessa espécie;
- ❖ Foi constatada baixa prevalência de detecção de um ou mais genes do operon *icaADBC*, que foi mais comumente encontrado em *S. capitis*, com predominância dos genes *icaA* e *IcaD*, isolados ou em combinação;
- ❖ A produção de biofilme foi pouco prevalente, porém mais frequente em *S. capitis* que também produziram biofilmes mais forte aderentes do que nas demais espécies, porém sem correlação com a presença de genes do operon *icaADBC*. A produção de biofilme em *S. capitis* ainda foi consideravelmente favorecida por condições hiperosmóticas, enquanto *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* foram significativamente mais produtores de biofilme do que *S. hominis* subsp. *hominis*;
- ❖ A grande maioria dos isolados de *S. lugdunensis* se mostraram clonais, agrupando em clusters diversos em termos de origem e ano de coleta, com destaque para um clone maior, persistente por seis anos, porém sem determinantes genéticos cabíveis de explicarem tal persistência, sugerindo a distribuição de linhagens geneticamente correlacionadas, devido ao genoma altamente conservado dessa espécie;
- ❖ Cepas de *S. hominis* se mostraram geneticamente mais diversas, com *SCCmec* frequentemente não tipados e variados, além de um novo tipo *SCCmec* recém descrito, indicando alta diversidade de *S. hominis* dentro do hospital;
- ❖ Amostras de *S. capitis* apresentaram perfil mais homogêneo, com predominância de *SCCmec* tipo III, tipo IV e tipo V, e evidência de diferentes clones dispersos no hospital, com linhagens persistentes por vários anos, com destaque para a UTI neonatal;
- ❖ *SCCmec* múltiplos foram detectados apenas em *S. capitis*, com o perfil *SCCmec* III & IV sendo o mais encontrado na espécie, em isolados do ano de 2021, possivelmente clonais;
- ❖ Isolados carreadores de *SCCmec* tipo III e tipo IV, separados ou em conjunto (*SCCmec* III & IV) foram, mais frequentemente, produtores de biofilme, principalmente forte aderente.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Fatores de Virulência e resistência antimicrobiana em *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis* e *Staphylococcus lugdunensis* isolados de hemocultura por um período de dez anos

Pesquisador: LETICIA CALIXTO ROMERO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 24139819.8.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Microbiologia e Imunologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.800.452

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de mestrado onde a pesquisadora e suas orientadoras pretendem avaliar o perfil de virulência, a epidemiologia molecular e a evolução de resistência a antimicrobianos em cepas de *Staphylococcus capitis*, *hominis*, e *lugdunensis* provenientes da coleção de culturas do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu, a qual por sua vez é originária de hemoculturas de pacientes do HCFMB no período de 2009 a 2018. As pesquisadoras pretendem incluir 92 isolados de *S. capitis*, 93 de *S. hominis* e todas as amostras possíveis de *S. lugdunensis*, que os autores estimam como em torno de 20. As pesquisadoras afirmam pretender incluir um total de 200 participantes na pesquisa. No entanto nenhum paciente será abordado pessoalmente. Serão usados apenas dados constantes no banco de dados de amostras do HCFMB. Critérios de inclusão: sexo masculino, idade de 18 a 40 anos, índice de massa corporal menor que 30, não ser tabagista e não apresentar enfermidades crônico-degenerativas não transmissíveis.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Caracterizar o perfil de virulência, epidemiologia molecular e a evolução de resistência à Beta-lactâmicos em *S. capitis*, *S. hominis* e *S. lugdunensis* isolados de hemoculturas

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Município: BOTUCATU

CEP: 18.618-970

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 3.800.452

de pacientes internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu no período de 2009 a 2019.

Objetivo Secundário: Fornecer uma melhor compreensão da epidemiologia e dos aspectos comportamentais dessas espécies a fim de entender melhor seu papel como patógeno oportunista de infecções da corrente sanguínea.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos são mínimos e que podem envolver a quebra de sigilo dos participantes. As pesquisadoras afirmam haver benefícios indiretos relacionados ao conhecimento produzido acerca desse grupo de bactérias.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de projeto de mestrado sob orientação de pesquisadoras do Instituto de Biociências. De acordo com o texto submetido à Plataforma Brasil a pesquisa será conduzida com financiamento próprio de R\$ 10.000,00.

O cronograma da pesquisa foi atualizado, deixando-se claro que a pesquisa apenas será iniciada após sua aprovação pelo CEP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos apresentados: folha de rosto, termo de anuência do HCFMB e da FMB e termo de biorrepositório. Os pesquisadores solicitaram dispensa de aplicação de TCLE, pois há impossibilidade de contatar os pacientes cujas amostras de sangue representam as origens das bactérias.

Recomendações:

apresentar relatório final de atividades após finalização da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise em REUNIÃO EXTRAORDINÁRIA, o Colegiado deliberou APROVADO o projeto de pesquisa apresentado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberação do Colegiado, em REUNIÃO EXTRAORDINÁRIA do Comitê de Ética em Pesquisa FMB/UNESP, realizada em 17/12/2019, o Projeto de Pesquisa encontra-se APROVADO.

O pesquisador deverá iniciar a coleta de dados após aprovação do CEP.

Após finalização da pesquisa, o pesquisador deverá apresentar relatório final de atividades.

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP **Município:** BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 3.800.452

Att CEP – FMB

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1388706.pdf	02/12/2019 13:08:46		Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	BIORREPOSITORIO.pdf	02/12/2019 13:07:16	LETICIA CALIXTO ROMERO	Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA.pdf	02/12/2019 13:05:54	LETICIA CALIXTO ROMERO	Aceito
Outros	TermoDeAnuenciaHcFMB.pdf	23/10/2019 15:48:36	LETICIA CALIXTO ROMERO	Aceito
Outros	TermoDeAnuencialInstitucional.pdf	25/09/2019 12:01:25	LETICIA CALIXTO ROMERO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DE_PESQUISA.pdf	24/09/2019 12:19:17	LETICIA CALIXTO ROMERO	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO.pdf	24/09/2019 11:51:31	LETICIA CALIXTO ROMERO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BOTUCATU, 14 de Janeiro de 2020

**Assinado por:
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
(Coordenador(a))**

Endereço: Chácara Butignolli , s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP **Município:** BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Epidemiologia molecular, suscetibilidade antimicrobiana e fatores de virulência em *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis* e *Staphylococcus lugdunensis* isolados de hemocultura por mais de uma década

Pesquisador: LETICIA CALIXTO ROMERO

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 24139819.8.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Microbiologia e Imunologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.913.912

Apresentação do Projeto:

A presente emenda tem a finalidade de notificar o CEP a ocorrência de Alterações no Protocolo de Pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

Realizar notificação de Alterações no Protocolo de Pesquisa.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

já avaliados anteriormente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A presente emenda tem a finalidade de notificar o CEP a ocorrência de Alterações no Protocolo de Pesquisa.

segundo a pesquisadora>>> "Esta emenda propõe alterações ao projeto inicial previamente aprovado pelo Comitê de Ética, de modo

a aprofundar as análises anteriormente propostas, porém mantendo os objetivos centrais e o escopo do estudo. Sugerimos a adição de novas técnicas, descritas a seguir, e um aumento do número de amostras incluídas no estudo (de 200 para 300 amostras) em decorrência da inclusão de três anos (2019,

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Município: BOTUCATU

CEP: 18.618-970

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 5.913.912

2021 e 2022)

ao delineamento do estudo.

Entre as novas técnicas propostas estão: (1) Pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em placa de poliestireno, (2) Sequenciamento genômico de algumas linhagens e (3) a detecção do gene lukD,

substituindo a pesquisa do gene pvl após apuração de estudos anteriores dentro no nosso grupo de pesquisa.

Em virtude dessas mudanças, será necessário alterar o título do projeto para que o mesmo esteja coerente com as novas modificações. Acreditamos que tais alterações possam contribuir com o alinhamento e aprimoramento do desenho do estudo, fornecendo dados mais robustos capazes de melhorar a qualidade deste Projeto de Pesquisa."

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os seguintes documentos:

Folha_de_rosto_V2.pdf

Carta_de_justificativa_de_emenda.pdf

PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_2066269_E1.pdf

Recomendações:

Não há .

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise em REUNIÃO EXTRAORDINÁRIA, o Colegiado deliberou APROVAÇÃO da EMENDA apresentada.

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberação do Colegiado, em REUNIÃO EXTRAORDINÁRIA do Comitê de Ética em Pesquisa FMB/UNESP, a EMENDA apresentada encontra-se APROVADA.

Ao final da execução da pesquisa, o Pesquisador deverá enviar o Relatório Final de Atividades, na forma de Notificação, via Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Endereço: Chácara Butignolli , s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP **Município:** BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 5.913.912

Comitê de Ética em Pesquisa FMB/UNESP

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_2066269_E1.pdf	07/02/2023 20:43:32		Aceito
Solicitação registrada pelo CEP	Carta_de_justificativa_de_emenda.pdf	07/02/2023 20:42:05	LETICIA CALIXTO ROMERO	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_V2.pdf	07/02/2023 20:03:51	LETICIA CALIXTO ROMERO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Pesquisa_V2_2023.pdf	22/01/2023 17:09:29	LETICIA CALIXTO ROMERO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biorepositorio_V2.pdf	22/01/2023 11:49:32	LETICIA CALIXTO ROMERO	Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA.pdf	02/12/2019 13:05:54	LETICIA CALIXTO ROMERO	Aceito
Outros	TermoDeAnuenciaHcFMB.pdf	23/10/2019 15:48:36	LETICIA CALIXTO ROMERO	Aceito
Outros	TermoDeAnuencialInstitucional.pdf	25/09/2019 12:01:25	LETICIA CALIXTO ROMERO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BOTUCATU, 27 de Fevereiro de 2023

Assinado por:
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
(Coordenador(a))

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br