

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Microbiologia

Programa de Pós-graduação em Microbiologia

Tese de Doutorado

Silvia Helena Sousa Pietra Pedroso

**FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE
Staphylococcus COAGULASE-NEGATIVO ISOLADOS DE PACIENTES COM
INFECÇÃO NA CORRENTE SANGUÍNEA**

Belo Horizonte

2018

Silvia Helena Sousa Pietra Pedroso

**FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE
Staphylococcus COAGULASE-NEGATIVO ISOLADOS DE PACIENTES COM
INFECÇÃO NA CORRENTE SANGUÍNEA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Microbiologia.

Orientadora: Prof. Dra. Simone Gonçalves dos Santos

Co-orientadora: Prof. Dra. Maria Rosa Quaresma Bomfim

Belo Horizonte

2018

AGRADECIMENTOS

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”.

Antoine de Saint-Exupéry

Meus sinceros agradecimentos vão para:

O meu pai Enio e minha mãe Mariângela, que sempre me apoiaram e me incentivaram nessa difícil tarefa de fazer Ciência. Obrigada por me transmitir valores e princípios fundamentais para que eu pudesse chegar até aqui.

O meu irmão Vinicius, pela paciência, companheirismo e amor.

A todos os meus familiares pela enorme torcida.

O meu noivo Sandro, pelas vindas ao ICB nos finais de semana, compreensão nos momentos de ausência, e amor.

A Tete e Rachel, por sempre acreditarem no meu potencial e me apoiarem em todos os momentos da minha vida.

A Prof Simone, pela oportunidade de realização deste trabalho, paciência, dedicação, orientação, ensinamentos, conselhos, carinho, compreensão e sua inestimável confiança. Muito obrigada!

A Prof Maria Rosa, pela co-orientação à distância.

A Cris, por toda sabedoria, ética e afeto transmitidos.

Os professores Luiz e Paula, por todo o carinho e por serem grandes exemplos de professores.

As professoras Beth e Andréia, que caminharam junto neste trabalho, desde a apresentação do projeto, e agora como membros da banca examinadora de defesa do Doutorado.

Os professores Marcelo e Cláudio pela disponibilidade em participar da banca avaliadora da minha tese.

As professoras Paula e Márcia por ter aceitado o encargo de relator e suplente da minha banca examinadora.

Os colaboradores deste trabalho: Prof. Maria Auxiliadora Roque de Carvalho, Prof. Álvaro Cantini, Kelly Cristina, Prof. Ricardo Dias, Prof. Robledo Filho, Prof. José Carlos Serufo, Prof. Enrica Pessione, Dra. Simona Cirrincione, Prof. Daniel Santos, Dra. Marliete Carvalho, Gustavo José e Prof. Gabriella Freitas.

O Sávio, por todos os ensinamentos de Biologia Molecular e Genética, e por ser esse amigo tão querido!

A Prof. Enrica Pessione e amigos do laboratório, que gentilmente me receberam na Itália e com quem aprendi muito: Lori, Chiara, Simona, Federica, Annalisa, Fabio, Giulia, Samuelle e Nicolau. Graziemille!

Os amigos brasileiros de Torino, por todo o companheirismo, amizade e momentos de diversão: Marta, Rogério, Cauane, Rafaela, Paulo, Francesca, Maryelle e Guilherme.

Os professores e funcionários do Departamento de Microbiologia, ICB/UFMG.

Os super bests Rafa, Léo, Mayra e Yasmin. O Rafa, por todo carinho, amizade e companheirismo ao longo desses seis anos de mestrado e doutorado. Sempre com uma idéia genial para meus experimentos, sempre com um ombro amigo para os dias tristes e sempre me fazendo rir com seu jeito maravilhoso de ser. O Léo, pela amizade e imensa disponibilidade em sempre me ajudar nos experimentos, me incentivando, animando e deixando essa caminhada muito mais agradável. A Mayra, minha BFF querida, pelo carinho, atenção e por estar sempre ao meu lado. A Yasmin por ser essa pessoa de alma iluminada, por toda preocupação, imensa torcida e afeto.

A Anninha, Thaysa e Nat, por sempre me apoiarem, ajudarem e me alegrarem durante todos os dias desses quatro anos de Doutorado!

A Silvinha, Kamillinha e Renata por serem minhas amigas queridas e sempre me apoiarem.

Os amigos do Moa: Amanda, Augusto, Carol, Cássia, Débora(s), Diego, Jaque, João, Marcela(s), Mari(s), Mirna, Pat(s), Pri, Samir, Renata, Kelly e André.

Os amigos do Laboratório de Micologia (Marli, Guga, Noelly, Lorena, Elu, Paulo e Lucas) que sempre me receberam de braços abertos, sorrisos e amor. Muito obrigada!!

Os amigos do LEFM: Mário, Clarice, Bárbara e Carol.

Os amigos da Veterinária: Renatinha, Felipe, Cosme e Gabi.

Os amigos do Departamento de Microbiologia por tornarem essa jornada muito mais agradável.

As queridas amigas do Dom Silvério (AC e DC).

A Raquel e Prof Raul, pelos conselhos, carinho e companheirismo.

As agências fomentadoras, por tornarem esse trabalho viável: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), e Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq-UFMG). A Capes, pela bolsa de Doutorado e Doutorado Sanduíche.

Obrigada a todos, que de alguma forma, tornaram este trabalho possível!

“Viver é negócio muito perigoso”

João Guimarães Rosa

LABORATÓRIOS ENVOLVIDOS E COLABORADORES

- **LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA ORAL E DE ANAERÓBIOS –
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA (ICB/UFMG)**

Profa. Dra. Simone Gonçalves dos Santos

Profa. Msc. Maria Auxiliadora Roque de Carvalho

Prof. Dr. Luiz de Macedo Farias

- **LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR DE PROTOZOÁRIOS
PARASITAS - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL (ICB/UFMG)**

IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS DE *Staphylococcus* coagulase-negativo pelo método de GTG₅

Msc Sávio Henrique de Cicco Sandes

Prof. Dr. Álvaro Cantini Nunes

- **LABORATÓRIO DE ENTEROTOXINAS DE ALIMENTOS (FUNDAÇÃO
EZEQUIEL DIAS)**

DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE TOXINAS PELAS AMOSTRAS ISOLADAS

Msc. Kelly Cristina Magalhães Luiz

Prof. Dr. Ricardo Souza Dias

- **DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS (UFV-CAMPUS
FLORESTAL)**

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Prof. Dr. Robledo de Almeida Torres Filho

- **DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA E BIOLOGIA (CENTRO
UNIVERSITÁRIO DO MARANHÃO)**

Prof. Dra. Maria Rosa de Quaresma Bonfim

- **DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA-FACULDADE DE MEDICINA DA
UFMG**

ISOLAMENTO DAS AMOSTRAS NOS HOSPITAIS DE BELO HORIZONTE

Prof. Dr. José Carlos Serufo

- **LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA MICROBIANA E PROTEÔMICA – UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO – (TORINO/ITÁLIA)**

ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DE LINHAGEM DE *Staphylococcus epidermidis* COM PERFIL DE RESISTÊNCIA INTERMEDIÁRIA À VANCOMICINA – Experimento em andamento.

Prof. Dra. Enrica Pessione

Dra. Simona Cirrincione

- **LABORATÓRIO DE MICOLOGIA – DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA (ICB/UFMG)**

ESTUDO DA ARTRITE INDUZIDA POR *Staphylococcus epidermidis* RESISTENTE À METICILINA

Prof. Dr. Daniel de Assis Santos

Dra. Marliete Carvalho

Dr. Rafael Wesley Bastos

Gustavo José Costa de Freitas

- **UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA – CAMPUS GOVERNADOR VALADARES**

ANÁLISE DE POTENCIAL ZETA DAS AMOSTRAS ISOLADAS

Prof. Dra. Gabriella Freitas

RESUMO

O grupo dos *Staphylococcus* coagulase-negativo (SCN) tem emergido como um dos principais micro-organismos causadores de infecções nosocomiais da corrente sanguínea. No entanto, trabalhos que investigam as características que permeiam a patogênese/resistência dos SCN são limitados. Dessa forma, o presente estudo visou contribuir para a definição dos atributos genotípicos e fenotípicos de SCN isolados de amostras clínicas de cinco diferentes hospitais de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, a fim de se compreender melhor os patógenos circulantes na cidade. Para tanto, as amostras foram identificadas fenotipicamente utilizando o sistema comercial de identificação GP 21342 TEST KIT VITEK II e genotipicamente pela técnica de rep-PCR (GTG)₅. A susceptibilidade a antimicrobianos foi avaliada por meio do Cartão AST-P5085 de acordo com recomendações do fabricante. Foi verificada a capacidade hemolítica das amostras por meio do esgotamento em ágar sangue e avaliação da formação de biofilme em ágar vermelho congo (AVG) e placas de poliestireno. A produção de toxinas também foi pesquisada pelo método *Optimum Sensitive Plate* (OSP) e pelo sistema VIDAS®(bioMérieux). Em relação à caracterização genotípica, foram realizadas Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção de genes de resistência: *mecA*, *blaZ*, *vanA*, *ermA*, *ermB*, *ermC* e *aac-aphD*; como também para genes de virulência: *atlE*, *icaA*, *icaB*, *icaC*, *sea*, *sec*, *sed*, *tsst-1*; do locus *agr* - relacionado ao *quorum-sensing*- e determinação do tipo de cassete *SCCmec*. Ademais, foram realizadas análises hierárquicas, qui-quadrado e análise de correspondência a fim de se estabelecer perfis similares das linhagens. Cinquenta e nove amostras foram avaliadas, sendo que as mais frequentes foram *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* e *S. hominis*. Todas as linhagens foram tipificáveis usando o iniciador (GTG)₅ e os produtos de PCR variaram de 250 a 5000 pb. A maioria das amostras apresentou perfil de impressão digital próximo. No entanto, variabilidade na presença de algumas bandas influenciou a análise final do agrupamento e vários clusters foram formados nas mesmas espécies. Com relação à resistência a antimicrobianos, 86,4% das amostras foram multirresistentes, sendo que a frequência de resistência foi maior para os fármacos benzilpenicilina, oxacilina, ciprofloxacina, norfloxacina, eritromicina e clindamicina. Os genes relacionados à resistência a antimicrobianos mais frequentes foram *blaZ* (78%) e *ermB* (100%) e o tipo de cassete *SCCmec* IIIB. Em referência à virulência, a maioria das amostras não apresentou padrão de hemólise, no entanto, todas

foram capazes de formar biofilme em AVG ou em poliestireno, sendo que os genes mais frequentes foram *atlE* (49%) e *icaB* (39%). A maior parte das amostras não produziu toxinas, mas foram frequentes para os genes *sea* (76,2%) e *tsst-1* (30,5%). Com relação ao locus *agr*, 39% das amostras foram positivas. Nas análises estatísticas, foram estabelecidos seis grupos distintos, sendo que quase todas as características apresentaram diferenças com relação à frequência de distribuição: apenas *icaC* ($\chi^2 = 3.88$; $P = 0.57$) *sed* ($\chi^2 = 3.98$; $P = 0.55$), biofilme no tempo de 48h ($\chi^2 = 16.30$; $P = 0.36$) e *ermA* ($\chi^2 = 7.96$; $P = 0.16$) não diferiram. Nesta análise em grupo, pôde-se observar relação entre o gene *icaB* e o grau forte de formação de biofilme, e com relação às características de resistência, os fatores discriminatórios que se destacaram foram: resistência à linezolida, vancomicina, teicoplanina, trimetropim/sulfametoxazol, moxifloxacina; sensibilidade à oxacilina e tipo *SCCmec* IIIB. Em conclusão, as amostras isoladas dos pacientes na cidade de Belo Horizonte contam com um arsenal expressivo de fatores de virulência/resistência, e dessa forma, mais estudos devem ser realizados a fim de se compreender melhor os mecanismos pelos quais os SCN têm sucesso em colonizar e persistir no hospedeiro a fim de se combater este perigoso grupo de micro-organismos.

Palavras-chave: *Staphylococcus* coagulase-negativo, infecções da corrente sanguínea, fatores de virulência e resistência.

ABSTRACT

Staphylococcus coagulase-negative (SCN) has emerged as major causative microorganisms of nosocomial bloodstream infections. However, studies that investigate the characteristics that underlie their pathogenesis/resistance are limited. Thus, this work aimed to contribute to the definition of genotypic and phenotypic attributes of SCN isolated from clinical samples of five different hospitals in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Therefore, the samples were phenotypically identified using GP 21342 TEST KIT VITEK II and genotypically by rep-PCR (GTG)₅. The sensitivity to antimicrobial agents was evaluated using the card AST-P5085 according to manufacturer's recommendations (bioMérieuxVitek®). The hemolytic capacity of samples was evaluated through depletion in blood agar and biofilm formation, through congo red agar (CRA) and polystyrene plates. The toxin production was also assessed by the method OSP (optimum sensitive plate) and by VIDAS ® kit (bioMérieux). In relation to genotypic characterization, PCRs were performed for the detection of resistance genes (*mecA*, *blaZ*, *vanA*, *ermA*, *ermB*, *ermC* and *aac-aphD*); of virulence genes (*atlE*, *icaA*, *icaB*, *icaC*, *sea*, *sec*, *sed*, *tsst-1*) of the *agr* locus - related to quorum-sensing- and of the type of *SCCmec* cassette. Furthermore, hierarchical analyzes, chi-square test and correspondence analysis were performed in order to establish similar profiles of the strains. 59 samples were isolated, and the most prevalent were *S. haemolyticus*, *S. hominis* and *S. epidermidis*. All lineages were typable using the primer (GTG)₅ and the PCR products ranged from 250 to 5000 bp. Most of the specimens had a close fingerprint profile. However, variability in the presence of some bands influenced the final cluster analysis and several clusters were formed in the same species. With regard to antimicrobial resistance, 86.4% of samples were multidrug resistant, and resistance frequency was higher for drugs: benzylpenicillin, oxacillin, ciprofloxacin, norfloxacin, erythromycin and clindamycin. The genes, also related to resistance, most prevalent were *blaZ* (78%), *ermB* (100%) and the type of *SCCmec* cassette IIIB. Regarding to virulence, most of the samples showed no pattern of hemolysis; however all strains were able to form biofilms in CRA or polystyrene plates, and the most frequent genes were *atlE* (49%) and *icaB* (39%). Most of the samples did not produce toxins, but were prevalent for *sea* genes (76.2%) and *tsst-1* (30.5%). Regarding the *agr* locus, 39% of the samples were positive. Six distinct groups were established and almost all the features presented differences in the frequency distribution: only *icaC* (χ^2

= 3.88; $P = 0.57$) *sed* ($\chi^2 = 3.98$; $P = 0.55$), *film48h* ($\chi^2 = 16.30$; $P = 0.36$) and *ermA* ($\chi^2 = 7.96$; $P = 0.16$) did not differ. In this group analysis, it was observed relationship between *icaB* gene and the strong degree of biofilm formation, and in relation to resistance characteristics, the most discriminatory factors were: resistance to linezolid, vancomycin, teicoplanin, trimethoprim/sulfamethoxazole, moxifloxacin; sensitivity to oxacillin and *SCCmec* type IIIB. In conclusion, the isolated samples in the city of Belo Horizonte have a significant arsenal of virulence/resistance factors, and so, more studies should be conducted to better understand the mechanisms by which the SCN succeed in colonizing and persist in host in order to combat this group of dangerous microorganisms.

Key-words: *Staphylococcus* coagulase-negative, nosocomial infections, virulence factors, resistance factors.

15

20

25

30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- μm – Micrômetros
 DNA – Ácido Desoxirribonucléico
 5 DO – Densidade Óptica
 FHE – Hospital João XXIII
 HC – Hospital das Clínicas
 IL-1 – Interleucina 1
 IL-2 – Interleucina 2
 10 MHCII – Complexo de histocompatibilidade de classe II
 MRSA - *S. aureus* resistentes a meticilina
 MRSCN – *Staphylococcus* coagulase-negativos resistentes à meticilina
 MSCRAMM - *Microbial surface componentes recognising adhesive matrix molecules*
 OB – Hospital Odilon Behrens
 15 OSP - *Optimum sensitive plate*
 PGA - Poliglutamato
 PGE2 - Prostaglandinas
 PIA - *Polysaccharide intercellular adhesion*
 RNA – Ácido ribonucléico
 20 S – Hospital Semper
 SC – Hospital Santa Casa
 SCP - *Staphylococcus* coagulase-positivos
 SCN - *Staphylococcus* coagulase-negativos
 SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
 25 TNF- α – Fator Tumoral de Necrose α
 UTIs - Unidades de Terapia Intensiva
 VRE – *Enterococcus* resistente à vancomicina

LISTA DE FIGURAS

	Figura 1: Hipóteses para quais seriam as fontes de SCN visualizados em infecções da corrente sanguínea.....	23
5	Figura 2: Terceira forma de septicemia causada por SCN.....	23
	Figura 3: Esquema de formação de um biofilme de SCN em um cateter.....	26
	Figura 4: Esquema da composição dos tipos de cassette dentro da família <i>SCCmec</i>	32
	Figura 5: Escala de coloração para interpretação do teste CRA.....	42
10	Figura 6: Identificação fenotípica automatizada das amostras isoladas de pacientes com infecção da corrente sanguínea.....	50
	Figura 7: Análise da frequência absoluta das espécies isoladas de cada hospital analisado.....	51
	Figura 8: Filotipagem das amostras isoladas no estudo.....	52
	Figura 9: Perfil de resistência das amostras isoladas.....	54
15	Figura 10: Frequência absoluta das amostras isoladas nos diferentes hospitais com relação à capacidade hemolítica.....	56
	Figura 11: Formação de biofilme em placa CRA.....	57
	Figura 12: Avaliação da formação de biofilme em placa de poliestireno em 4h, 8h, 12h, 24h e 48h.....	58
20	Figura 13: Aderência à placa de poliestireno em cada hospital nos diferentes tempos.....	59
	Figura 14: Teste OSP.....	61
	Figura 15: Caracterização genética da resistência nas amostras isoladas.....	62
25	Figura 16: Prevalência dos genes de resistência nos diferentes hospitais analisados.....	63
	Figura 17: Caracterização genotípica das amostras com relação aos genes de virulência.....	64
	Figura 18: Prevalência dos genes de virulência (formação de biofilme) nos diferentes hospitais avaliados.....	65
30	Figura 19: Prevalência do genes de virulência (toxinas e <i>quorum-sensing</i>) nos diferentes hospitais avaliados.....	66
	Figura 20: Determinação do tipo de cassette <i>SCCmec</i>	66
	Figura 21: Determinação do tipo de cassette <i>SCCmec</i> nos diferentes hospitais avaliados.....	67

Figura 22: Mapa Perceptual gerado a partir das características de virulência das amostras.....70

Figura 23: Mapa Perceptual gerado a partir das características de resistência a antimicrobianos das amostras.....74

5

10

15

20

25

SUMÁRIO

	1.0.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
	1.1.Aspectos taxonômicos e características gerais do gênero <i>Staphylococcus</i>	18
5	1.2.Estafilococos coagulase-negativo.....	20
	1.3.Patogenicidade do grupo SCN.....	25
	1.4.Resistência a antimicrobianos em SCN.....	30
	1.5.Conceituação entre septicemia, bacteremia e sepse.....	35
	2.0.JUSTIFICATIVA.....	37
10	3.0.OBJETIVOS.....	38
	3.1.Objetivo geral.....	38
	3.2.Objetivos específicos.....	38
	4.0.MATERIAL E MÉTODOS.....	39
	4.1.Amostras bacterianas.....	39
15	4.2.Características dos hospitais.....	39
	4.3.Critérios de inclusão.....	39
	4.4.Aspectos éticos da pesquisa.....	40
	4.5.Identificação fenotípica automatizada das amostras.....	40
20	4.6.Determinação das linhagens pelo método de PCR baseada em sequência repetitiva (rep-PCR).....	40
	4.7.Avaliação da concentração mínima inibitória (CIM).....	41
	4.8.Avaliação da atividade hemolítica.....	41
	4.9.Avaliação da produção de biofilme.....	41
	4.10.Avaliação da produção de enterotoxinas e toxina do choque tóxico.....	43
25	4.11.Extração de DNA genômico bacteriano.....	44
	4.12. Pesquisa de marcadores de virulência e resistência das amostras de SCN.....	45

	4.12.1. Análise dos produtos amplificados por PCR.....	47
	4.13. Determinação do tipo de cassete <i>SCCmec</i>	47
	4.14. Análise hierárquica de cluster, teste do qui-quadrado e análise de correspondência.....	49
5	5.0. RESULTADOS.....	50
	5.1. Identificação fenotípica das amostras.....	50
	5.2. Determinação das linhagens isoladas pela técnica de rep-PCR.....	51
	5.3. Concentração mínima inibitória.....	53
	5.4. Atividade hemolítica.....	55
10	5.5. Produção de biofilme.....	56
	5.6. Produção de enterotoxinas e toxina do choque tóxico.....	60
	5.7. Marcadores genéticos da resistência das amostras de SCN.....	61
	5.8. Marcadores genéticos da virulência e da presença do gene <i>agr</i> das amostras de SCN.....	63
15	5.9. Determinação do tipo de cassete <i>SCCmec</i>	66
	5.10. Análise hierárquica de cluster, teste do qui-quadrado e análise de correspondência.....	67
	6.0. DISCUSSÃO.....	76
	7.0. SUMÁRIO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO.....	85
20	8.0. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	86
	9.0. PRODUÇÃO CIENTÍFICA E COLABORAÇÕES.....	87
	10.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
	11.0. ANEXO I.....	100
	12.0. ANEXO II.....	108

1.0. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Aspectos taxonômicos e características gerais do gênero *Staphylococcus*

5 Em 1883, Alexander Ogston observou, pela primeira vez, cocos agrupados recuperados de abscessos e os relacionou como causa de doenças piogênicas em seres humanos. No mesmo ano, Rosenbach sugeriu um nome para esse arranjo visualizado por Ogston: o denominou de *Staphylococcus* (origem do grego “*staphyle*” = cacho de uvas, e “*cocos*” = grão) (PARISI, 1985). Rosenbach foi o primeiro pesquisador a isolar e estudar as características laboratoriais do gênero, sugerindo seus nomes de acordo com a coloração observada das colônias - as alaranjadas foram chamadas de *Staphylococcus pyogenes aureus* e as de coloração branca, foram chamadas de *Staphylococcus pyogenes albus* (BAIRD-PARKER, 1990).

Já em 1905, Andrewes e Gordon propuseram uma classificação baseada não só na pigmentação observada, mas também na patogenicidade dessas bactérias em cobaias. Dessa forma, quatro espécies foram reconhecidas: *Staphylococcus pyogenes* (laranja ou amarelo, altamente patogênica), *Staphylococcus epidermidis albus* (branca, pouco patogênica) e outras duas espécies de coloração branca e que também não eram patogênicas. Em 1940, R. W. Fairbrother introduziu a capacidade de produzir uma enzima denominada coagulase como princípio fundamental para distinção entre as espécies de *Staphylococcus*. Dessa forma, levando-se em consideração todas as supracitadas características, os termos ‘pyococcus’ e ‘saprococos’ começaram a serem utilizados a fim de separar as espécies patogênicas das não, respectivamente (PARISI, 1985; BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014).

25 Entre 1923 e 1948, o número de espécies de *Staphylococcus* aumentou de dois para nove. No entanto, ainda não havia correta distinção entre os gêneros *Staphylococcus* e *Micrococcus*, sendo todas as novas espécies descritas inseridas no último gênero. Já na década de 50, um estudo sugeriu que a propriedade de crescimento em anaerobiose e da produção de ácido a partir de glicose era particular do gênero *Staphylococcus* e, portanto este teste foi essencial para a discriminação dos gêneros e inserção definitiva do gênero *Staphylococcus* na sétima edição do Manual Bergey de Sistemática Bacteriológica. Na mesma época duas espécies foram reconhecidas: *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (PARISI, 1985).

Na década de 70, houve um aumento progressivo no número de novas espécies reconhecidas, sendo que atualmente o gênero abriga 52 espécies e 28 subespécies (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014; EUZÈBY, 2018).

Quanto às suas características gerais, são micro-organismos que se apresentam na forma de cocos Gram-positivos, com diâmetro entre 0,5 e 1,5 μm , agrupados em cachos, podendo também apresentar-se isolados, aos pares e em cadeias curtas. São anaeróbios facultativos, não fotossintéticos, não esporulados, catalase positivos e imóveis. Apresentam metabolismo fermentativo, com produção de ácido e não de gás, e são capazes de crescer em meios contendo altas concentrações de sais (10% a 20% de cloreto de sódio) (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010). Algumas linhagens são produtoras de coagulase, enzima relacionada à virulência destes micro-organismos, uma vez que, por coagular o plasma por meio da produção de fibrina, é responsável pelo recobrimento das células bacterianas permitindo sua rápida aglutinação e resistência aos processos de opsonização e fagocitose. Somente as espécies *S. aureus*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus schleiferi coagulans* e algumas linhagens de *Staphylococcus hyicus* são produtores dessa enzima. Tal característica segmenta o gênero em dois grupos: os *Staphylococcus* coagulase-positivo (SCP) e *Staphylococcus* coagulase-negativo (SCN) (KONEMAN *et al.*, 2008; VILEFORT *et al.*, 2011).

São micro-organismos mesófilos, com temperatura de crescimento de 7°C a 48°C, sendo a ótima de 37°C, e pH na faixa de 4 a 10, com ótimo de crescimento em pH entre 6 e 7 (GARRITY; DETRICK; KENEDDY, 1969; KLOOS; BANNERMAN, 1999; BANNERMAN, 2003). São ubíquos, estando amplamente distribuídos no meio ambiente e, também, como parte da microbiota indígena da pele e das membranas mucosas dos seres humanos, sendo que algumas espécies estão relacionadas a sítios bem específicos, tais como as glândulas sebáceas (BANNERMAN, 2003; COGEM *et al.*, 2008).

O genoma estafilocócico consiste de um cromossomo circular único, de aproximadamente 2.800 mega pares de bases, com profagos, plasmídeos, transposons, sequências de inserção e outros elementos genéticos acessórios variáveis (UDO *et al.*, 1993; SHEARER *et al.*, 2011).

As colônias podem variar de cor; desde branco fosco até alaranjadas, quando crescidas em meio sólido. O pigmento carotenóide pode ser visualizado nas colônias crescidas em meios que contenham amido ou ácido graxo. Esses micro-organismos,

embora não sejam esporulados, apresentam grande versatilidade metabólica e habilidade para sobreviver em diferentes ambientes e condições, como a dessecação e toleram bem a maioria dos desinfetantes (GARRITY; DETRICK; KENEDDY, 1969; CONCEIÇÃO et al., 2016). Inclusive, em estudo publicado por McClure et al. (2018), o grupo dos
5 SCN pesquisados apresentaram mais genes relacionados à resistência a quaternário de amônio e a clorexidina do que o grupo SCP avaliado.

Geralmente, esses micro-organismos apresentam relação benéfica com seus hospedeiros, podendo causar doenças oportunistas quando da quebra da barreira cutânea, inoculação de seringas e dispositivos médicos como cateteres ou por
10 predisposição do hospedeiro (PAIVA, 2010).

Nesse sentido, os estafilococos se configuram como patógenos importantes para os seres humanos e outros animais, podendo ser isolados como agentes etiológicos de vários processos patológicos, seja infecção ou intoxicação (WANG *et al.*, 2012). Com relação aos processos infecciosos, o grupo está relacionado com manifestações clínicas
15 como pústulas, furúnculos, impetigos, processos mais extensos e graves como infecção pós-cirúrgica, osteomielite, pneumonia, endocardite, meningite etc., ou disseminadas como bacteremia e septicemia. Já com relação às intoxicações, o grupo está relacionado com celulites, intoxicação alimentar, síndrome do choque tóxico e síndrome da pele escaldada (LUZ, 2008).

20 As espécies mais comumente associadas às doenças humanas são *S. aureus* e as espécies do grupo dos estafilococos coagulase negativo (SCN): *S. epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus lugdunensis* e *Staphylococcus saprophyticus* (PAIVA, 2010).

25 **1.2. *Staphylococcus coagulase negativo***

O grupo dos SCN foi considerado saprófito ou raramente patogênico durante muitos anos. Sua importância clínica só foi reconhecida quando Smith e colaboradores, em 1958, perceberam algum potencial patogênico nesses micro-organismos: esses pesquisadores relataram o primeiro caso publicado de septicemia por *Staphylococcus*
30 coagulase negativo. Alguns anos depois, foram documentados 128 casos de endocardite e acreditava-se que estes eram causados por SCN. Naquela época, médicos e microbiologistas ainda aceitavam a hipótese de que apenas a espécie *S. aureus* era, de fato, patogênica (PIETTE; VERSCHRAEGEN, 2009).

Em 1965, Wilson e Stuart notificaram a presença dessas espécies em infecções de feridas e seis anos depois, Holt (1971), relatou um dos primeiros casos relacionados a infecções de pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) (KLOOS; BANNERMAN, 1999).

5 Durante os anos 80, foi relacionada aos SCN uma ampla gama de infecções, tais como bacteremias, endocardites, infecções de válvulas cardíacas, pio-artrites, piodermites, mediastinites, peritonites, infecções relacionadas a cateteres, a dispositivos prostéticos e muitas outras. Depois dos anos 80, com o avanço dos métodos de tipagem e epidemiologia molecular, foi possível uma avaliação mais acurada a respeito da
10 etiologia dessas infecções (HUEBNER; GOLDMANN, 1999).

Hoje, o grupo dos SCN vem emergindo como um dos principais micro-organismos causadores de infecções nosocomiais de corrente sanguínea, de cateteres vasculares e próteses, especialmente entre pacientes imunocomprometidos, como aqueles em tratamento quimioterápico, usuários de drogas, portadores de SIDA e
15 recém-nascidos em todo o mundo (BHATT et al., 2015; PAPADIMITRIOU-OLIVGERI et al., 2015; LENART-BOROŃ et al., 2016; KUMAR et al., 2018).

Entre os pacientes neutropênicos devido ao tratamento quimioterápico, os SCN se configuram como os mais frequentes causadores de sepse, sendo responsáveis por 30% a 40% dos casos (HORASAN et al., 2011). Em um estudo multicêntrico, 50,6% e
20 44,9% dos pacientes com doença maligna hematológica e tumores sólidos, respectivamente, apresentaram bacteremia por SCN (ESCANDE; HERBRECHT, 1998).

Entre os usuários de drogas ilícitas, um estudo revelou frequência de 20% das infecções ósseas e articulares envolvendo o grupo SCN (ALLISON et al., 2010). Já entre
25 os portadores de SIDA, em um estudo avaliando a média de frequências de acordo com a literatura, 7% das infecções de corrente sanguínea são devido aos SCN, sendo que a taxa de mortalidade desses pacientes seria de 10% (TARAMASSO; TATARELLI; DI BIAGIO, 2016).

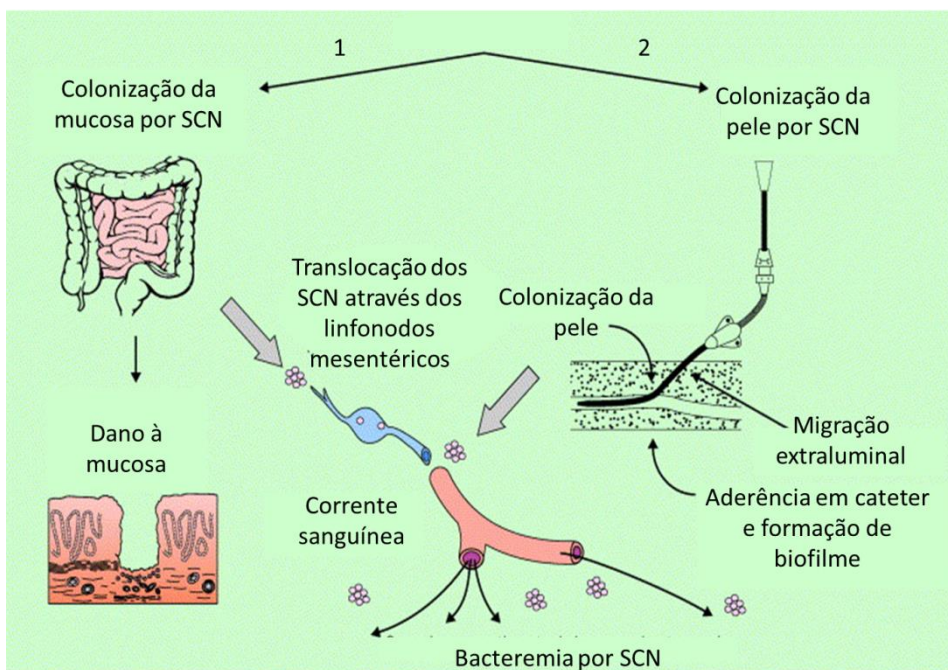
Entre os recém-nascidos a termo, os SCN se configuram como o grupo de
30 microrganismo mais abundantemente isolado (NERCELLES; UNITS, 2015; TURHAN; GÜRSOY; OVALI, 2015). Em um estudo realizado em um hospital universitário da Malásia, 1293 crianças foram admitidas em um período de vinte meses. Dessas, 113 (8,7%) apresentaram colonização por SCN e destas 113, 19 (16,8%) desenvolveram sepse, propiciando uma incidência de 1,5 por 100 admissões. Os locais mais comuns de

colonização foram: nasofaringe, tubo endotraqueal e olhos (BOO; SUHAIDA; ROHANA, 2015). Em outro trabalho realizado em um hospital norte americano, os SCN foram os micro-organismos mais comumente isolados em recém-nascidos com mais de três dias de idade, apresentando uma frequência de 31% (BIZZARRO et al., 2015). Entre os recém-nascidos pré-termo, os SCN também são a maior causa de septicemia. Aproximadamente, 16,6% de neonatos com baixo peso (< 1500g) desenvolvem um episódio de bacteremia por SCN. A infecção da corrente sanguínea impacta negativamente na recuperação do neonato e é um evento que está associado a um aumento significativo da mortalidade e morbidade, bem como aumento de internação e custos (MARCHANT *et al.*, 2013).

Em um estudo prospectivo nos hospitais dos Estados Unidos entre os anos de 1995-2002, os SCN se configuraram como os micro-organismos mais recuperados de infecções de corrente sanguínea, representando 31,3% dos casos e alcançando a taxa de mortalidade de 20,7% (WISPLINGHOFF et al., 2004). Martin *et al* (1989) atribuíram um aumento da taxa de mortalidade de 13,6% e um aumento do período de internação de 8,5 dias em pacientes com bacteremia por SCN. Recentemente, Molina *et al* (2013) desenvolveram um estudo observacional realizado entre os anos de 2007 e 2008 no Hospital Virgen del Rocío, na Espanha, e relataram que 95% das bacteremias do hospital eram devido aos SCN. Essa infecção da corrente sanguínea estava relacionada ao aumento da taxa de mortalidade dos pacientes quando adicionada a fatores do paciente (como, idade e presença de doença de base). Molina *et al* (2013) ainda relataram que a infecção da corrente sanguínea por SCN estava associada com o aumento do período de internação.

As Figuras 1 e 2 apresentam três hipóteses para quais seriam as fontes de SCN visualizados em bacteremias: (1) Como são micro-organismos da microbiota indígena de pele e superfícies mucosas, linhagens de SCN podem ser encontradas colonizando a mucosa intestinal de humanos ou outros animais. Quando ocorre injúria da mucosa devido à quimioterapia, radioterapia ou outros há um aumento da permeabilidade intestinal e dessa forma, uma translocação dos micro-organismos através dos linfonodos mesentéricos. A partir daí, atingem a corrente sanguínea. (2) Linhagens de SCN também podem ser encontradas colonizando a pele de humanos ou outros animais. Quando algum dispositivo é inserido na pele, como um cateter, pode haver uma migração dos micro-organismos da pele para o tecido e, assim, ao atingir os vasos sanguíneos, os micro-organismos atingem a corrente sanguínea. (3) A solução de uso

intravenoso utilizada em ambientes hospitalares pode estar contaminada e, assim, ocorre migração direta para o tecido sanguíneo (COSTA; MICELI ; ANAISSIE *et al.*, 2004).



- 5 **Figura 1:** Hipóteses para quais seriam as fontes de SCN visualizados em infecções da corrente sanguínea (COSTA; MICELI ; ANAISSIE *et al.*, 2004).

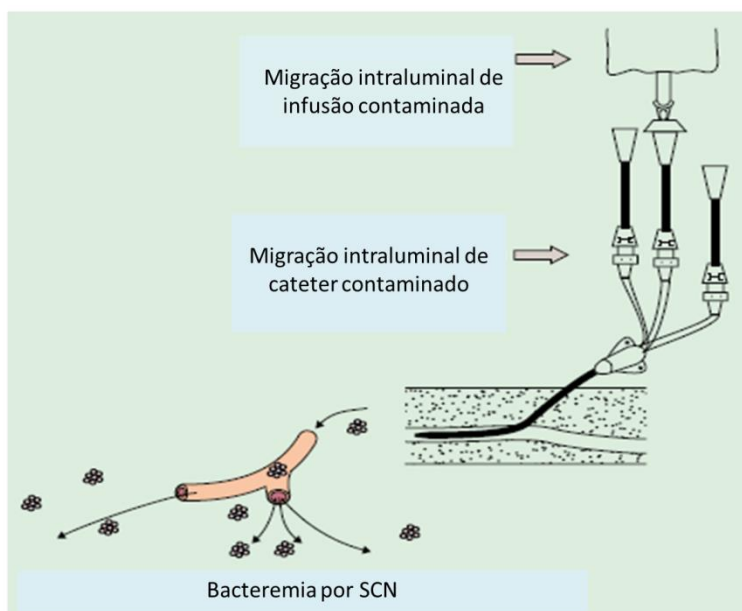


Figura 2: Terceira forma de septicemia causada por SCN (COSTA; MICELI; ANAISSIE *et al.*,

Diante do exposto, percebe-se que a maioria dos estudos investiga o grupo dos SCN como um todo e não distingue entre as diferentes espécies. Dessa forma, o impacto real de espécies menos frequentemente isoladas pode estar subestimado (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014).

5 De forma geral, a espécie mais recuperada de infecções nosocomiais é *S. epidermidis*, seguida de *S. haemolyticus*, *S. hominis* e *S. capitis* (PIETTE; VERSCHRAEGEN, 2009; MOLINA *et al.*, 2013; KUMAR *et al.*, 2018). Em um estudo realizado em um hospital da Bélgica, 44,6% dos casos de bacteremia eram devido à espécie *S. epidermidis*, superando os valores encontrados para *S. aureus*
10 (39,3%) (DODÉMONT *et al.*, 2014). Com relação às infecções em recém-nascidos (já mencionadas anteriormente), o SCN mais comumente encontrado é *S. epidermidis*. Este micro-organismo coloniza, de forma benéfica, a pele dos neonatos e impede que linhagens mais virulentas, como as de *S. aureus* se estabilizem no ambiente. No entanto, o recém-nascido, quando em cuidado intensivo, pode ser colonizado por linhagens de *S.*
15 *epidermidis* multirresistentes a antimicrobianos (KLEINSCHMIDT *et al.*, 2015).

Machado (2007) ainda relatou a existência do *óperon cap* em amostras de *S. epidermidis*. Esse óperon codifica cápsula de poliglutamato, o principal fator de virulência de *Bacillus anthracis*. Estudos recentes ainda sugerem que *S. epidermidis* seria um reservatório de genes, que após transferência horizontal facilitaria o potencial
20 de *S. aureus* em colonizar, sobreviver durante a infecção ou resistir ao tratamento antibacteriano. Tais características são bem observadas nas linhagens de *S. aureus* resistentes à metilina (MRSA), que por sua vez é uma notável adversidade observada no tratamento de pacientes em hospitais de todo o mundo (OTTO, 2013).

Em estudo publicado por Dib *et al.* (2017), foi demonstrado que as linhagens de
25 *S. epidermidis* causadoras de infecções de corrente sanguínea apresentam um perfil genético diverso de linhagens comensais, o que sugere uma adaptação das estirpes em causar infecções associadas à assistência à saúde.

S. haemolyticus é a segunda espécie mais isolada em hemoculturas e frequentemente resistente a uma gama de antimicrobianos, especialmente aos
30 glicopeptídeos (MACHADO, 2007; MOLINA *et al.*, 2013; HITZENBICHLER *et al.*, 2017). Esse micro-organismo tem sido relacionado à endocardite, septicemia, infecções do trato urinário, peritonite e infecções ósseas e articulares. *S. hominis* é a terceira espécie mais isolada de pacientes com infecções nosocomiais. Esta espécie está relacionada às infecções da corrente sanguínea, sepse, infecções oculares, endocardite,

peritonite, osso e infecções articulares (SZCZUKA; TELEGA; KAZNOWSKI, 2014; HITZENBICHLER et al., 2017). *S. capitis* é um patógeno oportunista humano, estando relacionado a 20% dos casos de sepse em recém-nascidos, e ocasionalmente a casos de endocardite e meningite associada a infecções nosocomiais (CAMERON et al., 2015).

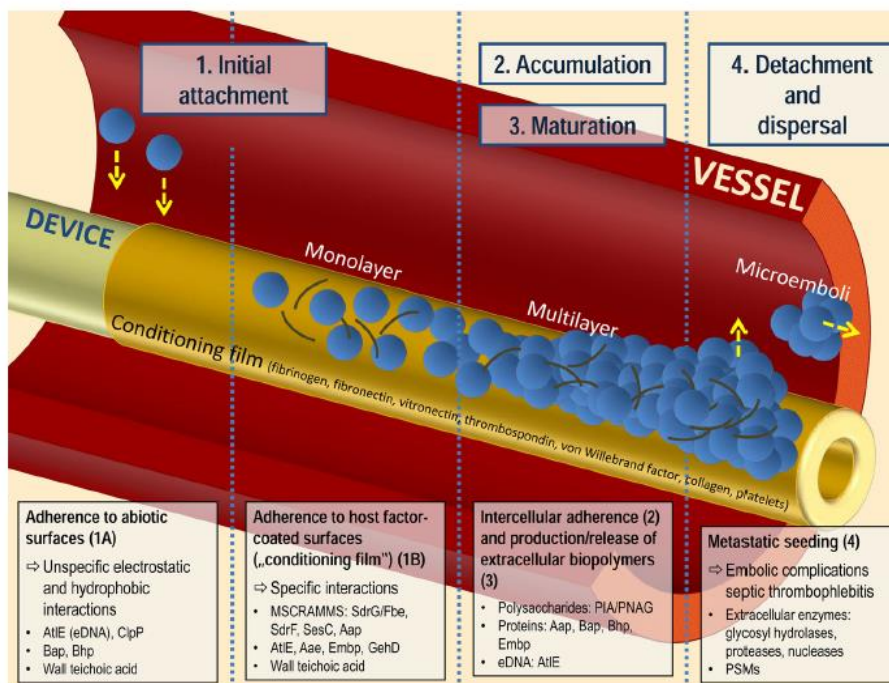
5 Outros SCN que merecem atenção são: *S. saprophyticus* – relacionado a infecções no trato urinário de mulheres jovens; *S. lugdunensis* - implicado em artrite, infecções em cateteres, bacteremia, infecções do trato urinário e infecções de próteses articulares e endocardite (VUONG; OTTO, 2002; BANNERMAN et al., 2003; VILEFORT, 2011). Além disso, em termos de virulência e destruição tecidual, *S.*
10 *lugdunensis* apresenta o mesmo curso clínico que infecções causadas por *S. aureus*, uma vez que parecem ter os mesmos determinantes de virulência (MACHADO, 2007). Em trabalho realizado por Sabe et al. (2014), avaliando endocardite, houve a confirmação de que *S. lugdunensis* atua de forma semelhante ao *S. aureus*, causando destruições graves em válvulas cardíacas e requerendo intervenção cirúrgica. Dessa forma,
15 infecções por essa espécie de SCN estão associadas a altas taxas de mortalidade devido ao seu poder de virulência (PAIVA, 2010). *S. lugdunensis* e *S. schleiferi* têm emergido, recentemente, como potenciais patógenos também em outros animais, incluindo-se como agentes de zoonoses (DAVIS et al., 2013).

Apesar de sua grande relevância clínica, há poucos estudos na literatura que
20 investigam a patogenicidade e virulência desses micro-organismos, o que revela a atual necessidade de se compreender melhor os fatores pelos quais esse grupo de micro-organismos saprófitas torna-se patogênicos aos seres humanos e outros animais.

1.3. Patogenicidade do grupo SCN

25 Os *Staphylococcus* apresentam capacidade para colonizar e infectar hospedeiros humanos e outros animais através de um arsenal de estratégias de patogenicidade que permitem a adesão, agressão, invasão, persistência e evasão dos sistemas imunológicos, inato e adaptativo (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014; NANOUKON et al; 2017). Contudo, os fatores de virulência presentes nos SCN não são totalmente
30 elucidados, como são em *S. aureus*. O que se sabe é que os mecanismos envolvidos na infecção e persistência dos SCN em superfícies biológicas ou inertes são diversos, sendo que o principal fator de virulência é a capacidade de produção de biofilme (HUEBNER; GOLDMANN, 1999; FONTES, 2013). Seu desenvolvimento ocorre em quatro etapas: (1) rápida adesão da bactéria à superfície; (2) proliferação e adesão

intercelular formando várias camadas de bactérias; (3) desenvolvimento do biofilme e (4) desprendimento e dispersão de partes do biofilme formado em outras direções (Figura 3).



- 5 **Figura 3:** Esquema de formação de um biofilme de SCN em um cateter. A primeira fase é de adesão rápida das bactérias à superfície. A segunda é de proliferação e adesão intercelular formando várias camadas de bactérias. A terceira é de desenvolvimento do biofilme formado e a quarta é de desprendimento e dispersão de partes do biofilme formado em outras direções (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014).

10

O evento inicial de formação de biofilme é a aderência e tem sido considerado como uma etapa crítica para o sucesso da colonização em superfícies bióticas ou abióticas e da doença infecciosa por SCN (BÜTTNER; MACK; ROHDE, 2015). A interação entre bactéria e superfícies é mediada por forças físico-químicas, como interações hidrofóbicas, forças de *van der Waals* e interação eletrostática (ANDRADE; PINTO; LIMA, 2008). Tais características vão determinar uma maior ou menor atração bacteriana pela superfície. Um bom exemplo da importância das interações químicas para o estabelecimento inicial da adesão é que linhagens de *S. epidermidis* que apresentam mutação em uma enzima que catalisa a inserção de D- alanina na estrutura dos ácidos teicóicos (constituente das paredes celulares de bactérias Gram-positivas) são deficientes em produzirem biofilme em vidro ou poliestireno. Isso porque, sem a ação enzimática, a célula bacteriana permanece com carga negativa e essas superfícies

15

20

apresentam a mesma carga negativa, ocorrendo repulsão entre ambos (GROSS et al., 2001).

A hidrofobicidade celular e adesão primária têm sido relacionadas às proteínas associadas às superfícies bacterianas. Os principais componentes associados a essa fase são as autolisinas e as adesinas de superfície celulares denominadas *Microbial Surface*
5 *Componentes Recognising Adhesive Matrix Molecules* (MSCRAMM). A autolisina AtlE, a principal adesina do estafilococo, é codificada pelo gene cromossômico *atlE* (PIETTE; VERSCHRAEGEN, 2009; BECKER; HEILMANN). É uma proteína de 115 kDa que faz parte de um grupo de hidrolases de peptidoglicano, e dessa forma, atua na
10 degradação da parede celular bacteriana, além de ser importante para a adesão primária às superfícies (BÜTTNER; MACK; ROHDE, 2015).

O mecanismo pelo qual a autolisina AtlE medeia a adesão não é totalmente compreendido, mas conforme sua função primária na célula, acredita-se que não tenha apenas uma função direta, mas a partir da degradação do peptidoglicano, há liberação
15 de DNA para o meio extracelular, que por sua vez, tem sido demonstrado um importante papel na fase inicial do biofilme de SCN (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014). O tratamento do biofilme inicial com DNase foi capaz de inibir a adesão primária de *S. epidermidis* (QIN et al., 2007).

Após a primeira etapa de adesão inicial, as células bacterianas se multiplicam e
20 se acumulam formando várias camadas de bactérias, em um processo onde a adesão intercelular se torna de extrema importância – dando início à segunda etapa de formação de biofilme. Dessa forma, há a produção de moléculas polissacarídicas, como: *Polysaccharide Intercellular Adhesion* (PIA) e Poliglutamato (PGA) (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014).

25 A acetilação de resíduos de PIA/PGA introduz carga positiva à molécula, por meio da liberação de grupos amina. Como a superfície bacteriana é carregada de forma negativa, PIA/PGA supostamente atua como uma “cola” que mantém as células unidas através dessas interações eletrostáticas (OTTO, 2008).

Os genes que produzem PIA/PGA estão organizados em um óperon denominado
30 *ica óperon* (*ica ADBC*). O *ica óperon* é composto pelos genes estruturais *icaADBC* e pelo *icaR* que está envolvido na regulação desses genes (PIETTE; VERSCHRAEGEN, 2009). O locus *icaA* e *icaD* codificam para uma N-acetilglucosamina transferase, *icaB* para uma deacetilase, enquanto o *icaC* para um transportador de PIA/PGA (DUNNE; DUNNE, 2002).

Em um modelo murino, mutantes para PIA/PGA se mostraram menos virulentos do que a linhagem selvagem, corroborando para o fato de esses polissacarídeos serem considerados como importantes fatores de virulência presente nos SCN (RUPP et al., 2001).

5 A terceira etapa da formação do biofilme é constituída pelo desenvolvimento da estrutura. Um biofilme formado consiste de aglomeração celular, separado por canais com fluidos que favorecem a nutrição bacteriana. As inúmeras células que constituem o biofilme ficam embebidas em um material extracelular amorfo (*slime*) que consiste da complexa mistura de vários açúcares, constituintes das paredes celulares, proteínas
10 extracelulares e ácido teicóico (MACHADO, 2007).

Essa estrutura apresenta propriedades imunomoduladoras ao estimular diretamente a produção de prostaglandinas (PGE2), inibindo a função das células T. Essas linhagens podem induzir a uma baixa resposta inflamatória por parte do hospedeiro, evidenciada por níveis mais baixos de concentração de Proteína C Reativa
15 quando comparados aos níveis produzidos pelos SCN que não produzem biofilme (HUEBNER;GOLDMANN, 1999; CORDEIRO et al., 2007).

O biofilme também confere proteção contra a entrada dos antimicrobianos, dificultando assim, a difusão desses no tecido. A concentração de antimicrobianos para eliminar bactérias produtoras de biofilme é de 100 a 1000 vezes maior do que a
20 concentração necessária para as mesmas espécies na forma planctônica (PAIVA, 2010). Os antimicrobianos administrados aos pacientes, em muitos casos, não atingem as células do interior do biofilme protegidas pela matriz extracelular polissacarídica, preservando a fonte de reinfecção do micro-organismo. A matriz também protege as células do interior do biofilme contra a ação dos anticorpos produzidos pelo sistema
25 imunológico e contra os radicais livres e outros compostos reativos produzidos por fagócitos recrutados para o combate do biofilme (SOUMYA et al.; 2017).

A quarta e última etapa de formação do biofilme é constituída pela dissociação de uma célula ou conjunto delas que outrora formavam o biofilme formado. A dispersão dessas células é mediada por ação enzimática que clivam o material extracelular que
30 propiciava a adesão intercelular. Dessa forma, dependendo da composição química dessas macromoléculas, há produção de diferentes enzimas, como: proteases, hidrolases de açúcar e nucleases (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014).

A formação de biofilme, tão essencial para a virulência dos SCN, é controlada pelo sistema de *quorum sensing*, que regula a expressão gênica em resposta ao aumento

da densidade celular. Para sinalizar e perceber o estado de densidade celular, os micro-organismos secretam moléculas sinalizadoras específicas, também conhecidas como feromônios ou autoindutores (OTTO, 2008; XUE *et al.*, 2013). O principal sistema de *quorum sensing* do gênero *Staphylococcus*, nomeado *agr* para o gene acessório regulador consiste de um sistema formado por dois componentes para transdução de sinal (AgrA e AgrC), feromônio (AgrD) e AgrB, que seria responsável pelo desenvolvimento e exportação do peptídeo formado após modificações traducionais. A molécula efetora do sistema *agr* é um RNA regulatório, denominado RNA III, cuja síntese é dependente da ativação do sistema *agr* e é dirigido pelo promotor P3 do sistema *agr* (OTTO, 2008).

Outros estudos envolvendo microscopia eletrônica, ainda revelaram outras estruturas de virulência. Tais pesquisas têm mostrado uma estrutura semelhante a fimbrias em SCN que poderiam auxiliá-los a aderir em materiais ou em moléculas no hospedeiro (VEENSTRA *et al.*, 1996), uma proteína extracelular de 140-kD também foi associada à acumulação de *S. epidermidis* em superfícies (HUSSAIN *et al.*, 1997), assim como uma hemaglutinina foi associada à adesão à superfície de polímeros (HUEBNER;GOLDMANN, 1999).Os SCN também podem produzir lantibióticos, bacteriocinas que tem atividade contra outras bactérias Gram-positivas (PIETTE; VERSCHRAEGEN, 2009).

Além dos fatores relacionados à formação de biofilme e lantibióticos, há estudos na literatura que relatam a detecção de diversos metabólitos, incluindo enzimas e toxinas que contribuem para o estabelecimento da infecção por esses micro-organismos. (CUNHA; CALSOLARI; JÚNIOR, 2007; GIORMEZIS *et al.*, 2014).

As hemolisinas são toxinas que lisam as células vermelhas do sangue e sua ação é geralmente mediada por receptores. Existem muitas classes de hemolisinas, como a α , β e γ -hemolisinas, sendo que a α é a mais bem estudada. Tal toxina lisa as células por meio da formação de poros quando ligada ao seu receptor específico, o que leva ao influxo de Ca^{2+} e efluxo de K^{+} . Esta perda de equilíbrio homeostático leva a morte celular por necrose. A β -hemolisina, apesar de não se compreender o mecanismo exato de ação, não é formadora de poros. Tem-se postulado que a toxina age principalmente sobre esfingomielina, causando uma desestabilização da membrana plasmática celular e irregularidade na fluidez de membrana. A γ -hemolisina confere lise aos eritrócitos de coelho e leucócitos humanos por meio de atividade degradante da membrana (KONG; NEOH; NATHAN, 2016).

Já as enterotoxinas estafilocócicas, são toxinas secretadas de tamanho molecular de 20 a 30kD que interfere com a função intestinal, causando emese e diarreia. São superantígenos capazes de estimular ativação de células T e proliferação sem a necessidade de processamento de antígenos, por meio da interação não específica do complexo de histocompatibilidade MHCII. A toxina do choque tóxico também é capaz de formar superantígenos por meio da estimulação da liberação de IL-1, IL-2, TNF- α e outras citocinas (OTTO, 2014). Com relação à produção de toxinas por SCN, há uma deficiência grande na literatura, uma vez que tais micro-organismos (quando) produzem uma pequena quantidade de toxinas e os métodos disponíveis não apresentam sensibilidade adequada para a sua detecção (CUNHA; CALSOLARI; JÚNIOR, 2007). Stach; Vu; Schlievert, 2015, não conseguiram detectar produção de toxinas em um grupo pequeno de SCN ou mesmo formação de superantígenos em modelo animal.

1.4. Resistência a antimicrobianos em SCN

Além dos importantes fatores de virulência presentes em SCN, outra eminente preocupação envolvendo o grupo é sua grande perda de sensibilidade aos antimicrobianos utilizados na prática clínica observada durante as últimas décadas. Um grande e dramático aumento do número de linhagens resistentes foi verificado, especialmente à penicilina, oxacilina/meticilina, ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina e gentamicina (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014; CERCENADO, 2016).

Com relação à resistência à penicilina, à oxacilina ou a outros antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos, houve um vertiginoso aumento do número de SCN resistentes à meticilina (MRSCN) nos hospitais do mundo todo. Tal fato é de extrema inquietação, uma vez que tais linhagens também podem apresentar resistência a outras classes de antimicrobianos (LENART-BORÓN et al., 2016). Em um estudo realizado na Suíça, 1176 cirurgiões ortopédicos, de coluna, cabeça e pescoço foram analisados com relação à colonização de SCN resistentes à meticilina na região nasal. Os pesquisadores encontraram 250 linhagens de MRSCN, representando 21,4% das amostras totais. Tal resultado é alarmante, uma vez que a alta taxa de amostras resistentes no profissional médico pode alertar para uma possível disseminação entre hospitais ou mesmo para a comunidade, advertindo aos profissionais de saúde a necessidade de se manter medidas preventivas de cuidados em ambientes de assistência à saúde (MORGENSTERN et al., 2016).

Em outro estudo realizado na Suíça, de 1999 pacientes analisados, 82 (4,1%) desenvolveram infecção profunda de ferida esternal. Houve uma alta frequência de SCN como causa do processo infeccioso (36), sendo que 25 eram resistentes à meticilina (SOMMERSTEIN et al., 2015). Em um trabalho realizado na China, avaliando 1739 amostras de SCN, 94% foram resistentes à penicilina e 73,7% à oxacilina (DENG et al., 2015). No Brasil, as taxas de resistência à meticilina ou penicilina também são altas. Em um trabalho analisando 117 linhagens de SCN isoladas de fluidos corporais, 90,6% foram resistentes à penicilina e 50,4%, à oxacilina. Enquanto em outro trabalho realizado em Campinas, as taxas de resistência à oxacilina de SCN isolados de hemocultura chegaram a 80% (CUNHA; LOPES, 2002; VENDEMIATO et al., 2015).

Os antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos possuem o anel β -lactâmico como constituinte da estrutura central e são análogos do substrato de ligação às proteínas ligadoras à penicilina, que por sua vez, catalisam a formação das ligações cruzadas das cadeias de glicano presentes na parede celular. Dessa forma, sem a ação enzimática adequada, há uma interrupção na síntese da parede celular e, uma posterior, lise bacteriana (LIM; STRYNADKA, 2002).

O fenótipo de resistência observado é devido à produção de penicilinases codificada pelo gene *blaZ* que pode estar localizado em elementos móveis no DNA cromossômico ou plasmidial. Uma vez que o micro-organismo é capaz de produzir uma β -lactamase, esta enzima inativa o antimicrobiano por meio da destruição hidrolítica do anel β -lactâmico (KAASE et al., 2008; FONTES, 2013).

Outro mecanismo de resistência à meticilina e aos outros β -lactâmicos está associada à presença do gene *mecA*, que codifica uma proteína de ligação adicional à penicilina. O gene *mecA* está inserido em um elemento gênico móvel, chamado de cassete estafilocócico *mec* (*SCCmec*). Este, por sua vez, apresenta uma imensa variedade. Segundo Saber et al (2017), já foram descritos 8 tipos de cassetes (I até VIII) em SCN, alguns ilustrados na Figura 4. O cassete *SCCmec* apresenta dois componentes: o complexo do gene *mecA* e do gene *ccr*. O complexo do gene *mecA* consiste do *mecA*, os genes regulatórios e uma sequência de inserção associada. O gene *ccr* codifica uma recombinase que medeia a integração e excisão do *SCCmec* de e para o cromossomo. O gene *ccr* em conjunto com os demais genes flanqueadores constituem o complexo *ccr* (BASSET et al., 2010; SABER et al., 2017).

A proteína de ligação adicional à penicilina (PBP2a), formada pelo gene *mecA*, apresenta um tamanho de 78 kDa e proporciona uma considerável redução da afinidade

ao antimicrobiano β -lactâmico. Dessa forma, o β -lactâmico não consegue interagir com a PBP2a e se torna ineficaz em lisar a célula microbiana (LIM; STRYNADKA, 2002).

A resistência à oxacilina também é preocupante para o laboratório de microbiologia. Isso porque amostras de SCN podem variar no seu nível de expressão fenotípica de resistência. Aqueles com baixos níveis podem ser difíceis de serem identificados (AZEVEDO *et al.*, 2007).

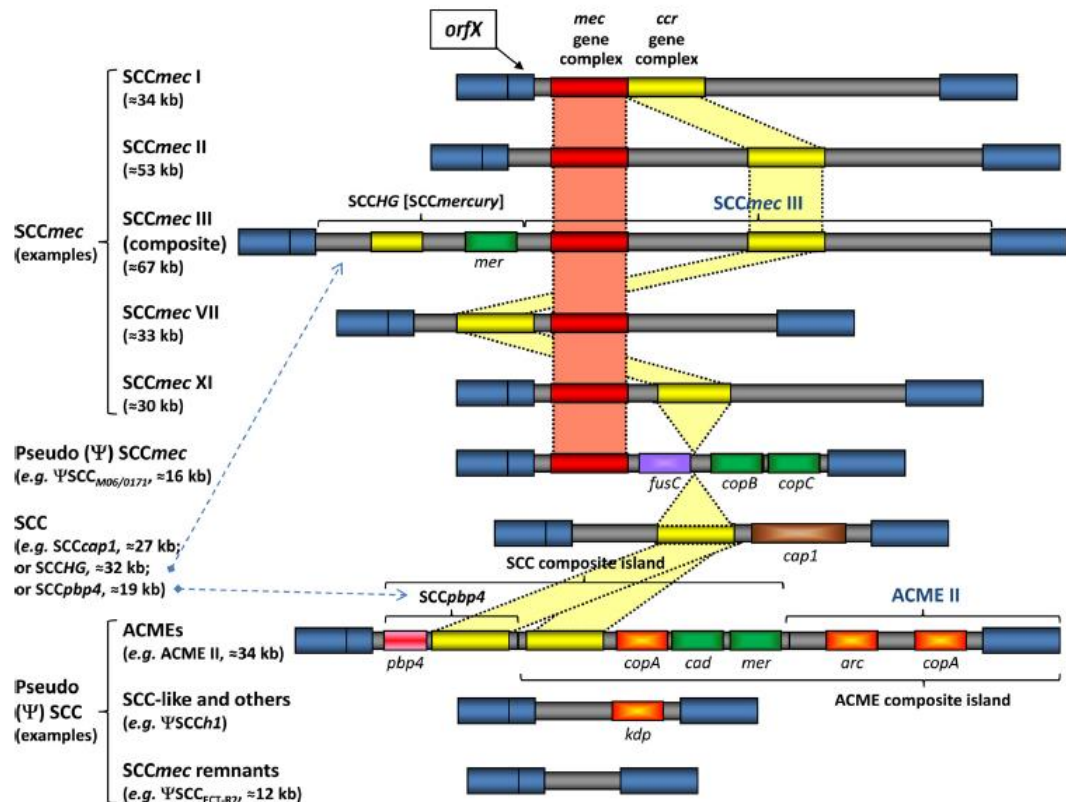


Figura 4: Esquema da composição dos tipos de cassete dentro da família *SCCmec*. Em azul, o cromossomo no qual o cassete está inserido. As estruturas principais incluem: o complexo do gene *mec* (em vermelho), o complexo do gene *ccr* (em amarelo) e as regiões de junção (em cinza). Alguns cassetes apresentam de forma adicional: (1) resistência a outros antimicrobianos, como ácido fusídico (em violeta); (2) óperons de resistência a metalóides com propriedades bactericidas (em verde), como arsênio (*ars*), cádmio (*cad*), cobre (*copB* e *copC*) e mercúrio (*mer*); (3) genes de virulência (em marrom), como gene que codifica cápsula de polissacarídeo (*cap1*), (4) outros genes (em laranja), como o gene de metabolismo de arginina (*arc*), gene de translocação do cobre (*copA*) e de potássio (*kdp*), outras PBPs (*pbp4*- em rosa). (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014).

Nos últimos anos, tem aumentado a preocupação de estafilococos com sensibilidade reduzida aos glicopeptídeos. O primeiro relato de um *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) com resistência intermediária à vancomicina (VISA) foi em 1997, no Japão, seguido por vários casos confirmados nos Estados Unidos (CDC, 2002). Em estudo realizado por Diekema et al (2001), a frequência de SCN com resistência intermediária à vancomicina já se apresentava alta nos Estados Unidos, América Latina, Europa, Canadá e na região do Oeste Pacífico.

Com relação ao grupo dos SCN, há poucos estudos que investigam a taxa de resistência dessas linhagens à vancomicina. Um estudo realizado nos Estados Unidos, avaliando 308 pacientes com bacteremia por SCN, não encontrou nenhuma linhagem resistente ao antimicrobiano (VALENCIA-REY et al., 2015). No entanto, no Brasil, o primeiro caso de SCN com resistência à vancomicina foi relatado em 2005 em amostra isolado de profissionais de saúde (PALAZZO; ARAUJO; DARINI, 2005). A taxa de resistência à vancomicina permanece baixa nos hospitais mundiais e pode ser considerada com uma boa opção terapêutica atualmente (BLANCHARD et al., 2017).

O mecanismo de resistência à vancomicina é mediado pela alteração dos peptídeos da parede celular, devido às alterações da estrutura do N-ácido acetilmurâmico e N-acetilglicosamina que, nessa forma, tem afinidade 1000 vezes menor à molécula do antimicrobiano (ZHU et al., 2008). A resistência se dá na presença do gene *vanA*, e suspeita-se que a aquisição do mesmo pelos estafilococos se deu a partir do contato dessas células com *Enterococcus faecalis*, normalmente resistentes à vancomicina (VRE) (FONTES, 2013).

A resistência à eritromicina e azitromicina em bactérias do gênero *Staphylococcus* está normalmente associada com a resistência a outros macrolídeos. Estudos mostram que tais bactérias podem ser portadoras dos genes *ermA*, *ermB* e *ermC*, que codificam metilases, que por sua vez inativam o antimicrobiano (FONTES, 2013).

Em 2013, em um estudo prospectivo nos hospitais poloneses, foram verificadas altas taxas de resistência à eritromicina, 90% das amostras de *S. epidermidis* e 100% das de *S. haemolyticus* foram resistentes a esse antimicrobiano (BRZYCHCZY-WLOCH et al., 2013). Em um estudo realizado no Brasil, avaliando a resistência de SCN isolados de hemoculturas, 62,5% das amostras foram resistentes à eritromicina (MARTINI et al., 2014).

Os antimicrobianos ácido fusídico, fosfomicina e rifampicina representam velhas opções de tratamento, que atualmente vêm sendo reintroduzidos na prática clínica (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014). Estudos envolvendo análise de resistência frente a esses agentes são incipientes e muitas vezes, inconsistentes. Com relação aos aspectos moleculares de resistência aos aminoglicosídeos, sugere-se que a resistência seja devida à enzima inativadora AAC(6')-APH(2") (ARCHER; CLIMO, 1994; BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014).

Os SCN também apresentam resistência ao antimicrobiano trimetropim. Os primeiros casos relatados de propagação de resistência a esse antimicrobiano entre o grupo de *Staphylococcus* foi descrito na Austrália e nos Estados Unidos, no início da década de 80. Tal resistência foi atribuída à produção de uma enzima alvo de trimetropim - diidrofolato redutase - codificada por plasmídeo. Mais tarde, foi observada a integração deste gene no cromossomo de algumas amostras isoladas de pacientes nos Estados Unidos e também a presença do mesmo em amostras de *S. aureus* e *S. epidermidis*, sugerindo transferência horizontal (FONTES, 2013).

Resistência às fluoroquinolonas também já foi descrita para os SCN. Esse grupo de antimicrobianos atua na célula bacteriana ao modificar a estrutura da DNA girase necessária para o superenrolamento do DNA. Um dos mecanismos de resistência proposto seria a mutação espontânea do gene que codifica a subunidade A da DNA girase, fazendo com que não ocorra mais a ação inibitória desses antimicrobianos. Mutações nesse gene já foram descritas em *S. epidermidis* resistentes à ciprofloxicina e norfloxacina (ARCHER; CLIMO, 1994; LENART-BOROÑ et al., 2016)

A frequência de resistência a agentes antimicrobianos varia bastante dentro do grupo dos SCN. As maiores taxas de resistência são encontradas em *S. haemolyticus* (76-96% resistentes à oxacilina, por exemplo). As taxas de resistência a este antimicrobiano também são elevadas nas espécies *Staphylococcus hominis* (80%) e *S. epidermidis* (38-81%). A espécie *S. lugdunensis* apresenta sensibilidade *in vitro* à maioria dos antimicrobianos, incluindo penicilinas, cefalosporinas e macrolídeos (PIETTE; VERSCHRAEGEN, 2009).

1.5. Conceituação de bacteremia e sepse

Os termos septicemia, bacteremia e sepse comumente são utilizados de forma inadequada. E por isso, alguns consensos internacionais propuseram padronizar esses conceitos. Em 2001, a *International Sepsis Definition Conference* realizou uma reunião de consenso para reavaliar as definições e critérios de sepse padronizadas pelo American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM) em 1991. A definição de sepse manteve-se como uma síndrome clínica caracterizada pela presença de infecção e resposta inflamatória sistêmica. Esta síndrome clínica pode ser classificada em sepse, sepse grave e choque séptico. Quando a sepse é acompanhada por alguma disfunção de órgão, hipotensão ou hipoperfusão tecidual denomina-se sepse grave. Um quadro de sepse mais grave, acompanhada de hipotensão refratária, denomina-se de choque séptico. Nos três casos, o risco de morte é progressivo, à medida que aumenta a gravidade da sepse (PAIVA, 2010).

A bacteremia refere-se à presença de bactérias viáveis no sangue, determinada pela positividade de um exame cultural de sangue (hemocultura). Tal achado laboratorial pode relacionar a existência ou não de uma infecção, uma vez que as hemoculturas podem ser positivas como resultado de contaminação das amostras durante a flebotomia, levando a um resultado falso-positivo. Esta contaminação é mais frequente devido à presença de bactérias residentes na pele como os SCN. No entanto, o crescimento desses micro-organismos ou de outras bactérias representantes da microbiota da pele em hemocultura, nem sempre representa contaminação e pode indicar uma bacteremia verdadeira, dependendo da situação clínica (GAUNA *et al.*, 2013).

A bacteremia pode ser classificada de acordo com seu sítio de origem em bacteremia primária ou secundária. A bacteremia primária resulta quando a fonte de infecção é endovascular (válvulas cardíacas ou cateteres intravasculares). Já a bacteremia secundária é denominada quando a fonte de infecção é extravascular, tal como o pulmão de um paciente com pneumonia. Entretanto, não é infrequente o relato de bacteremias de origem desconhecida. A bacteremia também pode ser classificada de acordo com seu local de aquisição, podendo ser adquiridas em ambientes hospitalares (bacteremia nosocomial) ou na comunidade (bacteremia adquirida na comunidade). A bacteremia nosocomial é definida como qualquer bacteremia ocorrida após 72 horas de hospitalização (PAIVA, 2010).

Além disso, a bacteremia pode ser classificada de acordo com sua duração. Uma bacteremia transiente pode ocorrer após um procedimento médico em um sítio específico, por exemplo, a partir da boca, do trato gastrintestinal e urogenital. Já uma bacteremia intermitente, pode ocorrer como resultado de um abscesso de um local específico ou como uma manifestação clínica de certas infecções como meningococemia e gonococemia. A bacteremia contínua ocorre quando os microorganismos têm como sítio primário de infecção uma fonte intravascular, além de se manifestarem em grande quantidade na corrente sanguínea. A endocardite infecciosa é a manifestação clínica mais associada à bacteremia contínua, embora outras fontes endovasculares, tais como cateteres intravasculares infectados, também possam resultar em bacteremia contínua (GAUNA *et al.*, 2013).

Devido à gravidade da bacteremia, e possibilidade de resultar em sepse, sua definição torna-se imprescindível para o diagnóstico e tratamento correto do paciente, principalmente, tratando-se de hemoculturas positivas para SCN. Dessa forma, a principal questão a ser respondida durante o isolamento de SCN em hemoculturas é se seu aparecimento é mesmo a causa da infecção ou apenas uma contaminação ou colonização do hospedeiro. Um fator que auxilia essa identificação é o isolamento de uma mesma linhagem em cultura pura do local infectado e o seu posterior isolamento no curso da infecção (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014).

A fim de se reduzir classificações errôneas de bacteremias por SCN e, por consequência, reduzir uma possível pressão seletiva de antimicrobianos desnecessária, o seguinte algoritmo foi criado: duas ou mais culturas positivas para SCN dentro de cinco dias ou uma cultura positiva acompanhada de sinais clínicos de infecção (BEEKMANN; DIEKEMA; DOERN, 2007).

25

30

2.0. JUSTIFICATIVA

O grupo dos SCN foi considerado saprófito ou raramente patogênico durante muitos anos. Sua importância clínica só foi relativamente reconhecida quando da publicação do primeiro caso de septicemia por micro-organismos desse grupo na década de 50. Desde então, houve aumento progressivo dos números de amostras de SCN como causa de infecções relacionadas à assistência à saúde, sendo que atualmente, o grupo vem emergindo como um dos principais causadores de infecções nosocomiais de corrente sanguínea, de cateteres vasculares e próteses, especialmente entre pacientes imunocomprometidos, como aqueles em tratamento quimioterápico, usuários de drogas, portadores de SIDA e recém-nascidos em todo o mundo.

Esse aumento paulatino dos casos se deve à alteração nas relações entre pacientes e procedimentos, uma vez que os SCN estão intimamente relacionados a dispositivos implantados no corpo humano ou de outros animais. A partir da quebra da barreira cutânea, os SCN presentes na pele ou membranas mucosas podem atingir a corrente sanguínea ou a contaminação pode ocorrer de maneira direta - a partir de infusões previamente contaminadas.

Os micro-organismos desse grupo conseguem sucesso na colonização no hospedeiro por contar com diversos mecanismos de virulência, como formação de biofilme e produção de enzimas e toxinas; além de possuir diversos mecanismos de resistência aos antimicrobianos utilizados na prática clínica, o que dificulta o tratamento requerido.

Todavia, trabalhos que busquem caracterizar os aspectos que permeiam a patogênese e a resistência aos antimicrobianos utilizados na prática clínica no grupo dos SCN em seres humanos e outros animais são incipientes. Dessa forma, torna-se de extrema importância estudos que definam os atributos genotípicos e fenotípicos dessas linhagens a fim de se compreender melhor os patógenos circulantes localmente ou mesmo, mundialmente.

Considerando-se o exposto, o presente estudo visa contribuir para o conhecimento acerca das linhagens de SCN isoladas de amostras clínicas de cinco hospitais diferentes de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

3.0. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

5 Caracterizar as linhagens de *Staphylococcus* coagulase-negativo isoladas de pacientes com infecções da corrente sanguínea, em diferentes hospitais de Belo Horizonte, quanto às suas características de patogenicidade e resistência a antimicrobianos.

3.2. Objetivos específicos

- 10 • Identificar, por método fenotípico automatizado, as espécies de SCN isoladas de pacientes com infecção da corrente sanguínea;
- Determinar as linhagens de SCN isoladas por método de rep-PCR;
- Determinar a menor concentração de agentes antimicrobianos de interesse clínico, capazes de inibir o crescimento das amostras selecionados;
- 15 • Avaliar fenotipicamente, as capacidades hemolíticas, de formação de biofilme e de produção de toxinas nas amostras de SCN em estudo;
- Pesquisar genes associados à virulência (produção de biofilme e toxinas);
- Pesquisar genes associados à resistência a antimicrobianos;
- Determinar o tipo SCCmec nas amostras de SCN avaliados;
- 20 • Determinar perfis de distribuição das características analisadas entre as amostras de SCN isolados.

25

30

4.0. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras bacterianas

5 Neste trabalho, foi avaliado um total de 59 amostras de *Staphylococcus* spp. coagulase negativo (SCN) de pacientes com quadro clínico de infecção da corrente sanguínea provenientes de cinco diferentes hospitais avaliados entre outubro de 2008 a março de 2009.

4.2 Características dos Hospitais

10 - Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais é um hospital universitário, público e geral que realiza atividades de ensino, pesquisa e assistência, sendo referência no sistema municipal e estadual de Saúde no atendimento aos pacientes portadores de doenças de média e alta complexidade.

15 - Hospital de Pronto Socorro João XXIII atua como centro de referência e excelência no atendimento a pacientes vítimas de politraumatismos, grande queimaduras, intoxicações e situações clínicas e/ou cirúrgicas de risco de morte. É mantido pela Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais – FHEMIG.

- Hospital Municipal Odilon Behrens é um hospital público, geral, de ensino e de pesquisa que presta atendimentos de urgência/emergência clínica e traumatológica.

20 - Hospital Semper SA é um hospital privado de atendimento geral em várias áreas da clínica médica, medicina intensiva, maternidade, pediatria, ginecologia e cirurgia geral.

- Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte é uma organização filantrópica, sem fins lucrativos, que tem várias especialidades médicas nos níveis ambulatoriais e de internação, pequenas e grandes cirurgias, pediatria e medicina intensiva.

25

4.3 Critérios de inclusão

Amostras de SCN isolados de pelos menos dois frascos de hemocultura, de pacientes internados no CTI. Os critérios clínicos de infecção da corrente sanguínea foram determinados pelos médicos responsáveis pelos pacientes em cada instituição.

30

4.4. Aspectos éticos da pesquisa

O projeto foi submetido e aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa dos Hospitais participantes e do COEP/UFMG (ETIC 114/08). Não foram identificados pacientes, nem utilizados dados clínicos referentes aos mesmos.

5 4.5. Identificação fenotípica automatizada das amostras

A identificação automatizada das amostras foi realizada através da utilização do sistema comercial de identificação GP 21342 TEST KIT VITEK II (bioMérieux Vitek®, Rio de Janeiro, Brasil). Estes consistem de 20 cartões plásticos padronizados e miniaturizados, contendo testes desidratados em tubos individuais. O sistema funciona com uma base de dados especialmente adaptada para identificar micro-organismos dos gêneros *Staphylococcus*, *Kocuria* e *Micrococcus*. O inóculo foi adicionado aos tubos e o cartão foi, então, incubado a 37°C, por 18 a 24 horas. Após esse período, o resultado foi interpretado de acordo com protocolos do fabricante. Foram considerados os resultados com porcentagem de confiança acima de 95%.

15

4.6. Determinação das linhagens pelo método de PCR baseada em sequência repetitiva (rep-PCR)

A filotipagem pela técnica de rep-PCR foi realizada como descrito por Svec e colaboradores (2010) com algumas modificações. Resumidamente, o DNA isolado foi amplificado usando o iniciador (GTG)₅ (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3') com PCR Master Mix (Promega, São Paulo, Brasil). A desnaturação inicial (94 °C durante 7 min) foi seguida de 30 ciclos de desnaturação (94 °C durante 1 min), anelamento do primer (40 °C por 1 min) e extensão (72 °C por 8 min). O último ciclo foi seguido pelo passo de extensão final (72 °C por 16 min). Os produtos de PCR que foram obtidos foram separados por 16 h a 1,55 V cm⁻¹ em géis de agarose a 1,5% (p / v) (20 x 25 cm) contendo brometo de etídio (0,5 g mL⁻¹). Um marcador de peso molecular de 1 kb (escala de DNA de 1 kb - Promega, São Paulo, Brasil) foi utilizado para permitir a normalização de imagens de gel. As impressões digitais resultantes foram visualizadas sob luz UV (302 nm), digitalizadas e processadas usando o software GelJ. Um dendrograma foi construído usando os coeficientes de correlação de Pearson com agrupamento usando o método do grupo de par não ponderado com médias aritméticas (UPGMA).

30

4.7. Avaliação da concentração mínima inibitória (CIM)

Para a realização do teste de suscetibilidade automatizado a antimicrobianos foi empregado o Cartão AST-P5085 (bioMérieuxVitek®) de acordo com as instruções do fabricante. Os antimicrobianos presentes no cartão AST-P5085 são os seguintes: ampicilina, ampicilina/sulbactam, ampicacina, aztreonam, ceftazidima, cefazolina, cefepime, cefotetan, ceftriaxona, cefuroxima, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, levofloxacina, meropenem, nitrofurantoína, piperacilina, piperacilina/tazobactam, sulfametoxazol/trimetoprim e tobramicina.

10

4.8. Avaliação da atividade hemolítica

A atividade hemolítica dos SCN isolados foi avaliada por meio da semeadura dos micro-organismos em meio ágar sangue e posterior incubação a 37°C por 18-24h. Após esse período, zonas de hemólise foram observadas e relacionadas à capacidade de hemólise pelos micro-organismos. Uma zona translúcida foi relacionada a uma β -hemólise, uma zona esverdeada foi relacionada a uma α -hemólise, enquanto ausência de zona de hemólise foi relacionada à γ -hemólise (JUNDIÁS, 2014).

15

4.9. Avaliação da produção de biofilme

A verificação da habilidade na formação de biofilme pelas amostras de SCN foi realizada de acordo com as metodologias descritas por Arciola et al. (2002) e Souza (2013).

20

Com relação à metodologia proposta por Arciola et al. (2002), as amostras foram crescidas em ágar vermelho congo (0,8g do corante vermelho congo, 36g de sacarose para 1L de ágar BHI). As placas foram incubadas por 24h a 37°C e subsequentemente a 25°C por 12h. No ágar vermelho congo, as amostras produtoras de biofilme formam colônias pretas, enquanto os não produtores formam colônias vermelhas. A escala de coloração utilizada como padrão pode ser observada na Figura 5.

25

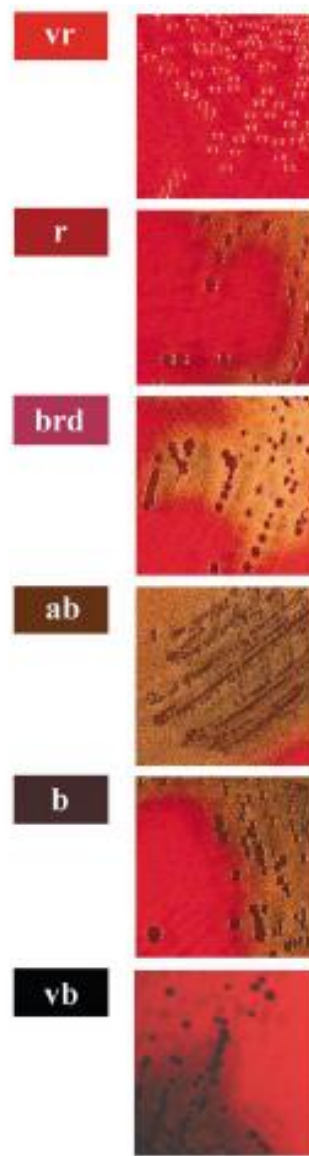


Figura 5: Escala de coloração para interpretação do teste AVG. (vr) muito vermelho; (r) vermelho; (brd) bordeaux; (ab) quase preto; (b) preto; (vr) muito preto (ARCIOLA et al., 2002).

- 5 Com relação à metodologia adaptada por Souza (2013), houve uma verificação da capacidade de formação de biofilme em placas de poliestireno. As amostras foram crescidas por esgotamento em ágar BHI e incubadas a 37°C durante 18h-24h. Após esse período, uma alçada do crescimento foi inoculada em tubos contendo 3mL de caldo BHI e incubados por 12h a 37°C. Após esse intervalo, as células foram lavadas três vezes em
- 10 tampão fosfato salino (PBS, pH7,2) e centrifugadas a 10000xg por 10 minutos. Após a centrifugação, as células foram suspensas em meio BHI líquido enriquecido com sacarose a 1%, de forma a obter a concentração celular correspondente a 0,5 de

absorbância a 600 nm. Alíquotas de 200 µL das culturas bacterianas foram aplicadas em quatro poços cada, e as placas foram incubadas a 37°C por 4h, 8h, 12h, 24h e 48h.

O conteúdo de cada poço foi aspirado e os poços foram gentilmente lavados três vezes com 200 µL de PBS e mantidas em temperatura ambiente até a completa
5 secagem. A biomassa aderida foi fixada com 300 µL de metanol (PA 99% v/v) por 10 minutos e em seguida, 300 µL de solução de cristal violeta 0,5% foram adicionados em cada poço. Após 10 minutos de coloração, a solução de corante foi aspirada, os poços foram lavados com água e o corante aderido na biomassa foi removido pela adição de
10 200 µL de etanol absoluto por 10 minutos. Após esse período, 150 µL da solução contida em cada um dos poços foram transferidos para outra placa limpa e seca. A absorbância foi quantificada utilizando leitor de ELISA (Thermo), em comprimento de onda de 620 nm.

As amostras foram classificadas em quatro categorias baseadas na relação entre a DO (densidade ótica) dos poços inoculados com as linhagens bacterianas em estudo e
15 dos controles negativos (meio sem inoculo) DOc. As categorias utilizadas foram: não aderente (NA), quando $DO \leq DOc$; fracamente aderente (+) quando $DOc < DO \leq 2 \times DOc$; moderadamente aderente (++), quando $2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$ ou fortemente aderente (+++), quando $4 \times DOc < DO$ (Souza, 2013).

20 **4.10. Avaliação da produção de enterotoxinas e toxina do choque tóxico**

A detecção da produção de enterotoxinas e da toxina do choque tóxico nas linhagens de SCN isoladas foi realizada utilizando duas técnicas diferentes: *Optimum Sensitive Plate* (OSP) (ROBBINS; GOULD; BERGDOLL, 1974) e o kit VIDAS® (bioMérieux) segundo recomendações do fabricante.

25 Com relação à metodologia OSP, as amostras foram crescidas em 5 mL de caldo BHI e incubados a 37°C durante 24h. Após a incubação, placas de Petri contendo 20 mL de ágar BHI acrescentado de 1% de extrato de levedura foram revestidas com discos de membrana de diálise. Inoculo de 0,5 mL da cultura foi vertida na superfície da membrana e as placas incubadas a 37°C por 24h. Em seguida, as membranas foram
30 lavadas com 2,5mL de tampão fosfato (20 mM, pH 7,4) duas vezes – na primeira lavagem, utilizou-se 1,5mL de tampão fosfato e na segunda, 1,0mL. As culturas, já lavadas, foram transferidas para um tubo e centrifugadas a 10000g/10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e 20µL de timerossol foi adicionado. Tal sobrenadante, então, foi utilizado para a verificação da produção de TSST-1 e das demais

enterotoxinas pela reação entre os anticorpos e as linhagens. Amostras controles foram utilizadas para checar a atividade dos anticorpos utilizados. Quando há reação positiva, o anticorpo reage com a toxina presente na amostra e se precipitam formando uma linha branca. A presença dessa linha, então, revela resultado positivo; enquanto que sua
5 ausência revela resultado negativo.

Ambos os testes foram realizados no Laboratório de Enterotoxinas de Alimentos da Fundação Ezequiel Dias (FUNED).

4.11. Extração de DNA genômico bacteriano

10 A extração de DNA genômico bacteriano foi realizada de acordo com metodologia proposta por Pitcher, Saunders & Owen (1989).

As amostras foram crescidas por esgotamento em ágar BHI e incubadas a 37°C por 18h-24h. Após esse período, uma alçada cheia foi transferida para um tubo contendo 300µL de tampão TE (TrisHCl/EDTA pH 8). A fim de se realizar a lise
15 mecânica das células, pequenas pérolas foram adicionadas aos tubos e a suspensão foi vortexada por 2 minutos. Logo depois, foram adicionados 600µL de solução de tiocianato de guanidina, EDTA e sarcosil nas proporções de 5M, 100mM e 0,5%, respectivamente. Os tubos foram, então, agitados por inversão e incubados a 10 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, 300µL de acetato de sódio 7,5M foram
20 adicionados, os tubos agitados por inversão e incubados a 10 minutos no gelo. Posteriormente, 600µL de clorofórmio-álcool isoamílico na proporção de 24:1 foram adicionados e os tubos centrifugados a 25000 g/10 minutos. O sobrenadante foi, então, transferido para outro tubo contendo isopropanol (mesmo volume de sobrenadante para o mesmo volume de isopropanol). Em seguida, os tubos foram incubados a -20°C por
25 12h. Após a incubação, os tubos foram retirados para descongelamento a temperatura ambiente e, em seguida, centrifugados a 6500g/20 minutos. O sobrenadante foi descartado e lavado com 500µL de etanol 70% duas vezes. Após a lavagem, o pellet foi ressuspendido com 50µL de água Mili-Q. A concentração de DNA foi medida em
30 NanoDrop® e a integridade do DNA extraído foi verificado em gel de agarose. A suspensão foi estocada a -20° C até o momento do uso. Uma alíquota do DNA bacteriano foi adicionada às reações de PCR, de acordo com o protocolo correspondente para cada gene.

4.12. Pesquisa de marcadores de virulência e resistência das amostras de SCN

A presença de genes de resistência e de genes codificadores de fatores de virulência – formação de biofilme e toxinas-, além do gene *agr* relacionado ao *quorum sensing* foi analisada por meio de PCR utilizando-se iniciadores e condições descritas em estudos anteriores (Tabela 1, 2,3). Para todas as reações, controles positivos foram utilizados (descrição detalhada no artigo presente no anexo II).

Tabela 1: Iniciadores para as reações de PCR para genes de resistência a antimicrobianos

Gene de resistência	Sequência (5'→3')	Referência	Fenótipo de resistência
<i>mecA</i>	<u>Iniciador 1:</u> 5-TCCAGATTACAACCTTCACCAGG-3 <u>Iniciador 2:</u> 5-CCACTTCATATCTTGTAACG-3	TAKANO et al., 2007	Meticilina/ Oxaciclina
<i>vanA</i>	<u>Iniciador 1:</u> 5-GGG AAA ACGACA ATT GC-3 <u>Iniciador 2:</u> 5-GTA CAATGCGGCCGT TA-3	DUTKA-MALEN et al, 1995	Vancomicina
<i>blaZ</i>	<u>Iniciador 1:</u> 5-ACT TCA ACA CCT GCT TTC-3 <u>Iniciador 2:</u> 5-TGA CCA CTT TTA TCA GCA ACC-3	MARTINEAU et al., 2000	Penicilina
<i>ermA</i>	<u>Iniciador 1:</u> 5-TAT CTT ATC GTT GAG AAG GGA TT-3 <u>Iniciador 2:</u> 5-CTA CAC TTG GCT TAG GAT GAA A-3	MARTINEAU et al., 2000	Azitromicina e Eritromicina
<i>ermB</i>	<u>Iniciador 1:</u> 5-CTA TCT GAT TGT TGA AGA AGG ATT-3 <u>Iniciador 2:</u> 5-GTT TAC TCT TGG TTT AGG ATG AAA-3	MARTINEAU et al., 2000	Azitromicina e Eritromicina
<i>ermC</i>	<u>Iniciador 1:</u> 5-CTT GTT GAT CAC GAT AAT TTC C- 3 <u>Iniciador 2:</u> 5-ATC TTT TAG CAA ACC CGT ATT C- 3	MARTINEAU et al., 2000	Azitromicina e Eritromicina
<i>aac-aphD</i>	<u>Iniciador 1:</u> TAATCCAAG AGCAATAAGGGC <u>Iniciador 2:</u> GCCACACTATCATAACCACTA	STROMMENDER et al., 2003	Gentamicina, Tobramicina, Netilmicina, e Amicacina

Tabela 2: Iniciadores para as reações de PCR para genes relacionados à formação de biofilme e o gene *agr* (*quorum-sensing*).

Gene de virulência	Sequência (5' → 3')	Referência	Fenótipo de virulência
<i>atlE</i>	Iniciador 1: 5-CAA CTG CTC AAC CGA GAA CA-3 Iniciador 2: 5-TTT GTA GAT GTT GTGCCC CA-3	FREBOURG <i>et al.</i> , 2000	Autolisina
<i>icaA</i>	Iniciador 1: 5-GACCTCGAAGTCAATAGAGGT-3 Iniciador 2: 5-CCCAGTATAACGTTGGATACC-3	ZIEBUHR <i>et al.</i> , 1999	PIA (polysaccharide intercellular adhesion)
<i>icaB</i>	Iniciador 1: 5-ATGGCTTAAAGCACACGACGC-3 Iniciador 2: 5-TATCGGCATCTGGTGTGACAG-3	ZIEBUHR <i>et al.</i> , 1999	PIA (polysaccharide intercellular adhesion)
<i>icaC</i>	Iniciador 1: 5-ATAAACTTGAATTAGTGTATT-3 Iniciador 2: 5-ATATATAAAACTCTCTTAACA-3	ZIEBUHR <i>et al.</i> , 1999	PIA (polysaccharide intercellular adhesion)
<i>agr</i>	Iniciador 1: 5-CAT AGC ACT GAG TCCAAG GA-3 Iniciador 2: 5-CAA TCG GTG ACT TAG AAA AAT G-3	REINOSO, 2004	Relacionado ao <i>quorum sensing</i>

Tabela 3: Iniciadores para as reações de PCR para genes de produção de enterotoxinas e toxina do choque tóxico

Gene de produção de toxina	Sequência (5' → 3')	Referência	Toxina
<i>sea</i>	Iniciador 1: 5-CCT TTG GAA ACG GTT AAA ACG-3 Iniciador 2: 5-TCT GAA CCT TCC CAT CAA AAA C-3	BECKER;ROTH;PETERS, 2008	Enterotoxina A
<i>sec</i>	Iniciador 1: 5-CTC AAG AAC TAG ACA TAA AAG CTA GG-3 Iniciador 2: 5-TCA AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC-3	BECKER;ROTH;PETERS, 2008	Enterotoxina C
<i>sed</i>	Iniciador 1: 5-CTA GTT TGG TAA TAT CTC CTT TAA ACG-3 Iniciador 2: 5-TTAATG CTA TAT CTT ATA GGG TAA ACA TC-3	BECKER;ROTH;PETERS, 2008	Enterotoxina D
<i>tsst-1</i>	Iniciador 1: 5-AAG CCC TTT GTT GCT TGC G-3 Iniciador 2: 5-ATC GAA CTT TGG CCC ATA CTT T-3	BECKER;ROTH;PETERS, 2008	Toxina 1 da Síndrome do Choque tóxico

4.12.1. Análise dos produtos amplificados por PCR

Os produtos de amplificação das reações de PCR para a detecção de genes de virulência e resistência aos diferentes fármacos testados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% em tampão TBE 1X (Tris-borato-EDTA) [100mM Tris-base; 2,0 mM de solução 0,5 EDTA (pH 8,0) e 50 mM ácido bórico] a 85 mV durante 1 hora. Juntamente com o tampão de amostra foi adicionado Gel Red® de acordo com a recomendação do fabricante. Após a corrida, os géis foram observados em transluminador ultravioleta. Para a determinação do tamanho dos produtos amplificados pela PCR foi incluído em cada gel um marcador de tamanho molecular 100pb DNA ladder (Promega, EUA).

4.13. Determinação do tipo de cassette *SCCmec*

Para a identificação do tipo de cassette *SCCmec* nas amostras de SCN, o protocolo de Oliveira & de Lencastre (2002) foi utilizado. As sequências dos iniciadores utilizados para a amplificação dos genes, assim como o tamanho dos produtos esperados, são mostradas na tabela 4.

A reação para a detecção destes genes ocorreu no formato multiplex, empregando-se no preparo dos reagentes, o kit Promega®, MADISON-WI USA, de acordo com as recomendações do fabricante e dos autores acima citados.

Os *amplicons* foram visualizados em gel de agarose a 2,0%. Juntamente com o tampão de amostra foi adicionado Gel Red® de acordo com a recomendação do fabricante. Após a corrida, os géis foram observados em transluminador ultravioleta. Para a determinação do tamanho dos produtos amplificados pela PCR foi incluído em cada gel um marcador de tamanho molecular (100pb DNA ladder, Promega, EUA).

25

30

Tabela 4: Iniciadores para as reações de PCR para genes de detecção do cassete *SCCmec*

Locus	Iniciadores	Sequências 5' – 3'	Referências
A	CIF2 F2 CIF2R2	5-TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG-3 5-ATTTACCACAAGGACTACCAGC-3	OLIVEIRA & DE LENCASTRE, 2002
B	KDP F1 KDP R1	5-AATCATCTGCCATTGGTGATGC-3 5-CGAATGAAGTGAAAAGAAAGTGG-3	OLIVEIRA & DE LENCASTRE, 2002
C	MECI P2 MECI P3	5-ATCAAGACTTGCATTTCAGGC-3 5-GCGGTTTCAATTCACCTTGTC-3	OLIVEIRA & DE LENCASTRE, 2002
D	DCS F2 DCS R1	5-CATCCTATGATAGCTTGGTC-3 5-CTAAATCATAGCCATGACCG-3	OLIVEIRA & DE LENCASTRE, 2002
E	RIF4 F3 RIF4 F9	5-GTGATTGTTCGAGATATGTGG-3 5-CGCTTTATCTGTATCTATCGC-3	OLIVEIRA & DE LENCASTRE, 2002
F	RIF4 F3 RIF4 F9	5-TTCTTAAAGTACACGCTGAATCG-3 5-GTCACAGTAATCCATCAATGC-3	OLIVEIRA & DE LENCASTRE, 2002
G	IS431 P4 pUB110 R1	5-CAGGTCTCTTCAGATCTACG-3 5-GAGCCATAAACACCAATAGCC-3	OLIVEIRA & DE LENCASTRE, 2002
H	IS431 P4 pT181 R1	5-CAGGTCTCTTCAGATCTACG-3 5-GAAGAATGGGGAAAGCTTCAC-3	OLIVEIRA & DE LENCASTRE, 2002
Controle interno <i>mecA</i>	MECA P4 MECA P7	5-TCCAGATTACAACCTTCACCAGG-3 5-CCACTTCATATCTTGTAACG-3	OLIVEIRA & DE LENCASTRE, 2002

Os quatro principais tipos de *SCCmec* são facilmente distinguíveis. O tipo I apresenta duas bandas com tamanhos de 495 e 342 bp. O tipo II apresenta quatro bandas com tamanhos de 381, 342, 284 e 209 bp. O tipo III apresenta quatro bandas com tamanhos de 414, 303, 243 e 209 bp. Finalmente o tipo IV apresenta uma única banda com tamanho de 342 bp. A variante IA se distingue da I por possuir uma banda extra de 381 bp, enquanto a variante IIIA se difere pela ausência da banda de 303 bp e a IIIB se distingue pela ausência das bandas 303 e 414 bp (OLIVEIRA; DE LENCASTRE, 2002).

4.14. Análise hierárquica de *cluster*, teste do qui-quadrado e análise de correspondência

A análise hierárquica de grupos foi realizada utilizando o software SPSS.15.0 para Windows (Pacote Estatístico para Ciências Sociais – SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) a fim de se identificar grupos de amostras com diferentes perfis genotípicos e fenotípicos. A distância Euclidiana entre cada par observado foi utilizado como um instrumento para medir similaridades entre os grupos e o método Ward de agrupamento hierárquico foi utilizado para congregar amostras similares (HAIR et al., 2003; JAIN; MURTY; FLYNN, 1999).

A análise hierárquica de grupos envolve três fases separadas. A primeira fase divide o total de amostras em subgrupos menores. A segunda verifica se os subgrupos formados são significativamente diferentes. A terceira gera o perfil dos grupos, descrevendo as características de cada grupo em termos dos aspectos genotípicos e fenotípicos (JAIN; MURTY; FLYNN, 1999).

O teste de qui-quadrado (χ^2) foi aplicado a fim de se avaliar a frequência de distribuição dos genes e das características fenotípicas avaliadas em um nível de significância de 5%. A análise de correspondência foi realizada utilizando o software SAS System para Windows 9.2 (Sistema de Análise Estatística – SAS Instituto Inc., Cary, NC, EUA) em um nível de significância de 5% para se visualizar as relações entre os agrupamentos formados. Nessa técnica descritiva e exploratória, as características e os grupos são representados de forma espacial, provendo um mapa perceptual.

25

30

5.0. RESULTADOS

5.1. Identificação fenotípica das amostras

Todas as espécies do grupo SCN foram caracterizadas fenotipicamente como cocos Gram-positivos, coagulase e DNase negativos. E pelas análises de identificação automatizada, um total de 59 amostras pertencentes a sete espécies do gênero *Staphylococcus* foi detectado: 35,5% (n=21) foram identificadas como *S. haemolyticus*, 25,4% (n=15) como *S. epidermidis*, 22,0% (n=13) como *S. hominis*, 10,1% (n=6) como *S. warneri*, 3,3% (n=2) como *S. equorum* e 1,6% (n=1) como *S. auricularis* e 1,6% (n=1) *S. cohnii* (Figura 6).

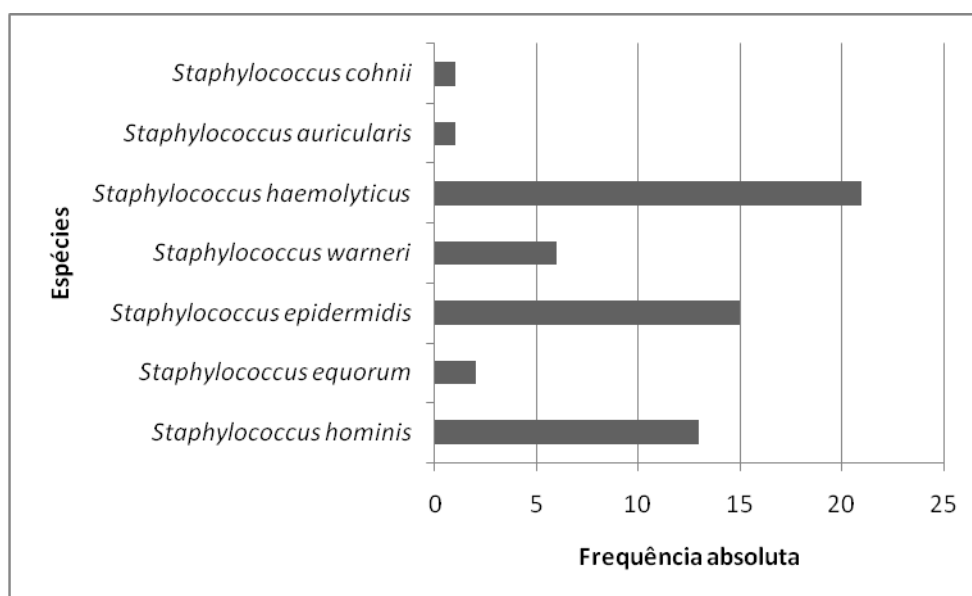


Figura 6: Identificação fenotípica automatizada das amostras isoladas de pacientes com infecção de corrente sanguínea (frequência absoluta) obtidas nos diferentes hospitais de Belo Horizonte. Um total de 59 linhagens pertencentes a sete espécies do gênero *Staphylococcus* foram analisadas: 35,5% foram identificadas como *S. haemolyticus*, 25,4% como *S. epidermidis*, 22,0% como *S. hominis*, 10,1% como *S. warneri*, 3,3% como *S. equorum* e 1,6% como *S. auricularis* e 1,6% como *S. cohnii*

Com relação à frequência absoluta de espécies isoladas em cada hospital (Figura 7), pode-se perceber que houve números iguais de *S. hominis* e *S. haemolyticus* no Hospital Santa Casa (SC); um maior número de *S. hominis* no Hospital Semper (S); *S. epidermidis* no Hospital Odilon Behrens (OB) e *S. haemolyticus* nos Hospitais das Clínicas (HC) e João XXIII (FHE).

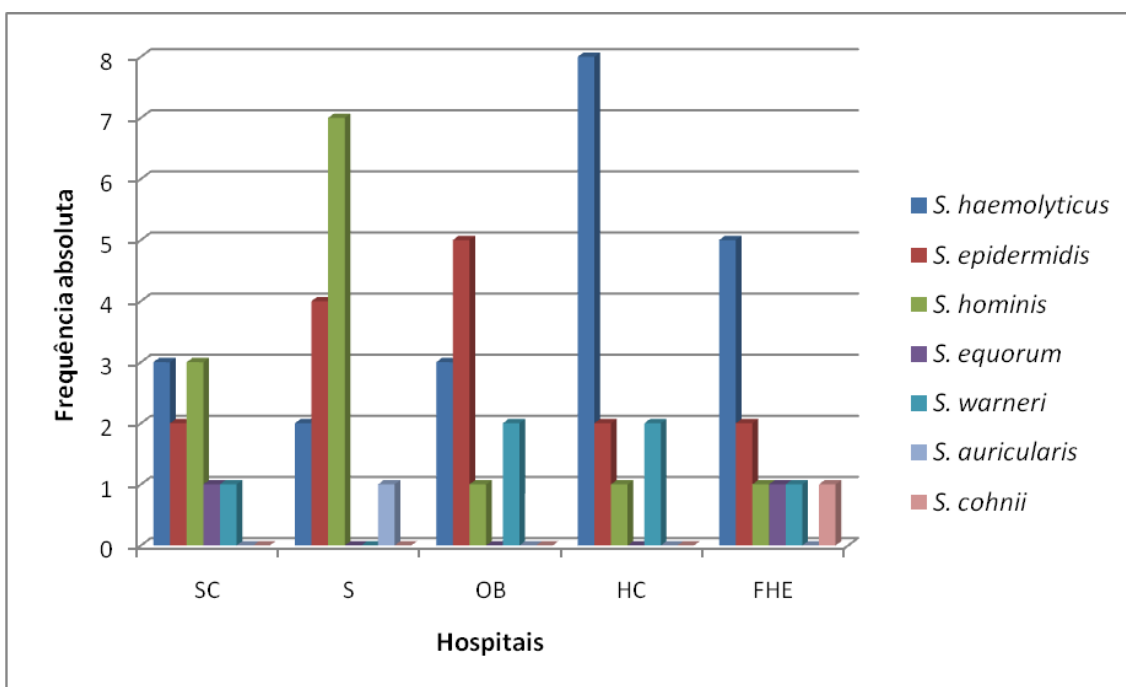


Figura 7: Análise da frequência absoluta das espécies isoladas de cada hospital analisado. Houve números iguais de *S. hominis* e *S. haemolyticus* no Hospital Santa Casa (SC); um maior número de *S. hominis* no Hospital Semper (S); *S. epidermidis* no Hospital Odilon Behrens (OB) e *S. haemolyticus* nos Hospitais das Clínicas (HC) e João XXIII (FHE).

5.2. Determinação das linhagens de SCN isoladas pela técnica de rep-PCR

10

Todas as linhagens analisadas foram tipificáveis usando o iniciador (GTG)₅ e os produtos de PCR variaram de 250 a 5000 pb. A maioria das amostras apresentou perfil de impressão digital próximo. No entanto, a variabilidade na presença de algumas bandas influenciou na análise final do agrupamento e vários clusters foram formados nas mesmas espécies (Figura 8).

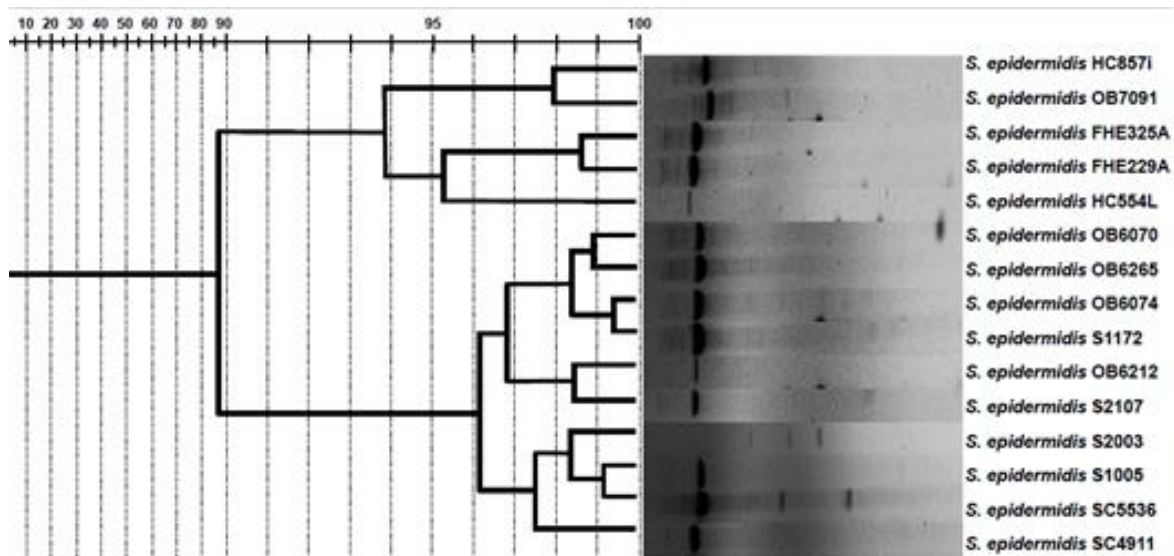
15

O grupo de *S. epidermidis* foi dividido em nove conjuntos: 857i e 7091; 325A e 229A; 554L; 6070 e 6265; 6074 e 1172; 6212 e 2107; 2003; 1005 e 5536; 4911. As duas linhagens de *S. equorum* foram divididas em dois *clusters* diferentes: 0006A e 4096. O grupo de *S. haemolyticus* foi dividido em quinze grupos: 332A e 568i; 018B e 0008A; 321B; 093ABC; 2048; 597 e 6625; 721i; 0675; 871i e 6157; 696L; 630i; 474 e 471i; 1123; 6298 e 6271; 5768. O grupo de *S. hominis* foi dividido em nove conjuntos: 1159 e 1016; 320; 296L; 5781; 1142; 2092 e 1016; 2032 e 2008; 6313; 4595 e 4081. O

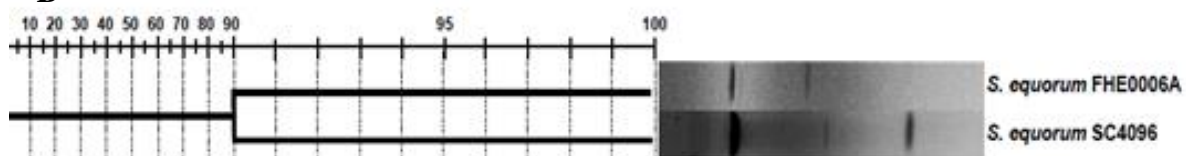
20

grupo de *S. warneri* foi dividido em quatro grupos: 227C; 523i e 5800; 588i e 6618; 5729.

A

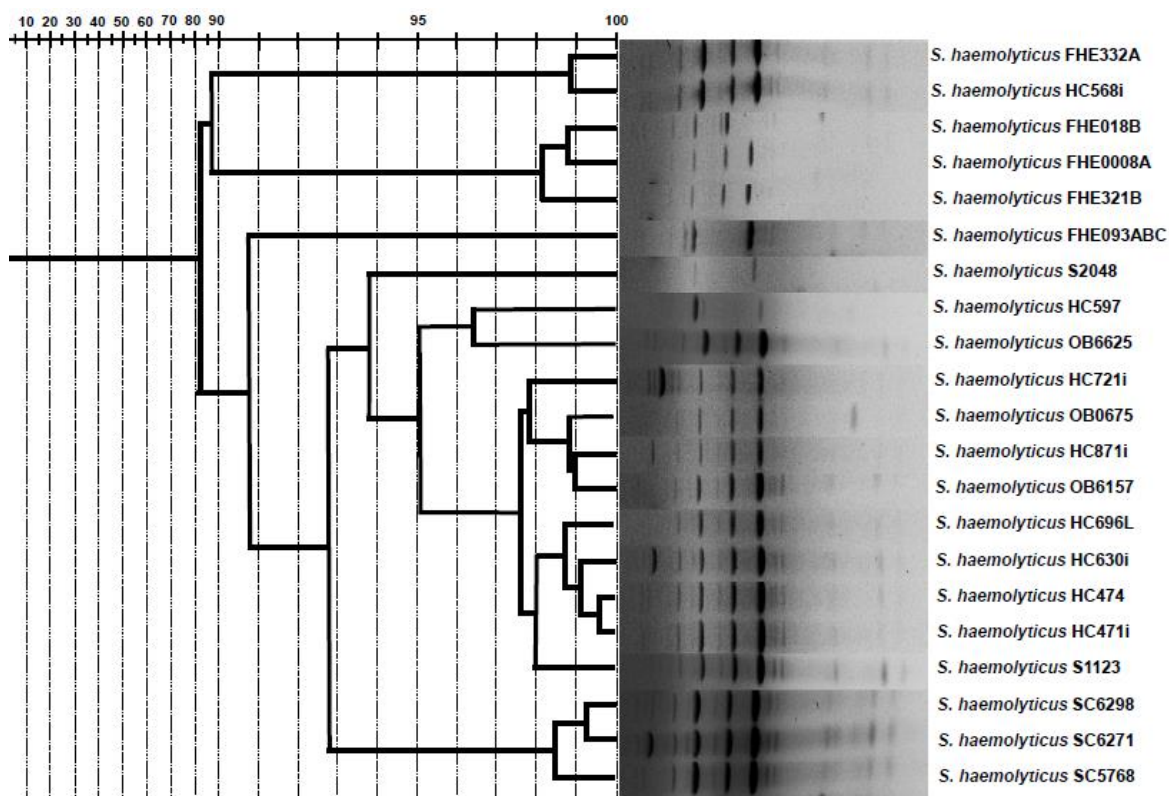


B



5

C



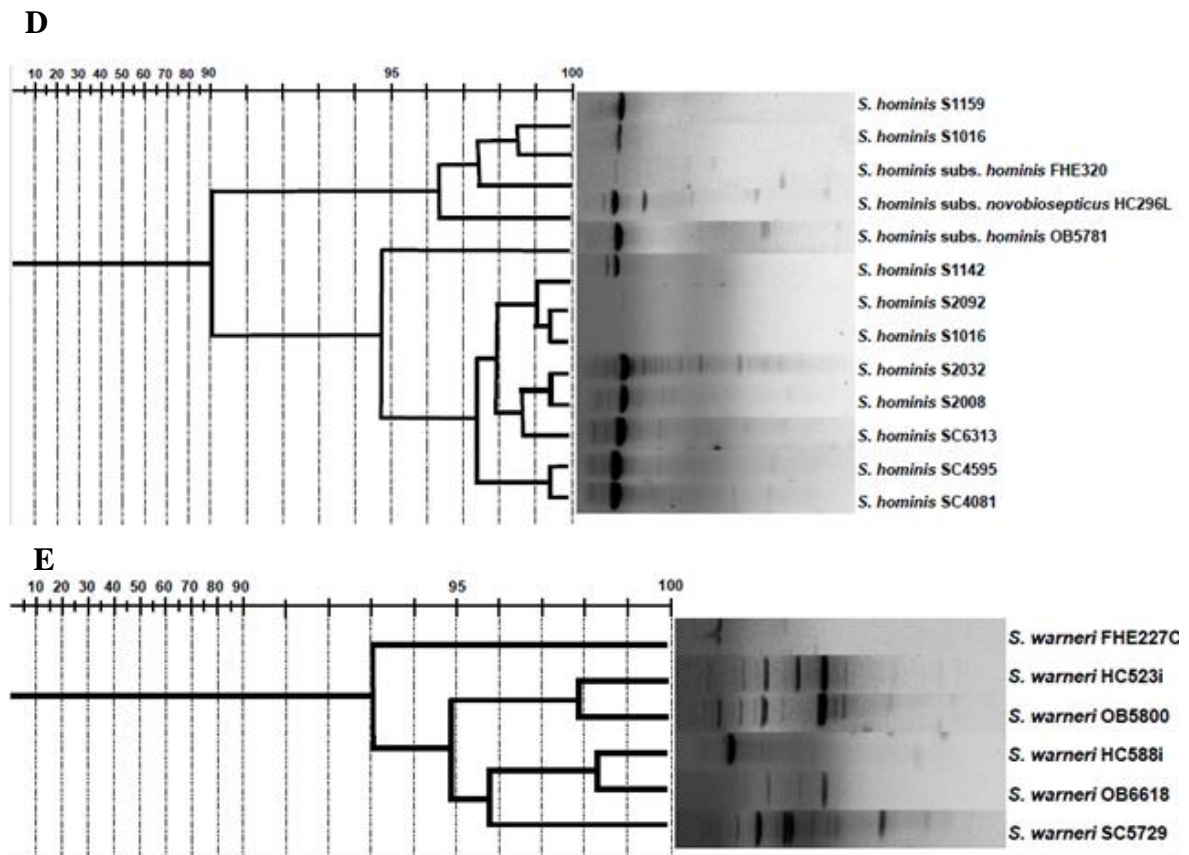


Figura 8: Filotipagem das amostras de *Staphylococcus* coagulase negativo avaliados no estudo (A. *S. epidermidis*; B. *S. equorum*; C. *S. haemolyticus*; D. *S. hominis*; E. *S. warneri*).

5.3. Concentração mínima inibitória dos (CIM)

Dos 59 amostras de SCN testados, 100% foram resistentes à benzilpenicilina; 91,5% à oxacilina; 35,5% à gentamicina; 64,4% à ciprofloxacina; 33,8% à moxifloxacina; 81,3% à norfloxacina; 86,4% à eritromicina; 74,5% à clindamicina, 3,3% à linezolida, teicoplanina e vancomicina (intermediário); 0% à tigeciclina, 15,2% ao ácido fusídico e rifampicina; 47,45% à trimetoprim/sulfametoxazol (Figura 9).

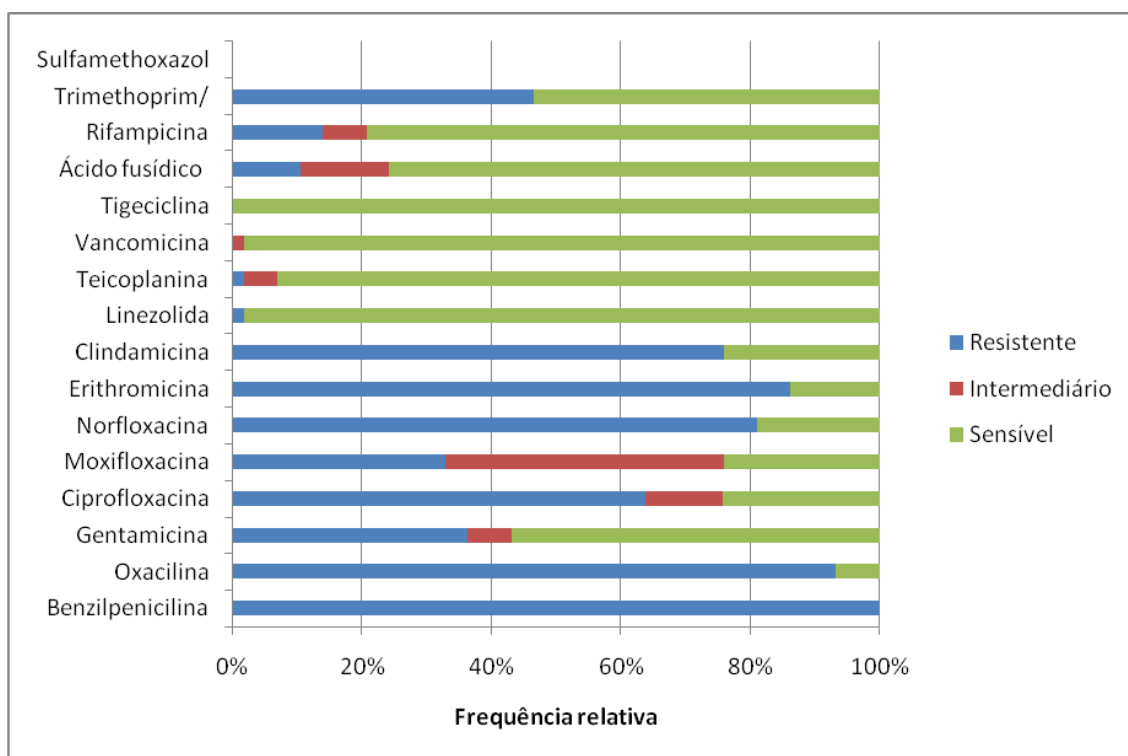


Figura 9: Perfil de susceptibilidade das amostras de SCN isoladas (frequência relativa). 100% foram resistentes à benzilpenicilina; 91,5% à oxacilina; 35,5% à gentamicina; 64,4% à ciprofloxacina; 33,8% à moxifloxacina; 81,3% à norfloxacina; 86,4% à eritromicina; 74,5% à clindamicina, 3,3% à linezolida, teicoplanina e vancomicina (intermediário); 0% à tigeciclina, 15,2% ao ácido fusídico e rifampicina; 47,45% à trimetoprim/sulfametoxazol.

Dentro do grupo analisado e com relação ao número de bactérias resistentes aos antimicrobianos avaliados de forma individual para cada hospital analisado, não houve grande diferença entre as frequências relativas encontradas para benzilpenicilina, linezolida, teicoplanina e vancomicina. No entanto, houve diferença entre as frequências relativas encontradas para oxacilina, moxifloxacina, norfloxacina, eritromicina, clindamicina, ácido fusídico, rifampicina e trimetoprim/sulfametoxazol (Tabela 5).

A fim de se efetuar a comparação realizada no parágrafo anterior foram consideradas mais similares diferenças de até 10% na frequência relativa encontrada.

Tabela 5: Frequência relativa das linhagens de *Staphylococcus* coagulase negativo resistentes aos antimicrobianos testados nos diferentes hospitais analisados.

ATB/Amostras	SC	S	OB	HC	FHE
Benzilpenicilina	100%	100%	100%	100%	100%
Oxacilina	81,80%	100%	91%	92,30%	91%
Gentamicina	27,20%	38,40%	27,20%	61,50%	45,40%
Ciprofloxacina	54,50%	92,30%	45,40%	76,90%	45,40%
Moxifloxacina	54,50%	23%	18,10%	38,40%	36,30%
Norfloxacina	81,80%	100%	63,60%	92,30%	45,40%
Eritromicina	81,80%	100%	81,80%	92,30%	81,80%
Clindamicina	72,70%	92,30%	63,60%	61,50%	91%
Linezolida	9%	7,70%	0%	0%	0%
Teicoplanina	9%	7,70%	0%	0%	0%
Vancomicina	0%	7,70%	0%	0%	0%
Tigeciclina	0%	0%	0%	0%	0%
Ácido Fusídico	18%	7,70%	9,09%	7,70%	36,30%
Rifampicina	18%	38,40%	0%	0%	18%
Trimetoprim/Sulfametoxazol	45,40%	46%	36,30%	69,20%	36,30%

Legenda: **SC** Hospital Santa Casa; **S** Hospital Semper; **OB** Hospital Odilon Behrens; **HC** Hospital das Clínicas; **FHE** Hospital de Pronto Socorro João XXIII.

5

5.4. Atividade hemolítica

Dos 59 amostras de SCN avaliados, 32 (54,2%) não apresentaram nenhum tipo de padrão de hemólise, enquanto que 27 (45,8%) apresentaram β -hemólise.

Com relação à distribuição dessa característica entre os hospitais avaliados, pôde-se observar que para os hospitais Santa Casa, Semper e Odilon Behrens houve um maior número de amostras não hemolíticas, enquanto que os Hospitais das Clínicas e João XXIII apresentaram um maior número de amostras apresentando β -hemólise (Figura 10).

10

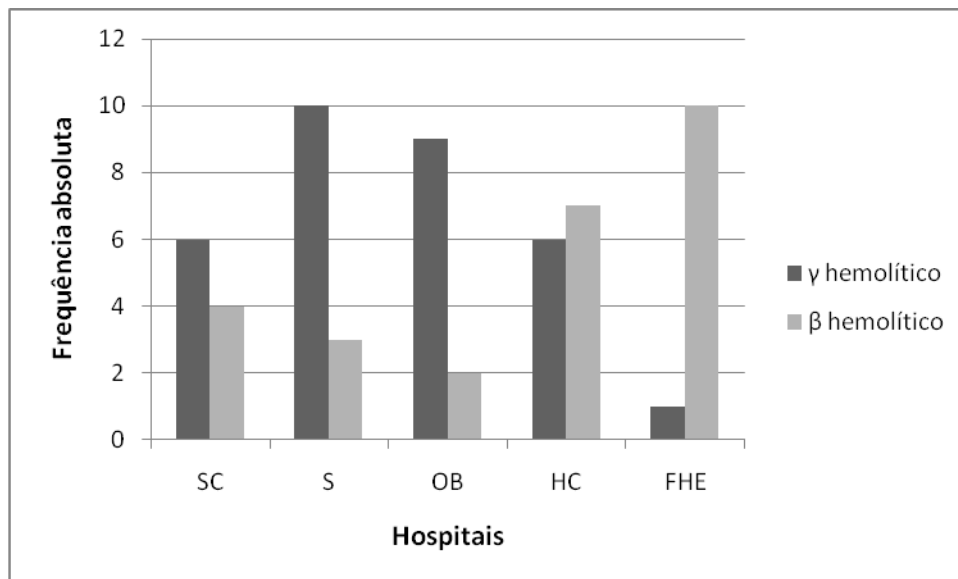


Figura 10: Frequência absoluta das amostras de SCN isolados nos diferentes hospitais com relação à capacidade hemolítica. Percebe-se que há um maior número de amostras apresentando γ -hemólise nos Hospitais Santa Casa, Semper e Odilon Behrens; enquanto que para os Hospitais das Clínicas e João XIII houve um maior número de amostras apresentando β -hemólise.

5.5. Produção de biofilme

Com relação à metodologia de avaliação da produção de biofilme em AVG, dos 59 amostras de SCN avaliados, 56 (95%) apresentaram colônias muito pretas – indicando serem bons produtores de biofilme, 1 (1,6%) apresentou colônias pretas – indicando formador fraco de biofilme, e 2 (3,4%) apresentaram colônias vermelhas – indicando que não são produtores de biofilme.

Com relação às análises por hospital, pôde-se perceber que todos as amostras isolados nos Hospitais Santa Casa, Odilon Behrens e das Clínicas foram bons produtores de biofilme, enquanto que no Hospital Semper, um amostra não foi produtor de biofilme; e no Hospital João XXIII, um amostra obteve uma fraca produção de biofilme e outra não teve tal capacidade. No entanto, em ambos os hospitais a maioria das linhagens foram boas produtoras de biofilme (Figura 11).

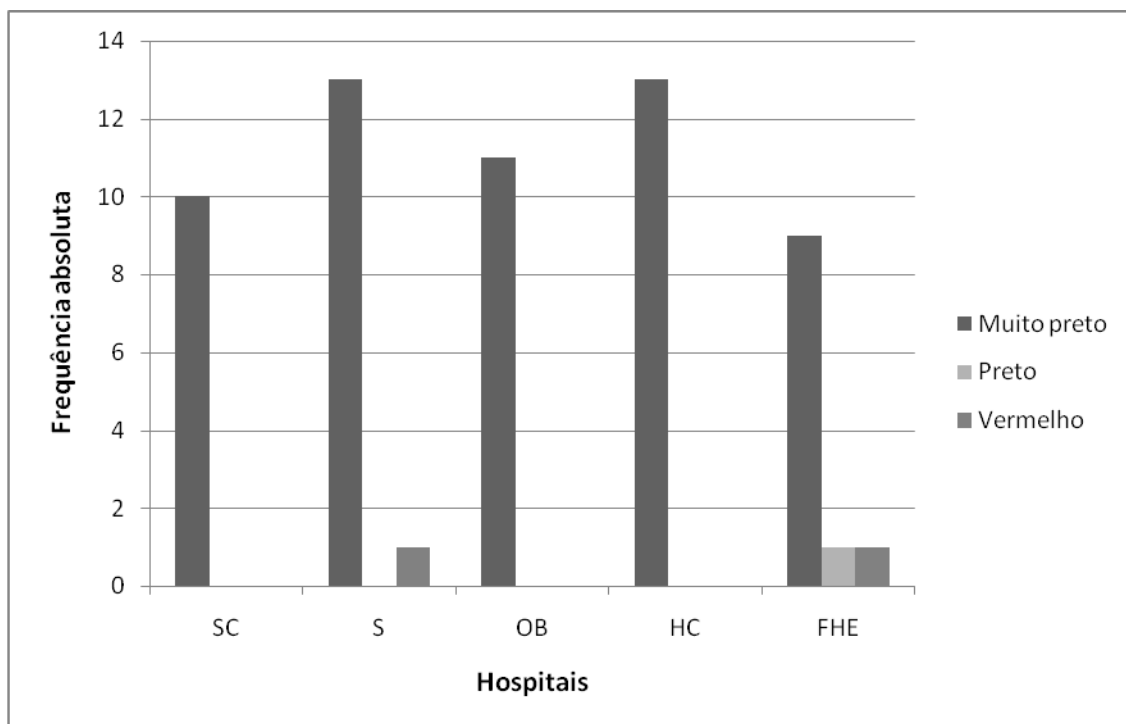


Figura 11: Formação de biofilme por *Staphylococcus* coagulase negativo em placa AVG (frequência absoluta). Todas as amostras isoladas nos Hospitais Santa Casa, Odilon Behrens e das Clínicas foram bons produtores de biofilme, enquanto que no Hospital Semper, uma amostra não foi produtor de biofilme; e no Hospital João XXIII, uma amostra obteve fraca produção de biofilme e outra não teve tal capacidade. No entanto, em ambos os hospitais a maioria das linhagens foram boas produtoras de biofilme.

Com relação à produção de biofilme em placa de poliestireno, todas as amostras apresentaram algum tipo de adesão – fraca, moderada ou forte - nos momentos avaliados (4h, 8h, 12h, 24h e 48h). Em 4h, 21 amostras (35,5%) não apresentaram adesão à placa de poliestireno, 35(59,3%) foram fracamente aderentes, 3 (5%) foram moderadamente aderente em nenhuma apresentou aderência forte. Em 8h, 6 amostras (10%) não apresentaram adesão à placa de poliestireno, 47 (79,6%) foram fracamente aderente, 5 (8,4%) foram moderadamente aderente e 1 (1,6%) foi fortemente aderente. Em 12h, 1 amostra (1,6%) não apresentou adesão à placa de poliestireno, 47 (79,6%) foram fracamente aderente, 9 (15,2%) foram moderadamente aderente e 2 (3,3%) foram fortemente aderente. Em 24h, todas as amostras apresentaram algum tipo de adesão: 47 (79,6%) foram fracamente aderente, 10(16,9%) foram moderadamente aderente e 2 (3,3%) foram fortemente aderente. Em 48h, 2 amostras não apresentaram aderência em placa de poliestireno, 54 (91,5%) foram fracamente aderente, 2(3,3%) foram moderadamente aderente e 1(1,6%) foram fortemente aderente (Figura 12).

De uma forma geral, a capacidade e o nível de adesão aumentaram com o tempo. No entanto, as amostras que apresentaram adesão moderada ou forte em 24h foram fracamente aderentes em 48h. Essa observação revela uma redução do nível de adesão no tempo de 48h.

5

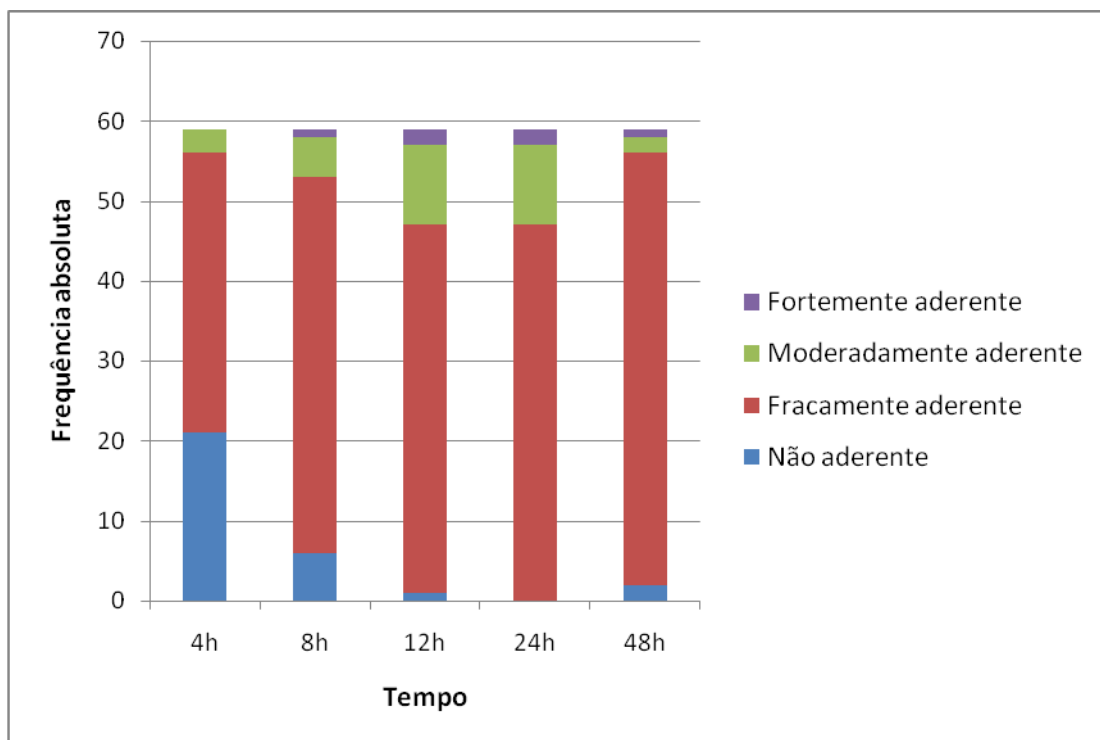


Figura 12: Avaliação da formação de biofilme por *Staphylococcus coagulase negativo* em placa de poliestireno em 4h, 8h, 12h, 24h e 48h (frequência absoluta). A capacidade e o nível de adesão aumentaram com o tempo. No entanto, as linhagens que apresentaram adesão moderada ou forte em 24h foram fracamente aderentes em 48h. Essa observação revela uma redução do nível de adesão no tempo de 48h.

10

15

Com relação às análises por hospital, no tempo de 4h, a maioria das amostras de SCN de todos os hospitais apresentou aderência fraca à placa de poliestireno, sendo que para os Hospitais Santa Casa, Semper e das Clínicas, houve uma maior proporção das linhagens fracamente aderentes e no Hospital das Clínicas, houve uma maior proporção de linhagens moderadamente aderentes. No Hospital Semper, houve uma maior proporção das linhagens não aderentes (Figura 13).

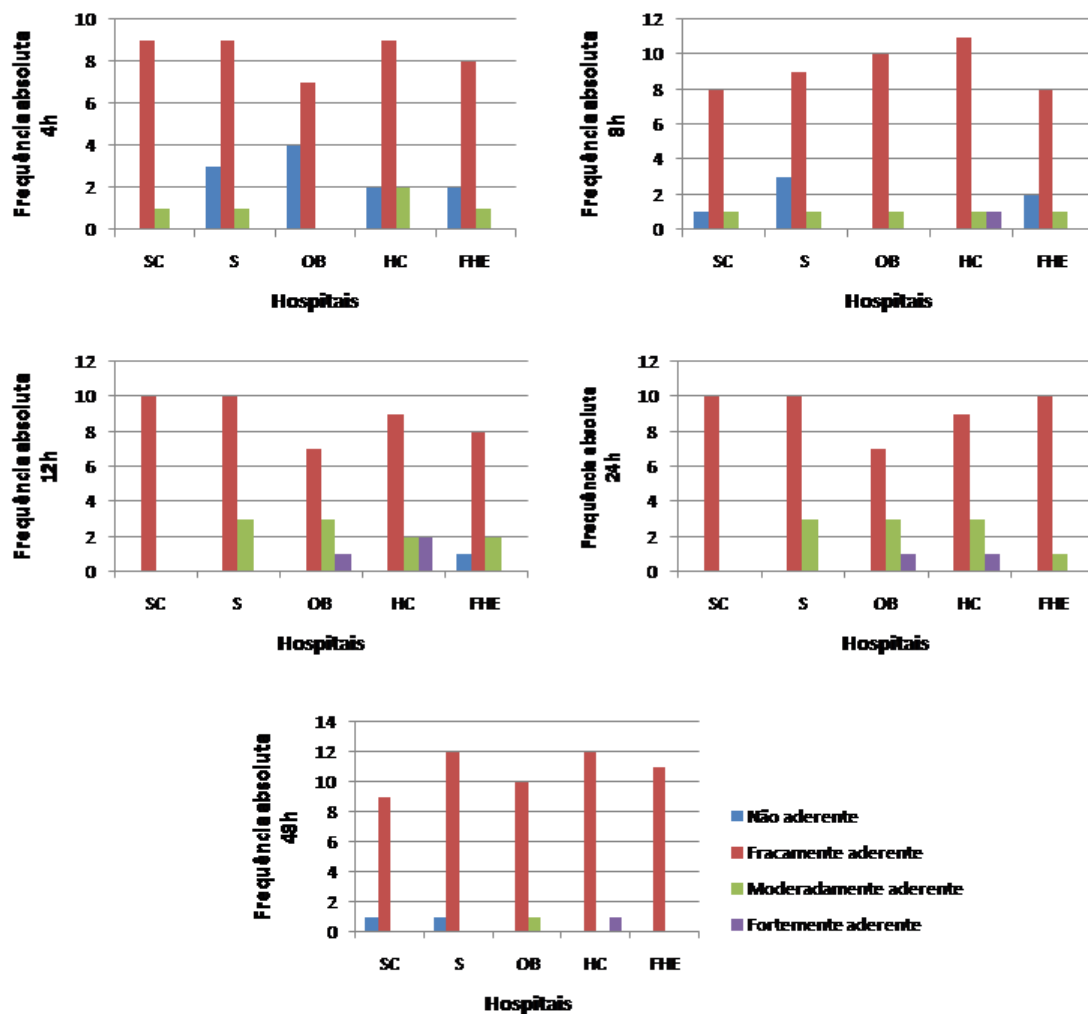


Figura 13: Aderência dos *Staphylococcus coagulase* negativo isolados à placa de poliestireno nos tempos de 4h, 8h, 12h, 24h e 48h em cada hospital estudado (frequência absoluta).

5 Já no tempo de 8h, a maioria das amostras de todos os hospitais permaneceu apresentando aderência fraca à placa de poliestireno, sendo que para o Hospital das Clínicas, houve uma maior proporção destas linhagens. De uma maneira geral, houve redução do número de linhagens não aderentes e aumento das fracamente aderentes, sendo que algumas linhagens isoladas do Hospital das Clínicas apresentaram adesão forte à placa de poliestireno.

10

No tempo de 12h, a maioria das amostras de todos os hospitais permaneceu apresentando aderência fraca à placa de poliestireno, sendo que para o Hospital Santa Casa houve uma maior proporção destas linhagens. Apenas alguns amostras isolados do Hospital João XXIII que continuaram a não se aderir à placa. Houve uma redução do

número de amostras que obteve adesão moderada no Hospital Santa Casa, sendo que todos apresentaram adesão fraca neste momento. No entanto, para as amostras isoladas dos outros hospitais, houve uma redução da proporção dos fracamente aderentes e um aumento dos moderadamente aderentes, sendo que alguns amostras isolados do hospital
5 Odilon Behrens, além das do Hospital das Clínicas, apresentaram adesão forte à placa de poliestireno.

No tempo de 24h, a maioria das amostras permaneceu apresentando adesão fraca à placa de poliestireno, sendo que houve uma maior proporção destas linhagens no Hospital Santa Casa (todas as linhagens deste Hospital permaneceram a apresentar
10 adesão fraca). As amostras isoladas do Hospital Semper e Odilon Behrens permaneceram apresentando a mesma proporção entre amostras fracamente e moderadamente aderentes. Já no Hospital das Clínicas, houve uma redução do número de amostras fortemente aderentes e um aumento dos moderadamente aderentes quando comparado ao encontrado no tempo de 12h. Para o Hospital João XXIII, houve um
15 aumento do número de amostras fracamente aderentes, e redução dos moderadamente aderentes – nesse tempo não houve amostras não aderentes.

No tempo de 48h, as amostras fracamente aderentes ainda foram as mais encontradas, sendo que de forma geral, houve uma redução do nível de aderência à placa de poliestireno nos diversos Hospitais avaliados. No Hospital Santa Casa e
20 Semper já apareceram amostras não aderentes novamente, enquanto que no Hospital Odilon Behrens e Hospital das Clínicas não se observaram amostras fortemente aderentes além de ter reduzido o número das moderadamente aderentes. Já no Hospital João XXIII, houve uma completa supressão do número das moderadamente aderentes – assim como observado para o Hospital das Clínicas - sendo que só as amostras
25 fracamente aderentes foram observadas nesse momento.

5.6. Produção de enterotoxinas e toxina do choque tóxico

Do total de amostras de SCN testados, apenas sete apresentaram resultado positivo para o teste de OSP – 4 foram positivos para a enterotoxina B, 1 foi positivo
30 para a enterotoxina C e duas foram positivos para a toxina do choque tóxico (TSST-1) (Figura 14). As enterotoxinas A e D também foram testadas, no entanto, nenhum amostra demonstrou resultado positivo.

Com relação ao kit VIDAS®, nenhum amostra demonstrou resultado positivo.

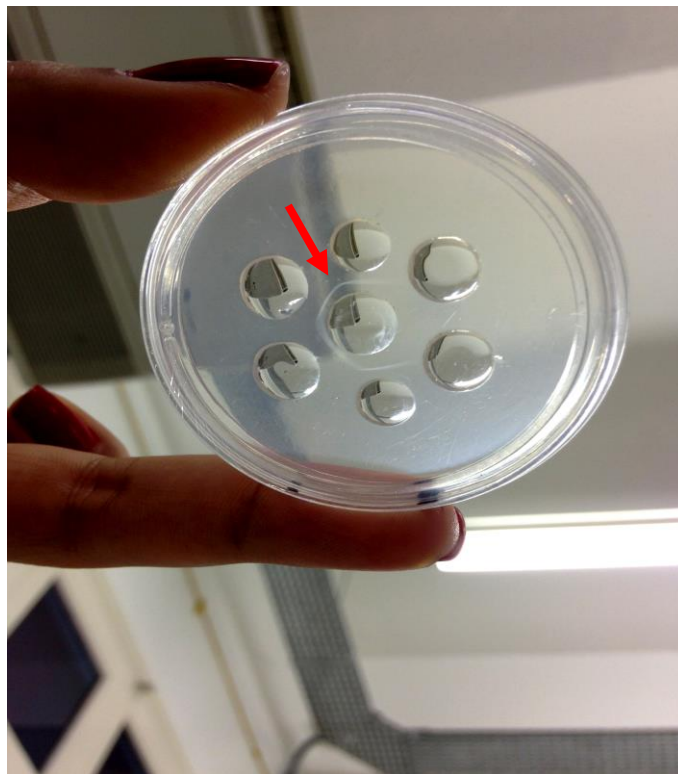


Figura 14: Teste OSP. A seta em vermelha salienta a linha branca que revela o resultado positivo de produção de enterotoxina B.

5.7. Marcadores genéticos da resistência das amostras de SCN avaliados

Com relação à caracterização genotípica de resistência, dos 59 amostras isolados, 24 (41%) apresentaram o gene *mecA*, nenhum apresentou o gene *vanA*, 46 (78%) apresentaram o gene *blaZ*, 25 (42%) apresentaram o gene *ermA*, 59 (100%) apresentaram o gene *ermB*, 14 (24%) apresentaram o gene *ermC* e 18 (30%) apresentaram o gene *aac-aphD* (Figura 15).

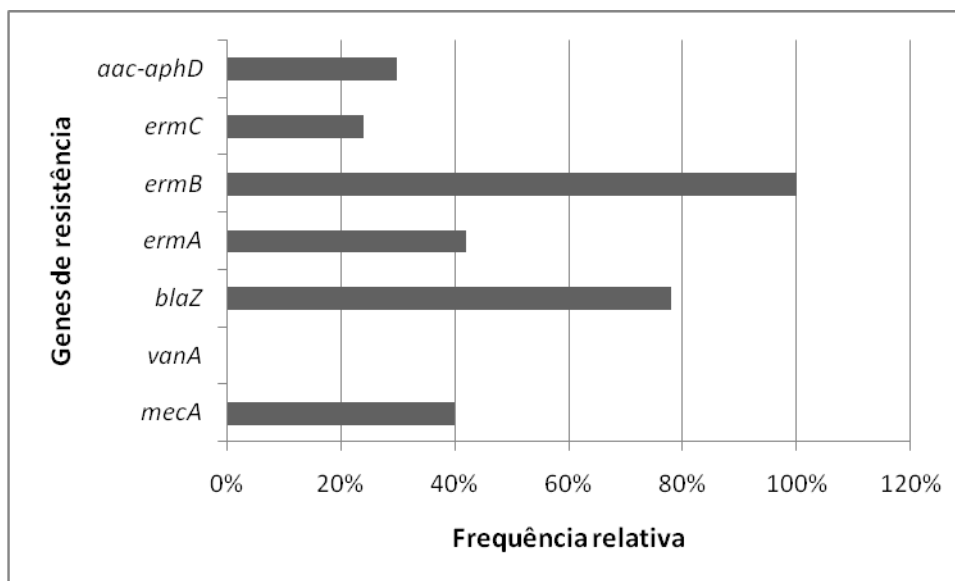


Figura 15: Caracterização genética da resistência nas amostras de SCN avaliados (frequência relativa). 41% apresentaram o gene *mecA*, nenhuma apresentou o gene *vanA*, 78% apresentaram o gene *blaZ*, 42% apresentaram o gene *ermA*, 100% apresentaram o gene *ermB*, 24% apresentaram o gene *ermC* e 30% apresentaram o gene *aac-aphD*.

Com relação à caracterização por hospital, houve um número maior de amostras positivas para o gene *mecA* nos hospitais Santa Casa, das Clínicas e João XXIII (60%, 69%, 55% respectivamente). Enquanto que nos hospitais Semper e Odilon Behrens, as amostras negativas ocorreram em maior número. Com relação ao gene *blaZ*, houve um maior número de amostras positivas nos hospitais: Santa Casa, Odilon Behrens, das Clínicas e João XXIII (90%, 55%, 100%, 100%, respectivamente). Com relação aos genes relacionados à resistência à eritromicina, houve um número maior de amostras *ermA* negativas em quase todos os hospitais avaliados. Apenas no Hospital João XXIII houve um número maior de amostras positivas (73%). O gene *ermB* foi amplamente encontrado nas amostras estudadas, e com relação ao gene *ermC*, houve um maior número de amostras negativas em quase todos os hospitais avaliados. Com relação ao gene *aac-aphD* houve um número maior de amostras positivas no Hospital Santa Casa (90%). Nos demais, o maior número de amostras foi negativo, sendo que nos Hospitais Semper e Odilon Behrens, encontrou-se apenas amostras negativas (Figura 16).

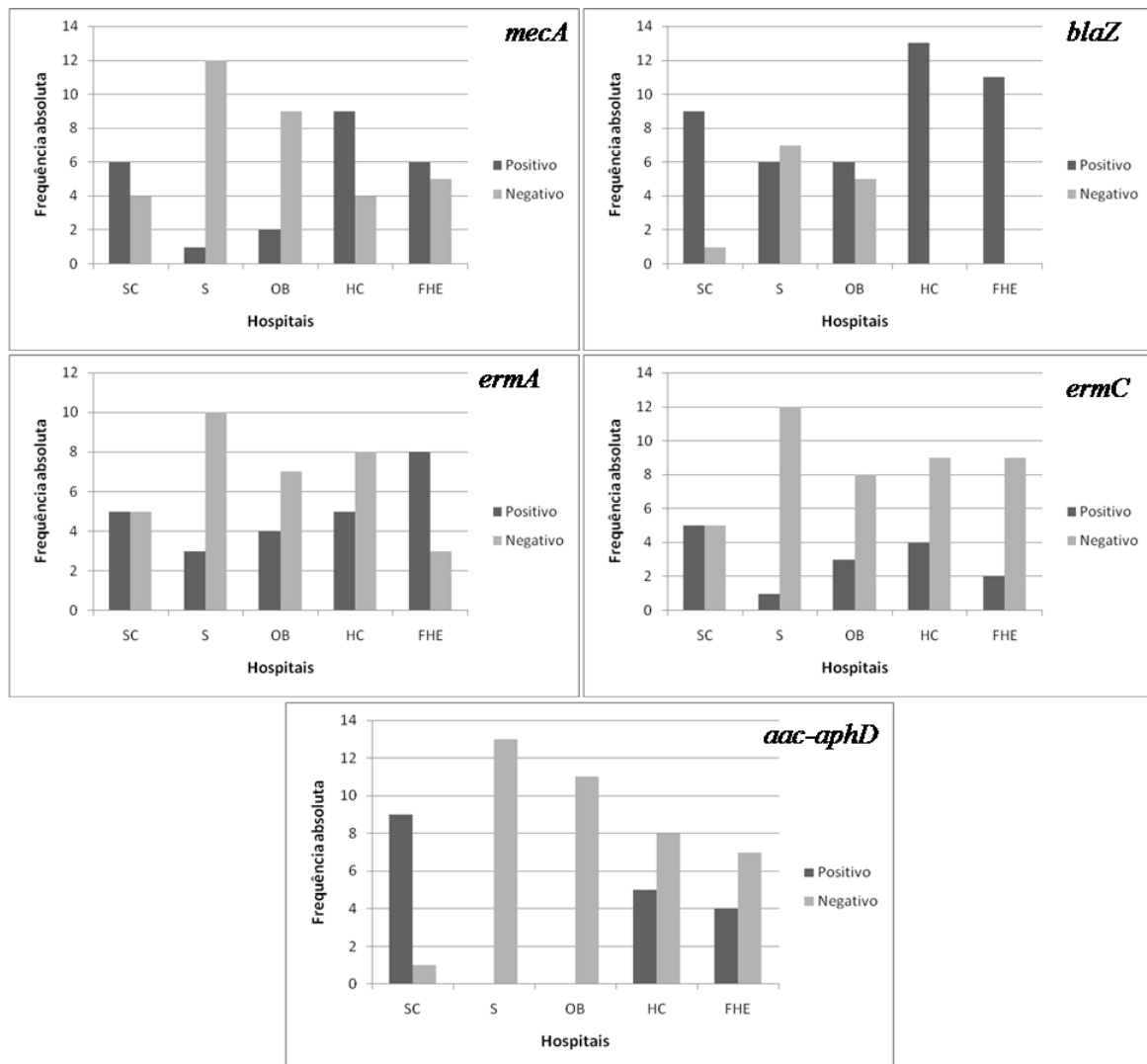


Figura 16: Frequência dos genes *mecA*, *blaZ*, *ermA*, *ermC* e *aac-aphD* isolados das amostras de SCN nos diferentes hospitais avaliados (frequência absoluta).

5 5.8. Caracterização genética da virulência e da presença do gene *agr* das amostras de SCN

Com relação à caracterização genotípica de virulência, dentre os 59 amostras de SCN isolados, 29 (49%) foram positivos para o gene *atlE*, 9 (15%) foram positivos para o gene *icaA*, 23 (39%) foram positivos para o gene *icaB*, 5 (8%) foram positivos para o gene *icaC*, 45 (76,2%) foram positivos para o gene *sea*, 14 (23,7%) foram positivos para o gene *sec*, 1 (1,7%) foram positivos para o gene *sed*, 18 (30,5%) foram positivos para o gene *tsst-1* e 23 (39%) foram positivos para o gene *agr* (Figura 17).

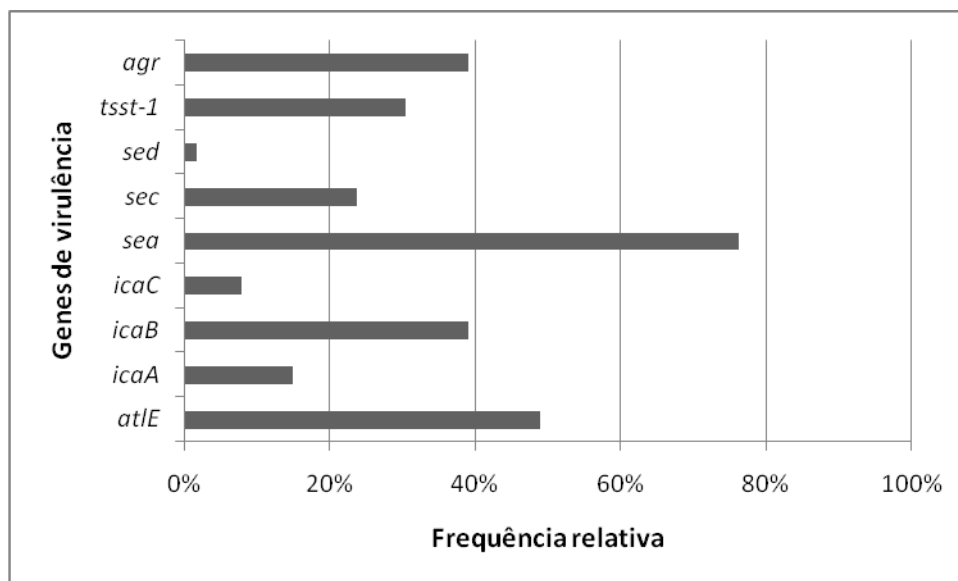


Figura 17: Caracterização genotípica das amostras de SCN com relação aos genes de virulência (frequência relativa). 49% foram positivos para o gene *atIE*, 15% foram positivos para o gene *icaA*, 39% foram positivos para o gene *icaB*, 8% foram positivos para o gene *icaC*, 76,2% foram positivos para o gene *sea*, 23,7% foram positivos para o gene *sec*, 1,7% foram positivos para o gene *sed*, 30,5% foram positivos para o gene *tsst-1* e 39% foram positivos para o gene *agr*.

Com relação à caracterização genética de formação de biofilme por hospital, houve um maior número de amostras positivos para o gene *atIE* no Hospital das Clínicas (69%). Nos Hospitais: Semper, Odilon Behrens e João XXIII houve um maior número de amostras negativos. Com relação ao gene *icaA*, houve um maior número de amostras negativos em todos os hospitais avaliados, sendo que todos as amostras do Hospital Santa Casa foram negativos. Com relação ao gene *icaB*, houve maior número de amostras positivos apenas no Hospital Semper (61,5%). Com relação ao gene *icaC*, houve maior número de amostras negativos em todos os hospitais avaliados, sendo que todos as amostras isoladas do hospital Semper e Odilon Behrens foram negativos (Figura 18).

Amostras positivas para os genes foram seqüenciadas para confirmação de sua positividade.

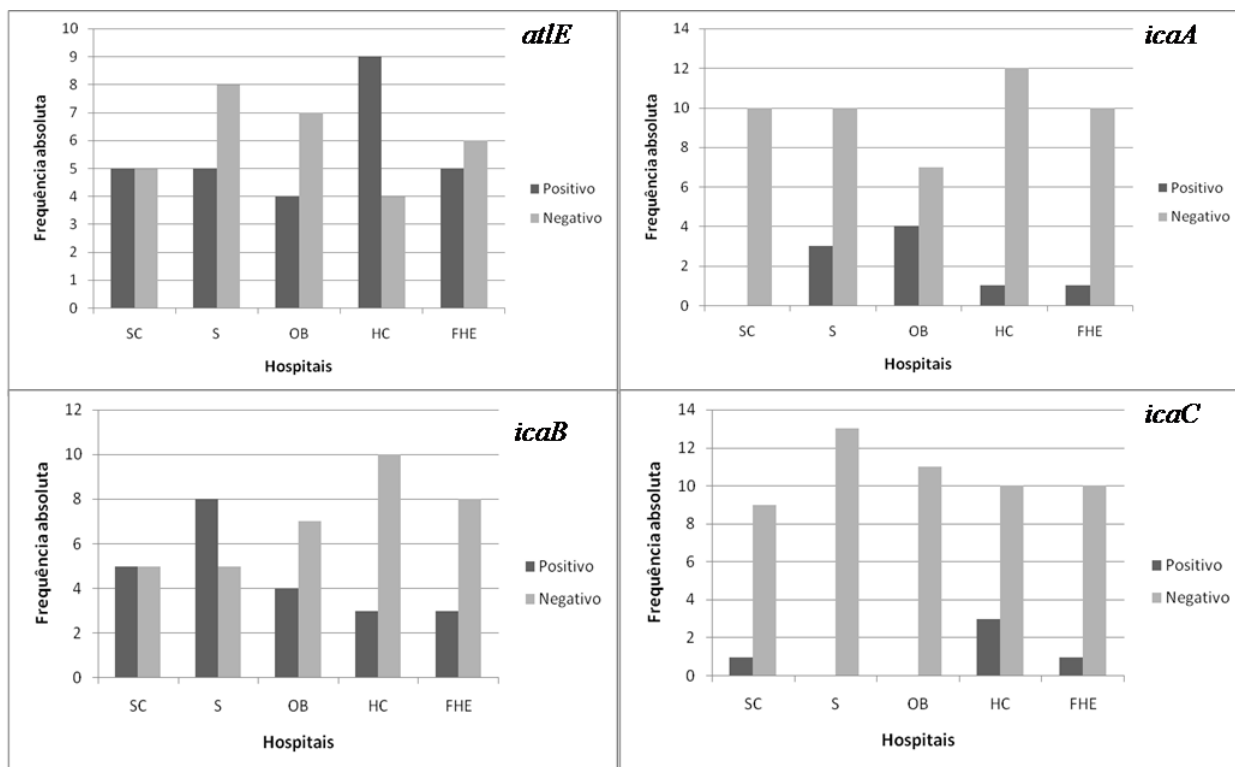


Figura 18: Frequência dos genes *atIE*, *icaA*, *icaB* e *icaC* nos diferentes hospitais avaliados (frequência absoluta).

5 Com relação à caracterização genética de produção de toxinas e *quorum sensing* por hospital, houve maior número de amostras positivos para o gene *seA* nos Hospitais: Semper, Odilon Behrens, das Clínicas e João XXIII (77%, 91%, 92%, 82%, respectivamente), enquanto no Hospital Santa Casa houve maior número de amostras negativos. Com relação ao gene *sec*, houve maior número das amostras negativos nos

10 Hospitais: Santa Casa, Odilon Behrens, das Clínicas e João XXIII, sendo que todos os exemplares isolados do Hospital Santa Casa foram negativos. A predominância no Hospital Semper foi de amostras positivos (69%). Com relação ao gene *sed*, apenas um amostra proveniente do Hospital Santa Casa foi positivo. Já para o gene *tsst-1*, houve maior número de amostras negativos nos Hospitais Santa Casa, Odilon Behrens, das

15 Clínicas e João XXIII. Já no Hospital Semper, houve maior número de amostras positivos (77%). Com relação ao gene relacionado ao *quorum-sensing*, houve maior número de amostras negativos nos hospitais: Santa Casa, Odilon Behrens, das Clínicas e João XXIII. Apenas no Hospital Semper, houve maior número de amostras positivos (54%) (Figura 19).

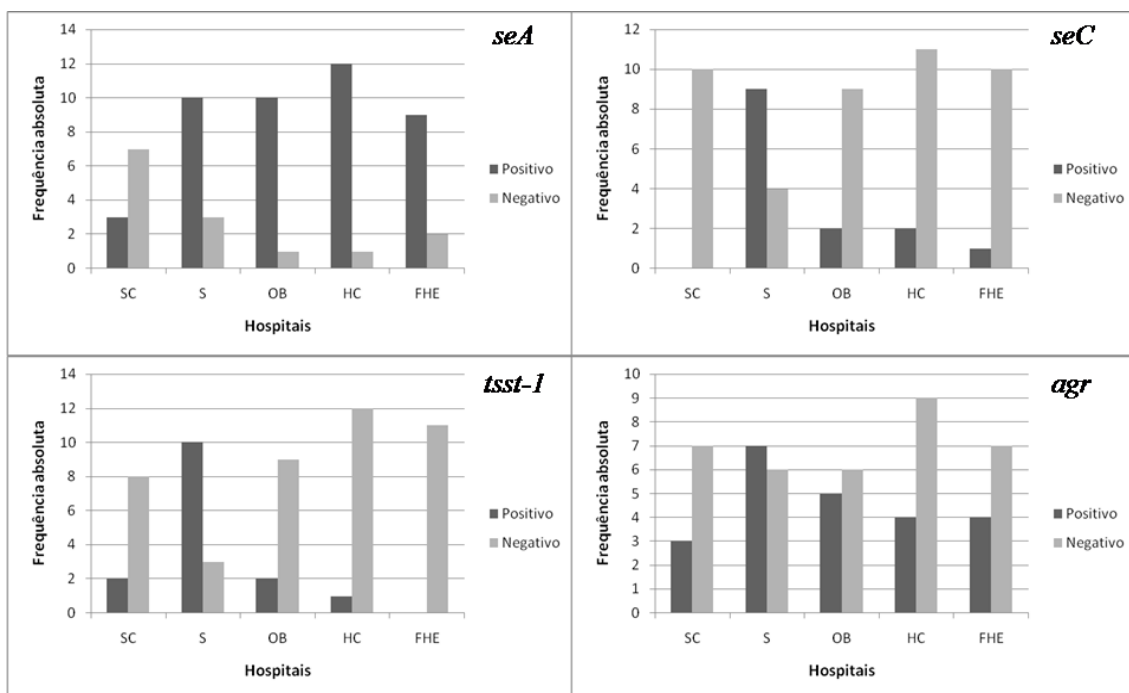


Figura 19: Frequência dos genes *sea*, *sec*, *tsst-1* e *agr* nos diferentes hospitais avaliados (frequência absoluta).

5

5.9. Determinação do tipo de cassete *SCCmec*

Com relação à determinação do tipo de cassete *SCCmec*, 3,4% apresentaram o tipo I, 5,0%; o tipo II, 27,1%; o tipo III, 20,3%; o tipo IIIA e 32,2%; o tipo IIIB (Figura 20).

10

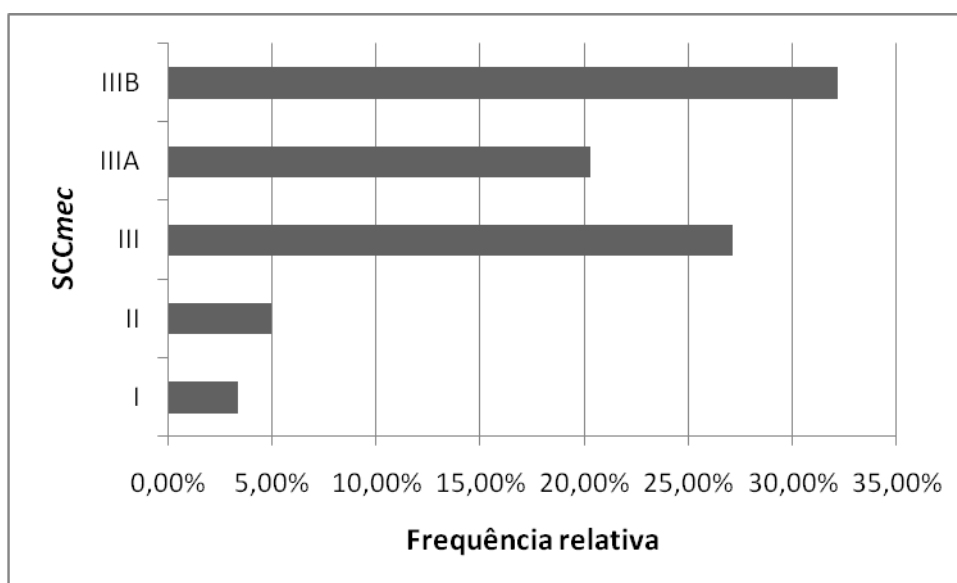


Figura 20: Determinação do tipo de cassete *SCCmec*.

Com relação à análise dos tipos de *SCCmec* por hospital, houve um maior número dos tipos III e IIIB no Hospital Santa Casa (40%). Já no Hospital Semper, houve maior número de do tipo IIIA (54%) e no Odilon Behrens, do tipo III (87,5%). Já nos Hospitais das Clínicas e João XXIII houve maior número do tipo IIIB (80%, 55,5%, respectivamente). Nenhum hospital apresentou os cinco tipos encontrados de forma geral e apenas no Hospital das Clínicas, encontrou-se o tipo I (Figura 21).

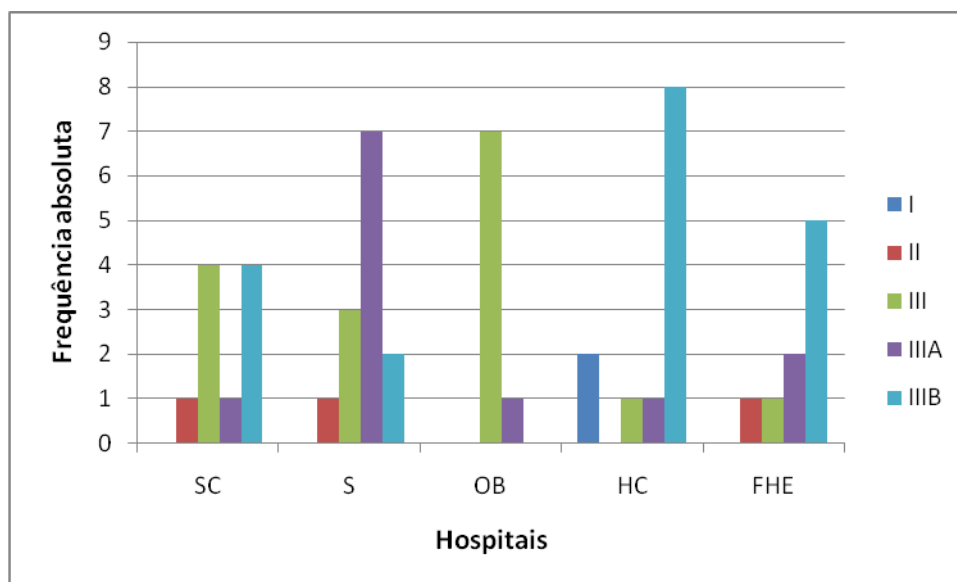


Figura 21: Determinação do tipo de cassete *SCCmec* das amostras de SCN de acordo com os diferentes hospitais avaliados. Houve um maior número dos tipos III e IIIB no Hospital Santa Casa. Já no Hospital Semper, houve maior número de do tipo IIIA, e no Odilon Behrens, do tipo III. Já nos Hospitais das Clínicas e João XXIII, houve maior número de do tipo IIIB.

5.10. Análise hierárquica de *cluster*, teste do qui-quadrado e análise de correspondência

As análises estatísticas foram realizadas para os fatores relacionados à patogenicidade de forma desmembrada das análises realizadas para os fatores relacionados à resistência a antimicrobianos.

No tocante às características de patogenicidade, as amostras de SCN foram classificados em seis grupos distintos e as frequências de distribuição de *agr* ($\chi^2 = 24.39$; $P < 0.001$), *atlE* ($\chi^2 = 34.37$; $P < 0.001$); *icaA* ($\chi^2 = 36.35$; $P < 0.001$), *icaB* ($\chi^2 = 15.14$; $P = 0.01$), *sea* ($\chi^2 = 19.16$; $P = 0.002$), *sec* ($\chi^2 = 32.65$; $P < 0.001$) e *tsst-1* ($\chi^2 = 27.62$; $P < 0.001$) diferiram em sua distribuição com relação à hipótese. Todavia, as frequências de distribuição de *icaC* ($\chi^2 = 3.88$; $P = 0.57$) e *sed* ($\chi^2 = 3.98$; $P = 0.55$) não diferiram.

Com relação à produção de biofilme, a frequência dos tempos: 4h ($\chi^2 = 40.32$; $P < 0.001$), 8h ($\chi^2 = 39.52$; $P = 0.001$), 12h ($\chi^2 = 43.42$; $P < 0.001$) e 24h ($\chi^2 = 37.22$; $P < 0.001$) diferiram. No entanto, a frequência do tempo 48h ($\chi^2 = 16.30$; $P = 0.36$) não diferiu.

5 Os perfis de cada grupo formado podem ser observados nas tabelas 6 e 7. A fim de se estabelecer uma descrição das amostras, o grupo foi considerado positivo ou negativo quando apresentou 70% ou mais em uma determinada característica. Observa-se que o grupo um apresentou 12 amostras negativos para todos os genes investigados e que apresentaram adesão fraca relativa ao biofilme, em todos os tempos. O grupo dois
10 apresentou 13 amostras negativos para os genes *icaA*, *icaC*, *sec*, *sed*, *tsst-1* e positivos para o gene *atlE*, exibindo adesão fraca em todos os tempos avaliados. Contudo, 23% das amostras exibiram adesão moderada em 8h e 12h que regrediu no tempo de 24h. O grupo três apresentou seis amostras negativos para *agr*, *atlE*, *icaC*, *sed* e positivos para *sea*, *sec* e *tsst-1*, exibindo adesão fraca em todos os tempos avaliados. O grupo quatro
15 apresentou 12 amostras negativos para *icaA*, *icaC*, *sec*, *sed*, *tsst-1* e positivos para *sea*, exibindo adesão fraca em todos os momentos avaliados. No entanto, 16,7% das amostras apresentaram adesão moderada em 24h regredindo no tempo de 48h. O grupo cinco apresentou nove amostras negativos para *icaB*, *icaC*, *sed* e positivos para *agr*, *atlE*, *icaA* e *sea*, exibindo adesão fraca em todos os tempos avaliados. Apesar disso,
20 11% das amostras apresentaram adesão moderada em 8h e 24h, enquanto que 22,2% apresentaram esse mesmo tipo de adesão em 12h. O grupo seis apresentou sete amostras negativos para *atlE*, *icaA*, *icaC*, *sed* e positivos para *icaB*, *sea* e *tsst-1*, exibindo perfil diversificado do nível de adesão nos tempos avaliados. Todavia, este foi o único grupo que apresentou adesão forte à placa de poliestireno.

25

30

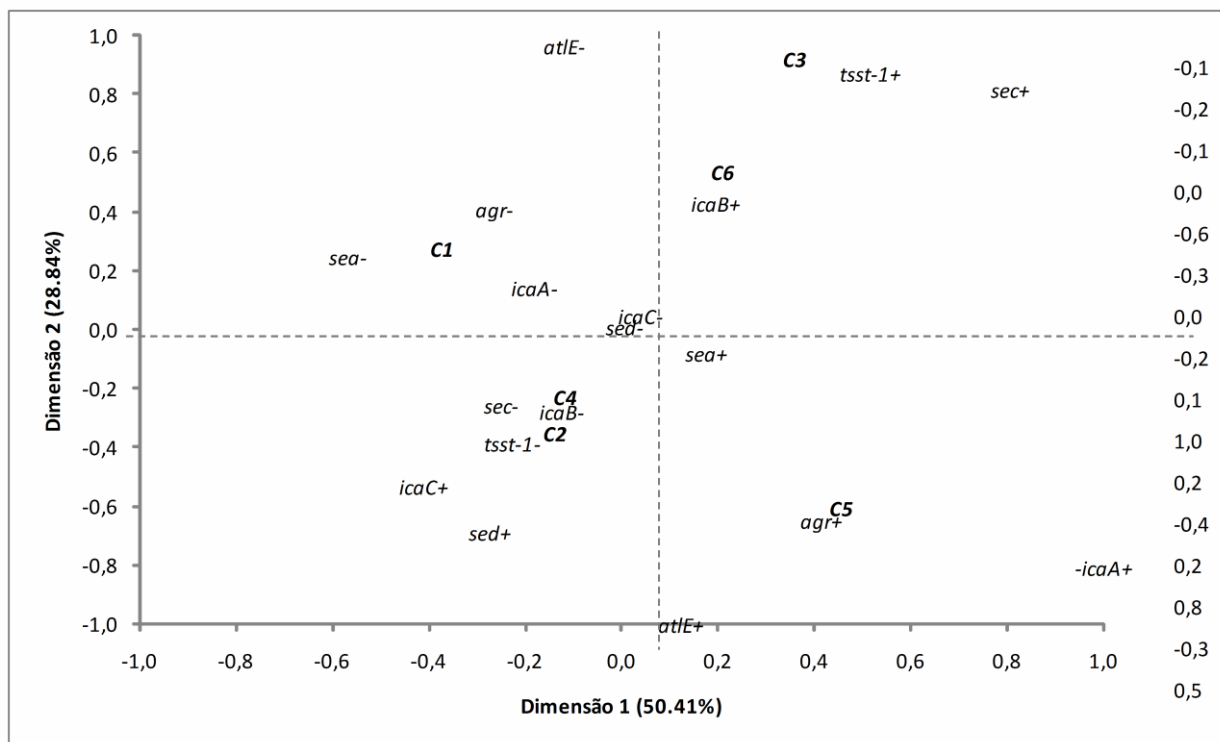
Tabela 6: Perfil molecular de cada grupo formado, relativo aos fatores de virulência avaliados

Grupo	N	Categoria (%)	agr	atlE	icaA	icaB	icaC	sea	sec	sed	tsst-1
1	12	-	100,00	100,0	100,0	91,7	91,7	66,7	100,0	100,0	100,0
		+	0,00	0,0	0,0	8,3	8,3	33,3	0,0	0,0	0,0
2	13	-	69,23	7,7	100,0	69,2	84,6	30,8	100,0	100,0	76,9
		+	30,77	92,3	0,0	30,8	15,4	69,2	0,0	0,0	23,1
3	6	-	83,33	100,0	66,67	33,3	100,0	0,0	16,7	100,0	0,0
		+	16,67	0,0	33,33	66,7	0,0	100,0	83,3	0,0	100,0
4	12	-	58,33	41,7	100,0	50,0	83,3	8,3	100,0	91,7	91,7
		+	41,67	58,3	0,0	50,0	16,7	91,7	0,0	8,3	8,3
5	9	-	0,00	11,1	22,2	77,8	100,0	0,0	44,4	100,0	66,67
		+	100,00	88,9	77,8	22,2	0,0	100,0	55,6	0,0	33,33
6	7	-	42,9	71,4	100,0	14,3	100,0	14,3	42,9	100,0	28,6
		+	57,1	28,6	0,0	85,7	0,0	85,7	57,1	0,0	71,4

Tabela 7: Perfil de formação de biofilme de cada grupo avaliado

Grupo	N	Categoria (%)	4h	8h	12h	24h	48h
1	12	Não Aderente	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		Fracamente Aderente	100,0	100,0	91,7	83,3	91,7
		Moderadamente Aderente	0,0	0,0	8,3	16,7	8,3
		Fortemente Aderente	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	13	Não Aderente	23,1	0,0	0,0	0,0	0,0
		Fracamente Aderente	69,2	76,9	76,9	100,0	100,0
		Moderadamente Aderente	7,7	23,1	23,1	0,0	0,0
		Fortemente Aderente	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3	6	Não Aderente	33,3	0,0	0,0	0,0	0,0
		Fracamente Aderente	66,7	100,0	100,0	100,0	100,0
		Moderadamente Aderente	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		Fortemente Aderente	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4	12	Não Aderente	100,0	50,0	8,3	0,0	8,3
		Fracamente Aderente	0,0	50,0	91,7	83,3	91,7
		Moderadamente Aderente	0,0	0,0	0,0	16,7	0,0
		Fortemente Aderente	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5	9	Não Aderente	33,3	0,0	0,0	0,0	11,1
		Fracamente Aderente	66,7	88,9	77,8	88,9	88,9
		Moderadamente Aderente	0,0	11,1	22,2	11,1	0,0
		Fortemente Aderente	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
6	7	Não Aderente	14,3	0,0	0,0	0,0	0,0
		Fracamente Aderente	57,1	71,4	0,0	0,0	71,4
		Moderadamente Aderente	28,6	14,3	57,1	71,4	14,3
		Fortemente Aderente	0,0	14,3	42,9	28,6	14,3

A análise de correspondência permitiu avaliar a relação entre os grupos formados de acordo com as características de patogenicidade por meio do mapa perceptual resultante (Figura 22). As duas dimensões explicaram 79,25% da



variabilidade dos dados experimentais.

- 5 **Figura 22:** Mapa Perceptual gerado a partir das características de virulência das amostras. C1: grupo 1; C2: grupo 2; C3: grupo 3; C4: grupo 4; C5: grupo 5 e C6: grupo 6.

Os perfis de cada grupo formado podem ser observados nas tabelas 8, 9 e 10. Observa-se que o grupo 1 apresentou 16 amostras resistentes para benzilpenicilina, oxacilina, norfloxacina, eritromicina e clindamicina. Foram sensíveis para gentamicina, linezolid, teicoplanina, vancomicina, tigeciclina, rifampicina e trimetropim/sulfametoxazol. Além disso, apresentaram o gene *mecA*, *blaZ* e *ermB*; mas foram negativos para a presença dos genes: *vanA* e *ermC*. O grupo 2 apresentou 17 amostras resistentes à benzilpenicilina, oxacilina, gentamicina, ciprofloxacina, norfloxacina, eritromicina, clindamicina, trimetropim/sulfametoxazol. Foram sensíveis à linezolid, teicoplanina, vancomicina, tigeciclina, ácido fusídico e rifampicina. Ademais, exibiram os genes *blaZ* e *ermB* e foram negativos para o gene *vanA*. O grupo 3 apresentou 8 amostras resistentes à benzilpenicilina e sensíveis à gentamicina,

ciprofloxacina, moxifloxacina, norfloxacina, eritromicina, clindamicina, linezolida, teicoplanina, vancomicina, tigeciclina, ácido fusídico, rifampicina, trimetropim/sulfametoxazol. Além disto, exibiram o gene *ermB*, mas foram negativos para os genes *mecA*, *vanA* e *aac-aphD*. O grupo 4 apresentou 2 amostras resistentes à benzilpenicilina, oxacilina, ciprofloxacina, moxifloxacina, norfloxacina, eritromicina, clindamicina, linezolida, teicoplanina, vancomicina, ácido fusídico, rifampicina e trimetropim/sulfametoxazol. Ademais, foram sensíveis à gentamicina e tigeciclina. Ainda, exibiram os genes *blaZ* e *ermB* e foram negativos para os genes: *mecA*, *vanA*, *ermA*, *ermC* e *aac-aphD*. O grupo 5 apresentou 9 amostras resistentes à benzilpenicilina, oxacilina, ciprofloxacina, norfloxacina, eritromicina e clindamicina. Além disso, apresentaram perfil intermediário para moxifloxacina e foram sensíveis para gentamicina, linezolida, teicoplanina, vancomicina, tigeciclina e ácido fúsidico. Ademais, esses exibiram o gene *ermB* e foram negativos para os genes *mecA*, *vanA*, *ermA*, *ermC* e *aac-aphD*. O grupo 6 apresentou 7 amostras resistentes à benzilpenicilina, oxacilina, ciprofloxacina, norfloxacina e eritromicina. Foram sensíveis para linezolida, teicoplanina, vancomicina, tigeciclina, ácido fusídico e rifampicina. Além disso, exibiram o gene *ermB* e foram negativos para os genes: *mecA*, *vanA*, *ermC* e *aac-aphD*.

20 **Tabela 8:** Perfil molecular de cada grupo

Grupos	N	Categorias	<i>mecA</i>	<i>vanA</i>	<i>blaZ</i>	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>	<i>aac</i>
1	16	-	25,0	100,0	0,0	37,5	0,0	93,8	62,5
		+	75,0	0,0	100,0	62,5	100,0	6,3	37,5
2	17	-	35,3	100,0	11,8	52,9	0,0	58,8	35,3
		+	64,7	0,0	88,2	47,1	100,0	41,2	64,7
3	8	-	100,0	100,0	37,5	62,5	0,0	37,5	100,0
		+	0,0	0,0	62,5	37,5	100,0	62,5	0,0
4	2	-	100,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	100,0
		+	0,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	0,0
5	9	-	100,0	100,0	55,6	88,9	0,0	88,9	100,0
		+	0,0	0,0	44,4	11,1	100,0	11,1	0,0
6	7	-	85,7	100,0	42,9	57,1	0,0	100,0	85,7
		+	14,3	0,0	57,1	42,9	100,0	0,0	14,3

Tabela 9: Perfil molecular do tipo de cassete *SCCmec* de cada grupo

Grupo	N	Categorias	Tipo	Tipo (%)
1	16	Ausente	0	0,0
		I	0	0,0
		II	1	6,3
		III	7	43,8
		IIIA	3	18,8
		IIIB	5	31,3
2	17	Ausente	0	0,0
		I	0	0,0
		II	1	5,9
		III	3	17,6
		IIIA	2	11,8
		IIIB	11	64,7
3	8	Ausente	3	37,5
		I	1	12,5
		II	0	0,0
		III	3	37,5
		IIIA	1	12,5
		IIIB	0	0,0
4	2	Ausente	0	0,0
		I	0	0,0
		II	0	0,0
		III	0	0,0
		IIIA	1	50,0
		IIIB	1	50,0
5	9	Ausente	0	0,0
		I	0	0,0
		II	0	0,0
		III	2	22,2
		IIIA	5	55,6
		IIIB	2	22,2
6	7	Ausente	4	57,1
		I	1	14,3
		II	1	14,3
		III	1	14,3
		IIIA	0	0,0
		IIIB	0	0,0

Tabela 9: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de cada grupo de SCN avaliado

Grupos	N	Categorias	Benzil	Oxa	Genta	Cipro	Moxi	Norf	Erit	Clind	Linez	Teico	Vanco	Tige	AF	Rifa	Trime	Sulfa	
1	16	S	0,0	0,0	87,5	43,8	37,5	25,0	12,5	12,5	100,0	100,0	100,0	100,0	56,3	87,5	100,0	100,0	
		I	0,0	6,3	0,0	18,8	31,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,3	6,3	0,0	0,0
		R	100,0	93,8	12,5	37,5	31,3	75,0	87,5	87,5	87,5	0,0	0,0	0,0	0,0	37,5	6,3	0,0	0,0
2	17	S	0,0	0,0	5,9	0,0	0,0	0,0	0,0	11,8	100,0	100,0	100,0	100,0	82,4	82,4	0,0	0,0	
		I	0,0	0,0	11,8	5,9	52,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	17,6	5,9	0,0	0,0
		R	100,0	100,0	82,4	94,1	47,1	100,0	100,0	88,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	11,8	100,0	100,0
3	8	S	0,0	50,0	75,0	87,5	100,0	87,5	75,0	87,5	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	87,5	87,5	
		I	0,0	0,0	0,0	12,5	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
		R	100,0	50,0	25,0	0,0	0,0	0,0	12,5	25,0	12,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	12,5	12,5
4	2	S	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		I	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
		R	100,0	100,0	0,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0	100,0	100,0	100,0	100,0
5	9	S	0,0	0,0	77,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	77,8	100,0	100,0	77,8	44,4	55,6	55,6	
		I	0,0	0,0	11,1	11,1	77,8	0,0	0,0	0,0	0,0	22,2	0,0	0,0	22,2	11,1	0,0	0,0	
		R	100,0	100,0	11,1	88,9	22,2	100,0	100,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	44,4	44,4	44,4	
6	7	S	0,0	0,0	57,1	0,0	0,0	0,0	0,0	57,1	100,0	85,7	100,0	100,0	85,7	85,7	42,9	42,9	
		I	0,0	0,0	14,3	14,3	57,1	0,0	0,0	0,0	0,0	14,3	0,0	0,0	0,0	14,3	0,0	0,0	
		R	100,0	100,0	28,6	85,7	42,9	100,0	100,0	42,9	0,0	0,0	0,0	0,0	14,3	0,0	57,1	57,1	

A análise de correspondência permitiu avaliar a relação entre os grupos formados de acordo com as características de resistência aos antimicrobianos testados por meio do mapa perceptual resultante (Figura 23). As duas dimensões explicaram 66,5% da variabilidade dos dados experimentais. As características ficaram muito
5 próximas no mapa perceptual, e dessa forma, números foram dados a fim de compreendê-lo melhor (vide legenda).

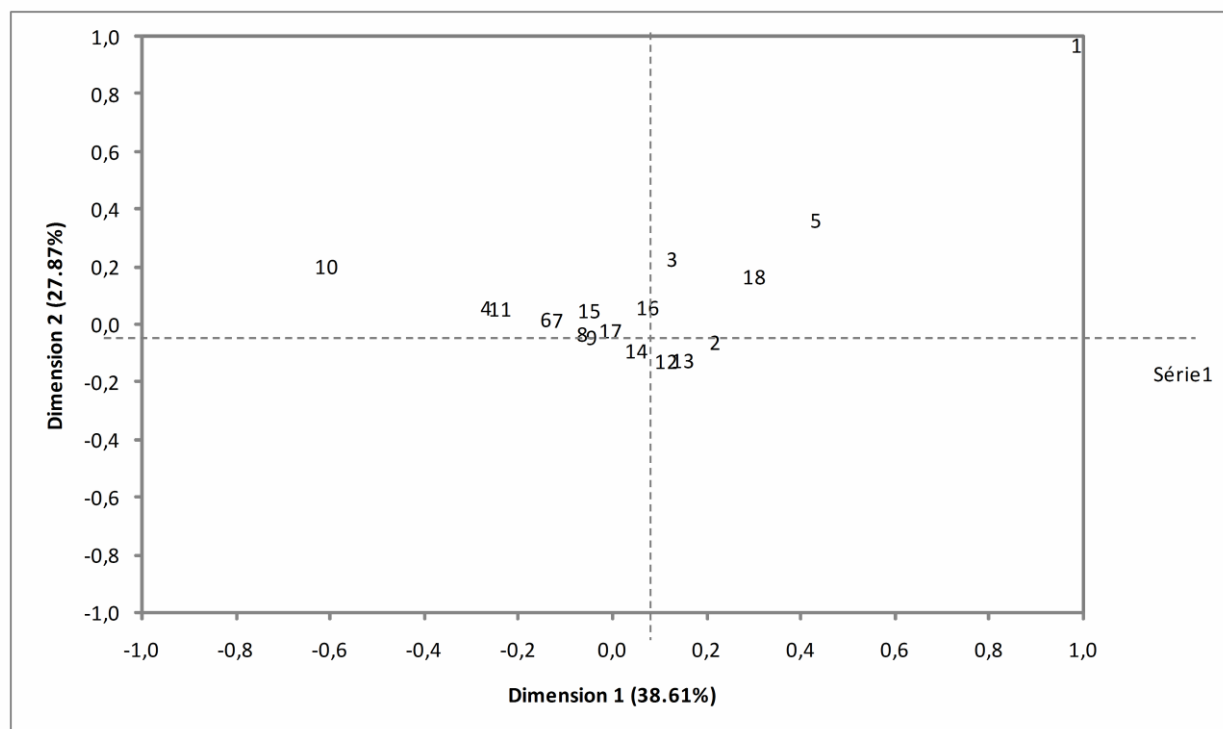


Figura 23: Mapa Perceptual gerado a partir das características de resistência a antimicrobianos dos exemplares. Legenda: 1- Resistência à linezolida, vancomicina e teicoplanina. 2- Resistência à rifampicina. 3- Resistência à trimetropim/sulfametoxazol. 4- Resistência ao ácido fusídico. 5- Sensibilidade à oxacilina. 6- Sensibilidade à eritromicina. 7- Sensibilidade à ciprofloxacina, moxifloxacina e Sensibilidade à trimetropim/sulfametoxazol. 10-Resistência à moxifloxacina e tipo de cassete SCCmec IIIB. 11- Resistência à ciprofloxacina, gentamicina, norfloxacina, eritromicina e clindamicina; perfil intermediário à gentamicina, ácido fusídico e moxifloxacina; grupo 2, ausência do gene *aac-aphD*. 12- ausência do gene *mecA*, perfil intermediário à teicoplanina e rimfampicina, resistência à oxacilina, tipo de cassete *SCCmec II*, grupo 5. 13- Tipo de cassete SCCmec IIIA e presença do gene *ermA*. 14-Presença do gene *ermC*, ausência do gene *blaZ* e *ermB*, sensibilidade à tigeciclina e resistência à benzilpenicilina. 15- Presença do gene *mecA*, *aac-aphD* e sensibilidade à gentamicina. 16- Grupo 6, sensilidade à linezolida, vancomicina, teicoplanina, ácido fusídico e rifampicina; ausência do gene *ermA* e

ermC. 17- Grupo 1, presença do gene *blaZ*, perfil intermediário à ciprofloxacina e tipo de cassette *SCCmecIII*.18-Grupo4.

6.0. DISCUSSÃO

A capacidade do gênero *Staphylococcus* de colonizar e infectar hospedeiros humanos e outros animais exerce um papel fundamental no desenvolvimento de infecções nosocomiais (CHAIEB; MAHDOUANI; BAKHROUF, 2005; BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014). O grupo SCN se configura como um dos principais patógenos isolados de infecções de corrente sanguíneas associadas a dispositivos médicos, como cateteres e meningites associadas a drenagens (HETEM, [s.d.]; NANOUKON et al., 2017).

De forma geral, *S. epidermidis* representa a espécie mais frequentemente associada a infecções, seguida por *S. hominis*, *S. haemolyticus* e *S. capitis* (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014). No entanto, em nosso estudo a espécie mais comum foi *S. haemolyticus*, seguida por *S. epidermidis* e *S. hominis*. Foi possível isolar inclusive, espécies menos frequentes, como *S. warneri*, *S. cohnii*, *S. auricularis* e *S. equorum*.

As espécies *S. warneri* e *S. cohnii* são colonizadores frequentes da pele e cabelos de seres humanos (SHAMOTO et al., 2015), enquanto *S. auricularis* habita a região externa de ouvidos humanos (KLOOS; SCHLEIFER, 1983). Dessa maneira, essas regiões são as possíveis fontes da infecção nosocomial causada por esses micro-organismos.

No entanto, *S. equorum* não é observado na microbiota normal de seres humanos e sua aparição como patógeno nosocomial está relacionada a contatos prévios com animais. *S. equorum* é resistente a novobiocina e é mais frequentemente isolado de cavalos saudáveis, leite de cabra e culturas *starter* (NOVÁKOVÁ et al., 2006; PLACE et al., 2003). Poucos exemplares foram encontrados em pacientes com blefarite crônica, conjuntivite purulenta e ceratite supurativa (PINNA et al., 1999). Apesar do número baixo desse micro-organismo no ambiente hospitalar, não se pode subestimá-lo uma vez que alberga genes de resistência a inúmeros antimicrobianos e de virulência, assim como observados neste trabalho (MIKULASOVÁ et al., 2014; FARAH, 2007).

Apesar da frequência geral das espécies encontradas, houve diferenças com relação às frequências individuais de cada hospital. Na Santa Casa e Semper, houve um maior número de *S. hominis*; Odilon Behrens, de *S. epidermidis* e Hospital das Clínicas e João XXIII, de *S. haemolyticus*. No entanto, torna-se impraticável uma comparação ou possível suposição sobre o porquê das dessemelhanças encontradas, já que se trata de hospitais que atendem perfis diferentes de pacientes e não houve acesso aos dados dos enfermos, nem da terapia antimicrobiana utilizada anteriormente.

Além da caracterização fenotípica das espécies, uma análise genotípica também foi realizada a fim de se distinguir linhagens dentro do grupo de micro-organismos isolados. Para isso, foi utilizada a técnica de *rep*-PCR, que se baseia na amplificação de segmentos repetitivos do genoma bacteriano. Iniciadores complementares à sequências GTG₅ têm se mostrado eficazes na tipificação e identificação de diferentes táxons bacterianos, como *Lactobacilli*, *Enterococci*, *Geobacilli*, *Streptomyces* e *Staphylococci* (SVEC et al., 2010).

No nosso estudo, as espécies apresentaram um perfil visual de bandas muito próximo, no entanto, variabilidades na presença/intensidade de algumas regiões influenciaram os agrupamentos finais, e por isso vários subgrupos foram formados dentro da mesma espécie. Esta técnica, ainda, nos possibilitou identificar perfis genotípicos semelhantes de espécimes isolados de diferentes hospitais de Belo Horizonte. Isto pode indicar a disseminação das linhagens entre os hospitais avaliados e alertar os profissionais de saúde para que tenham medidas higiênicas mais efetivas.

O objetivo principal deste trabalho foi investigar as características que permitem a essas bactérias atuarem com sucesso como patógenos aos hospedeiros. Dessa forma, foram avaliados os principais fatores de resistência presentes no grupo, que permitem a sua permanência no ambiente, mesmo sob a pressão de terapia antimicrobiana e os principais fatores de virulência descritos (capacidade de formação de biofilme e produção de toxina).

Com relação aos fatores de resistência aos antimicrobianos, foram encontradas frequências altas de micro-organismos resistentes, principalmente aos antimicrobianos benzilpenicilina, oxacilina, ciprofloxacina, norfloxacina, eritromicina e clindamicina. Estes achados não estão distantes dos dados mundiais, que também encontram frequências altas de SCN resistentes em ambientes hospitalares (AGHAZADEH et al., 2014; ROOPA; BIRADAR, 2015; SHRESTA;BHATTARAI;KHANAL, 2017). Em um trabalho realizado nos Estados Unidos, descrevendo a resistência nacional de *S. epidermidis* de 1999 a 2012, encontrou-se um aumento da resistência à ciprofloxacina (de 58,3% para 68,4%) e clindamicina (de 43,4% para 48,5%) com o passar dos anos (MAY et al., 2014). Em outro estudo realizado em Gana, 98% dos SCN isolados de infecções nosocomiais foram resistentes à penicilina V e 67% à trimetopim (LERBECH et al., 2014). Neste estudo, 69% dos SCN isolados foram multirresistentes aos fármacos avaliados (≥ 4 antimicrobianos); enquanto que em um estudo no Zimbábue, 86% dos SCN isolados de exemplares de urina foram resistentes a três ou mais antimicrobianos

(MBANGA; MASUKU; LUPHAHLA, 2016). Neste estudo, 86,4% dos SCN isolados foram multirresistentes a antimicrobianos. Shresta;Bhattarai;Khanal, 2017, ainda recomendam que os SCN isolados de amostras clínicas devam ser processados de forma rotineira e teste de susceptibilidade a antimicrobianos devem ser realizados, uma vez

5 que a frequência de SCN multi-resistentes é alta.

Dados de hospitais brasileiros também revelam taxas altas de resistência a antimicrobianos em SCN (MARTINI et al., 2014; RAMPELOTTO et al., 2014). Em um estudo realizado em São Paulo, na grade dos leitos de uma unidade de terapia intensiva, os SCN foram os micro-organismos mais prevalentemente isolados, sendo que 84,6%

10 foram resistentes à clindamicina e 76,9% à eritromicina (SOUZA; CÉSAR; BERNARDI, 2015).

Em outro trabalho realizado em um laboratório de análises clínicas no município de Santa Inês (Maranhão), o grupo dos SCN foi o mais isolado de pacientes com infecções do trato urinário, sendo que também foram os mais resistentes – resistência a

15 11 antimicrobianos diferentes - penicilina, ampicilina, tetraciclina, oxacilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefalotina, cefotaxima, norfloxacin, ciprofloxacina, gentamicina e ofloxacina (ALMADA et al., 2017).

Uma característica preocupante presente em um exemplar do presente estudo foi a resistência intermediária à vancomicina. Relatos de resistência a tal antimicrobiano

20 são muito raros e, de acordo com a literatura, até onde se sabe, há apenas um relato de SCN resistente à vancomicina no Brasil, sendo que tal espécime foi isolado de um profissional e não de um paciente (PALAZZO; ARAUJO; DARINI, 2005).

No tocante às análises individuais de resistência por hospital, observaram-se diferenças nas frequências encontradas para oxacilina, gentamicina, ciprofloxacina,

25 moxifloxacina, norfloxacin, eritromicina, clindamicina, ácido fusídico, e trimetropim/sulfametoxazol Tais diferenças podem ser justificadas pelas dessemelhanças entre as terapias empíricas aplicadas em cada hospital, o que pode acarretar em pressões seletivas desiguais e aparecimento de distintas comunidades resistentes em cada estabelecimento.

A respeito dos fatores genotípicos que impelem ao aparecimento da resistência fenotípica, observou-se frequência alta dos genes *blaZ*, e *ermB* – o que justificaria a alta frequência fenotípica também observada para os antimicrobianos benzilpenicilina e eritromicina, respectivamente. Também foi observada relação entre a frequência do gene *aac-aphD* e o número de micro-organismos resistentes à gentamicina.

30

No entanto, a frequência do gene *mecA* não apresentou associação com o número alto de linhagens fenotipicamente resistentes a oxacilina. Tal observação pode ser devida à existência de outros genes cromossômicos que influenciam a expressão da resistência, como os fatores essenciais para a resistência à meticilina (*fem*), fatores auxiliares (*aux*), alta resistência à meticilina (*hmt*) e a outros numerosos genes que não são associados ao gene *mecA* ou ao cassete *SCCmec*, mas influenciam na resistência à 5 meticilina. Tais genes propiciam a síntese da parede celular, mesmo na presença dos β -lactâmicos (PEACOCK; PATERSON, 2015).

O gene *mecA* está presente no cassete *SCCmec*, que por sua vez apresenta 10 enorme diversidade dentro do grupo dos SCN. Tal classificação é de extrema importância, uma vez que cada variedade carrega um grupo de genes específicos e que podem ocasionar resistência a outros antimicrobianos, metalóides e metais de transição com atividades bactericidas e também, genes relacionados à virulência, colonização e síntese de parede celular. Sua classificação também é valiosa para fins epidemiológicos 15 (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014).

Os tipos III, IV e V são os mais frequentes no grupo dos SCN (ZONG; PENG; LÜ, 2011; SABER et al., 2017) e os dados deste trabalho estão de acordo, uma vez que o mais frequente foi o tipo III e sua subvariedade IIIB. Em um trabalho realizado em Botucatu, o tipo mais frequente também foi o III. Dos 402 exemplares isolados, 77 20 carregavam o tipo III, 43 o tipo IV, 12 o tipo II e 47 o tipo I (BARBOSA, 2016).

De acordo com as análises individuais, por hospital, houve diferenças com relação ao subtipo de *SCCmec* III mais frequentes, mas de qualquer maneira este foi o tipo mais frequente.

No tocante a resistência à vancomicina, não se observou nenhuma linhagem 25 portadora do gene *vanA*. Palazzo; Araújo & Darini (2005) também não encontraram a presença desse gene em seu exemplar resistente isolado. Os pesquisadores relataram um aumento da espessura da parede celular microbiana, quando crescida em meio contendo vancomicina e relacionaram essa expansão à resistência visualizada.

Além de apresentarem importantes fatores de resistência, os SCN contam com 30 um arsenal de elementos de virulência, como: a produção de hemolisinas, toxinas e a capacidade de formação de biofilme.

A maioria dos nossos exemplares não apresentou padrão de hemólise em placas de ágar sangue; entretanto 45,8% apresentaram o tipo β de hemólise, o que se torna de extrema preocupação, uma vez que tais micro-organismos foram isolados de infecção na

corrente sanguínea, principalmente para os Hospitais das Clínicas e João XXIII – onde a ocorrência de linhagens hemolíticas foi maior dos que a sem padrão de hemólise.

Em referência à detecção de enterotoxinas e de toxina da síndrome do choque tóxico, pôde-se perceber um maior número de genes codificadores da enterotoxina A (76,2%), acompanhada pelo gene codificador da toxina da síndrome do choque tóxico (30,5%). Esses resultados estão de acordo com dados da literatura, que também conseguiram isolar linhagens positivas para os genes codificadores de toxinas em exemplares clínicos (CUNHA; CALSOLARI; JÚNIOR, 2007; GIORMEZIS et al., 2014). Entretanto, Cunha; Calsolari & Junior (2007) isolaram mais frequentemente o gene que codifica a enterotoxina C isoladamente ou em combinação com outro gene e Giomerziz et al. (2014) encontraram uma frequência maior do gene que codifica a toxina da síndrome do choque tóxico.

Com relação às análises individuais por hospital, pôde-se perceber que também houve um maior número do gene *sea* nos hospitais avaliados. Ademais, a frequência de linhagens positivas para *sec* e *tsst-I* foi maior no Hospital Semper.

Apesar da identificação genotípica, não foi possível determinar a produção de toxinas da maioria dos exemplares analisados. Essa detecção no grupo SCN é ainda pouco compreendida, uma vez que é dependente de métodos que requerem grandes quantidades de toxinas, e por isso, pode não detectar produção de linhagens pouco produtoras – o que é comum dentro do grupo SCN (CUNHA; CALSOLARI; JÚNIOR, 2007). Em outro trabalho, não foi possível, inclusive, verificar a indução de superantígenos em modelo murino (STACH; VU; SCHLIEVERT, 2015).

Uma metodologia que é mais sensível para detecção de toxinas é o sistema automatizado VIDAS®. No entanto, no nosso trabalho, também não foi possível obter resultados positivos quando o método foi utilizado. Uma possível explicação seria que os *kits* utilizados nessa metodologia foram desenvolvidos para detectar toxinas em alimentos, e por isso, talvez não fosse capaz de detectá-las em outro tipo de material. Além disso, as condições de crescimento também podem não ter sido ideais para a produção de toxinas.

A formação de biofilme em SCN é o principal fator de virulência do grupo, uma vez que possibilita a persistência desses micro-organismos em biomateriais, como dispositivos médicos invasivos (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014). Biofilmes são comunidades estruturadas de bactérias envolvidas em uma matriz aderida às superfícies bióticas ou abióticas (DUNNE; DUNNE, 2002).

Neste trabalho, 96,5% das linhagens foram produtoras de biofilme em placas AVG; e em placas de poliestireno, as linhagens, de forma geral, tiveram um aumento progressivo do grau de adesão de 4-24h e depois, reduziram em 48h. Acredita-se que neste modelo de formação de biofilme, as linhagens apresentam um pico de formação de biofilme em 24h e, depois, inicia-se a fase de dissociação com 48h.

Com relação às análises individuais de cada hospital, pôde-se constatar que as linhagens provenientes do hospital João XXIII tardaram mais a formar biofilme quando comparadas aos outros hospitais – as linhagens não aderentes foram observadas até o tempo de 24h; enquanto que nos Hospitais Santa Casa e Semper, este acontecimento ocorreu em 12h e nos Hospitais das Clínicas e Odilon Behrens em 8h. Nestes dois últimos hospitais – onde as linhagens formaram biofilme mais rápido- pôde-se, inclusive, visualizar linhagens fortemente aderentes (que não foram observadas em outros locais).

Durante a primeira fase da formação de biofilme, a autolisina *AtlE* desempenha papel importante na adesão inicial, enquanto que a matriz polissacarídica composta pelo PIA/PGA e codificada pelo locus *ica* é importante em fases mais posteriores de adesão intercelular. No presente trabalho, houve um maior número do gene *atlE* seguida do gene *icaB*.

Nesse sentido, já que se puderam observar linhagens produtoras de biofilme e que foram negativas para todos os genes observados, ou que não produziram biofilme e foram positivas para alguns genes, não foi possível estabelecer uma relação direta entre a presença do gene e a formação de biofilme nos exemplares isolados. Ademais, não foi possível verificar um padrão de formação de biofilme quando as linhagens apresentaram um, dois, três ou quatro genes. Por exemplo, exemplares que não apresentaram adesão forte quando foram positivas para todos os genes ou adesão fraca quando foi positiva para apenas um.

Arciola et al. (2002) encontraram uma relação direta entre a presença dos genes e formação de matriz polissacarídica em exemplares clínicos de *S. epidermidis*. Contudo, em outros trabalhos não se observou a mesma relação – concordando com os resultados encontrados no nosso estudo (CHAIÉB; MAHDOUANI; BAKHROUF, 2005; MARTINI et al., 2016; SILVA et al., 2002).

No tocante à caracterização individual por hospital, houve diferenças com relação à frequência dos genes nos diferentes hospitais avaliados. O gene *atlE* foi mais frequente nos Hospitais Santa Casa e Hospital das Clínicas; enquanto que o gene *icaB*

foi mais frequente no Hospital Semper. A alta frequência do gene *atlE* pode explicar, em parte, a maior velocidade de formação de biofilme nos exemplares isolados do Hospital das Clínicas, já que esta proteína está relacionada aos momentos iniciais de formação de biofilme. No entanto, esta mesma frequência não foi observada para os
5 exemplares do Hospital Odilon Behrens e dessa, forma, outros tipos de moléculas adesivas podem estar presentes para justificar uma maior rapidez na formação do biofilme nesta instituição.

Os resultados encontrados no presente trabalho sugerem que outros genes também estariam relacionados à formação de biofilme em SCN. Estudos revelam, por
10 exemplo, a participação de outras moléculas durante a formação de biofilme em SCN. Como é o caso da protease ClpP, que está relacionada às respostas ao estresse, virulência e formação de biofilme (Liu et al., 2017). Um mutante de *clpP* em *S. epidermidis* revelou uma menor produção de biofilme pela bactéria e reduziu a sua patogenicidade *in vivo* (WANG et al., 2007).

Bhp é outra proteína que está relacionada à adesão em poliestireno e na fase de
15 acúmulo da produção de biofilme em SCN isolados de ambientes clínicos. Exemplares que continham o gene – inserido em um transposon – estavam relacionados a uma aderência forte em placas de poliestireno e sua deleção, à ausência de biofilme nestas placas. Esta formação de biofilme não foi relacionada à produção de PIA/PGA
20 (TORMO et al., 2005a). Outra autolisina, que não a AtlE também tem sido identificada como Aae. Trata-se de uma proteína de 35kDa que apresenta propriedades bacteriolítica e adesiva e potencialmente relacionada à colonização de materiais bióticos ou abióticos (HEILMANN et al., 2003).

A regulação da produção de biofilme e produção de toxinas é estabelecida
25 principalmente pelo *locus agr* que produz RNA III como sua molécula efetora principal (GONG et al., 2014). No presente trabalho, menos da metade (38,9%) dos exemplares foram positivos para o gene *agr*, revelando um maior potencial de formação de biofilme do que produção de toxina nestas linhagens, uma vez que mutantes para o gene *agr* estão relacionadas a um decréscimo na síntese de enzimas extracelulares e toxinas e um
30 aumento da síntese de moléculas de adesão (COELHO et al., 2011).

Desta maneira, outros genes poderiam estar relacionados à regulação da expressão protéica dessas linhagens. O sistema luxS, que codifica uma molécula autoindutora denominada AI-2, já foi descrito em *S. epidermidis*. Seu mutante é capaz de sintetizar um biofilme mais espesso do que a linhagem selvagem por estimular a

produção de PIA/PGA (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014). Outro locus regulador é conhecido como *sar*, que controla a síntese de exoproteínas por modular a expressão de *agr*. A molécula autoindutora do sistema, *sarA*, regula de forma positiva a formação de biofilme por se ligar ao promotor do gene *icaA* e estimular a produção de PIA/PGA (TORMO et al., 2005b). Outra molécula relacionada à produção de biofilme em SCN é o *operon fator sigma B*. Inativação deste locus induz a um fenótipo negativo para a produção de biofilme devido a um decréscimo da síntese de PIA/PGA (KNOBLOCH et al., 2001).

Dessa forma, devido à numerosa presença de moléculas envolvidas na virulência do grupo, torna-se de extrema importância compreender quais proteínas estão relacionadas à formação de biofilme nos exemplares isolados de cada localidade, já que a elucidação dos mecanismos de adesão das linhagens clínicas poderia auxiliar no desenvolvimento de drogas anti-adesivas a fim de se combater a infecção nosocomial causada por esse grupo de micro-organismos (CHAIEB; MAHDOUANI; BAKHROUF, 2005).

Além das análises descritivas realizadas, outro objetivo do presente estudo foi identificar grupos de diferentes perfis baseados nas características de virulência e resistência aos antimicrobianos dos exemplares isolados. Seis grupos foram formados e, interessante, em ambas as análises, as linhagens de um mesmo grupo formado não foram pertencentes a um mesmo hospital, evidenciando características similares entre os exemplares de SCN dos diferentes hospitais de Belo Horizonte. Tal fato poderia indicar (mais uma vez) uma disseminação das linhagens entre os hospitais da cidade e alertar profissionais de saúde a fim de que realizem medidas preventivas.

No tocante à análise dos fatores de virulência, um ponto interessante foi que apesar da análise descritiva não indicar relação entre a presença do locus *ica* e a formação de biofilme, este estudo em grupo pôde revelar que o único agrupamento que apresentou adesão forte à placa de poliestireno foi o único a exibir o gene *icaB*. Esta observação poderia indicar um papel importante deste gene para a formação de biofilme nos exemplares isolados deste trabalho. Contudo, mais estudos são necessários a fim de se compreender melhor tal característica.

Em referência à análise dos fatores de resistência, o mapa perceptual gerado não atingiu o mesmo nível de explicação dos dados experimentais dos fatores de virulência. Possivelmente, a maioria dos exemplares apresentou grau de resistência a antimicrobianos e presença dos genes semelhantes e, dessa forma, poucas

características foram realmente discriminatórias, sendo elas: resistência à linezolida, vancomicina, teicoplanina, trimetropim/sulfametoxazol, moxifloxacina; sensibilidade à oxacilina, *SCCmec* IIIB e o grupo 4 dos grupos formados.

5 No presente trabalho, foi investigado um grupo bacteriano que ainda é negligenciado pela comunidade acadêmica, mas que conta com um arsenal de fatores de virulência e resistência importantes para o estabelecimento de sua patogenicidade. Portanto, nossas análises descritivas se configuram como primeiro passo para o entendimento das características das linhagens de SCN circulantes em nossa cidade.

10

15

20

25

30

7.0. SUMÁRIO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO

Em suma, 59 exemplares de SCN foram isolados de pacientes com infecção da corrente sanguínea, com um maior número de *S. haemolyticus*, seguido de *S. epidermidis* e *S. hominis*. As linhagens apresentaram frequência alta de resistência aos antimicrobianos, principalmente para benzilpenicilina, oxacilina, ciprofloxacina, norfloxacina, eritromicina e clindamicina; sendo que os genes mais frequentes foram *ermB*, seguido de *blaZ* e o tipo de cassete *SCCmec* mais frequente foi o tipo IIIB. A maioria dos exemplares não apresentou capacidade hemolítica e foram capazes de produzir biofilme em AVG. Ademais, todos foram capazes de produzir biofilme em placas de poliestireno, mesmo que fracamente, sendo que os genes mais frequentes foram *atlE* seguido de *icaB*. As linhagens apresentaram genes codificadores de toxinas, com maior número do gene *sea* seguido de *tsst-1*, mas a avassaladora maioria não foi capaz de produzi-las nos exames realizados. O gene *agr* não foi verificado na maioria dos exemplares, revelando uma importante participação de outros tipos de sistema de *quorum sensing*, como *luxS*, *SAR* e fatores sigma.

Houve diferenças com relação à distribuição das características fenotípicas e genotípicas nos diferentes hospitais, sugerindo análise mais local dos exemplares em cada estabelecimento a fim de se determinar os perfis circulantes em cada instituição e proposição de medidas preventivas ou de tratamento mais eficazes.

De acordo com as análises em grupo, quase todos os genes de virulência ou resistência apresentaram distribuição diferenciadas dentro dos grupos, sendo que o gene *icaB* apresentou papel importante no grau de adesão de biofilme em placas de poliestireno e as resistências à linezolidina, vancomicina, teicoplanina, trimetropim/sulfametoxazol, moxifloxacina; sensibilidade à oxacilina, tipo *SCCmec* IIIB e o grupo 4 foram os fatores mais discriminatórios para a análise estatística.

Em conclusão, os exemplares circulantes na cidade de Belo Horizonte contam com um arsenal expressivo de fatores de virulência/resistência, e dessa forma, mais estudos devem ser realizados a fim de se compreender melhor os mecanismos pelos quais os SCN têm sucesso em colonizar e persistir no hospedeiro a fim de se combater este perigoso grupo de micro-organismos.

8.0. PERSPECTIVAS

- 1) Estudo da importância do gene *icaB* no grau de adesão do biofilme em placas de poliestireno e outros materiais;
- 5 2) Término da análise de proteômica comparativa de linhagem de *Staphylococcus epidermidis* resistente à meticilina e com perfil de resistência intermediária à vancomicina;
- 3) Sequenciamento do genoma da linhagem de *Staphylococcus epidermidis* resistente à meticilina e com perfil de resistência intermediária à vancomicina;
- 10 4) Estudo do desenvolvimento de artrite por *Staphylococcus epidermidis* resistente à meticilina em modelo murino.

15

20

25

30

9.0. PRODUÇÃO CIENTÍFICA E COLABORAÇÕES

- **Artigo aceito**

5 PEDROSO, S.H.S.P.; SANDES, S.H.C.; FILHO, R.A.T.; NUNES, A.C.;
SERUFO, J.C.; FARIAS, L.M.; CARBALHO, M.A.R.; BOMFIM, M.R.Q.;
SANTOS, S.G. Coagulase-negative staphylococci isolated from human
bloodstream infections showed multi-drug resistance profile. *Microbial Drug
Resistance*, 2018.

- 10 • **Artigos publicados**

15 ACURCIO, L.B. ; SANDES, S.H.C. ; BASTOS, R.W. ; SANTANNA, F.M.
; PEDROSO, S.H.S.P. ; REIS, D.C. ; NUNES, Á.C. ; CASSALI, G.D. ;
SOUZA, M.R. ; NICOLI, J.R. . Milk fermented by *Lactobacillus* species from
Brazilian artisanal cheese protect germ-free-mice
against *Salmonella* Typhimurium infection. *Beneficial Microbes*, v. 8, p. 579-
588, 2017.

20 BASTOS, R.W. ; PEDROSO, S.H.S.P. ; VIEIRA, A.T. ; MOREIRA, L.M.C. ;
FRANÇA, C.S. ; CARTELLE, C.T. ; ARANTES, R.M.E. ; GENEROSO, S.V. ;
CARDOSO, V.N. ; NEVES, M.J. ; NICOLI, J.R. ; MARTINS, F.S. . UFMG A-
905 treatment reduces intestinal damage in a murine model of irinotecan-
induced mucositis. *Beneficial Microbes*, v. 7, p. 549-557, 2016.

25 PEDROSO, S.H.S.P.; SANDES, S.H.C. ; LUIZ, K.C.M. ; DIAS, R.S. ; FILHO,
R.A.T. ; SERUFO, J.C. ; FARIAS, L.M. ; CARVALHO, M.A.R. ; BOMFIM,
M.R.Q. ; SANTOS, S.G. . Biofilm and toxin profile: A phenotypic and
genotypic characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from
human bloodstream infections. *Microbial Pathogenesis*, v. 100, p. 312-318,
2016.

- **Capítulos de livro publicados**

30 1) PEDROSO, E. R. P. ; PIRES, M. T. B. ; OLIVEIRA, E. C. ; RINCON, L. G. ;
COUTO, R. C. ; PEDROSO, SILVIA H S P . Choque. In: Marco Tulio
Baccarini Pires; Sizenando Vieira Starling. (Org.). hoque. 11ed.Rio de Janeiro:
Guanabara Koogan, 2017, v. , p. 149-232.

35 2) PEDROSO, S.H.S. .P; PEDROSO, E. R. P. . Parasitoses Intestinais. In: Enio
Roberto Pietra Pedroso, Manoel Otávio da Costa Rocha. (Org.). Série Medicina
Interna - Doenças Infeciosas. 1ed.Rio de Janeiro: Rubio, 2015, v. 1, p. 436-470.

- **Colaborações**

- Efeito protetor de leites fermentados por lactobacilos isolados de queijos minas artesanais na infecção experimental por *Salmonella* Typhimurium em camundongos – Tese de Leonardo Borges Acúrcio.
- 5 • Variabilidade genética e potencial patogênico de *Staphylococcus* spp. isolados de queijos minas artesanais da região de Campos das Vertentes, Minas Gerais – Tese de Renata Dias de Castro.
- 10 • *Weisella paramesenteroides* WPK4 reduz o comportamento ansioso e depressivo em um modelo murino de estresse crônico – Tese de Sávio Henrique de Cicco Sandes.
- Síntese e avaliação da atividade inseticida e alcalóides tropânicos e síntese de cadiolíneos naturais e análogos com potencial atividade antibacteriana – Tese de Simone Mairink.
- 15 • Análise fenotípica e genotípica de *Staphylococcus* coagulase-negativo isolados em resíduos e fossas nasais de funcionários de um serviço de atenção à saúde da Odontologia – Dissertação de Débora Guimarães Calefi.

20

25

30

10.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGHAZADEH, M. et al. Determination of antimicrobial resistance profile and inducible clindamycin resistance of coagulase negative staphylococci in pediatric patients: the first report from Iran. **World Journal of Pediatrics**, v. 11, n. 3, p. 250–254, 2014.
- ALLISON, D. C. et al. Microbiology of bone and joint infections in injecting drug abusers. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 468, n. 8, p. 2107–2112, 2010.
- 10 ALMADA, D.V.; GOMES, H.B.S.; SOUSA, J.B.; NUNES, M.A.S.; FIRMO, W.C.A. Perfil de resistência a antimicrobianos em pacientes atendidos em um laboratório privado no município de Santa Inês-MA. *Revista Uningá Review*. v. 30, p. 10-14, 2017.
- ANDRADE, N.J.; PINTO, C.L.O.; LIMA, J.C. Adesão e formação de biofilme microbianos. In ANDRADE, N.J. **Higiene na Indústria de Alimentos**.ed. 1. Viçosa: Editora Varela. 2008. cap1.
- 15 ARCHER, G.L.; CLIMO, M.W. Antimicrobial Susceptibility of Coagulase-Negative Staphylococci. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 38(10), p. 2231-2237, 1994.
- ARCIOLA, C. R. et al. Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for ica locus. **Biomaterials**, v. 23, n. 21, p. 4233–4239, 2002.
- 20 AZEVEDO, P.A. *et al.* Suscetibilidade à novobiocina na identificação de amostras de *Staphylococcus coagulase negativo*(SCoN) isolados de hemoculturas. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**.v.39(4), p. 303-304, 2007.
- 25 BAIRD-PARKER, A. C. The Staphylococci: an introduction. **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**.p.1S-8S, 1990.
- BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. **Manual of clinical microbiology**. 8a ed. Washington (DC): ASM Press; p. 384-404, 2003.
- 30 BARBOSA, T.A. Epidemiologia da colonização e infecção microbiana em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal: abordagem clínica e molecular. Dissertação de Mestrado. Botucatu, 2016.
- 35 BASSET, P. et al. Diversity of staphylococcal cassette chromosome mec elements in predominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in a small geographic area. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4589–4595, 2010.
- 40 BECKER, K.; ROTH, R.; PETERS, G. Rapid and Specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of *Staphylococcal enterotoxin* genes, exfoliative toxin

genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 36, n.9,p2548-2553, 1998.

- 5 BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. Coagulase-negative staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 870–926, 2014.
- BEEKMANN, S.E.; DIEKEMA, D.J.; DOERN, G.V. Determining the clinical significance of coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. v. 26, n. 6, p. 559-566, 2007.
- 10 BHATT, P. et al. Species distribution and antimicrobial resistance pattern of Coagulase-negative Staphylococci at a tertiary care centre. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 72, n. 1, p. 71–74, 2015.
- BIZZARRO, M. J. et al. Neonatal sepsis 2004-2013: The rise and fall of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Pediatrics**, v. 166, n. 5, p. 1193–1199, 2015.
- 15 BLANCHARD, A.C.; FORTIN, E.; LAFERRIÈRE, C.; GOYER, I.; MOUSSA, A.; AUTMIZGUINE, J.; QUACH, C. Comparative effectiveness of linezolid versus vancomycin ad definitive antibiotic therapy for heterogeneously resistant vancomycin-intermediate coagulase-negative staphylococcal central-line -associated bloodstream infections in a neonatal intensive care unit. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 72, p. 1812-1817, 2017.
- 20 BOO, N. Y.; SUHAIDA, A. R.; ROHANA, J. Frequent nasopharyngeal suctioning as a risk factor associated with neonatal coagulase-negative staphylococcal colonisation and sepsis. **Singapore Medical Journal**, v. 56, n. 3, p. 164–168, 2015.
- BRZYCHCZY-WLOCH, M. et al. Prevalence of antibiotic resistance in multi-drug resistant coagulase-negative staphylococci isolated from invasive infection in very low birth weight neonates in two Polish NICUs. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 12, n. 1, p. 41, 2013.
- 30 BÜTTNER, H.; MACK, D.; ROHDE, H. Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. **Front Cell Infect.Microbiol.**, v. 5, n. 2235-2988 (Electronic), p. 14, 2015.
- 35 CAMERON, D. R. et al. Insights on virulence from the complete genome of *Staphylococcus capitis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. SEP, p. 1–12, 2015.
- 40 CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC).*Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin-United States.*Morb Mortal Wkly Rep*. v.51, p. 565–567, 2002.
- CERCENADO, E. Epidemiologia de la infección por grampositivos resistentes. **Revista Espanola de Quimioterapia**. v. 29, p.6-9, 2016.
- 45 CHAIEB, K.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUF, A. Detection of *icaA* and *icaD* loci by polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needles in a dialysis unit. **Journal of Hospital Infection**, v. 61, n. 3, p. 225–230, 2005.
- 50

- COELHO, S. M. O. et al. Short communication: profile of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 7, p. 3305–10, 2011.
- 5 COGEM, A.L.; NIZET, V.; GALLO, R. L. Skim microbiota: a source of disease or defence? **British Journal of Dermatology**. v.158, p. 422-455, 2008.
- CORDEIRO, D.N.G. Significância clínica da presença de *Staphylococcus coagulase-negativo* isolados de recém-nascidos de uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal em Brasília –DF. **Dissertação de Mestrado**. 2007.
- 10 COSTA, S.F.; MICELI, M.H.; ANAISSIE, E.J. Mucosa or skin as source of coagulase negative staphylococcal bacteraemia? **The Lancet**. v. 4, p. 278-286, 2004.
- 15 CUNHA, M. D. L. R. D. S. D.; LOPES, C. A. D. M. Estudo da produção de beta - lactamase e sensibilidade às drogas em linhagens de estafilococos coagulase-negativos isolados de recém-nascidos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 4, p. 281–290, 2002.
- 20 CUNHA, M. D. L. R. S.; CALSOLARI, R. A O.; JÚNIOR, J. P. A. Detection of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin 1 genes in *Staphylococcus*, with emphasis on coagulase-negative staphylococci. **Microbiology and immunology**, v. 51, n. 4, p. 381–90, 2007.
- DAVIS, M.F. *et al.* Two coagulase-negative staphylococci emerging as potential zoonotic pathogens: wolves in sheep's clothing? **Frontiers in Microbiology**. v. 4, p. 1-4, 2013.
- 25 DENG, Y. et al. Antimicrobial resistance investigation on *Staphylococcus* strains in a local hospital in Guangzhou, China, 2001-2010. **Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 21, n. 1, p. 102–4, 2015.
- 30 DIB, R.W.; NUMAN, Y.; LI, X.; KALIA, A.; RAAD, I.; SHELBURNE, S.A. Invasive *Staphylococcus epidermidis* isolates are highly clonal and distinct from commensal strains: time for a new paradigm in infection control? **Open Forum Infection Diseases**. v. 4, p. S564, 2017.
- 35 DIEKEMA, D.J. et al. Survey of Infections Due to *Staphylococcus* Species: Frequency of Occurrence and Antimicrobial Susceptibility of Isolates Collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific Region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. **Staphylococcal Infections and Resistance**. Suppl 2. p. S114-S132, 2001.
- 40 DODÉMONT, M. et al. Evaluation of Verigene Gram-positive blood culture assay performance for bacteremic patients. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 34, n. 3, p. 473–477, 2014.
- DUNNE, W. M.; DUNNE, W. M. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Bio Films Lately? **Society**, v. 15, n. 2, p. 155–166, 2002.
- 45

- DUTKA-MALEN, S. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant Enterococci by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. v.33, n. 1, p.24-27, 1995.
- 5 ESCANDE, M.C. HERBRECHT, R. Prospective study of bacteremia in cancer patients. Results of a French multicentre study. *Supportive Care in Cancer*, v. 6, n. 3, p. 273-280, 1998.
- EUZÉBY, J. P. LSPN List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/>> acesso em: 05 de fevereiro de 2018.
- 10 FARAH, S.M.I. Nosocomial infection of neonates in Khartoum State **Dissertação de Mestrado**. Khartoum, 2007.
- FONTES, C. O. *Staphylococcus* em queijo minas frescal: ocorrência, perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e aspectos da virulência. **Tese de Doutorado**. Juiz de Fora, 2013.
- 15 FREBOURG, N.B. et al. PCR-based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 38, n.2, p. 877-880, 2000.
- 20 GAUNA, T.T. et al. Bloodstream infection in patients with end-stage renal disease in a teaching hospital in central-western Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**.v.46, p. 426-432, 2013.
- GARRITY, F.L. DETRICK, B.; KENNEDY, E.R. *Staphylococcus* Composition in the Taxonomy of Deoxyribonucleic Acid Base. **Journal of Bacteriology**.v.97(2), p. 557-560, 1969.
- 25 GIORMEZIS, N. et al. Coagulase-negative staphylococcal bloodstream and prosthetic-device-associated infections: The role of biofilm formation and distribution of adhesin and toxin genes. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63, n. 2014, p. 1500–1508, 2014.
- 30 GONG, J. et al. The accessory gene regulator (agr) controls *Staphylococcus aureus* virulence in a murine intracranial abscesses model. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 18, n. 5, p. 501–506, 2014.
- 35 GROSS, M. et al. Key Role of Teichoic Acid Net Charge in *Staphylococcus aureus* Colonization of Artificial Surfaces Key Role of Teichoic Acid Net Charge in *Staphylococcus aureus* Colonization of Artificial Surfaces. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 5, p. 3423–2426, 2001.
- 40 HAIR, J.F., et al., 2003. *Essential of business research methods*. John Wiley & Sons, Australia.
- HEILMANN, C. et al. Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. **Microbiology**, v. 149, n. 10, p. 2769–2778, 2003.
- 45 HETEM, D. J. **Transmission Dynamics and Resistance in Staphylococci**. [s.l: s.n.].

- HITZENBICHLER, F.; SIMON, M.; SALZBERGER, B.; HANSES, F. Clinical significance of coagulase-negative staphylococci other than *S. epidermidis* blood stream isolates at a tertiary care hospital. **Infection**. v.45, p. 179-186, 2017.
- 5 HORASAN, E. S. et al. Bloodstream infections and mortality-related factors in febrile neutropenic cancer patients. **Med.Sci.Monit.**, v. 17, n. 1643-3750 (Electronic), p. CR304–CR309, 2011.
- HUEBNER, J.; GOLDMANN, D. Coagulase-Negative Staphylococci: Role as Pathogens. **Annual Review of Medicine**. v. 50, p. 223-236, 1999.
- 10 HUSSAIN, M. *et al.* A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. **Infection and Immunity**.v.65(2), p. 519-524, 1997.
- 15 JAIN, A. K.; MURTY, M. N.; FLYNN, P. J. Data clustering: a review. **ACM Computing Surveys**, v. 31, n. 3, p. 264–323, 1999.
- JUNDIÁS, E. M. Seleção de bactérias ácido-láticas com potencial probiótico em jundiás. p. 2011–2014, 2014.
- 20 KAASE, M.; *et al.* Comparison of phenotypic methods for penicillinase detection in *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 14, p. 614-616, 2008.
- KLEINSCHMIDT, S. et al. *Staphylococcus epidermidis* as a cause of bacteremia. v. 10, p. 1859–1879, 2015.
- 25 KLOSS, W.E.; BANNERMAN, T.L. Update on Clinical Significance of Coagulase-Negative Staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**.v. 7(1), p. 117-140, 1999.
- 30 KLOOS, W. E.; SCHLEIFER, K. H. *Staphylococcus auricularis* sp. nov.: an inhabitant of the human external ear. **Int.J.Syst.Bacteriol.**, v. 33, n. 1, p. 9–14, 1983.
- 35 KNOBLOCH, J. K. M. et al. Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the sigB operon: Differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 8, p. 2624–2633, 2001.
- KONEMAN; W. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 6ª Edição. Editora: Guanabara, 2008.
- 40 KONG, C.; NEOH, H.; NATHAN, S. Targeting *Staphylococcus aureus* Toxins: A Potential form of Anti-Virulence Therapy. **Toxins**, v. 8, n. 3, p. 72, 2016.
- 45 KUMAR, S.; JITENDRA; DAS, A.; MANE, P.; SANGWAN, J.; KUMARIS. Isolation, identification and antibiogram of coagulase negative *Staphylococcus* (CoNS) isolated from various clinical samples at a tertiary care teaching hospital, Jaipur, India. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. v.7. p.3048-3059, 2018.

- LAMBERTI, C. MANGIAPANE, E. PESSIONE, A.; MAZZOLI, R.; GIUNTA, C.; PESSIONE, E. Proteomic characterization of a selenium-metabolizing probiotic *Lactobacillus reuteri* Lb2 BM for nutraceutical applications. **Proteomics**. v. 11, 1-10, 2011.
- 5
- LENART-BORÓN, A. et al. Phenotypic and Molecular Antibiotic Resistance Determination of Airborne Coagulase Negative *Staphylococcus* spp. Strains from Healthcare Facilities in Southern Poland. **Microbial Drug Resistance**, v. 00, n. 00, p. mdr.2015.0271, 2016.
- 10
- LERBECH, A. M. et al. Antibiotic exposure in a low-income country: Screening urine samples for presence of antibiotics and antibiotic resistance in coagulase negative staphylococcal contaminants. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1–18, 2014.
- 15
- LIM, D.; STRYNADKA, N. C. J. Structural basis for the beta lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature structural biology**, v. 9, n. 11, p. 870–6, 2002.
- 20
- LIU, Q.; WANG, X.; QIN, J.; CHENG, S.; YEO, W.S.; HE, L.; MA, X.; LIU, X.; LI, M.; BAE, T. The ATP-dependent protease ClpP inhibits biofilm formation by regulating agr and cell wall hydrolase Sle1 in *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v.7. p1-11, 2017.
- 25
- LUZ, I.S. Caracterização molecular das toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo de coalho em municípios da região agreste de Pernambuco. **Dissertação de Mestrado**. Recife, 2008.
- 30
- MACHADO, B.M.P. Resistência à meticilina mediada pelo gene mecA nos *Staphylococcus* spp. coagulase negativa. **Dissertação de Mestrado**. Rio Grande do Sul, 2007.
- MARCHANT, E.A. et al. Neonatal Sepsis due to Coagulase-Negative *Staphylococci*. **Journal of Immunology Research**. v. 2013, p. 1-10, 2013.
- 35
- MARTIN, M.A., et al. Coagulase-negative staphylococcal bacteremia: Mortality and hospital stay. **Annals of Internal Medicine**. v. 1; 110(1):9e16, 1989.
- 40
- MARTINEAU, F. et al. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 44, n.2, p.231-238, 2000.
- 45
- MARTINI, R. et al. Perfil de susceptibilidade e pesquisa do gene mec A em *Staphylococcus coagulase negativo* isolados de plaquetas. n. 1999, p. 4–5, 2014.
- MARTINI, R. et al. Investigation of biofilm formation in coagulase-negative staphylococci isolated from platelet concentrate bags. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 58, n.1, p. 1-7, 2016.

- MAY, L. et al. Trends in antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci in the United States, 1999 to 2012. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 3, p. 1404–1409, 2014.
- 5 MBANGA, J.; MASUKU, S.; LUPHAHLA, S. Antibiotic resistance patterns and virulence factors of coagulase negative Staphylococcus associated with urinary tract infections in Bulawayo Province, Zimbabwe. **British Journal of Medicine and Medical Research**, v. 11, n. November 2015, 2016.
- 10 MCCLURE, J.A.; DELONGCHAMP, Z.; CONLY, J.M.; ZANG, K. Novel multiplex PCR assay for detection of chlorhexidine-quaternary ammonium, mupirocin, and methicillin resistance genes, with simultaneous discrimination of Staphylococcus aureus from coagulase-negative Staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**. v 55, p. 1857-1864, 2018.
- 15 MIKULAKOVÁ, M. et al. Multiresistance of Staphylococcus xylosus and Staphylococcus equorum from Slovak Bryndza cheese. **Folia microbiologica**, v. 59, n. 3, p. 223–227, 2014.
- 20 MOLINA, J, et al. Mortality and hospital stay related to coagulase-negative Staphylococci bacteremia in non-critical patients. *Journal of Infection*. v. 66, p. 155-162, 2013.
- MORGENSTERN, M. et al. Antibiotic Resistance of Commensal Staphylococcus aureus and Coagulase-Negative Staphylococci in an International Cohort of Surgeons : A Prospective Point-Prevalence Study. p. 1–16, 2016.
- 25 MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**. 6ª Edição. Editora: Elsevier, 2010.
- 30 NANOUKON, C.; ARGEMI, X.; SOGBO, F.; OREKAN, J.; KELLER, D.; AFFOLABI, D.; SCHRAMM, F.; RIEGEL, P.; BABA-MOUSSA, L.; PRÉVOST, G. Pathogenic features of clinically significant coagulase-negative staphylococci in hospital and community infections in Benin. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 307, p. 75-82, 2017.
- 35 NERCELLES, P.; UNITS, I. C. Riesgo de bacteriemia asociada a dispositivos intravasculares estratificados por peso de nacimiento en recién nacidos de un hospital público de alta complejidad: seguimiento de siete años. v. 32, n. 3, p. 278–282, 2015.
- 40 NOVÁKOVÁ, D. et al. Staphylococcus equorum and Staphylococcus succinus isolated from human clinical specimens. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 523–528, 2006.
- 45 OLIVEIRA, D. C.; DE LENCASTRE, H. Multiplex PCR Strategy for Rapid Identification of Structural Types and Variants of the. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 7, p. 2155–2161, 2002.
- 50 OTTO, M. Quorum-sensing control in Staphylococci – a target for antimicrobial drug therapy?. **FEMS Microbiology Letters**. v. 241, p. 135-141, 2004.

- OTTO, M. Staphylococcal biofilms. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 322, p. 207–228, 2008.
- 5 OTTO, M. Coagulase-negative staphylococci as reservoirs of genes facilitating MRSA infection. **Insights & Perspectives**. v. 35, p. 4-11, 2013.
- OTTO, M. Staphylococcus aureus toxins. **Current Opinion in Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 32–37, 2014.
- 10 PAIVA, R.M. Concentração inibitória mínima de vancomicina para staphylococcus sp. coagulase-negativa resistente à meticilina: Comparação entre os métodos de microdiluição em caldo e Etest e correlação com falha terapêutica em pacientes com bacteremia. **Dissertação de mestrado**. Porto Alegre, 2010.
- 15 PALAZZO, I. C. V; ARAUJO, M. L. C.; DARINI, A. L. C. First report of vancomycin-resistant staphylococci isolated from healthy carriers in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 179–185, 2005.
- 20 PAPADIMITRIOU-OLIVGERI, I. et al. Number of positive blood cultures, biofilm formation, and adhesin genes in differentiating true coagulase-negative staphylococci bacteremia from contamination. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, 2015.
- 25 PARISI, J. T. Coagulase-negative staphylococci and the epidemiological typing of *Staphylococcus epidermidis*. **Microbiological reviews**, v. 49, n. 2, p. 126–139, 1985.
- PEACOCK, S. J.; PATERSON, G. K. Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Annual review of biochemistry**, v. 84, p. 577–601, 2015.
- 30 PIETTE, A.; VERSCHRAEGEN, G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1-2, p. 45–54, 2009.
- PINNA, A. et al. Identification and antibiotic susceptibility of coagulase negative staphylococci isolated in corneal/external infections. **The British journal of ophthalmology**, v. 83, n. 7, p. 771–3, 1999.
- 35 PITCHER, D.G.; SAUNDERS, N.A.; OWEN, R.J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*. v. 8, p. 151-156, 1989.
- 40 PLACE, R. B. et al. *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*, subsp. nov., a starter culture component for surface ripened semi-hard cheeses. **Syst.Appl.Microbiol.**, v. 26, n. 0723-2020, p. 30–37, 2003.
- 45 QIN, Z. et al. Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. **Microbiology**, v. 153, n. 7, p. 2083–2092, 2007.
- 50 RAMPELOTTO, R. F. et al. RELAÇÃO ENTRE A RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS COM A. n. 1, p. 2–3, 2014.

REINOSO, E.B. Análisis epidemiológico y molecular de cepas de *Staphylococcus aureus* de distintos orígenes. **Tese de Doutorado**. Instituto de Microbiología. Universidad Nacional de Río Cuarto, 2004.

- 5 RIVERA, M. et al. *Staphylococcus lentus* peritonitis: A case report. **Peritoneal Dialysis International**, v. 34, n. 4, p. 469–470, 2014.
- ROBBINS, R.; GOULD, S.; BERGDOLL, M. Detecting the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains. **Applied microbiology**, v. 28, n. 6, p. 946–950, 1974.
- 10 ROOPA, C.; BIRADAR, S. Incidence and Speciation of Coagulase Negative *Staphylococcus* Isolates from Clinically Relevant Specimens with their Antibiotic Susceptibility Patterns. v. 4, n. 9, p. 975–980, 2015.
- 15 RUPP, M. E. et al. Characterization of the importance of *Staphylococcus epidermidis* autolysin and polysaccharide intercellular adhesin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. **The Journal of infectious diseases**, v. 183, n. 7, p. 1038–1042, 2001.
- 20 SABE, M.A. *et al.* *Staphylococcus lugdunensis*: a rare but destructive cause of coagulase-negative staphylococcus infective endocarditis. **European Heart Journal**.p 1-6, 2014.
- SABER, H.; JASNI, A.S.; JAMALUDDIN, T.Z.M.T.; IBRAHIM, R. A review of Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) types in coagulase-negative Staphylococci (CoNS) species. **Malaysian Journal of Medical Sciences**. v.24, p 7-18, 2017.
- 25 SHAMOTO, I. et al. Dissemination of *Staphylococcus warneri* in the Hair of ICU Doctors. n. August, p. 599–603, 2015.
- 30 SHEARER, J. E. S.; *et al.* Major Families of Multiresistant Plasmids from Geographically and Epidemiologically Diverse Staphylococci. **Genes, Genetic and Genome**.p.581-591, 2011.
- 35 SHRESTA, L.B; BHATTARAI, N.R.; KHANAL, B. Antibiotic resistance and biofilm formation among coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples at a tertiary care hospital of eastern Nepal. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**. v. 6, p. 1-7, 2017.
- 40 SILVA, G. D. I. DE et al. Operon and Bio Im Production in Coagulase-Negative Staphylococci Associated with Carriage and Disease in a Neonatal Intensive Care Unit. **Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 382–388, 2002.
- 45 SOMMERSTEIN, R. et al. Factors associated with methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci as causing organisms in deep sternal wound infections after cardiac surgery. **New Microbes. New Infect.**, v. 6, n. 2052-2975 (Electronic), p. 15–21, 2015.

- SOUMYA, K.R.; PHILIP, S.; SUGATHAN, S.; MATHEW, J.; RAHAKRISHNAN, E.K. Virulence factors associated with coagulase negative Staphylococci isolated from human infections. **Biotech.** v. 7, p. 1-10, 2017.
- 5 SOUZA, M.V.D. Atividade antimicrobiana e anti-biofilme de flavonoides de anacardium occidentale livres e lipossomados em isolados clínicos de Staphylococcus aureus e Staphylococcus epidermidis. **Dissertação de Mestrado.** Governador Valadares, 2013.
- 10 SOUZA, T. DE; CÉSAR, A.; BERNARDI, A. Avaliação da Resistência a Antimicrobianos de Staphylococcus coagulase negativo Encontrados nas Grades dos Leitos em uma Unidade de Terapia Intensiva Evaluation of the Antimicrobial Resistance of Coagulase-Negative Staphylococci Found in the Bars of the B. p. 33–36, 2015.
- 15 STACH, C. S.; VU, B. G.; SCHLIEVERT, P. M. Determining the Presence of Superantigens in Coagulase Negative Staphylococci from Humans. **Plos One**, v. 10, n. 11, p. e0143341, 2015.
- 20 STROMMINGER, B. et al. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in Staphylococcus aureus. v. 41, n. 9, p. 4089-4094, 2003.
- 25 SVEC, P. et al. Identification of Staphylococcus spp. using (GTG)₅-PCR fingerprinting. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 33, p. 451-456, 2010.
- SZCZUKA, E.; TELEGA, K.; KAZNOWSKI, A. Biofilm formation by Staphylococcus hominis strains isolated from human clinical specimens. **Folia Microbiologica**, v. 60, n. 1, p. 1–5, 2014.
- 30 TAKANO, T. et al. Spread of community-acquired methicilin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in hospitals in Taipei, Taiwan in 2005, and comparison of its drug resistance with previous hospital-acquired MRSA. **Microbiologu and Immunology**. v. 51, n. 6, p. 627-632, 2007.
- 35 TARAMASSO, L.; TATARELLI, P.; DI BIAGIO, A. Bloodstream Infections in HIV-infected patients. **Virulence**, v. 5594, n. March, p. 00–00, 2016.
- 40 TORMO, M. Á. et al. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of Staphylococcus: Evidence of horizontal gene transfer? **Microbiology**, v. 151, n. 7, p. 2465–2475, 2005a.
- 45 TORMO, M. Á. et al. SarA Is an Essential Positive Regulator of Staphylococcus epidermidis Biofilm Development SarA Is an Essential Positive Regulator of Staphylococcus epidermidis Biofilm Development. v. 187, n. 7, p. 2348–2356, 2005b.
- TURHAN, E. E.; GÜRSOY, T.; OVALI, F. Yenidoğan sepsisinde mortaliteyi etkileyen etmenler. **Turk Pediatri Arsivi**, v. 50, n. 3, p. 170–175, 2015.

- UDO, E. E.; PEARMAN, J. W.; GRUBB, W. B. Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. **Journal of Hospital Infection**, v. 25, p. 97-108. 1993.
- 5 VALENCIA-REY, P. et al. Coagulase-negative staphylococcal bloodstream infections: Does vancomycin remain appropriate empiric therapy? **Journal of Infection**, 2015.
- VEENSTRA, G.J.; *et al.* Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesion of *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Bacteriology**.v.178(2), p. 537-541,
10 1996.
- VENDEMIATO, A. V. R. et al. Microbiological characteristics of sepsis in a University hospital. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 1–7, 2015.
- 15 VILEFORT, L.O.R. *Staphylococcus* sp. Em profissionais de áreas de apoio de uma instituição oncológica da região centro-oeste.v **Dissertação de Mestrado**.2011.
- VUONG, C; OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* infections. **Microbes and Infection**. v. 4, p. 481-489, 2002.
- 20 XUE, T.; ZHAO, L; SUN, B. LuxS/AI-2 system is involved in antibiotic susceptibility and autolysis in *Staphylococcus aureus* NCTC 8325. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 41, p. 85-89, 2013.
- WANG, C. et al. Role of ClpP in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 11, p. 1376–1383, 2007.
25
- WANG, X. *et al.* Antimicrobial susceptibility testing and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* from food and food animals. **Foodborne Pathogens and Diseases**.v.9, p.95-101, 2012.
30
- WISPLINGHOFF, H. et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 39, n. 3, p. 309–317, 2004.
35
- ZHU, W., *et al.*, Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates Associated with Inc18-Like *vanA* Plasmids in Michigan, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 52 (2), p.452 – 457, 2008.
- 40 ZIEBUHR, W., *et al.* A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. **Molecular Microbiology**. v. 32, n. 2, p. 345-356, 1999.
- 45 ZONG, Z.; PENG, C.; LÜ, X. Diversity of SCCmec elements in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci clinical isolates. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, p. 1–6, 2011.

11.0ANEXO I

Compilação dos resultados mais importantes obtidos na tese

Iden tifica ção	Espé cie	He mó lise	Bio fil me 24h	B en zil	O x a	G en ta	Ci pr o	M o xi	N or flo	E r it	Cl in da	L i n e	T ei c o	V an co	T i g e	a tl E	ic A	ic B	ic C	a g r	m e c a	v a A	b l Z	er A	er B	er C	a c- a p h D	s a c	s e c	s e d	ts - l	Ca sse te		
SC 4081	<i>S. homi nis</i>	γ	Fra co	R	R	S	I	I	R	R	R	S	S	S	S	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	III A
SC 4096	<i>S. equo rum</i>	γ	Fra co	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	III B	
SC 4595	<i>S. homi nis</i>	γ	Fra co	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	III	
SC 4911	<i>S. epide rmidi s</i>	γ	Fra co	R	R	R	I	I	R	R	R	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	II	
SC 5729	<i>S. warn eri</i>	β	Fra co	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+		+	-	-	-	-	-	III B	
SC 5768	<i>S. haem olyti cus</i>	β	Fra co	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	III	

SC 6271	<i>S. haemolyticus</i>	β	Fra co	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	III B		
SC 6298	<i>S. haemolyticus</i>	β	Fra co	R	R	S	I	I	R	R	R	S	S	S	S	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	III		
SC 6313	<i>S. hominis</i>	γ	Fra co	R	R	I	R	R	R	R	R	S	S	S	S	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	III			
SC 5536	<i>S. epidermidis</i>	γ	Fra co	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	---		
SC 1055	<i>S. lentus</i>	γ	Fra co	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	III B		
S 1005	<i>S. epidermidis</i>	β	Fra co	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	III A		
S 1092	<i>S. auricularis</i>	β	Fra co	R	R	S	R	I	R	R	R	S	S	S	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	III B
S 2008	<i>S. hominis</i>	γ	Fra co	R	R	S	I	I	R	R	R	S	S	S	S	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	III A	
S 2032	<i>S. hominis</i>	γ	Fra co	R	R	R	R	I	R	R	R	S	I	S	S	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	III A	

OB 5800	<i>S. warneri</i>	γ	Fra co	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	III
OB 6074	<i>S. epidemics</i>	γ	Fra co	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	III A
OB 6157	<i>S. haemolyticus</i>	γ	Fra co	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	III
OB 6212	<i>S. epidemics</i>	γ	Fra co	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	III
OB 6265	<i>S. epidemics</i>	γ	Mo der ado	R	R	S	R	I	R	R	S	S	S	S	S	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	---
OB 6070	<i>S. epidemics</i>	γ	For te	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	III
OB 7091	<i>S. epidemics</i>	γ	Mo der ado	R	R	S	I	I	R	R	R	S	S	S	S	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	---
OB 6075	<i>S. haemolyticus</i>	γ	Fra co	R	R	R	R	I	R	R	R	S	S	S	S	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	III
HC	<i>S.</i>	γ	Fra	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	III

12.0. ANEXO II

ARTIGOS

5

10

15

20

25

30

35

40

45



Biofilm and toxin profile: A phenotypic and genotypic characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from human bloodstream infections



S.H.S.P. Pedroso^a, S.H.C. Sandes^b, K.C.M. Luiz^c, R.S. Dias^c, R.A.T. Filho^d, J.C. Serufo^e, L.M. Farias^a, M.A.R. Carvalho^a, M.R.Q. Bomfim^f, S.G. Santos^{a,*}

^a Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, Pampulha - Campus UFMG, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, C.P. 486, Pampulha - Campus UFMG, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

^c Laboratório de Enterotoxinas de Alimentos, Fundação Ezequiel Dias, Rua Conde Pereira Carneiro, 80, Gameleira, 30510-010, Belo Horizonte, MG, Brazil

^d Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Rodovia LMG-818, Km 06, s/n – Zona Rural, 35690-000, Florestal, MG, Brazil

^e Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Professor Alfredo Balena, 190, Santa Efigênia, 30130-100, Belo Horizonte, MG, Brazil

^f Departamento de Parasitologia e Biologia, Centro Universitário do Maranhão, Rua Josué Montello, 1, 65075-120, São Luís, Maranhão, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 August 2016

Received in revised form

28 September 2016

Accepted 6 October 2016

Available online 8 October 2016

Keywords:

Staphylococcus coagulase negative

Biofilm

Enterotoxin

Toxic shock syndrome toxin (TSST-1)

Hemoculture

ABSTRACT

Coagulase-negative staphylococci (CNS) represent one of the most prevalent microorganisms in nosocomial infections worldwide, nevertheless little is known about their pathogenicity features. Thus, our aim was to characterize virulence aspects of CNS isolated from patients with bloodstream infections assisted in hospitals of Belo Horizonte, MG, Brazil. Strains were identified using bioMérieuxVitek[®] and for biofilm production evaluation, Congo Red Agar (CRA) and polystyrene plates were used. PCR was applied to detect *icaA*, *icaB*, *icaC*, *atlE*, *sea*, *sec*, *sed*, *tsst-1* and *agr*. For statistical analyses were used hierarchical cluster, chi-square test and correspondence. 59 strains were analyzed, being *S. haemolyticus* the most prevalent. On CRA, 96.5% were biofilm producer, whereas on polystyrene plate, 100% showed adhesion at different times evaluated. Regarding genotypic analyses, 15.2%, 38.9%, 8.4%, 49.1%, 76.2%, 23.7%, 1.6%, 30.5% and 38.9% were positive for *icaA*, *icaB*, *icaC*, *atlE*, *sea*, *sec*, *sed*, *tsst-1* and *agr*, respectively. Six clusters were formed and frequency distributions of *agr*, *atlE*, *icaA*, *icaB*, *sea*, *sec*, *tsst-1* differed ($P < 0.001$). In conclusion, all strains were biofilm producer, with high prevalence of *atlE*, and had potential of toxin production, with high prevalence of *sea*. According to the group-analyses, *icaB* showed relationship with the strong adherence in samples.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Coagulase-negative staphylococci (CNS) were first classified as commensals of healthy skin and mucosa of human and other animals. Due to the large use of invasive medical devices, their clinical

relevance is nowadays recognized, considering them one as the most prevalent microorganisms in nosocomial infections, particularly among immunocompromised patients, such as those undergoing chemotherapy, illicit drug users, patients with Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) and newborns [1,2].

Unfortunately, much attention has been paid on coagulase positive group, especially *Staphylococcus aureus*, and little is known about the pathogenicity characteristics in CNS. What it is known is that the genus has an incredible capacity to colonize, attack and infect human and animal hosts through biofilm formation and production of toxin [3,4].

The formation of CNS biofilm can be divided, in general, into three steps: during the first one, bacteria adhere to the surface

Abbreviation: CNS, Coagulase negative staphylococci; CRA, Congo Red Agar; PCR, Polymerase chain reaction.

* Corresponding author. Laboratório de Microbiologia Oral e de Anaeróbios, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, C.P. 486, Pampulha - Campus UFMG, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil.

E-mail address: simonegsantos@icb.ufmg.br (S.G. Santos).

through factors, such as autolysin AtlE, which is a 115 kDa protein belonging to a group of peptidoglycan hydrolases [5]. The second step involves the production of polysaccharide molecules, such as polysaccharide intercellular adhesin (PIA) and polyglutamate (PGA). The production of PIA is crucial for CNS biofilm formation, since it enables adherence between bacteria, and consequently biofilm elaboration [6]. The *ica* operon (*ica* ADBC gene cluster) is responsible for the codification of PIA and studies have demonstrated relationship between the presence of the *ica* operon and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolated from device-associated infections [7,8]. The last step consists of disassembly of the biofilm structure, and liberated cells are believed to allow CNS to colonize additional body sites [5].

Other important virulence factor of CNS is the ability to produce enterotoxins (SE) and toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) [9,10]. These toxins form superantigens that bind to the major histocompatibility complex class II molecule resulting in increased T cell stimulation and the release of proinflammatory cytokines that leads to the appearance of characteristics signs and symptoms of intoxication [4]. Although the little knowledge about the toxigenic profile of CNS, some researchers have reported production of SE and TSST-1 in CNS samples, indicating that their clinical relevance cannot be underestimated [11,12].

The regulation of biofilm formation and toxin synthesis is carried out via Quorum Sensing, a cell-to-cell communication mechanism. *Staphylococcus* Quorum Sensing system is encoded by the accessory gene regulator (*agr*) locus that controls expression of the regulatory RNA molecule (RNAIII). Once this molecule reaches a critical concentration, the expression of virulence factors is initialized [13].

Thus, our aim was to evaluate biofilm formation and the presence of genes encoding for biofilm formation (*icaA*, *icaB*, *icaC*, *atlE*), for enterotoxins (*sea*, *sec*, *sed*) for toxic shock syndrome toxin-1 (*tsst-1*) and for accessory gene regulator (*agr*) in CNS strains.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and ethics parameters

This study evaluated 59 CNS strains obtained from blood cultures from December 2008 to June 2009, in five hospitals that provide general assistance, emergency and outpatient care, in Belo Horizonte city, Minas Gerais state, Brazil. It was approved by the Research Ethics Committees of the participating services and by Ethics Committee in Research of the Federal University of Minas Gerais (COEP/UFMG - ETIC 614/08) and was followed in accordance with the Helsinki Declaration.

2.2. Characterization and identification of bacterial species

Bacterial strains were cultured on Brain Heart Infusion (BHI), Agar - Difco® and the plates were incubated at 37 °C under aerobic conditions for 18 h–24 h. The grown colonies were submitted to Gram staining, coagulase and DNase tests as its preliminary characterization [14]. The species identification were realized using the GP card of bioMérieuxVitek® system, according to manufacturer's specification.

2.3. Biofilm production

For qualitative biofilm production, the Congo Red Agar assay (CRA) was used according to methodology previously described [15]. The bacteria were seeded on plates with BHI agar supplemented with 0.08% of congo red and 3.6% of saccharose and the plates were incubated at 37 °C for 24 h and subsequently overnight at room temperature. On CRA, slime-producing strains form black

colonies, whereas non-producing strains develop red colonies.

Quantitative biofilm production was assessed according to methodology previously described [16]. A medium without inoculum was used as a negative control and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 as a reference strain. The strains were activated in BHI agar and incubated at 37 °C for 24 h. After this incubation, an aliquot was inoculated into tubes containing 3 mL of BHI broth and incubated for 12 h at 37 °C. Cells were washed three times in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) and centrifuged at 10000 × g for 10 min. After centrifugation, the cells were suspended in BHI broth supplemented with 1% glucose to obtain a concentration corresponding to 0.5 absorbance at 600 nm. An aliquot of 200 µL/well of the bacterial culture (10³ UFC/µL) was added in four wells of a polystyrene plate and the plate was incubated at 37 °C for 4 h, 8 h, 12 h, 24 h and 48 h. After each time, the contents of the wells were collected and the wells were gently washed three times with 200 µL of PBS (pH 7.2) and maintained at room temperature to dry. The biomass adhered was fixed with 300 µL of methanol (99% v/v) for 10 min. Then, 300 µL of 0.5% crystal violet solution was added to each well. After 10 min, the staining solution was collected, the wells were washed with water and the dye was resuspended with 300 µL of absolute ethanol. After 10 min, 150 µL of the solution contained in each well were transferred to another plate clean and dry.

The absorbance was quantified using ELISA reader at a wavelength of 620 nm. The samples were classified into four categories based on relationship between the optical density (OD) of the wells inoculated with the strains and the results obtained for the optical density of the negative control (COD). The categories were: no adherent (NA) when OD ≤ COD; weakly adherent when COD < OD ≤ 2 × COD; moderately adherent when 2 × COD < OD ≤ 4 × COD or strongly adherent when 4 × COD < OD.

2.4. Identification of genes related to biofilm formation and toxin production

The bacterial DNA was extracted according to methodology previously described [17]. The supernatant DNA was quantified using a nanodrop spectrophotometer and stored in the freezer at –20 °C until use. Polymerase chain reaction (PCR) assays were applied to detect the presence of the genes related to biofilm formation (*icaA*, *icaB*, *icaC* and *atlE*) toxins (*tsst-1*, *sea*, *sec*, *sed*) and QS system (*agr*) according to methodology previously described [7,18–20] (Table 1). All reactions were done with Master Mix (Phoneutria®, Belo Horizonte, Brazil) according to manufacturer's recommendation. In all analyses, references strains as positive controls encoding the analyzed genes were used and water was used as negative control (Table 2).

2.5. Hierarchical cluster analysis, chi-square test and correspondence analysis

A hierarchical cluster analysis was performed on software SPSS.15.0 for Windows (Statistical Package for the Social Sciences - SPSS Inc., Chicago, IL, USA) to identify groups of samples with different profile of genes detection and biofilm formation. The Euclidian distance between each pair of observations was used as an instrument to measure similarity between groups and the Ward hierarchical clustering method was used to group similar samples [21,22].

A hierarchical cluster analysis involves three separate phases. The first phase divides the total sample into smaller subgroups. The second phase verifies if the groups are significantly different and theoretically significant. The third phase generates the profile of the clusters, describing the characteristics of each in terms of genes

Table 1
Primers employed for the detection of genes related to biofilm formation (*icaA*, *icaB*, *icaC* and *atIE*) toxins (*tsst-1*, *sea*, *sec*, *sed*) and QS system (*agr*).

Gene	Phenotype	Primers sequence (5'-3')	Size in base pairs	Reference
<i>icaA</i>	PIA	5'-GACCTCGAAGTCAATAGAGGT-3' 5'-CCGAGTATAACGTTGGATACC-3'	814 bp	[16]
<i>icaB</i>	PIA	5'-ATGGCTTAAAGCACACGACGC-3' 5'-TATCGGCATCTGGTGTGACAG-3'	526 bp	[16]
<i>icaC</i>	PIA	5'-ATAAACTTGAATTAGTGTATT-3' 5'-ATATATAAACTCTCTTAAACA-3'	989 bp	[16]
<i>atIE</i>	Autolysin E	5'-CAACTGCTCAACCGAGAACA-3' 5'-TTTGTAGATGTTGTGCCCA-3'	682 bp	[7]
<i>sea</i>	Enterotoxin A	5'-CCTTTGGAACGGTAAAAACG-3' 5'-TCTGAACCTTCCCATCAAAAA C-3'	127 bp	[18]
<i>sec</i>	Enterotoxin C	5'-CTCAAGAAGTACATATA AAGCTA GG -3' 5'-TCAAAATCGGATTAACATTATCC-3'	271 bp	[18]
<i>sed</i>	Enterotoxin D	5'-CTAGTTTGGTAATAT CTC CTTTAA ACG-3' 5'-TTAATGCTATATCTTATA GGTAAACATC-3'	319 bp	[18]
<i>tsst-1</i>	Toxic shock syndrome toxin-1	5'-AAGCCCTTTGTTGCTTGC G-3' 5'-ATCGAAGCTTGGCCCATCTTT-3'	445 bp	[18]
<i>agr</i>	QS system	5'-CATAGCACTGAGTCCAAGGA-3' 5'-CAATCGGTGACTTAGTAAAATG-3'	200 bp	[19]

detection and biofilm formation [21,22]. Examination was conducted to the point where the error variances were reduced as passing from a smaller to a larger number of clusters [21,22].

The chi-square test (χ^2) was applied to evaluate the frequency distributions of genes detection and biofilm formation and the clusters at a significance level of 5%.

Correspondence analysis was carried out on the software SAS System for Windows 9.2 (Statistical Analysis System - SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), at a significance level of 5%, to visualize the relationship between the genes detection and biofilm formation and the clusters; in this exploratory and descriptive technique, the characteristics and clusters are represented spatially, providing the perceptual map.

3. Results

3.1. 59 strains belonging to eight species of *Staphylococcus* were isolated

All bacterial strains were confirmed as being gram positive cocci, coagulase negative and DNase negative. A total of 59 strains belonging to eight species of genus *Staphylococcus* were analyzed: 32.2% (19) were identified as *S. haemolyticus*, 23.7% (14) as *S. epidermidis* and the same number as *S. hominis*, 11.8% (7) belongings to specie *S. warneri*, 3.3% (2) to *S. equorum* 1.6% and 1.6% (1) as *S. lentus*, *S. auricularis*, and *S. cohnii* (Fig. 1A).

Table 2
Strains used as positive controls for PCR reactions.

Genes	Positive strains
<i>icaA</i>	<i>Staphylococcus homini</i> 1159s ^a
<i>icaB</i>	<i>Staphylococcus homini</i> 320 ^a
<i>icaC</i>	<i>Staphylococcus hominis</i> 320 ^a
<i>atIE</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 1005s ^a
<i>sea</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> 36/2014 ^b
<i>sec</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> 30/2014 ^b
<i>sed</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> 13/2013 ^b
<i>tsst-1</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> 39/2009 ^b
<i>agr</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ^c

^a Strains obtained from our study which was sequenced for the confirmation of the investigated genes.

^b Strains kindly provided by Fundação Ezequiel Dias – Belo Horizonte, Minas Gerais.

^c Strain kindly provided by Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ.

3.2. CNS isolated from bloodstream infections were biofilm producer in CRA and polystyrene plates

Phenotypic biofilm production was analyzed by CRA and polystyrene plates. On the first one, 56 (94.9%) analyzed strains showed a very dark color, 1 (1.6%) a black color and 2 (3.3%) a red color (data not shown). On this test, slime-producing strains form black colonies, whereas non-producing strains develop red colonies. In this sense, almost all the strains isolated were excellent slime-producing bacteria.

On polystyrene plate, the strains were classified according to the relationship between control OD and strain OD into four categories: no adherent, weakly adherent, moderately adherent or strongly adherent (Fig. 1B). In 4 h, 21 strains (35.5%) were no adherent, 35 strains (59.3%) were weakly adherent, 3 strains (5%) were moderately adherent and 0 strains were strongly adherent. In 8 h, 6 strains (10%) were no adherent, 47 strains (79.6%) were weakly adherent, 5 strains (8.4%) were moderately adherent and 1 strain (1.6%) was strongly adherent. In 12 h, 1 strain (1.6%) was no adherent, 47 strains (79.6%) were weakly adherent, 9 strains (15.2%) were moderately adherent and 2 strains (3.3%) were strongly adherent. In 24 h, 0 strain was no adherent, 47 strains (79.6%) were weakly adherent, 10 strains (16.9%) were moderately adherent and 2 strains (3.3%) were strongly adherent. In 48 h, 2 strains (3.3%) were no adherent, 54 strains (91.5%) were weakly adherent, 2 strains (3.3%) were moderately adherent and 1 strain (1.6%) was strongly adherent (Fig. 1B). In a general observation, all strains showed a category of adhesion at different times evaluated – weakly, moderately or strongly. The biofilm formation increased with time (4 h–24 h), but decreased at 48 h.

3.3. The strains analyzed had a high prevalence of the gene *atIE* for biofilm formation and the gene *sea* for toxin production

The *ica* operon is responsible for the codification of PIA and studies have demonstrated relationship between the presence of this operon and biofilm formation in CNS. Therefore, we investigated the presence of these genes in our samples. 9 strains (15.2%) were positive for *icaA*, 23 strains (38.9%) were positive for *icaB*, 5 strains (8.4%) for *icaC*, 29 (49.1%) for *atIE* and 23 strains (38.9%) were positive for *agr* (Fig. 1C).

Another important virulence factor in CNS is the presence of toxin genes, leading patients to intoxication. 45 strains (76.2%) were positive for *sea*, 14 strains (23.7%) were positive for *sec*, 1

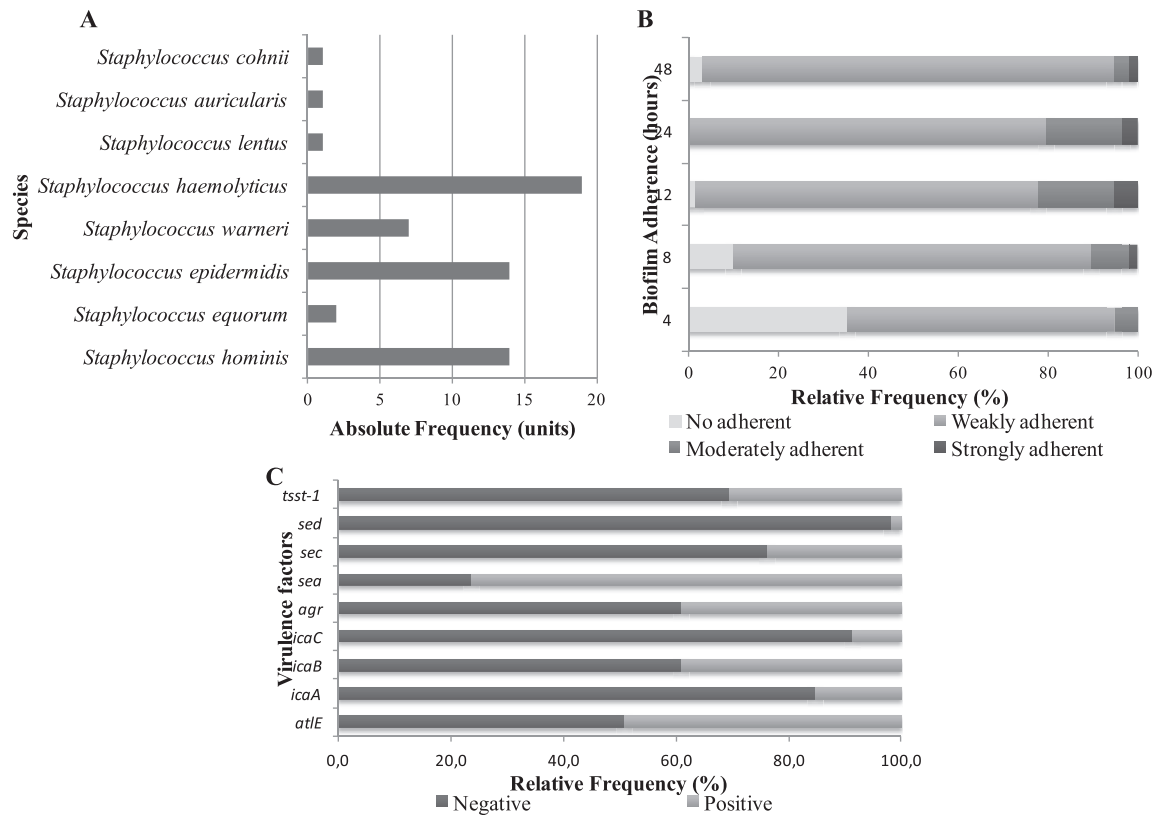


Fig. 1. Characterization of the samples. (A) Relative frequency of biofilm adherence in hours of CNS isolated. (B) Relative frequency of genes detection in CNS isolated.

strain (1.6%) was positive for *sed* and 18 strains (30.5%) positive for *tsst-1* (Fig. 1C).

3.4. According to the group-analyses, almost all genes had different frequency distributions among clusters and *icaB* showed important role in biofilm formation in these strains

The strains were classified accordingly to the phenotypic and genotypic characterization observed. We could form six groups and frequency distributions of clusters differed for *agr* ($\chi^2 = 24.39$; $P < 0.001$), *atlE* ($\chi^2 = 34.37$; $P < 0.001$), *icaA* ($\chi^2 = 36.35$; $P < 0.001$), *icaB* ($\chi^2 = 15.14$; $P = 0.01$), *sea* ($\chi^2 = 19.16$; $P = 0.002$), *sec* ($\chi^2 = 32.65$; $P < 0.001$) and *tsst-1* ($\chi^2 = 27.62$; $P < 0.001$). However, the frequency distributions of clusters did not differ for *icaC* ($\chi^2 = 3.88$; $P = 0.57$) and *sed* ($\chi^2 = 3.98$; $P = 0.55$).

Regarding, biofilm formation, the frequency distributions of clusters differed for *filme4* ($\chi^2 = 40.32$; $P < 0.001$), *filme8* ($\chi^2 = 39.52$; $P = 0.001$), *filme12* ($\chi^2 = 43.42$; $P < 0.001$) and *filme24* ($\chi^2 = 37.22$; $P < 0.001$). However, the frequency distributions of clusters did not differ for *filme48* ($\chi^2 = 16.30$; $P = 0.36$).

The profiles of each formed cluster can be seen in Tables 3 and 4. We can observe that cluster 1 showed 12 samples that had a typical profile: negative for all investigated genes with a weakly adhesion in all times. Cluster 2 showed 13 samples that had a typical profile: negative for *icaA*, *icaC*, *sec*, *sed*, *tsst-1* and positive for *atlE*, with a weakly adhesion in all times evaluated, but 23% showed a moderately adhesion in 8 h and 12 h that regressed in 24 h. Cluster 3 showed 6 samples that had a typical profile: negative for *agr*, *atlE*, *icaC*, *sed* and positive for *sea*, *sec* and *tsst-1*, with a weakly adhesion in all times evaluated. Cluster 4 showed 12 samples that had a typical profile: negative for *icaA*, *icaC*, *sec*, *sed*, *tsst-1* and positive for

sea, with a weakly adhesion in all times, but 16.7% showed a moderately adhesion in 24 h that regressed in 48 h. Cluster 5 showed 9 samples that had a typical profile: negative for *icaB*, *icaC*, *sed* and positive for *agr*, *atlE*, *icaA* and *sea*, with the most samples having a weakly adhesion, but 11.1% showed a moderately adhesion in 8 h and 24 h, while 22.2% showed this same type of adhesion in 12 h. Cluster 6 showed 7 samples that had a typical profile: negative for *atlE*, *icaA*, *icaC*, *sed* and positive for *icaB*, *sea* and *tsst-1*, with a diversified type of adhesion among the times evaluated, but it was the unique cluster that showed samples with a strongly adhesion in polystyrene plates.

The correspondence analysis allowed visualizing the relationship between these formed clusters and genes detection and biofilm formation levels by means of the resulting perceptual map (Fig. 2). Their first two dimensions explained 79.25% of the variability of the experimental data.

4. Discussion

The capacity of *Staphylococcus* to colonize and infect human plays a key role in the development of nosocomial infection [2,23]. The group of CNS is the main pathogens isolated in catheter-associated bloodstream infections and drain-associated meningitis [24]. *S. epidermidis* is the most prevalent species in CNS infections, followed by *S. hominis*, *S. haemolyticus* and *S. capitis* [2]. Nevertheless, in our study the most common specie was *S. haemolyticus* followed by *S. epidermidis* and *S. hominis*. We could, even, isolate other species like *S. warneri*, *S. cohnii*, *S. auricularis*, *S. equorum* and *S. lentus*.

The species *S. warneri* and *S. cohnii* are frequent colonizer of human's hair and skin [25], while, *S. auricularis* inhabits the outer

Table 3
Molecular profile by *Coagulase-negative staphylococci* clusters found in this study.

Cluster	N	Levels (%)	agr	atlE	icaA	icaB	icaC	sea	sec	sed	tsst-1
1	12	–	100,00	100,0	100,0	91,7	91,7	66,7	100,0	100,0	100,0
		+	0,00	0,0	0,0	8,3	8,3	33,3	0,0	0,0	0,0
2	13	–	69,23	7,7	100,0	69,2	84,6	30,8	100,0	100,0	76,9
		+	30,77	92,3	0,0	30,8	15,4	69,2	0,0	0,0	23,1
3	6	–	83,33	100,0	66,67	33,3	100,0	0,0	16,7	100,0	0,0
		+	16,67	0,0	33,33	66,7	0,0	100,0	83,3	0,0	100,0
4	12	–	58,33	41,7	100,0	50,0	83,3	8,3	100,0	91,7	91,7
		+	41,67	58,3	0,0	50,0	16,7	91,7	0,0	8,3	8,3
5	9	–	0,00	11,1	22,2	77,8	100,0	0,0	44,4	100,0	66,67
		+	100,00	88,9	77,8	22,2	0,0	100,0	55,6	0,0	33,33
6	7	–	42,9	71,4	100,0	14,3	100,0	14,3	42,9	100,0	28,6
		+	57,1	28,6	0,0	85,7	0,0	85,7	57,1	0,0	71,4

Percentages of positive (+) and negative (–) strains for each gene of the 6 clusters formed.

region of human's ears [26]. So this is probably the source of nosocomial infection seen by these microorganisms.

Nevertheless, *S. equorum* and *S. lentus* are not seen in the healthy microbiota of humans and its appearance as nosocomial pathogens is related to previous contact with animals. *S. equorum* is a novobiocin-resistant CNS and is more frequently isolated from healthy horses, goat milk and starter culture [27,28]. Few isolates were found in patients with chronic blepharitis, purulent conjunctivitis, and suppurative keratitis [29]. *S. lentus* is a bacterium of animal origin that rarely affects humans, with few reports of nosocomial infections [30]. Despite the low prevalence, we can not underestimate these species, since it's houses multidrug resistance genes [31] and virulence genes, as seen in this work.

Our main aim was to investigate the characteristics which enable these saprophytic bacteria to succeed in becoming pathogen to the host. In this way, we investigated the main virulence factors described in CNS: biofilm formation and toxin production.

The biofilm formation in CNS is the major virulence factor of this group, since it is enables the persistence of these microorganisms in

Table 4
Biofilm profile by *Coagulase-negative staphylococci* clusters found in this study.

Cluster	N	Levels (%)	film4	film8	film12	film24	film48
1	12	Not Adherent	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		Weakly Adherent	100,0	100,0	91,7	83,3	91,7
		Moderately Adherent	0,0	0,0	8,3	16,7	8,3
		Strongly Adherent	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	13	Not Adherent	23,1	0,0	0,0	0,0	0,0
		Weakly Adherent	69,2	76,9	76,9	100,0	100,0
		Moderately Adherent	7,7	23,1	23,1	0,0	0,0
		Strongly Adherent	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3	6	Not Adherent	33,3	0,0	0,0	0,0	0,0
		Weakly Adherent	66,7	100,0	100,0	100,0	100,0
		Moderately Adherent	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		Strongly Adherent	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4	12	Not Adherent	100,0	50,0	8,3	0,0	8,3
		Weakly Adherent	0,0	50,0	91,7	83,3	91,7
		Moderately Adherent	0,0	0,0	0,0	16,7	0,0
		Strongly Adherent	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5	9	Not Adherent	33,3	0,0	0,0	0,0	11,1
		Weakly Adherent	66,7	88,9	77,8	88,9	88,9
		Moderately Adherent	0,0	11,1	22,2	11,1	0,0
		Strongly Adherent	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
6	7	Not Adherent	14,3	0,0	0,0	0,0	0,0
		Weakly Adherent	57,1	71,4	0,0	0,0	71,4
		Moderately Adherent	28,6	14,3	57,1	71,4	14,3
		Strongly Adherent	0,0	14,3	42,9	28,6	14,3

Percentage of positive(+) and negative (–) strains for biofilm formation in each time of the 6 clusters formed (film4 = biofilm formation in 4 h; film8 = biofilm formation in 8 h; film12 = biofilm formation in 12 h; film24 = biofilm formation in 24 h; film48 = biofilm formation in 48 h).

biomaterials, like invasive medical devices [2]. Biofilms are structured communities of bacterial cells enclosed in a matrix attached to biotic or abiotic surfaces [32].

In our work, 96.5% of the strains had a positive result in the qualitative test of biofilm formation (CRA) and in the quantitative test; the strains increased their biofilm formation in 4–24 h and then reduced in 48 h. In this way, our samples had a peak of biofilm formation in 24 h and then start its dispersion phase as seen with 48 h.

During the first step of biofilm formation, the autolysin AtlE plays an important role in the initial adhesion, while the polysaccharide matrix – PIA/PNAG-is important for intercellular adhesion present on second phase. PIA/PNAG is encoded by *ica* locus, consisting of four genes *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD* and a promoter region called *icaR*. The gene *icaA* induces transferase enzyme activity, *icaB* has a deacetylation activity of PIA molecule, *icaC* is required for the synthesis of *N*-acetylglucosamin oligomers and *icaD* potentiates *icaA* action [2]. According to Grinholc et al. (2007), all strains harboring *icaA* gene, also harbor *icaD*. Thus, detection of one of these genes can be used to determine if the sample is a potential biofilm producer [33].

In our work, 15.2% of the strains were positive for *icaA*, 38.9% were positive for *icaB*, 8.4% were positive for *icaC* and 49.1% were positive for *atlE*. In this way, since we observed samples that produced biofilm and was negative for all the investigated genes or, do not produced biofilm and was positive for some of the investigated genes, it was not possible to see a direct relationship between the presence of these genes and biofilm formation.

Arciola et al. [14], found a direct relationship between the presence of the genes and the formation of slime by *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. While, Chaieb et al. [19] did not find the same relationship in *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needles in a dialysis unit, accordingly with our results.

The findings of this study suggest that other genes were also related to biofilm formation in CNS. The literature indicates the participation of other molecules during biofilm formation: for example, ClpP is a protease related to stress responses, virulence and biofilm formation. A ClpP mutant in *S. epidermidis* showed less biofilm production and reduced pathogenicity *in vivo* [34]. BHP is another protein that is related to adhesion to polystyrene and biofilm production in accumulation phase of CNS isolated from clinical environments. Samples containing this gene were related to a strong grip on polystyrene plates and its deletion, the absence of biofilm production. This biofilm formation was not related to the production of PIA/PNAG [35]. Another autolysin has also been identified as Aae. It is a 35 kDa protein which has bacteriolytic and adhesive property and potentially related to colonization of biotic or abiotic material [36].

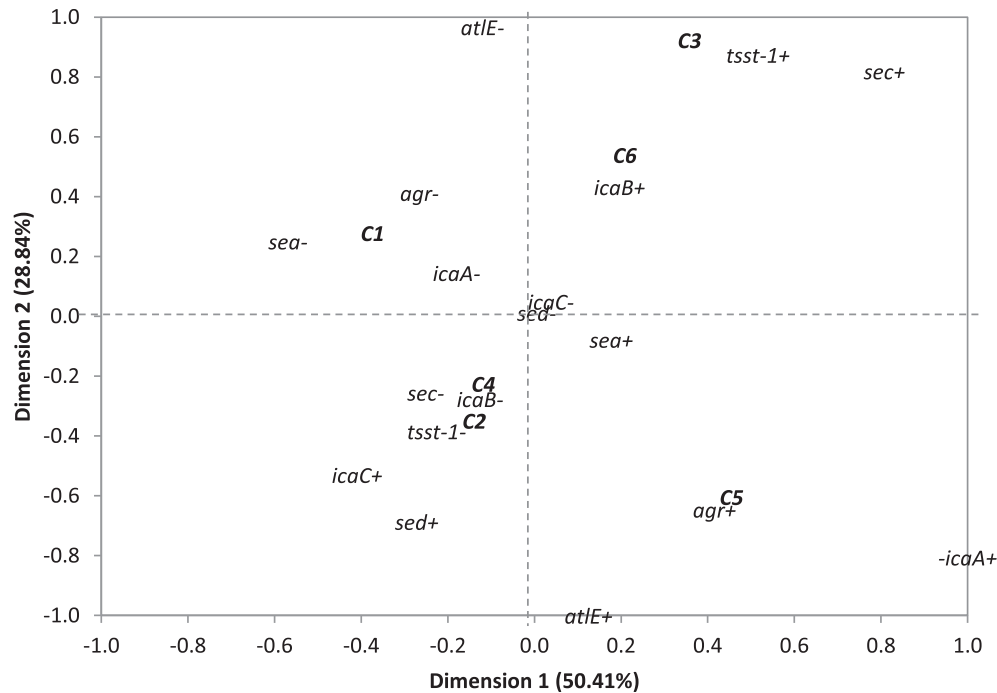


Fig. 2. Perceptual map of the clusters formed. Cluster 1 showed 12 samples that had a typical profile: negative for all investigated genes with a weakly adhesion in all times. Cluster 2 showed 13 samples that had a typical profile: negative for *icaA*, *icaC*, *sec*, *sed*, *tsst-1* and positive for *atle*, with a weakly adhesion in all times in a general way, but 23% showed a moderately adhesion in 8 h and 12 h that regressed in 24 h. Cluster 3 showed 6 samples that had a typical profile: negative for *agr*, *atle*, *icaC*, *sed* and positive for *sea*, *sec* and *tsst-1*, with a weakly adhesion in all times evaluated. Cluster 4 showed 12 samples that had a typical profile: negative for *icaA*, *icaC*, *sec*, *sed*, *tsst-1* and positive for *sea*, with a weakly adhesion in all times, but 16.7% showed a moderately adhesion in 24 h that regressed in 48 h. Cluster 5 showed 9 samples that had a typical profile: negative for *icaB*, *icaC*, *sed* and positive for *agr*, *atle*, *icaA* and *sea*, with a weakly adhesion in a general way, but 11.1% showed a moderately adhesion in 8 h and 24 h, while 22.2% showed this same type of adhesion in 12 h. Cluster 6 showed 7 samples that had a typical profile: positive for *atle*, *icaA*, *icaC*, *sed* and positive for *icaC*, *sea* and *tsst-1*, with a diversified type of adhesion among the times evaluated, but it was the unique cluster that showed samples with a strongly adhesion in polystyrene plates.

The elucidation of the adhesive mechanisms of clinical strains may help in developing antiadhesive coatings or anti-adhesin drugs to combat the nosocomial infection caused by this group of microorganisms [20].

Other virulence factor described for CNS is the production of toxins. Researches involving CNS have shown that these microorganisms produce various metabolites, including enzymes and toxins, and this contributes to the establishment of the infection [4,33].

In our work, 76.2% of strains were positive for *sea*, 23.7% were positive for *sec*, 1.6% was positive for *sed* and 30.5%, positive for *tsst-1*. These results are in accordance with Cunha et al. [4] and Giormezis et al. [32] that also isolated toxin-producers in clinical isolates. But, on the other hand, our work had a higher frequency of CNS with *sea* alone or with *sec*, while Cunha et al. [4] isolated more strains with *sec* alone or in combination with another gene and Giormezis et al. [32] found a higher number of *tsst-1*.

Although genotypic identification, we could not determinate the toxin production of our strains (data not shown). This detection in CNS is still poorly understood, once is dependent of methods that require high concentration of toxin produced, and, thus, might not detect low-producing strains, justifying our results [4]. Another possible explanation is that the strains has the genes encoding for toxins, but do not express in the growth conditions realized.

The regulation of biofilm formation and toxin synthesis is provided by *agr* locus that produces RNA III as its major effector. It acts as a small RNA regulating the expression of many virulence factors, including most of those encoding cell-wall-associated and extracellular proteins [37]. In our work, 61.1% of the strains were negative for *agr*, revealing an important role of other types of quorum sensing system as *luxS*, *SAR* or sigma factor. The *luxS* system, which

encodes the autoinducer AI-2, has been described for *S. epidermidis* and its mutant is capable of synthesizing a thicker biofilm than the wild strain by stimulating the production of PIA/PGA [2]. Other regulatory locus is known as *sar*, which controls exoproteins synthesis by modulating the expression of *agr*. The autoinducer molecule system, *sarA*, regulates positively biofilm formation by binding the promoter of the gene *icaA* and stimulate the production of PIA/PGA [38]. Another molecule is the sigma factor operon B. Inactivation of this locus induces a negative phenotype for the production of biofilm due to a decrease in the PIA/PGA synthesis [39].

Besides the descriptive analyses realized, another aim of our work was to identify groups of different profile based on biofilm and toxins genes in the strains isolated. We could form six different groups and interestingly, the clusters formed were not from the same hospital, showing similar characteristics between strains of CNS in different hospitals of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. This could indicate a dissemination of the strains between hospitals in our city that could alarm healthy professionals to have preventions measures.

Another interesting point of this analysis is that despite of the fact that the descriptive analysis could not indicate a relationship between locus *ica* and biofilm formation, the group-analysis could show that the unique cluster that had strongly adhesion in polystyrene plates was the only one to show a positive profile for the gene *icaB*. This observation could indicate an important role of this gene in biofilm formation in our strains.

In our work, we investigated a bacterial group that is still neglected by academic community and we goal in helping to better understand the pathogenicity characteristics in the strains circulating in different hospitals of our city.

5. Conclusion

In conclusion, all strains analyzed were biofilm producer, with high prevalence of *atIE*, and had potential of toxin producing, with high prevalence of *sea*. According to the group-analyses, almost all genes had different frequency distributions among clusters and *icaB* showed important role in biofilm formation in these strains.

Funding

This work was supported by 1) Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); 2) Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG); 3) Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão (FAPEMA) and 4) Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Acknowledgments

We are grateful to Viviane Marques from UFRJ for providing *agr*-controls.

References

- [1] M. Widerström, J. Wiström, A. Sjöstedt, T. Monsen, Coagulase-negative staphylococci: update on the molecular epidemiology and clinical presentation, with a focus on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus*, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 31 (2012) 7–20, <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-011-1270-6>.
- [2] K. Becker, C. Heilmann, G. Peters, Coagulase-negative staphylococci, Clin. Microbiol. Rev. 27 (2014) 870–926, <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00109-13>.
- [3] M. Otto, Virulence factors of the coagulase-negative staphylococci, Front. Biosci. 9 (2004) 841–863.
- [4] M.D.L.R.S. Cunha, R.A.O. Calsolari, J.P.A. Júnior, Detection of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin 1 genes in *Staphylococcus*, with emphasis on coagulase-negative staphylococci, Microbiol. Immunol. 51 (2007) 381–390.
- [5] H. Büttner, D. Mack, H. Rohde, Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions, Front. Cell. Infect. Microbiol. 5 (2015) 14, <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2015.00014>.
- [6] S.M. Soltati, E. Tajbakhsh, F. Khamesipour, H.C. Gugnani, Prevalence of virulence genes of biofilm producing strains of *Staphylococcus epidermidis* isolated from clinical samples in Iran, AMB Express 5 (2015) 134, <http://dx.doi.org/10.1186/s13568-015-0134-3>.
- [7] L.L.E.B. Frebourg, S. Lefebvre, G. De Recherche, C.H.U. De Rouen, PCR-based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains, J. Clin. Microbiol. 38 (2000) 877–880.
- [8] J.O. Galdbart, J. Allignet, H.S. Tung, C. Rydén, N. El Solh, Screening for *Staphylococcus epidermidis* markers discriminating between skin-flora strains and those responsible for infections of joint prostheses, J. Infect. Dis. 182 (2000) 351–355, <http://dx.doi.org/10.1086/315660>.
- [9] M. Vasil, Aetiology of Mastitis and Enterotoxin Production by *Staphylococcus* sp. isolated from milk of two sheep herds, Slovak J. Anim. Sci. 4 (2007) 189–195.
- [10] J.F. Veras, L.S. do Carmo, L.C. Tong, J.W. Shupp, C. Cummings, D.A. dos Santos, M.M.O.P. Cerqueira, A. Cantini, J.R. Nicoli, M. Jett, A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil, Int. J. Infect. Dis. 12 (2008) 410–415, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2007.09.018>.
- [11] S.D.S.P. da Silva, T.A. Cidral, M.J.D.S. Soares, M.C.N. de Melo, Enterotoxin-encoding genes in *Staphylococcus* spp. from food handlers in a university restaurant, Foodborne Pathog. Dis. 12 (2015) 921–925, <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2015.1941>.
- [12] F. Bertelloni, F. Fratini, V.V. Ebani, A. Galiero, B. Turchi, D. Cerri, Detection of genes encoding for enterotoxins, TSST-1, and biofilm production in coagulase-negative Staphylococci from bovine bulk tank milk, Dairy Sci. Technol. 95 (2015) 341–352, <http://dx.doi.org/10.1007/s13594-015-0214-9>.
- [13] B.R. Boles, A.R. Horswill, *agr*-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms, PLoS Pathog. 4 (2008), <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000052>.
- [14] N. Confidence, J. Anyanwu, W.C. John, Conventional and rapid methods for identification of *Staphylococcus aureus* from clinical specimens, AJBMS 1 (2013) 41–43, <http://dx.doi.org/10.11648/j.ajbms.20130103.11>.
- [15] C.R. Arciola, D. Campoccia, S. Gamberini, M. Cervellati, E. Donati, L. Montanaro, Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus, Biomaterials 23 (2002) 4233–4239, [http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00171-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00171-0).
- [16] M.V. Dias-Souza, et al., Evaluation of antimicrobial and anti-biofilm activities of *Anacardium occidentale* stem bark extract, J. Nat. Prod. 6 (2013) 198–205.
- [17] D.G. Pitcher, N.A. Saunders, R.J. Owen, Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate, Lett. Appl. Microbiol. 8 (1989) 151–156, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.1989.tb00262.x>.
- [18] W. Ziebuhr, V. Krimmer, S. Rachid, F. Go, I. Lo, A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element, Mol. Microbiol. 32 (1999) 345–356.
- [19] E. Reinoso, S. Bettera, C. Frigerio, M. DiRenzo, A. Calzolari, C. Bogno, RAPD-PCR analysis of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine and human hosts, Microbiol. Res. 159 (2004) 245–255, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmics.2004.04.002>.
- [20] K. Becker, R. Roth, G. Peters, Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of Staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene, J. Clin. Microbiol. 36 (1998) 2548–2553.
- [21] J.F. Hair, et al., Essential of business research methods, John Wiley & Sons, Australia, 2003.
- [22] A.K. Jain, M.N. Murty, P.J. Flynn, Data clustering: a review, ACM Comput. Surv. 31 (3) (1999) 264–323.
- [23] K. Chaieb, K. Mahdouani, A. Bakhrouf, Detection of *icaA* and *icaD* loci by polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needles in a dialysis unit, J. Hosp. Infect. 61 (2005) 225–230, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2005.05.014>.
- [24] D.J. Hetem, Transmission Dynamics and Resistance in Staphylococci, n.d.
- [25] I. Shamoto, Y. Ishihara, A. Sato, H. Usami, N. Matsuda, Dissemination of *Staphylococcus Warneri* in the hair of ICU Doctors, AiM, 2015, pp. 599–603, AiM (2015) 599–603.
- [26] W.E. Kloos, K.H. Schleifer, *Staphylococcus auricularis* sp. nov.: an inhabitant of the human external ear, Int. J. Syst. Bacteriol. 33 (1983) 9–14, <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-33-2-442a>.
- [27] D. Nováková, I. Sedláček, R. Pantůček, V. Štětina, P. Švec, P. Petrás, *Staphylococcus equorum* and *Staphylococcus succinus* isolated from human clinical specimens, J. Med. Microbiol. 55 (2006) 523–528, <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.46246-0>.
- [28] R.B. Place, D. Hiestand, H.R. Gallmann, M. Teuber, *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*, subsp. nov., a starter culture component for surface ripened semi-hard cheeses, Syst. Appl. Microbiol. 26 (2003) 30–37, <http://dx.doi.org/10.1078/072320203322337281>.
- [29] A. Pinna, S. Zanetti, M. Sotgiu, L.A. Sechi, G. Fadda, F. Carta, Identification and antibiotic susceptibility of coagulase negative Staphylococci isolated in corneal/external infections, Br. J. Ophthalmol. 83 (1999) 771–773, <http://dx.doi.org/10.1136/bjo.83.7.771>.
- [30] M. Rivera, M.D. Dominguez, N.R. Mendiola, G.R. Roso, C. Quereda, *Staphylococcus lentus* peritonitis: a case report, Perit. Dial. Int. 34 (2014) 469–470, <http://dx.doi.org/10.3747/pdi.2012.00303>.
- [31] M. Mikulasová, J. Valáriková, R. Dusyinski, R. Chovanová, A. Belicová, A. Belicová, Multiresistance of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus equorum* from Slovak Bryndza cheese, Folia Microbiol. (Praha) 59 (2014) 223–227, *J. Nat. Prod.* 6, 198–205.
- [32] W.M. Dunne, W.M. Dunne, Bacterial adhesion: seen any good bio lms lately? Society 15 (2002) 155–166, <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.15.2.155>.
- [33] M. Grinholc, G. Wegrzyn, J. Kurlenda, Evaluation of biofilm production and prevalence of the *icaD* gene in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with nosocomial infections and carriers, FEMS Immunol. Med. Microbiol. (2007), <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00262.x>.
- [34] C. Wang, M. Li, D. Dong, J. Wang, J. Ren, M. Otto, Q. Gao, Role of ClpP in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*, Microbes Infect. 9 (2007) 1376–1383, <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2007.06.012>.
- [35] M.A. Tormo, E. Knecht, F. Götz, I. Lasa, J.R. Penadés, Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? Microbiology 151 (2005) 2465–2475, <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.27865-0>.
- [36] C. Heilmann, G. Thumm, G.S. Chhatwal, J. Hartleib, A. Uekötter, G. Peters, Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*, Microbiology 149 (2003) 2769–2778, <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.26527-0>.
- [37] J. Gong, D. Li, J. Yan, Y. Liu, D. Li, J. Dong, Y. Gao, T. Sun, G. Yang, The accessory gene regulator (*agr*) controls *Staphylococcus aureus* virulence in a murine intracranial abscesses model, Braz. J. Infect. Dis. 18 (2014) 501–506, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2014.03.005>.
- [38] N. Giormezis, F. Kolonitsiou, A. Foka, E. Drougka, A. Liakopoulos, A. Makri, A.D. Papanastasiou, A. Vogiatzi, G. Dimitriou, M. Marangos, M. Christofidou, E.D. Anastassiou, E. Petinaki, I. Spiliopoulou, Coagulase-negative Staphylococcal bloodstream and prosthetic-device-associated infections: the role of biofilm formation and distribution of adhesin and toxin genes, J. Med. Microbiol. 63 (2014) 1500–1508, <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.075259-0>.
- [39] J.K.M. Knobloch, K. Bartscht, A. Sabottke, H. Rohde, H.H. Feucht, D. Mack, Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the sigB operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress, J. Bacteriol. 183 (2001) 2624–2633, <http://dx.doi.org/10.1128/JB.183.8.2624-2633.2001>.

Coagulase-negative Staphylococci Isolated from Human Bloodstream Infections Showed Multi-drug Resistance Profile

Journal:	<i>Microbial Drug Resistance</i>
Manuscript ID:	MDR-2017-0309.R2
Manuscript Type:	Epidemiology
Date Submitted by the Author:	19-Jan-2018
Complete List of Authors:	Pedroso, Silvia Helena; Universidade Federal de Minas Gerais Instituto de Ciencias Biologicas, Microbiology Sandes, Savio Henrique; Universidade Federal de Minas Gerais Instituto de Ciencias Biologicas, Biologia Geral Almeida, Robledo; Universidade Federal de Viçosa Campus Florestal, Departamento de Engenharia de Alimentos Nunes, Álvaro; Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Biologia Geral Serufo, José Carlos; Universidade Federal de Minas Gerais Instituto de Ciencias Biologicas, Departamento de Clínica Médica Farias, Luiz; ICB/UFMG, Microbiology Carvalho, Maria Auxiliadora; ICB/UFMG, Microbiology Bomfim, Maria Rosa dos Santos, Simone; Universidade Federal de Minas Gerais Instituto de Ciencias Biologicas, Microbiology
Keyword:	Antibiotics, Microbial Drug Resistance, Nosocomial Infections, Genotyping, Epidemiology
Manuscript Keywords (Search Terms):	Coagulase-negative staphylococci, Hemoculture, Antimicrobial resistance
Abstract:	Coagulase-negative staphylococci (CNS) are important pathogens causing nosocomial infections worldwide with increasing resistance to antimicrobials. The aim of this study was to characterize resistance aspects of CNS isolated from patients with bloodstream infections acquired in hospitals in Belo Horizonte, MG, Brazil. Staphylococcus strains were characterized using rep-PCR fingerprinting with (GTG) ₅ primer. Phenotypic resistance was analyzed using AST-P5085 card (bioMérieuxVitek®). PCR was used to detect <i>mecA</i> , <i>vanA</i> , <i>blaZ</i> , <i>ermA/B/C</i> , <i>aac-aphD</i> and <i>SCC-mec</i> . For statistical analyses we used hierarchical cluster, chi-square test and correspondence. Several clusters were formed within the same species <i>s</i> using (GTG) ₅ primer, and strains showed resistance to antimicrobials: benzylpenicillin (100%); oxacillin (93.1%); gentamycin (36.3%); ciprofloxacin (63.7%); moxifloxacin (32.7%); norfloxacin (81.0%); erythromycin (86.2%); clindamycin (75.8%); linezolid, teicoplanin and vancomycin (1.7%); tigecycline (0%); fusidic acid (10.35%); rifampicin (13.7%); trimethoprim / sulfamethoxazole (46.5%). Regarding genotypic analyses, 40%, 0%, 78%, 42%, 100%, 24% and 30% were positive for <i>mecA</i> , <i>vanA</i> , <i>blaZ</i> , <i>ermA</i> , <i>ermB</i> , <i>ermC</i> and <i>aac-aphD</i> , respectively. Regarding <i>SCCmec</i> type, 3.4% presented type I; 5.0% type II; 27.1% type III; 20.3% type IIIA and 32.2% type IIIB. Six clusters were formed and frequency distributions of resistant strains to oxacillin, gentamicin, ciprofloxacin, moxifloxacin, norfloxacin, erythromycin, clindamycin, linezolid, teicoplanin, vancomycin, fusidic acid, rifampicin and trimetropin/sulfametoxazol, and also <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>ermC</i> , <i>aac-aphD</i> and <i>SCCmec</i> type differed ($P < 0.001$). In conclusion, the strains investigated in this study were multi-drug resistant and carried multiple antibiotic-resistance genes.

Microbial Drug Resistance

Decision Letter (MDR-2017-0309.R2)

From: tomasz@mail.rockefeller.edu

To: simonesantoskey@ufmg.br

CC:

Subject: Microbial Drug Resistance - Decision on Manuscript ID MDR-2017-0309.R2

Body: 14-Feb-2018

Dear Dr. dos Santos:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Coagulase-negative staphylococci isolated from human bloodstream infections showed multi-drug resistance profile" in its current form for publication in Microbial Drug Resistance.

Please be sure to cite this article to ensure maximum exposure of your work.

All authors will get a follow-up email with instructions on how to complete our online Copyright Agreement form.

FAILURE BY ALL AUTHORS TO SUBMIT THIS FORM MAY RESULT IN A DELAY OF PUBLICATION.

The corresponding author is responsible for communicating with coauthors to make sure they have completed the online copyright form. Authors not permitted to release copyright must still return the form acknowledging the statement of the reason for not releasing the copyright. The corresponding author will receive notification when all copyright forms have been submitted.

Consider Liebert Open Option to have your paper made free online immediately upon publication for a one-time fee. Benefits of Liebert Open Option include: accelerated e-pub ahead of print publication; email message highlighting the article; increased readers, citations and downloads; an identifying icon in the table of contents showing that the paper is permanently available for free to all readers; and immediate deposition into PubMed Central®. Please contact OpenAccess@liebertpub.com or call (914) 740-2194 for more information.

If your institution is not currently subscribing to this journal, please ensure that your colleagues have access to your work by recommending this title (http://www.liebertpub.com/mcontent/files/lib_rec_form.pdf) to your Librarian.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of Microbial Drug Resistance, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
Dr. Alexander Tomasz
Editor-in-Chief, Microbial Drug Resistance
tomasz@mail.rockefeller.edu

Date Sent: 14-Feb-2018