

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



Porto Alegre

2014

Caio Fernando de Oliveira

**Os enigmáticos *Staphylococcus* Coagulase Negativos (SCoN):
estudos de métodos de extração de DNA e tipos de SCC*mec* em
SCoN e epidemiologia molecular e formação de biofilme de
*Staphylococcus epidermidis***

Tese submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde
da Universidade Federal de Ciências da
Saúde de Porto Alegre, como requisito
para a obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Alves d'Azevedo

Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre Rieger

Porto Alegre

2014

Oliveira, Caio Fernando de

Os enigmáticos Staphylococcus Coagulase Negativos (SCoN) : estudos de métodos de extração de DNA e tipos de SCCmec em SCoN e epidemiologia molecular e formação de biofilme de Staphylococcus epidermidis / Caio Fernando de Oliveira. -- 2014.

73 p. : il., tab. ; 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2014.

Orientador(a): Prof. Dr. Pedro Alves d'Azevedo ;
coorientador(a): Prof. Dr. Alexandre Rieger.

1. Doenças infecciosas. 2. Microrganismos causadores de infecção hospitalar. 3. Resistência aos antimicrobianos. 4. Microbiologia clínica. 5. Biologia molecular. I. Título.

RESUMO

Os *Staphylococcus* coagulase negativos (SCoN) são um grupo de patógenos oportunistas que vêm crescendo em importância como agentes de infecções hospitalares relacionadas a dispositivos médicos invasivos. Além de causarem infecções de difícil tratamento, pois frequentemente são microrganismos multirresistentes e formadores de biofilme, este grupo de microrganismos também pode servir como reservatório de elementos genéticos móveis e genes de resistência para outras espécies. Neste estudo retrospectivo, foram analisados 137 isolados clínicos de SCoN provenientes do Complexo Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. Primeiramente, foi comparado (com relação à quantidade e qualidade do material obtido) o rendimento de 4 métodos de extração de DNA utilizando-se espectrofotometria e PCR simples. Posteriormente, foi pesquisada a presença dos principais tipos de SCC*mec* utilizando-se um PCR multiplex. Em uma segunda etapa, a clonalidade dos isolados de *S. epidermidis* foi investigada por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e tipagem por sequenciamento de múltiplos loci (MLST). Os resultados obtidos foram cruzados com formação de biofilme, presença do gene *icaD* e multirresistência. Embora com rendimentos diferentes, os 4 métodos de extração de DNA forneceram material apropriado para amplificação em PCR simples. O método baseado em coluna de separação apresentou os melhores resultados para os SCoN. Os tipos de SCC*mec* mais prevalentes foram os tipos II, III e V. Muitos isolados demonstraram possuir mais de um tipo de SCC*mec*, apesar disso, foi encontrada maior associação com multirresistência nos isolados que possuíam apenas um tipo de SCC*mec*. Os métodos de tipagem molecular revelaram uma grande diversidade genética da população de *S. epidermidis*. Apesar disso, também foi possível reconhecer alguns grupos clonais com características em comum. Os resultados obtidos neste estudo confirmam as principais características de virulência e a grande diversidade e mobilidade genética dos SCoN, justificando continuidade de monitoramento, assim como novos estudos envolvendo este grupo de microrganismos.

Palavras-chave: *Staphylococcus* coagulase negativos. Extração de DNA. Tipos de SCC*mec*. Biofilme. Tipagem molecular.

ABSTRACT

Coagulase negative Staphylococci (CoNS) are a group of opportunistic pathogens which are increasing as agents of nosocomial infections related to indwelling medical devices. These infections are usually hard to treat since these microorganisms are frequently multidrug resistant (MDR) and biofilm formers. Besides that, they may also act as reservoir of mobile genetic elements and resistance genes to other species. In this retrospective study were analyzed 137 clinical specimens of CoNS isolated from “Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre” medical center. First, yielding of 4 DNA extraction methods were compared (regarding DNA amount and quality) using spectrophotometry and PCR. Later, main SCC*mec* types were searched by multiplex PCR. Afterwards, clonal relationship of *S. epidermidis* isolates were surveyed by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST). Results obtained were crossed with data from biofilm formation, presence of gene *icaD*, and MDR. Although with different yielding, 4 DNA extraction methods provided appropriated material for amplification in simplex PCR. The method based on separation column presented best results for CoNS. SCC*mec* types most frequently amplified were types II, III and V. Several strains showed harbour more than one SCC*mec* type, nevertheless, higher association with MDR were found in strains holding just one SCC*mec* type. Molecular typing methods showed great genetic diversity among *S. epidermidis* population. Despite this, it was also possible recognize clusters with common characteristics. Results obtained in this study confirm SCoN main virulence characteristics as well as their great diversity and genetic mobility, justifying constant monitoring as well as new studies with this special group of microorganisms.

Keywords: Coagulase negative Staphylococci. DNA extraction. SCC*mec* types. Biofilm. Molecular typing.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	4
1.1 Contextualização.....	4
1.2 O gênero <i>Staphylococcus</i>	4
1.2.1 <i>S. aureus</i>	6
1.2.2 O grupo dos <i>Staphylococcus</i> coagulase negativos (S _{CoN}).....	6
1.2.3 Habitat natural.....	7
1.2.4 Características estruturais.....	8
1.2.5 Importância clínica.....	8
1.2.6 Formação de biofilme.....	9
1.2.7 Resistência aos antimicrobianos.....	10
1.2.8 Métodos moleculares no estudo da epidemiologia dos S _{CoN}	13
1.2.8.1 Extração de DNA de S _{CoN}	13
1.2.8.2 O cassete cromossômico estafilocócico <i>mec</i> (SCC <i>mec</i>).....	15
1.2.8.3 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) de <i>S. epidermidis</i>	15
1.2.8.4 Tipagem molecular por sequenciamento de múltiplos <i>locus</i> (MLST) de <i>S. epidermidis</i>	17
1.3 Referências bibliográficas.....	21
2. Objetivos.....	34
3. Materiais e métodos.....	35
3.1 Artigo 1 - Métodos de extração de DNA em S _{CoN}	35
3.2 Artigo 2 - Tipos de SCC <i>mec</i> em S _{CoN} e tipagem molecular de <i>S. epidermidis</i>	48
4. Considerações finais.....	69
5. Anexos.....	71
5.1 Demais produções científicas.....	71
5.1.1 Artigos científicos como coautor.....	71
5.1.2 Resumos publicados em eventos.....	72
5.1.3 Aspectos éticos.....	73
5.1.4 Normas da revista que será submetido o artigo 2.....	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 Contextualização

As doenças infecciosas fazem parte da história da humanidade e as grandes epidemias, muitas vezes, alteraram significativamente o rumo da mesma (McNeill, 1998; Cartwright and Biddiss, 2000). O grande avanço da ciência contemporânea modificou definitivamente a relação do homem com diversas doenças, trazendo inúmeros benefícios para a saúde e expectativa de vida da população mundial. Entretanto, algumas vezes esses benefícios fazem surgir novos problemas, decorrentes das inevitáveis alterações que acompanham grandes mudanças. A área da microbiologia médica possui dois exemplos bastante clássicos e atuais neste sentido: a emergência de novas espécies bacterianas como agentes de infecções em humanos e o aumento da resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos. O primeiro exemplo possui causas mais diversas, mas que geralmente tem em comum baixa da imunidade de pacientes internados em hospitais. Já o segundo é causado principalmente pelo uso incorreto de uma das maiores descobertas da ciência no século passado: os agentes antimicrobianos.

Os *Staphylococcus* coagulase negativos (SCoN) constituem um grupo de microrganismos que se encaixa adequadamente nas situações exemplificadas acima. Este grupo é composto por microrganismos de baixa virulência, mas que podem causar infecções importantes em situações específicas como imunossupressão e/ou utilização de procedimentos invasivos. Além disso, algumas características altamente frequentes em muitas espécies do grupo, como a elevada resistência a antibióticos e a formação de biofilme, podem dificultar o tratamento dessas infecções. Dentre as diversas espécies que compõem o grupo, destaca-se *Staphylococcus epidermidis* por ser o representante mais frequentemente encontrado como agente responsável por infecções em humanos (Vuong, 2002; Rogers, 2009).

1.2 O gênero *Staphylococcus*

Membros deste gênero são cocos gram positivos imóveis, não formadores de esporos, geralmente catalase positivos, anaeróbios facultativos e não possuem

cápsula. Estas características fazem com que o gênero *Staphylococcus* seja formado atualmente por 40 espécies e 22 subespécies. Destas, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus lugdunensis* e *Staphylococcus warneri* são mais frequentemente encontradas como agentes etiológicos de infecções em humanos. Entretanto, outras espécies como *Staphylococcus schleiferi*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus sacharolyticus*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus cohnii* e *Staphylococcus xylosus* também têm sido ocasionalmente identificadas nesta condição (Becker, 2007). A Tabela 1 apresenta as principais espécies de *Staphylococcus* envolvidas atualmente em infecções em humanos e seus respectivos locais de isolamento.

Tabela 1. Principais espécies de SCoN isoladas de infecções em humanos

Espécies	Local de isolamento
<i>S. auricularis</i>	Meato auditivo externo humano, primatas
<i>S. capitis</i> subs. <i>Capitis</i>	Pele humana
<i>S. capitis</i> subs. <i>urealyticus</i>	Primatas
<i>S. caprae</i>	Cabras, humanos
<i>S. cohnii</i> subs. <i>Cohnii</i>	Humanos
<i>S. capitis</i> subs. <i>urealyticus</i>	Primatas, musaranhos ^a
<i>S. epidermidis</i>	Pele humana
<i>S. haemolyticus</i>	Pele humana, primatas, artiodáctilos ^b , cavalos
<i>S. hominis</i> subs. <i>hominis</i>	Pele humana
<i>S. hominis</i> subs. <i>novobiosepticus</i>	Isolados clínicos humanos
<i>S. intermedius</i>	Carnívoros, cavalos domésticos, poluição
<i>S. lugdunensis</i>	Isolados clínicos humanos
<i>S. pettenkoferi</i>	Isolados clínicos humanos
<i>S. saccharolyticus</i>	Humanos
<i>S. saprophyticus</i> subs. <i>Saprophyticus</i>	Pele humana, primatas, musaranhos, roedores
<i>S. saprophyticus</i> subs. <i>bovis</i>	Narinas bovinas
<i>S. schleiferi</i>	Isolados clínicos humanos, cães
<i>S. sciuri</i> subs. <i>Sciuri</i>	Roedores, artiodáctilos, cetáceos ^c , marsupiais
<i>S. simulans</i>	Pele humana, carnívoros
<i>S. warneri</i>	Pele humana, artiodáctilos, cavalos
<i>S. xylosus</i>	Pele humana, roedores, mamíferos, pássaros

^a Pequenos mamíferos; ^b Mamíferos ungulados de dedos pares; ^c Mamíferos aquáticos. Adaptada de Mathema, 2010.

1.2.1 *S. aureus*

Entre as espécies citadas acima, *S. aureus* é sem dúvida o patógeno humano mais frequente. Esta espécie possui elevada virulência e é capaz de causar grande gama de infecções, desde infecções de pele até bacteremias com elevado risco de morte (Sangvik, 2012). Globalmente, *S. aureus* é responsável por grande proporção de bacteremias (22%) e infecções de pele e tecidos moles (39%) (Diekema, 2001; Hope, 2008). Além disso, este microrganismo também é motivo de preocupação por ter alto índice de isolados resistentes às inúmeras classes de antimicrobianos, pois pode expressar diversos mecanismos de resistência (Leclercq, 2009).

S. aureus vêm adquirindo e desenvolvendo mecanismos de resistência aos antimicrobianos desde o final dos anos 40 com o início da era dos antibióticos (Barber, 1948). Entretanto, talvez o acontecimento mais marcante tenha ocorrido no início dos anos 60, com a introdução da metilina e o surgimento do *S. aureus* resistente à metilina (MRSA), através da aquisição do gene *mecA* (Barber, 1961). Além da metilina, este gene confere resistência a outros importantes agentes antimicrobianos (Ex.: penicilinas e cefalosporinas) utilizados no tratamento de infecções causadas por *S. aureus*. No final dos anos 60, o MRSA já era endêmico em hospitais, posteriormente apareceu rápida e inesperadamente na comunidade nos anos 90 e atualmente está disseminado no mundo todo (Somerville, 2010). Atualmente, o MRSA representa uma ameaça substancial aos sistemas de saúde de diversos países, já sendo inclusive considerado endêmico em muitos hospitais (Hope, 2008; ECDC, 2013).

1.2.2 O grupo dos *Staphylococcus* coagulase negativos (SCoN)

Com exceção do *S. aureus*, as demais espécies do gênero *Staphylococcus* pertencem ao grupo conhecido como SCoN. Esta divisão surgiu da necessidade de separar a espécie *S. aureus* (primeiramente reconhecida como patógena humana e mais virulenta) das demais espécies consideradas inicialmente apenas como contaminantes de culturas (Rogers, 2009; Widerström, 2012). O teste da enzima coagulase foi primeiramente utilizado, pois era positivo apenas para *S. aureus*. Atualmente, embora *S. hyicus* e *S. intermedius* também produzam a enzima

coagulase em quantidade suficiente para coagular o plasma sanguíneo *in vitro* em testes laboratoriais, estas espécies também são consideradas como pertencentes ao grupo dos SCoN (Bannerman, 2006).

S. epidermidis é o principal representante do grupo dos SCoN. Esta espécie aparece como uma das mais frequentes causadoras de infecções da corrente sanguínea associadas ao ambiente hospitalar e infecções relacionadas a cateteres vasculares e dispositivos prostéticos (Rogers, 2009; Schoenfelder, 2010). Em grande parte desses casos, as cepas isoladas são resistentes à ação de diversos agentes antimicrobianos e produtoras de biofilme (Wisplinghoff, 2004; Reiter, 2011; Antunes, 2011). O resultado são infecções extremamente difíceis de tratar e que causam grandes transtornos aos pacientes e um ônus significativo aos sistemas de saúde (Vuong, 2002; Otto, 2009).

1.2.3 Habitat natural

Os SCoN podem ser encontrados em poeira, alimentos e água, mas são principalmente saprófitas da pele e membranas mucosas humanas e de outros mamíferos. No corpo humano, algumas espécies têm predileção por colonizar áreas específicas: *S. hominis* e *S. haemolyticus*, por exemplo, são mais comuns em áreas com glândulas apócrinas como axilas e região inguinal. Entretanto, existem espécies como *S. lugdunensis* e *S. epidermidis* que são encontradas amplamente distribuídas por todo o corpo (Kloos, 1975).

S. epidermidis é o microrganismo mais frequentemente isolado do epitélio humano, pois possui a habilidade de tolerar o pH ácido, os lipídios e a concentração de sais encontrados neste local (Kushwaha, 1976). A espécie coloniza principalmente as narinas, mas também axilas, cabeça, pernas e braços. Um adulto saudável pode abrigar em sua pele de 10 a 24 cepas diferentes de *S. epidermidis* (Kloos, 1975; Vuong, 2002).

Como parte da microbiota da pele humana, *S. epidermidis* usualmente tem uma relação benigna com seu hospedeiro. De maneira geral, é considerado um patógeno oportunista, pois requer condições especiais ou situação de imunossupressão para migrar da condição de habitante normal para agente

infeccioso (Vuong, 2002). Análises feitas no genoma deste microrganismo indicam que ele possui diversos genes responsáveis pela sua sobrevivência nas condições encontradas na superfície da pele humana (Rogers, 2009). Isto faz com que talvez desempenhe papel importante, na manutenção da microbiota da pele mais saudável, por competição com microrganismos mais patogênicos como, por exemplo, *Staphylococcus aureus* (Otto, 2012).

1.2.4 Características estruturais

A parede celular dos SCoN é formada principalmente por uma rede complexa de peptidoglicano e ácido teicóico, mas que também envolve polissacarídeos e outras proteínas. A ligação peptídica deste complexo consiste de peptídeos oligoglicínicos, o que torna o complexo susceptível à ação de lisostafina. Dependendo da espécie e da composição do meio de cultura a glicina pode ser substituída por outros aminoácidos. Da mesma forma, existem diversos tipos de ácidos teicóicos e os mesmos podem ser substituídos por N-acetilgalactosamina, glicose e N-acetilglicosamina (Salton, 1953; Bannerman, 2006). Independente destas variações de constituintes, a parede celular dos SCoN geralmente também é suscetível a ação de detergentes aniônicos como, por exemplo, o dodecil sulfato de sódio (SDS) e calor acima de 95° C (Cheng, 2006). Entretanto, apenas a susceptibilidade a lisostafina pode variar de acordo com o conteúdo das bases guanina (G) e citosina (C) presentes no DNA de cada espécie (Klesius, 1968).

1.2.5 Importância clínica

A importância clínica dos SCoN começou a ser reconhecida a partir dos anos 70 e 80 com o surgimento de pesquisas relacionando estes microrganismos com infecções do trato urinário e endocardites (Speller, 1973; Latham, 1983). Atualmente, o grupo está cada vez mais sendo reconhecido como um dos principais responsáveis por diversos outros tipos de infecções, geralmente relacionadas ao implante de dispositivos médicos invasivos como cateteres vasculares, próteses ortopédicas e válvulas cardíacas (Góngora-Rúbio, 1997; Rogers, 2009; Widerström, 2012). Entre 1995 e 2002, 31% das bacteremias de 49 hospitais dos Estados Unidos

foram causadas por SCoN e 20%, por *S. aureus* (Wisplinghoff, 2004). Além disso, os SCoN também são motivo de preocupação por serem os principais agentes responsáveis por septicemias em recém-nascidos (Klingenberg, 2005).

Os SCoN são raramente implicados como a causa de infecções de tecidos naturais. Seu potencial patogênico é resultado de sua capacidade de colonizar e proliferar em biomateriais (Götz, 2002). Não coincidentemente, os principais tipos de infecções causadas por SCoN atualmente são bacteremias relacionadas a cateteres vasculares (30 a 40%), infecções relacionadas a dispositivos cardíacos (ex: marcapasso) (1 a 20%), infecções de enxertos vasculares prostéticos (1 a 6%), infecções de próteses ortopédicas, endocardite de válvula prostética, infecções de *shunts* no sistema nervoso central e infecções em sítios cirúrgicos (Huebner, 1999; Rogers, 2009). Exceção importante a esta regra é a presença frequente de *S. saprophyticus* como agente de infecção do trato urinário de mulheres jovens (18 a 35 anos) (Latham, 1983). Entre as principais razões para esta peculiaridade estão a produção de proteínas específicas de aderência a células uroepiteliais e de transporte que permitem rápido ajuste a mudanças de osmolaridade e pH, além de produção abundante de urease que facilita a proliferação na urina (Rogers, 2009).

Na maioria dos casos citados acima a remoção completa do dispositivo infectado e a antibioticoterapia prolongada é frequentemente necessária, aumentando a morbidade, o tempo de internação e o custo financeiro (Klingenberg, 2007; Otto, 2009). A principal causa desta necessidade é a capacidade dos SCoN de formarem biofilmes microbianos na superfície destes dispositivos (Costerton, 1999). Estima-se que aproximadamente 3% dos pacientes que utilizam algum tipo de dispositivo médico invasivo desenvolvem infecções relacionadas à formação de biofilme. Além disso, se o dispositivo em questão for um implante cirúrgico as adversidades são ainda maiores e os custos mais elevados. Infecções associadas a biofilmes são responsáveis por 15 a 25% da falha de implantes e frequentemente requerem nova cirurgia (Arciola, 2012).

1.2.6 Formação de biofilme

Os *Staphylococcus* são reconhecidos como os agentes mais frequentes em infecções relacionadas a biofilme e a principal razão para esta liderança está relacionada à superior presença destes microrganismos na pele e membranas mucosas humanas. Esta maciça presença faz com que haja uma maior probabilidade de contaminação com estes microrganismos quando algum dispositivo médico penetra estas superfícies ou é inserido durante uma cirurgia (Vuong, 2002; Otto, 2008). A habilidade de produzir biofilme na superfície de dispositivos médicos invasivos é fator fundamental nas infecções causadas por SCoN, constituindo-se no principal fator de virulência deste grupo de microrganismos (Mack, 2006; Widerström, 2012).

A formação de biofilme é uma estratégia de sobrevivência que parece ser ativada quando surgem situações de stress como, por exemplo, presença de concentrações subletais de certos antibióticos ou as condições hostis dos tecidos e sangue humano (Götz, 2002). Embora em *Staphylococcus* a formação de biofilme seja multifatorial, é reconhecido o papel principal de uma adesina polissacarídica intercelular conhecida como PIA (abreviatura do nome em inglês *polysaccharide intercelular adhesine*). A biossíntese de PIA é realizada através de um processo complexo que envolve diversas proteínas que são produtos do gene *ica* (Vuong, 2004). A presença do gene *ica* é bastante frequente em isolados clínicos (Klingenberg, 2005; Fredheim, 2009; Reiter, 2012), mas sua expressão é modulada por vários fatores ambientais (Rachid, 2000) e proteínas regulatórias (Otto, 2008). Além disso, concentrações subinibitórias de antibióticos específicos como tetraciclina e quinupristina-dalfopristina, por exemplo, aumentam a transcrição do gene *ica* em *S. epidermidis* (Rachid, 2000), um fator que deve ser levado em consideração durante o tratamento de infecções relacionadas a biofilmes em *Staphylococcus*.

1.2.7 Resistência aos antimicrobianos

Conforme comentado anteriormente, com poucas exceções como, por exemplo, as infecções urinárias causadas por *S. saprophyticus*, a maioria das

infecções causadas por SCoN estão relacionadas ao ambiente hospitalar. Os isolados hospitalares de SCoN geralmente possuem o gene *mecA* (70 a 90%) (Archer, 1994; Diekema, 2001) que confere resistência à meticilina e aos demais antimicrobianos beta-lactâmicos (Archer, 1995). Além disso, muitas vezes, isolados que possuem o gene *mecA* também são resistentes a uma variedade de outras classes de agentes antimicrobianos, fazendo com que a multirresistência seja uma das principais características deste grupo (Huebner, 1999; Wisplighoff, 2004). *S. haemolyticus*, por exemplo, é conhecido por sua habilidade de ativar genes de resistência, sendo uma das espécies com mais altos índices de multirresistência (Takeuchi, 2005; Hope, 2008).

Nos *Staphylococcus* o gene *mecA* é transportado em um elemento genético móvel chamado cassete cromossômico estafilocócico *mec*, bastante conhecido pela sigla de suas iniciais em inglês, SCC*mec* (*Staphylococcal cassette chromosome mec*). Além do complexo *mec* que contém o gene *mecA*, o elemento SCC também pode transportar outros genes de resistência a antibióticos, plasmídeos e transposons (Ito, 2001). A fácil transferência deste elemento entre os *Staphylococcus* é uma das principais causas da rápida emergência e disseminação de MRSA e de SCoN resistentes à meticilina (MRSCoN) (Shore, 2013). A grande mobilidade de SCC também contribui para a alta frequência de isolados MRSA e MRSCoN multirresistentes (Hellmark, 2013) e ajuda a justificar a hipótese de que os SCoN funcionam como um reservatório deste elemento (Hanssen, 2004; Jamaludin, 2008), principalmente no que diz respeito ao *S. haemolyticus* (Cavanagh, 2012).

Entre as principais classes de antimicrobianos as quais os MRSCoN também apresentam resistência estão aminoglicosídeos, tetraciclina, macrolídeos e fluoroquinolonas (Widerstrom, 2012). Interessantemente, os SCoN possuem baixas taxas de resistência aos antibióticos mais antigos sulfametoxazol-trimetoprim (20 a 40% de resistência) e rifampicina (Rogers, 2009). Entre os antibióticos aos quais os SCoN permanecem sensíveis na maioria dos casos estão a associação quinupristina-dalfopristina, além de linezolida, daptomicina e tigeciclina. Entre estes antimicrobianos, o agente que mais preocupa é a linezolida, pois já existem relatos de tipos sequenciais (STs) de *S. epidermidis* resistentes na Alemanha e Estados Unidos (Wisplighoff, 2003; Kozitzkaya, 2005). A resistência à vancomicina, embora

já tenha sido relatada (Schwalbe, 1987), ainda parece ser rara em SCoN (Leclercq, 2009).

Os SCoN também apresentam resistência às lincosamidas e estreptograminas por resistência cruzada com os macrolídeos por pelo menos três mecanismos: modificação ribossomal, inativação do agente e efluxo do agente (Leclercq, 2002; Woodford, 2005). Entre estes, o primeiro é especialmente preocupante, pois nos casos em que o mecanismo de resistência é induzível, a não detecção do mesmo pode levar a falha terapêutica. Cepas resistentes a eritromicina, mas sensíveis a clindamicina, podem se tornar resistentes durante a terapia com clindamicina (Siberry, 2003; Lewis, 2005). Este mecanismo, conhecido como resistência induzível a clindamicina (RIC), é causado por diversas metilases ribossomais codificadas pelos genes *ermA*, B e C (Leclercq, 2002; Woodford, 2005; Lewis, 2005). O mecanismo de ação destas proteínas consiste na alteração do sítio de ligação da clindamicina no ribossomo bacteriano através de uma metilação (Poehlsaard, 2005).

A detecção da RIC pode ser feita fenotipicamente através do Teste D: aproximação dos discos de clindamicina e eritromicina no método de antibiograma convencional por disco difusão (Fiebelkorn, 2003). Além disso, os genes *erm* podem ser pesquisados molecularmente por PCR simples (Lina, 1999) ou multiplex para os genes mais comumente envolvidos (*ermA* e C) (Khan, 1999). Na prática, entre os laboratórios que realizam o antibiograma por disco difusão, o mecanismo de RIC pode ser detectado com grande segurança (Fernandes, 2007; Aktas, 2007; Coutinho, 2010). Entretanto, a detecção pelos novos métodos automatizados que utilizam microdiluição ainda carecem de maior sensibilidade e especificidade (Lavallée, 2010; Buchan, 2012).

A baixa virulência dos SCoN associada ao grande número de cepas multirresistentes é uma característica intrigante deste grupo de microrganismos. Neste sentido, estudos analisando as cepas que tiveram seu genoma completo determinado têm levantado algumas hipóteses interessantes envolvendo o genoma dos SCoN. Segundo estes estudos, os SCoN possuem sequências de inserção (*IS* – do inglês insertion sequence) que promovem rearranjos e deleções no genoma, contribuindo com a aquisição de resistência aos antimicrobianos. Além disso, estas

/S também poderiam ativar ou inativar genes que participam na integração de plasmídeos que carregam genes de resistência. Contudo, ainda não foi possível elucidar por completo a razão da elevada resistência aos antimicrobianos presente nos SCoN (Ziebuhr, 1999; Gill, 2005; Takeuchi, 2005; Watanabe, 2007).

1.2.8 Métodos moleculares no estudo da epidemiologia dos SCoN

O uso de técnicas moleculares no estudo de microrganismos está definitivamente solidificado no ramo da bacteriologia (Brooks, 2013). Atualmente, os métodos tradicionais de tipagem de amostras bacterianas como sorotipagem, por exemplo, têm sido substituídos em muitos laboratórios por métodos moleculares baseados em PCR (van Belkum, 1994) ou na análise dos padrões de restrição do DNA cromossomal em gel de eletroforese em campo pulsado (PFGE) (Arbeit, 1990). Além disso, novos métodos moleculares ainda não tão disseminados, baseados no sequenciamento de material genômico, também vêm cada vez mais ganhando espaço no ramo da bacteriologia (Maiden, 2006). As tipagens por sequenciamento de *locus* diversos (MLST), por exemplo, além de fornecer uma caracterização de cepas unificada, também gera dados que podem ser utilizados em estudos evolucionários e populacionais (Turner, 2007). Em comum entre estes métodos, está o trabalho com o constituinte cromossomal dos microrganismos, ao invés da observação de caracteres fenotípicos ou reações específicas (Aldea-Mansilla, 2006).

1.2.8.1 Extração de DNA de SCoN

O uso de métodos ou kits de extração de DNA apropriados que forneçam DNA genômico de boa qualidade é crucial para o sucesso e confiabilidade de estudos moleculares envolvendo PCR em amostras clínicas, ambientais ou experimentais (McOrist, 2002; Nogueira, 2004; Muldrew, 2009; Reyes-Escogido, 2011). Neste sentido, as técnicas de extração de DNA devem ser cuidadosamente selecionadas com especial atenção ao tipo de microrganismo em questão, pois a maioria dos métodos de extração de DNA é ideal para apenas espécies bacterianas com características em comum (McOrist, 2002; Nogueira, 2004; van Tongeren, 2011). Além disso, deve-se ter atenção também aos reagentes utilizados por cada

método, pois alguns podem interferir negativamente nas técnicas que serão aplicadas subsequentemente (Fredericks, 1998).

Entre os principais fatores que influenciam na escolha da extração de DNA a ser utilizada está a diferença na constituição da parede celular de diferentes espécies bacterianas (Rantakokko-Jalava, 2002). De uma maneira geral, a parede celular das bactérias gram negativas é rompida mais facilmente do que a das gram positivas (Goldenberger, 1995). Entretanto, dentro desses dois grandes grupos existem diversos tipos de bactérias com características de parede celular única (Rantakokko-Jalava, 2002; Freschi, 2005; Käser, 2009; Yang, 2011; Loonem, 2011). Os SCoN têm uma parede celular rígida que pode ser difícil de lisar, enzimas especiais e métodos têm sido desenvolvidos para resolver este problema (Cheng, 2006; Wilfinger, 2012).

A lisostafina é a principal enzima utilizada na extração de DNA do gênero *Staphylococcus*, porém, o alto preço desta enzima torna seu uso praticamente inviável mesmo na pesquisa (Oliveira, 2014). Por outro lado, métodos de extração de baixo custo como a extração por fervura, por exemplo, geralmente fornecem DNA de inferior qualidade, principalmente considerando as possibilidades de armazenamento (Nogueira, 2004). As demais opções para a extração de DNA de *Staphylococcus* mais comumente utilizadas incluem métodos que utilizam para a lise da parede celular reagentes como ácido iminodiacético (método conhecido como *Chelex*) (Giraffa, 2000) e dodecil sulfato de sódio (Goldenberg, 1995). Entretanto, para purificar o produto final, estes métodos também utilizam reagentes como fenol, clorofórmio ou álcool isoamílico que permanecem em pequenos resíduos na solução final e podem inibir análises posteriores (Alexopoulou, 2006; Cheng, 2006). Por fim, os novos métodos automatizados que utilizam sílicas magnéticas ou fibras de vidro têm apresentado bons resultados (Dundas, 2008; Yang, 2011; Loonem, 2011), mas também possuem o problema do alto custo financeiro (Dundas, 2008).

1.2.8.2 O cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*)

Os SCoN são microrganismos que apresentam uma composição genômica singular. Apesar de possuírem alto grau de genes conservados, algumas áreas de

seu genoma revelam pouca homologia entre as espécies (Takeuchi, 2005). Os principais responsáveis por esta variação entre espécies são elementos genéticos móveis que carregam genes ligados a fatores de virulência e resistência a agentes antimicrobianos (Gill, 2005). Como dito anteriormente, nos *Staphylococcus* o principal elemento carreador destes genes é o SCCmec. Devido a grande quantidade de tipos de SCCmec presentes nos *Staphylococcus*, este elemento também pode ser utilizado no estudo da epidemiologia destes microrganismos (Miragaia, 2008).

A excisão e integração do elemento SCCmec no genoma dos *Staphylococcus* é realizada por recombinases específicas mais conhecidas pela abreviatura de sua designação em inglês, *ccr* (*cassette chromosome recombinase*). Os elementos SCCmec podem ser classificados de acordo com a combinação de um dos oito tipos de recombinases (*ccrAB* 1 – 6 e *ccrC* 1 – 2) e um dos 5 tipos de complexos *mec* (A – E). A identificação dos tipos de SCCmec presentes nos *Staphylococcus* tem ajudado a esclarecer a epidemiologia molecular e a evolução dos MRCoNS (Katayama, 2000) e a transmissão de determinantes de resistência para *S. aureus* (Turlej, 2011; Svensson, 2011). Atualmente, existem diversos estudos propondo esquemas de classificação e já foram identificados 11 tipos de SCCmec em *Staphylococcus* (<http://www.sccmec.org>).

1.2.8.3 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) de *S. epidermidis*

No que diz respeito a espécies isoladas em hospitais ou centros de saúde, o laboratório de microbiologia frequentemente é questionado a respeito da clonalidade dos microrganismos isolados (Tenover, 1995). Para a grande maioria das espécies, é de consenso geral que a técnica de PFGE é o padrão ouro quando o objetivo é avaliar a clonalidade entre isolados clínicos. Com relação aos *S. epidermidis* não é diferente; além disso, a técnica de PFGE pode ser associada a outras técnicas, ampliando as possibilidades de interpretações dos resultados obtidos. No que diz respeito aos *S. epidermidis*, por exemplo, a associação com os tipos de SCCmec pode prever com consistência a evolução clonal a longo prazo (Miragaia, 2008).

Nos últimos anos, diversos métodos de tipagem com fins epidemiológicos têm sido usados no estudo de *S. epidermidis*. Os métodos genotípicos, por possuírem maior força discriminatória entre cepas fortemente relacionadas, têm se tornado os métodos de escolha para a tipagem de cepas bacterianas (Widerström, 2012). Entretanto, excluindo-se o caro e trabalhoso sequenciamento do genoma, o método mais discriminatório para a genotipagem de isolados de *S. epidermidis* é o PFGE (Miragaia, 2008).

Até pouco tempo atrás, a maioria das infecções causadas por *S. epidermidis* eram consideradas como de origem endógena, provenientes da microbiota normal do paciente (Huebner, 1999). Entretanto, utilizando o método de PFGE, diversos relatos dos últimos anos também têm demonstrado que certas cepas de *S. epidermidis* (Miragaia, 2007; Widerström, 2009; Li, 2009) e demais SCoN (Krediet, 2004; Klingenberg, 2007) aparecem estabelecidas por longos períodos como patógenos oportunistas em unidades hospitalares. Além disso, genótipos indistinguíveis de *S. epidermidis* também têm sido identificados em amostras de diferentes unidades (Li, 2009) e hospitais (Widerström, 2006; Ibrahim, 2008), indicando a disseminação de genótipos específicos desta espécie entre pacientes e ambientes diversos.

O método mais usado mundialmente para a caracterização de isolados clínicos de *S. epidermidis* é o PFGE, o qual tem sido principalmente empregado para avaliar assuntos epidemiológicos de curtos períodos (Miragaia, 2008). Entretanto, os estudos que têm avaliado a epidemiologia molecular dos *S. epidermidis* têm demonstrado a existência de grande diversidade genética entre os isolados investigados (Miragaia, 2005; Jamaludin, 2008). Apesar disso, alguns destes estudos também têm encontrado grupos de SCoN, geralmente *S. epidermidis* resistentes a meticilina, os quais podem persistir no ambiente hospitalar por diversos anos (Krediet, 2004; Widerström, 2009). Interessantemente, a maioria desses genótipos apresenta um perfil de resistência aos antimicrobianos que reflete o consumo destes agentes no local estudado.

O PFGE também tem sido utilizado para rastrear a disseminação de cepas específicas de *S. epidermidis* entre diferentes pacientes (Milisavljevic, 2005), enfermarias (Petinaki, 2004) e até hospitais (Worthington, 2000) provando ser uma

ferramenta valiosa no controle de *S. epidermidis* em cenários clínicos. Mas, além disso, alguns estudos também vêm sendo realizados alvejando a população de *S. epidermidis* presente em indivíduos sadios da comunidade (Rolo, 2012; Cherifi, 2013). Estes estudos são de fundamental importância, pois permitem que se faça uma comparação entre as cepas circulantes na comunidade com aquelas isoladas em infecções em instituições de saúde. Nos estudos citados acima, diferentes populações de *S. epidermidis* foram encontradas nos diferentes ambientes em questão. Entre as principais diferenças encontradas estão a maior resistência aos antimicrobianos e presença de fatores de virulência nos isolados clínicos e a maior heterogeneidade genética e sensibilidade aos agentes antimicrobianos dos isolados comunitários (Cherifi, 2013). Além disso, cepas adaptadas ao ambiente hospitalar possuem uma maior frequência e diversidade de tipos de SCCmec (Rolo, 2012).

Finalmente, embora o PFGE seja uma excelente técnica para explorar questões epidemiológicas locais, não é uma ferramenta apropriada para resolver questões de estrutura populacional. Um dos principais problemas neste sentido é a dificuldade de padronização entre diferentes laboratórios devido às características intrínsecas da técnica. Para se definir a biologia populacional de *S. epidermidis*, a tipagem molecular por sequenciamento de *locus* diversos (MLST) vem sendo recentemente aplicada com sucesso nesta espécie (Rogers, 2009).

1.2.8.4 Tipagem molecular por sequenciamento de *locus* diversos (MLST) de *S. epidermidis*

O uso de métodos de tipagem molecular que utilizam todo o genoma bacteriano têm sido úteis para rastrear clones e definir rotas de transmissão locais de determinadas espécies. Os dados fornecidos por estes métodos são úteis no controle mais efetivo da disseminação da resistência aos antimicrobianos, assim como de outras questões de infecções nosocomiais localizadas (Miragaia, 2002; Widerström, 2009). De forma semelhante, o recente desenvolvimento de métodos de tipagem molecular baseados na análise de polimorfismos genômicos têm aumentado significativamente os conhecimentos sobre evolução, dinâmica de populações e padrões de disseminação de espécies bacterianas (Gutacker, 2006; Miragaia, 2008; Miragaia, 2009). A grande vantagem deste segundo tipo de método

é a possibilidade de correlações e comparações entre laboratórios distantes geograficamente, possibilitando uma análise mais global do microrganismo em questão (Maiden, 2006).

Um método bastante utilizado atualmente para grande parte dos principais patógenos humanos e também em desenvolvimento para outros tipos de microrganismos é o MLST (Turner, 2007). Além de fornecer uma abordagem padronizada para a coleta de dados, o MLST tem suas informações e dados disponíveis gratuitamente na internet, garantindo uma nomenclatura disponível àqueles que estejam interessados em caracterizar bactérias (Maiden, 2006). De uma maneira geral, os esquemas de tipagem por MLST têm como alvo regiões conservadas do genoma dos microrganismos que são menos sujeitas a modificações genéticas importantes (Turner, 2007). As sequências de alelos e as designações de alelos e STs presentes nos bancos de dados do MLST de cada espécie fornecem uma linguagem universal para a tipagem molecular de microrganismos (Maiden, 2006).

O método de tipagem ideal para cada microrganismo pode variar, pois o genoma das espécies bacterianas é bastante diverso e evolui diferentemente na adaptação das mesmas em diferentes ambientes (Bentley, 2004). Porém, de uma maneira geral, os métodos de tipagem bacterianos têm como alvo regiões diferentes do cromossomo que evoluem em diferentes taxas. A preferência é por regiões mais conservadas, que não são alvo de frequentes eventos genéticos. No caso do MLST, a própria tradução do seu nome do inglês sugere um esquema de tipagem baseado na determinação de alelos em múltiplos *locus* por sequenciamento de nucleotídeos (Maiden, 2006). O esquema atual de MLST para *S. epidermidis* está baseado no sequenciamento de fragmentos internos de 7 genes *housekeeping*, utilizando-se o esquema revisado por Thomas *et al.* (2007). Os resultados obtidos são introduzidos no software eBURST, hospedado no site do Imperial College London e disponível em <http://eburst.mlst.net>.

Os estudos empregando MLST em *S. epidermidis* até o momento têm revelado que, em termos populacionais, *S. epidermidis* apresenta uma diversidade genética grande e que vem aumentando a cada ano com a realização de novos estudos (Miragaia, 2007; Miragaia, 2009; Rolo, 2012; Mendes, 2012). Em 2007,

quando Miragaia *et al.* (2007) inferiram a primeira proposta de organização populacional, existiam 74 STs diferentes de *S. epidermidis*. Dois anos mais tarde esse número estava em 86 (Miragaia, 2009) e em setembro de 2011, Mendes *et al.* (2011) apresentaram um diagrama populacional contendo 312 STs. Atualmente, existem mais de 500 diferentes STs, mas muitos ainda não estão relacionados a nenhum complexo clonal (CC), sendo considerados como *singletons* (<http://sepidermidis.mlst.net/>).

O algoritmo do *software* eBurst identifica grupos de genótipos relacionados em uma população e infere o genótipo fundador (ancestral) de cada grupo. Em seguida, os ancestrais de cada grupo são ligados aos prováveis descendentes, formando um diagrama radial (Figura 1). Cada genótipo diferente recebe um número precedido das iniciais ST (*Sequence Type*) e grupos de genótipos intimamente relacionados são classificados em complexos clonais (CCs) (Feil, 2004). O CC2 é o principal complexo clonal da população de *S. epidermidis*; por razões filogenéticas, este complexo é subdividido em dois *clusters*: CC2-I e CC2-II. O estudo realizado por Mendes *et al.* em 2011 coletou isolados de vários hospitais dos EUA e as análises com eBURST demonstraram que os isolados associados ao CC2-II foram mais prevalentes e apresentam um perfil mais susceptível aos antimicrobianos enquanto que os isolados associados ao CC2-I, apesar de menos frequentes, foram mais resistentes.

Na grande maioria dos estudos, ST2 é o genótipo mais frequentemente encontrado, seguido por ST5 e ST59 (Miragaia, 2009; Li, 2009; Miragaia, 2007). Entretanto, em um estudo publicado em 2012 por Mendes *et al.* (2012), analisando isolados de diversos hospitais dos EUA, ST5 aparece superando ST2 em prevalência. No Brasil, no primeiro estudo envolvendo MLST e *S. epidermidis*, Iorio *et al.* (2012) encontraram, em 35 isolados de hospitais do Rio de Janeiro, 8 STs diferentes, sendo que ST2 e ST23 representaram juntos, 71,4% dos isolados. Contudo, este estudo avaliou apenas isolados resistentes à metilicina (MRSE). Algumas teorias a respeito da maior prevalência de ST2 apontam para o fato de que estes isolados possuem sequências de inserção IS256 (capazes de influenciar a expressão do operon *ica* e subsequente formação de biofilme) e genes *ica*; fatores

ligados à capacidade de invasão dos *S. epidermidis*. Além disso, a maioria dos ST2 possui a capacidade de formar biofilme *in vitro* (Li, 2009).

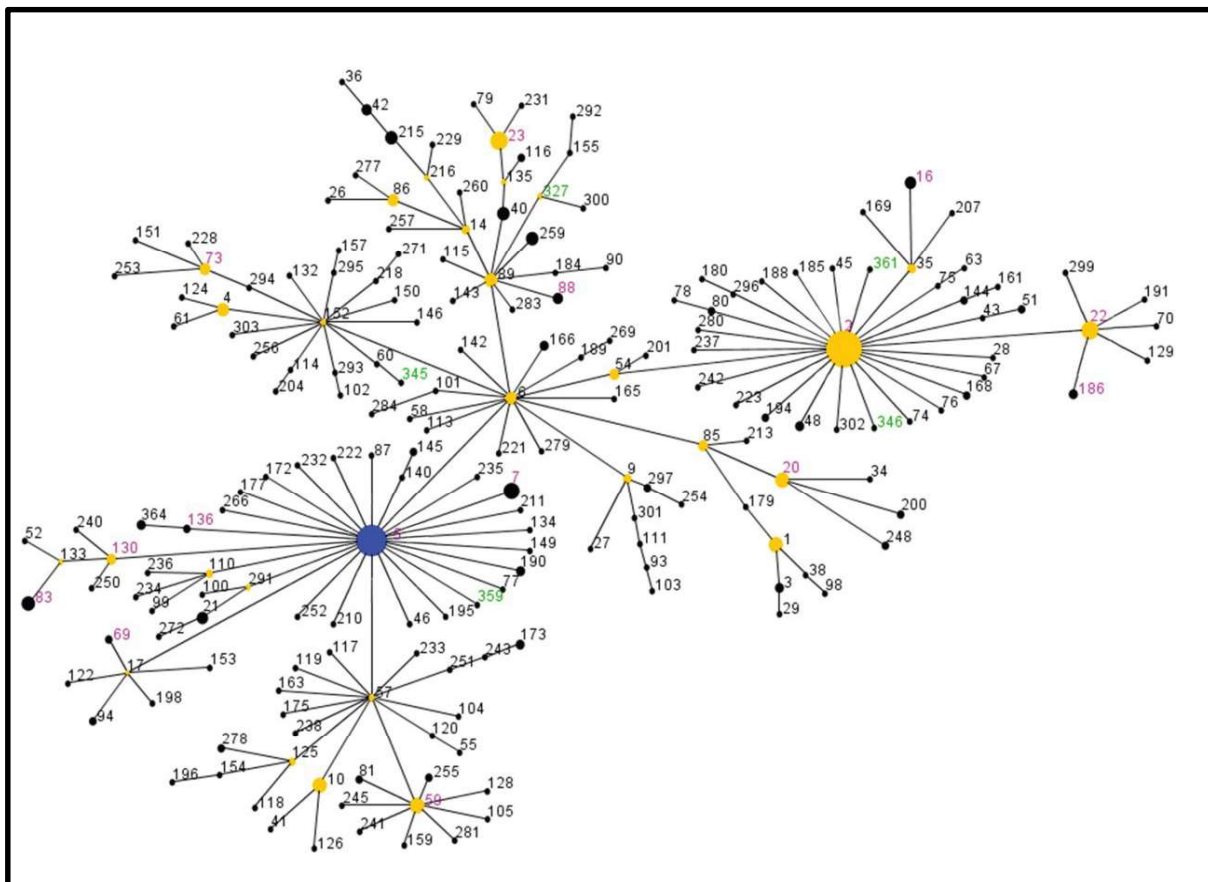


Figura 1. Principais STs de *S. epidermidis* e respectivos variantes em apenas um *locus* disponíveis em setembro de 2011. Cada ST é representado por um ponto. O ponto azul (ST5) representa o fundador do CC2. Pontos amarelos representam fundadores de subgrupos; as linhas conectam variantes em um único lócus. Os singletons não aparecem representados nesta imagem. Números em diferentes cores são isolados encontrados por Mendes *et al.* (2011). Adaptada de Mendes *et al.* (2011).

Estudos recentes utilizando MLST têm identificado *S. epidermidis* como uma espécie com alta diversidade genética que evolui principalmente por recombinação, além de adquirir facilmente elementos genéticos móveis (Schoenfelder, 2010). Ao contrário de *S. aureus*, onde é evidenciado que algumas cepas hospitalares possuem uma estrutura populacional clonal com clones específicos associados com doenças (Feil, 2003), a estrutura populacional do *S. epidermidis* é menos clonal, e um mais alto grau de diversidade tem sido observado em comparação com *S. aureus* (Miragaia, 2007). Entretanto, alguns estudos mostram que também parece

haver um número limitado de clones de *S. epidermidis* associados com infecções (Widerström, 2009; Li, 2009; Klingenberg, 2007). Com respeito aos isolados de instituições de saúde, um reduzido número de linhagens clonais foi encontrado como originário e estabelecido em ambientes hospitalares no mundo todo (Miragaia, 2007). Na maioria dos casos, estes isolados são caracterizados por possuírem diversos tipos de SCC*mec*, resistência a meticilina e habilidade de formar biofilme em dispositivos médicos (Monk, 2008; Klingenberg, 2007; Kositzkaya, 2005).

1.3 Referências bibliográficas

Aktas Z, Aridogan A, Kayacan CB, Aydin D (2007) Resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in staphylococci isolated in Istanbul, Turkey. *J Microbiol* 45 (4): 286–90.

Aldea-Mansilla C, Viedma DG, Cercenado E, Martín-Rabadán P, Marín M, Bouza E (2006) Comparison of Phenotypic with Genotypic Procedures for Confirmation of Coagulase-Negative *Staphylococcus* Catheter-Related Bloodstream Infections. *J Clin Microbiol* 44 (10): 3529-32.

[Alexopoulou K](#), [Foka A](#), [Petinaki E](#), [Jelastopulu E](#), [Dimitracopoulos G](#), [Spiliopoulou I](#) (2006) Comparison of two commercial methods with PCR restriction fragment length polymorphism of the *tuf* gene in the identification of coagulase-negative staphylococci. *Lett Appl Microbiol* 43: 450-4.

Antunes AL, Bonfanti JW, Perez LR, Pinto CC, Freitas AL, Macedo AJ, Barth AL (2011) High vancomycin resistance among biofilms produced by *Staphylococcus* species isolated from central venous catheters. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106: 51-5.

Arbeit RD, Arthur M, Dunn RD, Kim C, Selander RK, Goldstein R (1990) Resolution of recent evolutionary divergence among *Escherichia coli* from related lineages: the application of pulsed field gel electrophoresis to molecular epidemiology. *J Infect Dis* 161: 230-5.

Archer GL, Climo MW (1994) Antimicrobial Susceptibility of Coagulase-Negative Staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 38 (10): 2231-7.

Archer GL (1995) *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci. In *Principles and Practice of Infectious Diseases*, ed. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, New York: Churchill Livingstone.

Arciola CR, Campoccia D, Speziale P, Montanaro L, Costerton JW (2012) Biofilm Formation in *Staphylococcus* Implant Infections. A Review of Molecular Mechanisms and Implications for Biofilm-resistant Materials. *Biomaterials* 33 (26): 5967-82.

Bannerman TL, Peacock SJ (2006) *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase- positive cocci. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen J, Pfaller M, Landry ML eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, D.C: ASM Press, 390–411.

Barber M (1961) [Methicillin-resistant staphylococci](#). *J Clin Pathol* 14: 385-93.

[Barber M](#), [Rozwadowska-Dowzenko M](#) (1948) Infection by penicillin-resistant staphylococci. *Lancet* 23 (2): 641-4.

Becker K, Bierbaum G, von Eiff C, Engelmann S, Götz F, Hacker J, Hecker M, Peters G, Rosenstein R, Ziebuhr W (2007) [Understanding the physiology and adaptation of staphylococci: a post-genomic approach](#). *Int J Med Microbiol* 297 (7-8): 483-501.

Bentley SD, Parkhill J (2004) Comparative genomic structure of prokaryotes. *Annu Rev Genet* 38: 771-92.

Brooks HJ (2013) [Modern microbiology - a quiet revolution with many benefits](#). *Australas Med J* 6 (7): 378-81.

[Buchan BW](#), [Anderson NW](#), [Ledeboer NA](#) (2012) Comparison of BD Phoenix and bioMérieux Vitek 2 automated systems for the detection of macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance among clinical isolates of *Staphylococcus*. [Diagn Microbiol Infect Dis](#) 72(3): 291-4.

Cartwright, FF and Biddiss, MD. *Disease and History*. 2nd Ed. Manchester: Sutton Publishing Ltd. 2000.

Cavanagh JP, Klingenberg K, Hanssen A, Fredheim EA, Francois P, Schrenzel J, Flaegstad T, Sollid, JE (2012) Core genome conservation of *Staphylococcus haemolyticus* limits sequence based population structure analysis. *J Microbiol Methods* 89: 159-66.

Cheng H, Jiang N (2006) Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnol Lett* 28: 55–9.

Cherifi S, Byl B, Deplano A, Nhonhoff C, Denis O, Hallind M (2013) Comparative Epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* Isolates from Patients with Catheter-Related Bacteremia and from Healthy Volunteers. *J Clin Microbiol* 51 (5): 1541–7.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999) Bacterial Biofilms: a Common Cause of Persistent Infections. *Science* 284 (5418): 1318–22.

[Coutinho VL](#), [Paiva RM](#), [Reiter KC](#), [de-Paris F](#), [Barth AL](#), [Machado AB](#) (2010) Distribution of *erm* genes and low prevalence of inducible resistance to clindamycin among staphylococci isolates. *Braz J Infect Dis*. 14(6): 564-8.

Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, Beach M (2001) SENTRY Participants Group. [Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999](#). *Clin Infect Dis*. 15(32): S114-32.

Dundas N, Leos NK, Mitui M, Revell P, Rogers BB (2008) Comparison of Automated Nucleic Acid Extraction Methods with Manual Extraction *J Mol Diagn* 10 (4): 311-6.

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). www.ecdc.europa.eu/ (6 de agosto de 2013).

Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG (2004) [eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data](#). *J Bacteriol* 186 (5): 1518-30.

[Feil EJ](#), [Cooper JE](#), [Grundmann H](#), [Robinson DA](#), [Enright MC](#), [Berendt T](#), [Peacock SJ](#), [Smith JM](#), [Murphy M](#), [Spratt BG](#), [Moore CE](#), [Day NP](#) (2003) How clonal is *Staphylococcus aureus*? *J Bacteriol*. 185(11): 3307-16.

Fernandes CJ, O'Sullivan MVN, Cai Y, Kong F, Zeng X, Gilbert GL, Kotsiou G (2007) Agar dilution method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus* spp. *J. Clin. Microbiol*. 45: 4018-20.

Fiebelkorn KR, Crawford SA, McElmeel ML, Jorgensen JH (2003) The practical disc diffusion method for the detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase negative *Staphylococcus*. *J Clin Microbiol* 41: 4740–4.

Fredheim EGA, Klingenberg C, Rohde H, Frankenberger S, Gaustad P, Flægstad T, Sollid JE (2009) Biofilm Formation by *Staphylococcus haemolyticus*. *J Clin Microbiol* 47 (4): 1172–80.

Fredricks DN, Relman DA (1998) Improved amplification of microbial DNA from blood cultures by removal of the PCR inhibitor sodium polyanetholesulfonate. *J Clin Microbiol* 36 (10): 2810–6.

Freschi CR, Carvalho LFOS, Oliveira CJB (2005) Comparison of DNA extraction methods and selective enrichment broths on the detection of *Salmonella typhimurium* in swine feces by polymerase chain reaction *Braz J Microbiol* 36: 363-7.

[Gill SR](#), [Fouts DE](#), [Archer GL](#), [Mongodin EF](#), [Deboy RT](#), [Ravel J](#), [Paulsen IT](#), [Kolonay JF](#), [Brinkak L](#), [Beanan M](#), [Dodson RJ](#), [Daugherty SC](#), [Madupu R](#), [Angioli SV](#), [Durkin AS](#), [Haft DH](#), [Vamathevan J](#), [Khouri H](#), [Utterback T](#), [Lee C](#), [Dimitrov G](#), [Jiang L](#), [Qin H](#), [Weidman J](#), [Tran K](#), [Kang K](#), [Hance IR](#), [Nelson KE](#), [Fraser CM](#) (2005) Insights on Evolution of Virulence and Resistance from the Complete Genome Analysis of an Early Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain and a Biofilm-Producing Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Strain. *J Bacteriol* 187 (7): 2426-38.

Giraffa G, Rossetti L, Neviani E (2000) An evaluation of chelex-based DNA purification protocols for the typing of lactic acid bacteria. *J Microbiol Methods* 42: 175–84.

Goldenberger D, Perschil I, Ritzler M, Altwegg M (1995) A simple "universal" DNA extraction procedure using SDS and proteinase K is compatible with direct PCR amplification. *Genome Res* 4: 368-70.

Góngora-Rubio F, Pignatari ACC, Costa LMD, Bortolloto VI, Machado AM, de Góngora DVN (1997) Significância clínica, epidemiologia e microbiologia das bacteremias por estafilococos coagulase-negativos em Hospital de Ensino. *Rev Ass Med Brasil* 43 (1): 9-14.

Götz F (2002) *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol* 43 (6): 1367-78.

Gutacker MM, Mathema B, Soini H, Shashkina E, Kreiswirth BN, Graviss EA, Musser JM (2006) Single-nucleotide polymorphism based population genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains from 4 geographic sites. *J Infect Dis* 193: 121-8.

Hanssen A, Kjeldsen G, Sollid JUE (2004) Local Variants of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* in Sporadic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci: Evidence of Horizontal Gene Transfer? *Antimicrob Agents Chemoter* 48 (1): 285-96.

Hope R, Livermore DM, Brick G, Lillie M, Reynolds, R (2008) Non-susceptibility trends among staphylococci from bacteraemias in the UK and Ireland, 2001–06. *J Antimicrob Chemoter* 62 Suppl. 2, 65-74.

Hellmark B, Söderquist B, Unemo M, Nilsson-Augustinsson A (2013) Comparison of *Staphylococcus epidermidis* isolated from prosthetic joint infections and commensal isolates in regard to antibiotic susceptibility, *agr* type, biofilm production, and epidemiology. *Int J Med Microbiol* 303: 32–9.

Huebner J, Goldmann DA (1999) Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annu Rev Med* 50: 223–36.

Ibrahim S, Salmenlinna S, Lyytikäinen O, Vaara M, Vuopio-Varkila J (2008) Molecular characterization of methicillin resistant *Staphylococcus epidermidis* strains from bacteraemic patients. *Clin Microbiol Infect* 14 (11): 1020–7.

Iorio NLP, Caboclo RF, Azevedo MB, Barcellos AG, Neves FPG, Domingues RMCP, dos Santos KRN (2012) Characteristics related to antimicrobial resistance and biofilm formation of widespread methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* ST2 and ST23 lineages in Rio de Janeiro hospitals, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 72: 32-40.

Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, Hiramatsu K (2001) Structural Comparison of Three Types of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Integrated in the Chromosome in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemoter* 45 (5): 1323–36.

Jamaluddin TZMT, Kuwahara-Arai K, Hisata K, Terasawa M, Cui L, Baba T, Sotozono C, Kinoshita S, Ito T, Hiramatsu K (2008) Extreme Genetic Diversity of Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Strains Disseminated among Healthy Japanese Children. *J Clin Microbiol* 46 (11): 3778-83.

Käser M, Ruf M, Hauser J, Marsollier L, Pluschke G (2009) Optimized Method for Preparation of DNA from Pathogenic and Environmental Mycobacteria. *Appl Environ Microbiol* 75 (2): 414-8.

Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K (2000) A new class of genetic element, *Staphylococcus* cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 1549-55.

Khan SA, Nawaz MS, Khan AA, Cerniglia CE (1999) Simultaneous detection of erythromycin-resistant methylase genes *ermA* and *ermC* from *Staphylococcus* spp. by multiplex-PCR. *Mol Cell Probes* 13: 381-7.

Klesius PH, Schuhardt VT (1968) Use of Lysostaphin in the Isolation of Highly Polymerized Deoxyribonucleic Acid and in the Taxonomy of Aerobic Micrococcaceae. *J Bacteriol* 95 (3): 739-43.

Klingenberg C, Aarag E, Rønnestad A, Sollid JE, Abrahamsen TG, Kjeldsen G, Flægstad T (2005) Coagulase-Negative Staphylococcal Sepsis in Neonates Association Between Antibiotic Resistance, Biofilm Formation and the Host Inflammatory Response. *Pediatr Infect Dis J* 24: 817-22.

Klingenberg C, Rønnestad A, Anderson AS, Abrahamsen TG, Zorman J, Villaruz A, Flaegstad T, Otto M, Sollid JE (2007) Persistent strains of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: virulence factors and invasiveness. *Clin Microbiol Infect* 13 (11): 1100-11.

Kloos WE, Musselwhite MS (1975) Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. *Appl Microbiol* 30 (3): 381-5.

Kozitskaya S, Olson ME, Fey PD, Witte W, Ohlsen K, Ziebuhr W (2005) Clonal Analysis of *Staphylococcus epidermidis* Isolates Carrying or Lacking Biofilm-Mediating Genes by Multilocus Sequence Typing. *J Clin Microbiol* 43 (9): 4751-7.

Krediet TG, Mascini EM, van Rooij E, Vlooswijk J, Paauw A, Gerards LJ, Flier A (2004) Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococci causing sepsis in a neonatal intensive care unit over an 11-year period. *J Clin Microbiol* 42 (3): 992-5.

Kushwaha SC, Kates M (1976) Nonpolar Lipids of a Halotolerant Species of *Staphylococcus epidermidis*. *Can J Biochem* 54 (1): 79-85.

Latham RH, Running K, Stamm WE (1983) Urinary tract infections in young adult women caused by *Staphylococcus saprophyticus*. *JAMA* 250: 3063-66.

Lavallée C, Rouleau D, Gaudreau C, Roger M, Tsimiklis C, Locas MC, Gagnon S, Delorme J, Labbe AC (2010) Performance of an agar dilution method and a Vitek 2 card for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol* 48: 1354-7.

Leclercq R (2009) Epidemiological and resistance issues in multidrug-resistant staphylococci and enterococci. *Clin Microbiol Infect* 15 (3): 224-31.

Leclercq R (2002) Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: Nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis* 34: 482-92.

Lewis JS 2nd, Jorgensen JH (2005) Inducible clindamycin resistance in staphylococci: should clinicians and microbiologists be concerned? *Clin Infect Dis* 40: 280-5.

Li M, Wang X, Gao Q, Lu Y (2009) Molecular characterization of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from a teaching hospital in Shanghai, China. *J Med Microbiol* 58 (Pt 4): 456-61.

Lina G, Quaglia A, Reverdy ME, Leclercq R, Vandenesch F, Etienne J (1999) Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 1062-6.

Loonen AJM, Jansz AR, Kreeftenberg H, Bruggeman CA, Wolffs PFG, van den Brule AJC (2011) Acceleration of the direct identification of *Staphylococcus aureus* versus coagulase-negative staphylococci from blood culture material: a comparison of six bacterial DNA extraction methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30: 337-42.

Mack D, Rohde H, Harris LG, Davies AP, Horstkotte MA, Knobloch JK (2009) Biofilm formation in medical device-related infection. *Int J Artif Organs* 29(4): 343-59.

Maiden MCJ (2006) Multilocus sequence typing of bacteria *Annu Rev Microbiol* 60: 561-88.

Mathema B, Mediavilla JR, Chen L, Kreiswirth BN (2010) Evolution and Taxonomy of Staphylococci. In: Crossley KB, Jefferson KK, Archer GL, Fowler Jr VG. Editors. Staphylococci in Human Diseases. Wiley-Blackwell, Singapore.

McNeill WH (1998) Plagues and people. 3rd Ed. New York: Anchor books by arrangement with Doubleday.

McOrist AL, Jackson M, Bird AR (2002) A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. *J Microbiol Methods* 50, 131-9.

[Mendes RE](#), [Deshpande LM](#), [Costello AJ](#), [Farrell DJ](#) (2012) Molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from U.S. hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 56 (9): 4656-61.

Milisavljevic V, Wu F, Cimmotti J, Haas J, Della-Latta P, Larson E, Saiman L (2005) Genetic relatedness of *Staphylococcus epidermidis* from infected infants and staff in the neonatal intensive care unit. *Am J Infect Control* 33: 341-7.

Miragaia M, de Lencastre H, Perdreau-Remington F, Chambers HF, Higashi J, Sullam PM, Lin J, Wong KI, King KA, Otto M, Sensabaugh GF, Diep BA (2009) Genetic Diversity of Arginine Catabolic Mobile Element in *Staphylococcus epidermidis*. *PLoS One* 4 (11): e7722.

Miragaia M, Carriço JA, Thomas JC, Couto I, Enright MC, Lencastre H (2008) Comparison of Molecular Typing Methods for Characterization of *Staphylococcus epidermidis*: Proposal for Clone Definition. *J Clin Microbiol* 46 (1): 118-29.

Miragaia M, Thomas JC, Couto I, Enright MC, de Lencastre H (2007) Inferring a population structure for *Staphylococcus epidermidis* from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol* 189 (6): 2540-52.

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

Miragaia M, Couto I, Pereira SFF, Kristinsson KG, Westh H, Jarlöv JO, Carriço J, Almeida J, Santos-Sanches I, Lencastre H (2002) Molecular Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Clones: Evidence of Geographic Dissemination *J Clin Microbiol* 40 (2): 430–8.

Muldrew KL (2009) Molecular diagnostics of infectious diseases. *Curr Opin Pediatr* 21: 102-11.

Monk AB, Boundy S, Chu VH, Bettinger JC, Robles JR, Fowler Jr VG, Archer GL (2008) Analysis of the Genotype and Virulence of *Staphylococcus epidermidis* Isolates from Patients with Infective Endocarditis *Infect Immun* 76 (11): 5127-32.

Nogueira CAM, Momesso CAS, Machado RLD, de Almeida MTG, Rossit ARB (2004) Desempenho de kits comerciais e protocolos laboratoriais para a extração de DNA genômico bacteriano. *Rev Panam Infectol* 6: 35-8.

Oliveira CF, Paim, TGS, Reiter KC, Rieger A, d'Azevedo (2014) Evaluation of Four Different DNA Extraction Methods in Coagulase-negative Staphylococci Clinical Isolates *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 56 (1):1-5.

Otto M (2012) Molecular Basis of *Staphylococcus epidermidis* Infections. *Semin Immunopathol* 34: 201-14.

Otto M (2009) *Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 7: 555-67.

Otto M. (2008) Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 322: 207-28.

Petinaki E, Spiliopoulou I, Kontos F, Maniati M, Bersos Z, Stakias N, Malamou-Lada H, Koutsia-Carouzou C, Maniatis AN (2004) Clonal dissemination of mupirocin-resistant staphylococci in Greek hospitals. *J Antimicrob Chemother* 53: 105-8.

Poehlsgaard J, Douthwaite S (2005) The bacterial ribosome as a target for antibiotics. *Nat Rev Microbiol* 3 (11): 870-81.

Rachid S, Ohlsen K, Witte W, Hacker J, Ziebuhr W (2000) Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesion expression in biofilm forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 3357-63.

Rantakokko-Jalava K, Jalava J (2002) Optimal DNA isolation method for detection of bacteria in clinical specimens by broadrange PCR. *J Clin Microbiol* 40: 4211-17.

Reiter KC, Villa B, Paim TGS, Sambrano GE, Oliveira CF, d'Azevedo PA (2012) Enhancement of anti-staphylococcal activities of six antimicrobials against sasG-negative methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: an *in vitro* biofilm model [Diagn Microbiol Infect Dis](#) 74 (2): 101-5.

Reiter KC, Paim TGS, Oliveira CF, d'Azevedo PA (2011) High biofilm production by invasive multiresistant staphylococci. *Act Pathol Microbiol Immunol Scand* 119: 776-81.

Reyes-Escogido L, Balam-Chi M, Rodríguez-Buenfil I, Valdés J, Kameyama L, Martínez-Pérez F (2010) Purification of bacterial genomic DNA in less than 20 min using chelex-100 microwave: examples from strains of lactic acid bacteria isolated from soil samples. *Antonie van Leeuwenhoek* 98: 465-74.

Rogers KL, Fey PD, Rupp ME (2009) Coagulase-negative staphylococcal infections. *Infect Dis Clin North Am* 23 (1): 73–98.

Rolo J, de Lencastre H, Miragaia M (2012) [Strategies of adaptation of *Staphylococcus epidermidis* to hospital and community: amplification and diversification of SCCmec.](#) *J Antimicrob Chemother* 67 (6):1333-41.

Salton MR (1953) Studies of the bacterial cell wall. IV. The composition of the cell walls of some gram-positive and gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 10: 512-23.

Sangvik M (2012) *Staphylococcus aureus* colonization and host-microbe interactions. Tese de doutorado. Faculty of Health Sciences, University of Tromso, NO.

Schoenfelder SM, Lange C, Eckart M, Hennig S, Kozytska S, Ziebuhr W (2010) Success through diversity-how *Staphylococcus epidermidis* establishes as a nosocomial pathogen. *Int J Med Microbiol* 300 (6): 380-6.

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

Shore AC, Coleman DC (2013) Staphylococcal cassette chromosome mec: Recent advances and new insights. *Int J Med Microbiol* 303 (6-7): 350-9.

Siberry GK, Tekle T, Carroll K, Dick J (2003) Failure of clindamycin treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance *in vitro*. *Clin Infect Dis* 37: 1257-60.

Silva ER, Silva N (2005) Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in southeastern Brazil. *Can J Vet Res* 69: 260-4.

Somerville GA, Proctor RA (2010) The biology of Staphylococci. In: Crossley KB, Jefferson KK, Archer GL, Fowler Jr VG. Editors. *Staphylococci in Human Diseases*. Wiley-Blackwell, Singapore.

Speller DCE, Mitchell RG (1973) Coagulase-negative staphylococci causing endocarditis after cardiac surgery. *J Clin Path* 26: 517-22.

Svensson K, Hellmark B, Söderquist B (2011) Characterization of SCC*mec* elements in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolated from blood cultures from neonates during three decades. *APMIS* 119: 885-93.

Takeuchi F, Watanabe S, Baba T, Yuzawa H, Ito T, Morimoto Y, Kuroda M, Cui L, Takahashi M, Ankai A, Baba S, Fukui S, Lee JC e Hiramatsu K (2005) Whole-genome sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* uncovers the extreme plasticity of its genome and evolution of human-colonizing staphylococcal species. *J Bacteriol* 187: 7292-308.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B (1995) [Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing](#). *J Clin Microbiol* 33 (9): 2233-9.

Thomas [JC](#), [Vargas MR](#), [Miragaia M](#), [Peacock SJ](#), [Archer GL](#), [Enright MC](#) (2007) Improved multilocus sequence typing scheme for *Staphylococcus epidermidis*. [J Clin Microbiol](#) 45 (2): 616-9.

Turlej A, Hryniewicz W, Empel J (2011) Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) Classification and Typing Methods: an Overview. *Pol J Microbiol* 60 (2): 95-103.

Turner KME, Feil EJ (2007) The secret life of the multilocus sequence type. [*Int J Antimicrob Agents*](#) 29 (2): 129-35.

van Belkum A (1994) DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. *Clin Microbiol Rev* 7: 174-84.

van Tongeren SP, Degener JE, Harmsen HJM (2011) Comparison of three rapid and easy bacterial DNA extraction methods for use with quantitative real-time PCR. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30: 1053-61.

Vuong C, Kocianova S, Voyich JM, Yao Y, Fischer ER, DeLeo FR, Otto M (2004) A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem* 279: 54881-6.

Vuong C, Otto M (2002) *Staphylococcus epidermidis* Infections. *Microbes Infect* 4 (4): 481-9.

Watanabe S, Ito T, Morimoto Y, Takeuchi F, Hiramatsu K (2007) Precise excision and self-interaction of a composite transposon as a model for spontaneous large scale chromosome inversion/deletion of the *Staphylococcus haemolyticus* clinical strain JCSC1435. *J Bacteriol* 189: 2724-34.

Widerström M, Monsen T, Karlsson C, Edebro H, Johansson A, Wiström J (2009) Clonality among multidrug-resistant hospital associated *Staphylococcus epidermidis* in northern Europe. *Scand J Infect Dis* 41 (9): 642-9.

Widerström M, Monsen T, Karlsson C, Wiström J (2006) Molecular epidemiology of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in a Swedish county hospital: evidence of intra- and interhospital clonal spread. *J Hosp Infect* 64 (2): 177-83.

Widerström M, Wiström J, Sjöstedt A, Monsen T (2012) 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: 7–20.

Wilfinger W. Extended Bactozyme lysis procedure for the isolation of genomic DNA from recalcitrant gram-positive bacteria. Molecular Research Center Technical Bulletin No. 8. URL: <http://mrcgene.com/tb8-grampositive.htm>. October, 2012.

Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB (2004) Nosocomial Bloodstream Infections in US Hospitals: Analysis of 24,179 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. *Clin Infect Dis* 39 (3): 309-17.

Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB (2003) Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 39 (3): 309-17.

Woodford, N (2005) Biological counterstrike: antibiotic resistance mechanisms of Gram-positive cocci. *Clin Microbiol Infect* 11 (Suppl. 3): 2–21.

Worthington T, Lambert PA, Elliott TS (2000) Is hospital-acquired intravascular catheter-related sepsis associated with outbreak strains of coagulase-negative staphylococci? *J Hosp Infect* 46:130-4.

Yang G, Erdmanc DE, Kodanib M, Koolsc J, Bowenc MD, Fields BS (2011) Comparison of commercial systems for extraction of nucleic acids from DNA/RNA respiratory pathogens. *J Virol Methods* 171: 195-9.

Ziebuhr W, Hennig S, Eckart M, Kranzler H, Batzilla C, Kozitskaya S (2006) Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. *Int J Antimicrob Agents* 28 Suppl 1: S14–20.

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

2 OBJETIVOS

O principal objetivo deste estudo foi ampliar os conhecimentos a respeito dos SCoN isolados de pacientes atendidos em uma instituição de saúde no Brasil. Os objetivos específicos foram:

1. Avaliar as diferenças com relação à qualidade e quantidade de DNA dos principais métodos de extração de DNA comerciais e “caseiros” utilizados para SCoN.
2. Determinar os principais tipos de *SCCmec* presentes nos SCoN isolados no período de 2002 a 2004 e comparar com os SCoN isolados no ano de 2010 no mesmo hospital.
3. Aplicar técnicas de tipagem molecular nos isolados de *S. epidermidis* para determinar a diversidade genética deste microrganismo em nosso meio.
4. Comparar os resultados obtidos nos métodos de tipagem molecular com dados de resistência aos antimicrobianos e formação de biofilme.
5. Comparar os tipos sequenciais de *S. epidermidis* identificados com os tipos sequenciais presentes em instituições de outros estados brasileiros e também com outros países.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Artigo 1 - Métodos de extração de DNA em SCoN

Evaluation of Four Different DNA Extraction Methods in Coagulase-negative Staphylococci Clinical Isolates

Caio Fernando de Oliveira, Thiago Galvão da Silva Paim, Keli Cristine Reiter, Alexandre Rieger, Pedro Alves d'Azevedo.

Aceito para publicação na Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo em 19 de abril de 2013. A ser publicado na edição de jan/fev 2014.

Evaluation of Four Different DNA Extraction Methods in Coagulase-negative Staphylococci Clinical Isolates

Caio Fernando de Oliveira^{1,2}, Thiago Galvão da Silva Paim^{1,2}, Keli Cristine Reiter^{1,2}, Alexandre Rieger^{3,4}, Pedro Alves d'Azevedo^{1,2,5}

1 Health Sciences Post-graduate Program, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA); 2 Laboratory of Gram-positive Cocci, UFCSPA; 245 Sarmiento Leite Street, zip code 90050-170 Porto Alegre 3 Laboratory of Biotechnology and Genetic, Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC); 4 Department of Biology and Pharmacy, UNISC, 2293 Independência Avenue, zip code 96815-900, Santa Cruz do Sul; 5 Department of Microbiology and Parasitology, UFCSPA, Rio Grande do Sul, Brazil.

Corresponding author: Pedro Alves d'Azevedo. Mail adress: Laboratório de Cocos Gram-positivos, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre; 245 Sarmiento Leite Street, zip code 90050-170 Porto Alegre – RS, Brazil. Phone number: 55 (51) 3303-8742 Fax number: 55 (51) 3303-8740 e-mail: pedroaze@ufcspa.edu.br

Abstract

Currently there are several methods to extract bacterial DNA based on different principles. However, the amount and the quality of the DNA obtained by each one of those methods is highly variable and microorganism dependent, as illustrated by coagulase-negative

staphylococci (CoNS) which have a thick cell wall that is difficult to lyse. This study was designed to compare the quality and the amount of CoNS DNA, extracted by four different techniques: two in-house protocols and two commercial kits. DNA amount and quality determination was performed through spectrophotometry. The extracted DNA was also analyzed using agarose gel electrophoresis and by PCR. 267 isolates of CoNS were used in this study. The column method and thermal lyses showed better results with regard to DNA quality (mean ratio of 260/280 = 1.95) and average concentration of DNA ($\bar{x} = 1,018.2$ ng/ μ L), respectively. All four methods tested provided appropriate DNA for PCR amplification, but with different yields. DNA quality is important since it allows the application of a large number of molecular biology techniques, and also its storage for a longer period of time. In this sense the extraction method based on an extraction column presented the best results for CoNS.

Keywords: DNA extraction, Coagulase-negative Staphylococci (CoNS), Spectrophotometry.

Introduction

In recent years, numerous methods developed by the molecular biology have been applied on the scientific research in clinical microbiology. On those methods, the genetic

material most widely used is DNA. Therefore, for an effective DNA extraction there are several methods based on different principles⁴. However, the amount and the quality of the DNA obtained for each one of those methods are variable, becoming an important factor in the type of molecular method that will be used, and on the subsequent storage of this material¹⁸. Moreover, to access bacterial DNA it is necessary to disrupt the cell wall, which presents distinct characteristics among different types of microorganisms¹³.

Coagulase-negative staphylococci (CoNS) are gram-positive cocci often considered as culture contaminants, since many species are members of the human skin microbiota and mucous membranes. However, CoNS are increasingly being recognized as agents of clinically important infections. In some recent studies they have been considered the main responsible for infections related to medical devices and surgical sites^{9, 12}. Furthermore, those microorganisms are also common as agents of the bovine mastitis, as well as infections in humans related to contaminated animal products^{7, 16}.

CoNS have a rigid cell wall that can be difficult to lyse, and special enzymes and methods have been developed to address this problem^{2, 18}. The gram-positive cell wall is composed of a complex reticulate of peptidoglycan, teichoic acid, polysaccharides, and other proteins, whereas the gram-negative cell wall is thinner with a simpler reticular pattern¹³. Methods used for genomic DNA isolation from gram-negative bacteria are not always successful with gram-positive^{2, 6, 11}. This is important because a suitable method of DNA isolation and recovery is one of the most important prerequisites for molecular tests^{18, 19}.

The aim of this study was to select a method that provides the best DNA from culture strains of CoNS clinical isolates. The main parameters considered were those related to storage for future testing in genomic libraries and application in molecular biology tests for scientific research or clinical diagnosis. To achieve this, the quality and the quantity of the DNA extracted from CoNS cultures through four different techniques were analyzed. The quality and amount of DNA was determined by spectrophotometry. The visualization of pattern bands in agarose gel electrophoresis was performed to evaluate the DNA integrity and a PCR to test the possibility of amplification of the different types of materials.

Materials and Methods

267 CoNS from infections in patients admitted at the “Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre” Medical Center were selected. Those microorganisms were obtained from 2002

to 2004 mainly from bacteremia, but also from other types of infections such as surgical wounds, and infections related to indwelling devices. Species identification was previously performed by Secchi *et al.* and published in 2008¹⁵ (Table 1). Each isolate was stored on skimmed milk (Difco Skim Milk, Becton Dickinson) and was cultivated in tryptone soy agar (TSA) (Tryptone Soy Agar, Oxoid) for 24 hours prior to the extraction procedures. One or two isolated colonies were then grown in 2 mL brain heart infusion broth (BHI, Merck) for 16 hours; 1 mL of this suspension was centrifuged at 7000 x g/5 min and the bacterial pellet obtained used as template in all methods.

Table 1 Species and mean yield of DNA quantity (ng/ μ L) of each method.

Specie	n of isolates (%)	Extraction method			
		Boiling	Phenol-chloroform	Extraction Column	Salting Out
<i>S. epidermidis</i>	107 (40.1)	1173.3	67.3	100.1	30.1
<i>S. haemolyticus</i>	91 (34.2)	1181.8	202.1	35.1	16.4
<i>S. hominis</i>	27 (10.1)	989.4	61.6	34.5	14.0
<i>S. warneri</i>	15 (5.6)	1002.2	NT	12.9	86.9
<i>S. capitis</i>	7 (2.6)	1016.5	89.2	15	21.1
<i>S. saprophyticus</i>	6 (2.2)	1052*	50.6	54.3	NT
<i>S. cohnii</i>	4 (1.5)	825*	28*	41.7	18.9*
<i>S. caprae</i>	3 (1.1)	NT	40*	28.8	NT
<i>S. xylosus</i>	3 (1.1)	NT	23	31.6	NT
<i>S. sciuri</i>	2 (0.7)	NT	NT	86.5	NT
<i>S. lugdunensis</i>	1 (0.4)	NT	NT	32*	NT
<i>S. auricularis</i>	1 (0.4)	NT	NT	41*	NT
Total	267 (100.0)	1018.2	87.8	65.5	28.2

* Just one sample tested.

NT = Method not tested for specie.

Four methods were performed, the first one, popularly known as boiling, was based on Alexopoulou *et al.*¹ with no relevant modifications. This procedure was performed on 50 randomly selected samples. The second, phenol-chloroform, it was based on Silva and Silva¹⁶ with just one relevant modification: 20 μ L of lysozyme (100 mg ml⁻¹) (Sigma) were added to the enzymatic lysis suspension. The phenol-chloroform used was Equilibrated Phenol, pH 8.0, purchased from USB Corporation. This procedure was applied to 70 randomly selected

samples. The third method was based on extraction columns and was performed according to the kit manual (QIAamp DNA mini kit, Qiagen). Lysozyme and lysostaphin were used together on the enzymatic lyses step. One modification was introduced: after the deproteinization step with proteinase K, 4 μL of RNase A (100 mg ml^{-1}) (BioAmerica) were added to it and then incubated at 70°C for 10 min. All the samples ($n = 267$) were submitted to this extraction method. Finally, we also test a salting out method following the kit manual (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega) recommendations for gram-positive bacteria without modifications. This procedure was performed on 50 randomly selected samples. Usual bacterial amount used in all methods was growth cell of 16 hours incubation in 1 mL of brain heart infusion broth (BHI) (Merck).

After extraction procedures, we verified the presence and integrity of the DNA on the extracted material in agarose gel electrophoresis. Five microliters of DNA and 5 μL of loading buffer (buffer type IV¹⁴) were mixed in a 0.2 mL tube. This mixture was placed into the gel wells and subjected to a voltage of 6 volts/cm for 20 min in a horizontal electrophoresis system (PowerPac Basic, Bio-Rad). After that, DNA visualization and photo documentation were performed by the system MF-Chemi BIS (BioAmerica, Inc.). The extracted material of each method was also analyzed by spectrophotometry. Two μL of DNA extracted from each sample were placed directly on the spectrophotometer (NanoDrop, 2000, Thermo Cientific) and measures in 230, 260 and 280 nm were performed. The system software provides the DNA concentration in $\text{ng}/\mu\text{L}$ and automatically calculates the absorption ratio 260/280 ($A_{260/280}$) and 260/230 ($A_{260/230}$). At last, we performed amplification by PCR using the pair of primers described by Jensen *et al.*⁸: G1 (GAA GTC GTA ACA AGG) and L1 (CAA GGC ATC CAC CGT) (Integrated DNA Technologies, Coralville, USA). This pair of primers was selected from conserved sequences from the adjacent 16S and 23S genes⁸. The amplification reaction was performed on a LifePro Thermal Cycler (Hangzhou Bioer Technology Co. Ltda, Hangzhou, China). The reagent concentrations and the reaction conditions were the same used by Couto *et al.*³. Based on the results of DNA quantification found by spectrophotometry, approximately 50 ng of DNA were used on each PCR reaction. The amplification was checked in agarose gel electrophoresis under the same conditions described above. Each sample was tested once. The major costs of reagents per sample are showed in Table 2.

Table 2 Main cost of reagents per sample of each method in U. S. dollars (US\$).

Method	Kit	Lysostaphin	Lysozyme	Proteinase K	Equilibrated	Total
--------	-----	-------------	----------	--------------	--------------	-------

					phenol		
Boiling	NR	NR	NR	0.51	NR	0.51	
Phenol-chloroform	NR	13.80	0.08	0.50	0.15	14.53	
Column	6.15	24.85	0.14	*	NR	31.14	
Salting out	2.79	20.71	0.03	NR	NR	23.53	

NR: not required.

*: provided in the kit.

To obtain values of mean and standard deviation, calculations of descriptive measures were used. The quantitative variables were tested for normality by the Kolmogorov-Smirnov test. Mann-Whitney U test was used to compare results among species. Values of the quantity and quality of the DNA from the four extraction methods were compared by the Kruskal-Wallis test; multiple comparisons between methods were analyzed using Dunn's test. Kruskal-Wallis and Dunn's test were performed with the support of the program GraphPad Prism (GraphPad, version 5) and other tests, with the program Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Statistics, version 17). The significance level used was 5%.

Results and Discussion

The increasing use of molecular methods on clinical microbiology further emphasizes the necessity of efficient DNA purification, free of proteins and high molecular weight cellular debris^{5, 10}. Several studies have shown the importance of the parameter "quality" in obtaining better results on techniques like RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) and RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)^{1, 4, 11, 17}. Furthermore, differences between gram-positive and gram-negative bacteria should also be considered when choosing the DNA extraction method¹⁰, a fact that prevents the use of many low-cost protocols indicated for any type of microorganisms¹¹. This study aimed to identify the most suitable method for DNA extraction for CoNS evaluating mainly the quality of the material obtained from four different methodologies.

The agarose gel electrophoresis showed better results for the samples extracted by the method of extraction column. Although some samples evidenced DNA fragmentation, on almost all samples extracted by this method it was possible to visualize the DNA. Samples

extracted by boiling, phenol-chloroform and salting out showed the same quality range, but inconstant presence. On the other hand, comparing the four methods by spectrophotometry, samples extracted by boiling demonstrated more DNA than the others ($\bar{x} = 1,018.2 \text{ ng}/\mu\text{L}$) (Table 1). The average amount of DNA extracted by the phenol-chloroform method was a little bit higher than by extraction column, 87.8 and 65.5 $\text{ng}/\mu\text{L}$, respectively, but this was not statistically significant ($p > 0,05$). Likewise, according to Kruskal-Wallis test, the average A280/230 and A260/230 differences was statistically significant between all four methods ($p < 0,0001$); except for average A260/280 between extraction column and salting out and the average A260/230 between phenol-chloroform and salting out ($p > 0,05$) (Table 3). Finally, all four methods provided effective DNA for PCR amplification with the pair of primers used. The percentage of positive amplification results in one single reaction performed was 94% for the extraction column method, 91% for the salting out, 83% for the boiling, and 71% for the phenol-chloroform.

Table 3 Mean results of each extraction method regarding parameters evaluated.

Parameter	Boiling	Phenol-chloroform	Extraction Column	Salting Out	p
Agarose gel electrophoresis	Variable*	Variable*	Positive	Variable*	
Amount of DNA in $\text{ng}/\mu\text{L}$	1018.2 (168.8)	87.8 (70.2)	65.5 (64.5)	28.2 (32.5)	< 0.0001
A260/280	0.42 (0.03)	1.42 (0.15)	1.95 (0.26)	1.82 (0.44)	< 0.0001
A260/230	2.99 (0.72)	0.66 (0.31)	1.34 (0.66)	0.81 (0.45)	< 0.0001
PCR	Positive	Positive	Positive	Positive	
Yeld	200 μL	100 μL	200 μL	100 μL	

* Some samples showed no visible bands.

() = Standard deviation.

The bands visualized by the four extraction methods in agarose gel electrophoresis showed the same quality parameters. The great majority of the bands were well defined and not fragmented. However, some samples, mainly the ones extracted by boiling, phenol-chloroform, and salting out showed no visible bands on the gel. Surprisingly, in the spectrophotometry those samples showed to hold an amount of DNA detectable using the method of agarose gel electrophoresis. Regarding agarose gel electrophoresis, similar results were found by Nogueira *et al.*¹¹ and as reported by them the absence of bands on the gel was not determinant for obtaining a successful PCR. On the boiling method, the high

protein contamination can lead to an overestimation of the real concentration of DNA¹⁴. Besides that, DNA fragmentation by the high temperatures used on this method can be responsible for the low visualization of bands on agarose gels.

Analysis by spectrophotometry can reveal important information about the DNA extracted from one sample. Besides determining the DNA amount (ng/ μ L), the A260/280 can be used to assess the DNA purity concerning the protein contamination. Pure DNA preparations have a A260/280 of 1.8. Similarly, significant absorbance at 230 nm decreases the values of A260/230 and indicates contamination with polyphenols and organic compounds¹⁴. So although the boiling method presented the greatest average amount of DNA extracted, this may not be true since the very low value of A260/280 (0.42) evidences a high protein contamination (Table 3). On the same way, looking for A260/230 we also can see a low value (0.66) for the phenol-chloroform extraction method. In this case, this high presence of organic solvents can be responsible for the low PCR amplification (71%). The extraction column method showed the best results regarding quality and purity of the DNA extracted, which partially explains the better results obtained on the PCR amplification.

Calculations of the standard deviation values demonstrated that the quality of DNA obtained in each one of the four methods did not change much (normal distribution). In contrast, the quantitative values on phenol-chloroform, extraction column, and salting out had higher variation resulting on a significant standard deviation (Table 2). The reason for this is the different amount of DNA obtained in each species. Comparing each quantitative result with the respective specie, some interesting observations can be made. The mean amount of DNA extracted by the extraction column method from *Staphylococcus epidermidis* was 100.1 ng/ μ L, greater than the overall average of other species ($p < 0.001$) (Table 1). In the specific case of this method, this finding is important because *Staphylococcus epidermidis* is the most common CoNS clinical isolate¹². Nevertheless, the boiling method didn't show significant differences among species. On the other hand, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus warneri* had the largest average number by phenol-chloroform and salting out, respectively and *Staphylococcus capitis*, the lower by extraction column. However, our results cannot explain those findings and further studies are needed to investigate the reason of those variations.

Using the pair of primers described by Jensen *et al.*⁸ and the DNA obtained by the methods used in this study we were able to perform the proposed PCR. However, using

similar methods of boiling and phenol-chloroform, Nogueira *et al.*¹¹ found no positive results in a RAPD-PCR for the gram-positive samples, only for the gram-negative. Nevertheless, Alexopoulou *et al.*¹ published a study in 2006 in which they successfully used the same boiling method used by us and performed a CoNS identification by RFLP-PCR.

Currently there are numerous in-house protocols and commercial kits based on different principles for DNA extraction from bacteria. Nevertheless, the number of comparative studies between these methods is still scarce^{5, 10}. Taking into account the difficulty to lyse the CoNS cell wall, we evaluated four methods based on different principles and found significant differences between the quality and the amount of the DNA extracted. Quality of the DNA extracted is important when choosing the extraction method to be used for those species, especially if we consider posterior sequencing, long term storage or the construction of genomic libraries for future tests. Considering these parameters extraction column method has proven to be the best alternative when extracting DNA from CoNS. However, when working with CoNS the choice of the best method should be done thinking in the investigation purpose and the future perspectives taken into consideration the methods yield and the resources available. In-house protocols are cheaper and can be used mainly for quick determinations, but the quality of the material makes commercial kits worthwhile in deeper investigations. We hope that the results presented in this study could help other researches or professionals to make this important decision.

Acknowledgments

The authors thanks to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) for financial support.

Authors contributions

KCR and TGSP participated in the discussions along the realization of the study, elaboration of statistical analyses, figure and tables, and helped to draft the manuscript. CFO designed the study, carried out the molecular biology procedures and drafted the manuscript. AR participated in the design of the study, elaboration of statistical analyses, figure and tables and helped to carry out the spectrophotometry analyses. PAd'A participated in the design and coordination of the study. All authors read and approved the final manuscript.

RESUMO

Avaliação de quatro métodos diferentes de extração de DNA em isolados clínicos de estafilococos coagulase negativos (SCoN)

Atualmente, para extrair o DNA bacteriano, existem diversos métodos baseados em diferentes princípios. Entretanto, a quantidade e qualidade do DNA obtido por cada um destes métodos é variável e depende do tipo de micro-organismo em questão; os estafilococos coagulase-negativos (CoNS), por exemplo, possuem uma parede celular espessa difícil de lisar. O objetivo deste estudo foi comparar a quantidade e a qualidade do DNA extraído de isolados clínicos de CoNS utilizando quatro metodologias diferentes: dois protocolos caseiros e dois kits comerciais. A determinação da quantidade e da qualidade do DNA foi realizada por espectrofotometria. O DNA extraído também foi analisado em eletroforese em gel de agarose e por PCR. A concentração média de DNA foi mais alta no método de lise térmica ($\bar{x} = 1.018,2 \text{ ng}/\mu\text{L}$). Entretanto, com relação à qualidade do DNA, o kit comercial que utiliza um método de extração baseado em uma coluna de separação apresentou melhor resultado (média da relação $260/280 = 1,95$). As quatro técnicas testadas forneceram DNA passível de amplificação por PCR, porém com diferentes rendimentos. A qualidade do DNA extraído de bactérias é importante, pois possibilita a realização de um maior número de técnicas de biologia molecular e também um armazenamento do material por maior período de tempo. Neste sentido, a técnica de extração por coluna de separação apresentou melhor desempenho frente aos CoNS.

References

- 1 [Alexopoulou K, Foka A, Petinaki E, Jelastopulu E, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I.](#) Comparison of two commercial methods with PCR restriction fragment length polymorphism of the *tuf* gene in the identification of coagulase-negative staphylococci. [Lett Appl Microbiol.](#) 2006; 43: 450-4.

- 2 Cheng H, Jiang N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnol Lett.* 2006; 28: 55-9.
- 3 Couto I, Pereira S, Miragaia M, Sanches IS, de Lencastre H. Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by internal transcribed spacer PCR. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 3099–103.
- 4 Forbes BA. Introducing a molecular test into the clinical microbiology laboratory – development, evaluation, and validation. *Arch Pathol Lab Med.* 2003; 127: 1106-11.
- 5 Giraffa G, Rossetti L, Neviani E. An evaluation of chelex-based DNA purification protocols for the typing of lactic acid bacteria. *J Microbiol Methods.* 2000; 42: 175–84.
- 6 Goldenberger D, Perschil I, Ritzler M, Altwegg M. A simple "universal" DNA extraction procedure using SDS and proteinase K is compatible with direct PCR amplification. *Genome Res.* 1995; 4: 368-70.
- 7 Huber H, Ziegler D, Pflüger V, Vogel G, Zweifel C, Stephan S. Prevalence and characteristics of methicillin resistant coagulase-negative staphylococci from livestock, chicken carcasses, bulk tank milk, minced meat, and contact persons. *BMC Vet Res* 2011, 7: 6.
- 8 Jensen MA, Webster JA, Straus N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59: 945–52.
- 9 Kloos WE, Bannerman TL. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* 1994; 7: 117–40.
- 10 McOrist AL, Jackson M, Bird AR. A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. *J Microbiol Methods.* 2002; 50: 131–9.
- 11 Nogueira CAM, Momesso CAS, Machado RLD, de Almeida MTG, Rossit ARB. Performance of commercial kits and laboratory protocols for bacterial genomic DNA extraction. *Rev Panam Infectol.* 2004; 6: 35-8.
- 12 Rogers KL, Fey PD, Rupp ME. Coagulase-negative staphylococcal infections. *Infect Dis Clin North Am.* 2009; 23: 73–98.

- 13 Salton MR. Studies of the bacterial cell wall IV. The composition of the cell walls of some gram-positive and gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta*. 1953; 10: 512-23.
- 14 Sambrook J, Russel DW. Quantitation of nucleic acids. In: *Molecular cloning: a laboratory manual*. Third edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001; A8.19-A8.24.
- 15 Secchi C, Antunes ALS, Perez LRR, Cantarelli VV, d'Azevedo PA. Identification and detection of methicillin resistance in non-epidermidis coagulase-negative staphylococci. *Braz J Infect Dis*. 2008; 12: 316-20.
- 16 Silva ER, Silva N. Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in southeastern Brazil. *Can J Vet Res*. 2005; 69: 260–4.
- 17 Tyler KD, Wang G, Tyler SD, Johnson WM. Factors affecting reliability and reproducibility of amplification based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. *J Clin Microbiol*. 1997; 35: 339-46.
- 18 Wilfinger W. Extended bactozone lysis procedure for the isolation of genomic DNA from recalcitrant gram-positive bacteria. Molecular Research Center Technical Bulletin No. 8. URL: <http://mrcgene.com/tb8-grampositive.htm>. October, 2012.
- 19 Yang G, Erdmanc DE, Kodanib M, Koolsc J, Bowenc MD, Fields BS. Comparison of commercial systems for extraction of nucleic acids from DNA/RNA respiratory pathogens. *J Virol Methods*. 2011; 171: 195-9.

Artigo 2 - Tipos de SCC*mec* em SCoN e tipagem molecular de *S. epidermidis*

SCC*mec* evolution in coagulase negative staphylococci and genetic diversity of *Staphylococcus epidermidis* isolates from Porto Alegre, Brazil

Caio Fernando de Oliveira, Jorum Pauline Cavanagh, Elizabeth Aarag Fredheim, Keli Cristine Reiter, Alexandre Rieger, Klaus Klingenberg, Pedro Alves d'Azevedo and Johanna Ericson Sollid.

A ser enviado à revista International Journal of Medical Microbiology.

SCC_{mec} evolution in coagulase negative staphylococci and genetic diversity of *Staphylococcus epidermidis* isolates from Porto Alegre, Brazil

Caio Fernando de Oliveira^a, Jorunn Pauline Cavanagh^b, Elizabeth Aarag Fredheim^b, Keli Cristine Reiter^a, Alexandre Rieger^c, Claus Klingenberg^d, Pedro Alves d'Azevedo^e, and Johanna Ericson Sollid^f

^a Health Sciences Post-Graduate Program, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, 245 Sarmiento Leite Street, zip code 90050-170, Porto Alegre, Brazil

^b Post-doc student, University of Tromsø, Tromsø, Norway

^c Laboratory of Biotachnology and Genetic, University of Santa Cruz do Sul, 2293 Independência Avenue, zip code 96815-900, Santa Cruz do Sul, Brasil

^d Department of Paediatrics, University Hospital of North Norway, University of Tromsø, Tromsø, Norway

^e Department of Microbiology and Parasitology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, 245 Sarmiento Leite Street, zip code 90050-170, Porto Alegre, Brazil

^f Department of Microbiology and Virology, Institute of Medical Biology, University of Tromsø, Tromsø, Norway

Corresponding author at: Health Sciences Post-Graduate Program, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, 245 Sarmiento Leite Street, zip code 90050-170, Porto Alegre, Brazil. Tel.: +55 51 33038742; Fax.: +55 51 33038740.

E-mail address: caiofarm@yahoo.com.br

Authors e-mail address: JP Cavanagh, pauline.cavanagh@uit.no; EA Fredheim, elizabeth.aarag@uit.no; KC Reiter, kelicrisr@gmail.com; A Rieger, rieger@unisc.br; C Klingenberg, claus.klingenberg@unn.no; PA d'Azevedo, pedro_dazevedo@yahoo.com.br; JE Sollid, johanna.e.sollid@uit.no.

Abstract

Coagulase negative staphylococci (CoNS) are the most prevalent pathogens in nosocomial infections, in particular biofilm-associated medical device infections. CoNS may also serve as a reservoir of mobile genetic elements, e.g. the staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) encoding methicillin resistance. Molecular characterization of SCC*mec* types combined with advanced molecular typing techniques may provide essential information in order to understand the evolution and the epidemiology of CoNS infections.

In this study we analyzed 136 CoNS blood culture isolates obtained between 2002-2004 from patients admitted in a tertiary care hospital in Brazil. SCC*mec* types I to V were determined by multiplex PCR and compared with a more recent collection from 2010. The clonal relationship of *Staphylococcus epidermidis* was determined by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST). Molecular epidemiological data were interpreted along with information regarding biofilm formation, presence of *icaD* gene and multidrug resistance (MDR).

The most prevalent species and SCC*mec* types were *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* and *S. hominis* and SCC*mec* types II, III, and V. We also observed the emergence of SCC*mec* types I, IVb and IVc. *S. epidermidis* isolates had a high prevalence of *icaD* gene but low phenotypic biofilm formation. PFGE and MLST revealed a high genetic diversity in *S. epidermidis* population.

Our results confirm the high genetic diversity among CoNS species and the importance of constant monitoring of mobile genetic elements and virulence determinants in these microorganisms.

Keywords: Coagulase negative staphylococci, nosocomial infections, multidrug resistance, biofilm, molecular typing.

Introduction

The number of infections caused by coagulase negative staphylococci (CoNS) is increasing and CoNS are currently the most prevalent microorganisms responsible for nosocomial infections related to indwelling medical devices (Rogers, 2009; Huebner, 1999). In a Brazilian prospective surveillance study from 2007 to 2010, CoNS were identified as the most common pathogens in nosocomial bloodstream infection of pediatric patients (Pereira, 2013). *Staphylococcus epidermidis* is the most prevalent CoNS species isolated from nosocomial infections, in particular in relation to indwelling devices (Uckay, 2009). The ability to form biofilm is considered to be the most important *S. epidermidis* virulence factor (Otto, 2008).

CoNS infections are frequently difficult to treat due to multidrug resistance (MDR) and biofilm formation (Reiter, 2011; Fredheim, 2009). This may result in infections with limited therapeutic options, increased risk of treatment failure as well as increased cost (Ziebuhr, 2006; Vuong, 2002). Moreover, the high genetic diversity and constant presence on the human body makes CoNS a permanent reservoir of genetic material to other and more virulent staphylococcal species including *Staphylococcus aureus* (Fluit, 2013; Takeuchi, 2005).

The staphylococcal cassette chromosome (SCC) is a family of mobile genetic elements found in the genus *Staphylococcus*. SCC_{mec} harbors the *mec* genes, encoding resistance to methicillin and almost all β -lactam antibiotics (Ito, 2003). Furthermore, the SCC_{mec} element frequently harbor integrated insertion sequences, plasmids and transposons that often encode additional resistance determinants (Shore, 2013). According to the current SCC_{mec} classification scheme in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (<http://www.sccmec.org>) a high number of non-typable and new SCC_{mec} types not previously identified in *S. aureus* have been detected in CoNS (Shore, 2013; Bouchami, 2011; Svensson, 2011; Hanssen, 2007; Miragaia, 2007; Miragaia, 2005; Hanssen, 2004). The high genetic diversity within SCC_{mec} elements carried by CoNS makes the identification of SCC_{mec} types in CoNS challenging and reflects a high degree of genetic flexibility (Miragaia, 2008; Hanssen, 2007).

Among the different molecular techniques currently used to characterize *S. epidermidis*, pulsed field gel electrophoresis (PFGE) is considered the best discriminatory method to explore local epidemiological outbreaks (Martins, 2013; Rolo, 2012; Widerström, 2009; Hanssen, 2004; Miragaia, 2002). Multilocus sequence typing (MLST) is, however,

considered a more robust tool to identify population structure and global epidemiology (Mendes, 2012; Klingenberg, 2007; Miragaia, 2007). To date there are few studies evaluating the molecular epidemiology of *S. epidermidis* from Brazilian hospitals (Martins, 2013; Almeida, 2012; Iorio, 2012).

The aim of this study was to investigate the SCC*mec* distribution, antimicrobial resistance and biofilm formation in CoNS blood culture isolates from a hospital in southern Brazil. We compared the SCC*mec* distribution with data from a more recent study from the same institution (Reiter *et al.*, 2011) in order to evaluate the evolution of this mobile genetic element. Furthermore, for *S. epidermidis* we investigate the molecular epidemiology to reveal additional virulence factors and the possible spread of successful clones.

Material and Methods

Setting

During a 3-year period (from 2002 to 2004) all CoNS blood culture isolates from patients admitted to the Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre Hospital, a tertiary care hospital in the south of Brazil, were collected. A total of 136 isolates were stored at – 70 °C on skimmed milk (Difco Skim Milk, Becton Dickinson). For this study isolates were grown on blood agar 24 hours prior to each test procedure.

Species identification and antimicrobial susceptibility test

CoNS were identified by automated systems (MicroScan and Vitek), conventional phenotypic tests, and desferrioxamine and fosfomicin disks (Antunes, 2007; Caierão, 2006). The antimicrobial susceptibility profile of each isolate was determined by the disk diffusion method and automated system (Vitek2), as previously reported (d’Azevedo, 2009). The antimicrobial agents tested comprised penicillin, oxacillin, teicoplanin, gentamicin, erythromycin, tetracycline, ciprofloxacin, clindamycin, trimethoprim-sulfamethoxazole, rifampin, quinupristin-dalfopristin, linezolid, and cefoxitin (Oxoid). Resistance to methicillin was determined by the cefoxitin disc test using the interpretative criteria recommended by the CLSI (2007). MDR was defined as an isolate exhibiting a resistance phenotype to at least four classes of antimicrobial agents.

Biofilm formation

Semi-quantitative determination of biofilm formation for *S. epidermidis* was performed as described previously (Christensen, 1985; Fredheim, 2009). All *S. epidermidis* isolates were tested in polystyrene microtiter plates with three parallel runs. For each parallel, the highest and the lowest values for optical density (OD) were removed to exclude outliers and the remaining values were averaged. We used Tryptic Soy Broth (TSB) with 1% glucose to induce biofilm formation. We determined the optical density (OD) of the crystal violet-stained adherent biofilm with a spectrophotometer at 570 nm. Isolates were considered biofilm producers if they had an $OD \geq 0.12$. Cutoff value was chosen to distinguish between isolates that produced significant amounts of biofilm and those that did not, taking into account the OD values for the negative controls included in each experiment. Presence of the *icaD* gene was determined by PCR as described previously (Fredheim, 2009). In both assays *S. epidermidis* RP62A was used as a positive control and *S. epidermidis* ATCC 12228 and *S. haemolyticus* 51-03 were included as negative control.

DNA preparation

DNA for polymerase chain reactions (PCR) was extracted with the QIAamp DNA mini kit (Qiagen) according to Oliveira *et al.* (2014). Agarose plugs (Certified Megabase Agarose, BioRad) containing chromosomal DNA for PFGE were prepared as previously described (Hanssen, 2004). Lysozyme (Omega) and Lysostaphin (Sigma) were used in cell wall lysis step.

Determination of SCCmec types among all CoNS

SCCmec types and subtypes I, II, III, IVa, IVb, IVc, IVd, and V and *mecA* were investigated using the multiplex PCR designed by Zhang *et al.* (2005) with few modifications: PCR reactions contained 1.5 mM MgCl₂, and 1.15 unit of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA). The final concentration of each pair of primers were: I (0.096 μM), II (0.064 μM), III (0.08 μM), IVa (0.208 μM), IVb (0.184 μM), IVc (0.156 μM), IVd (0.56 μM), and V (0.12 μM). Positive control strain for each gene was as follow: types I and V (BRA524), types II and III (BRA645), type IVa (BRA614), type IVd (BRA364) (this study), type IVb (8/6-3P) and type IVc (MR108) (Reiter, 2011). Methicillin resistant isolates that did not result in PCR products by any of the primers tested were considered non-typable.

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of S. epidermidis isolates

Restriction digestion of chromosomal DNA was performed with *Sma*I (New England Biolabs) and the fragments were separated by PFGE employing a CHEF-DRIII device (Bio-Rad) as previously described (Hanssen, 2004). The PFGE types were defined after analysis using the BioNumerics software version 4.5 (Applied Maths). Clustering was performed by using the Dice similarity coefficient and the unweighted pair group method with arithmetic means (UPGMA), with 1.3% of tolerance and 0.8% optimization. PFGE types were automatically assigned by using a cutoff similarity value of 79%; the types obtained were represented by numbers.

Multilocus sequence typing (MLST): Fragments of seven housekeeping genes were amplified by conventional PCR using the MLST scheme published by Thomas *et al.* (2007). The alleles and sequence type (ST) numbers were assigned using the *S. epidermidis* MLST database (<http://sepidermidis.mlst.net>). The most likely patterns of evolutionary descent in the collection were assessed using the eBURST algorithm (<http://eburst.mlst.net>).

Statistical analysis: Comparisons between prevalence of independent samples were performed by binomial test. Variables association were accessed with Pearson Chi-square test, and when necessary, Fischer's exact test. Eventually adjusted standardized residual analysis was included to identify the associated variables. Significance level used was 5%.

Results

SCC*mec*

The species and SCC*mec* distribution among all CoNS isolates are presented in Table 1. 126 out of 136 (93%) CoNS isolates were phenotypically resistant to methicillin. All the methicillin resistant isolates were *mecA* positive (n = 126). The 10 methicillin sensitive isolates were all *S. epidermidis*. 100 (79%) of the 126 methicillin resistant isolates harboured at least one of the SCC*mec* types tested in this study. In order to investigate the evolution of SCC*mec*, the distribution of SCC*mec* types among the isolates in this study collected between 2002-2004 (2004 collection) was compared to isolates collected in 2010 (2010 collection) by Reiter *et al.* (2011). The results are summarised in table 1. Both strain collections show a wide distribution of SCC*mec* types. The major differences were observed for SCC*mec* type IVb and IVc which appeared only in the 2010 collection. The prevalence of SCC*mec* type I and non-typeable cassettes increased from 2004 to 2010 (from 0.8 to 11.8 and 20.6 to 40.3 %, respectively).

respectively) whereas the prevalence of type III and multiple cassettes were less frequent in the 2010 collection (from 41.3 to 18.5 and 18.3 to 2.5 %, respectively) (Table 1).

Table 1. SCC mec distribution in methicillin resistant CoNS (MR-CoNS) from the 2004 and 2010 collections.

Collection	n	SCC mec type											Non-typable			
		I	II	III	IVa	IVb	IVc	IVd	V	I+III	I+V	II+V		III+IVa	III+IVd	II+III+V
2004																
<i>S. epidermidis</i>	52	-	-	20	4	-	-	6	4	-	1	1	5	3	1	7
<i>S. haemolyticus</i>	41	-	5	16	-	-	-	-	6	-	-	9	-	-	1	4
<i>S. hominis</i>	19	-	-	14	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	4
<i>S. warneri</i>	6	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	4
<i>S. saprophyticus</i>	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
<i>S. xylosus</i>	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
<i>S. cohnii</i>	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	126	-	5	52	4	-	-	6	10	-	1	12	5	3	2	26
%	100	-	4.0	41.2	3.2	-	-	4.8	7.9	-	0.8	9.5	4.0	2.4	1.6	20.6
2010																
MR-CoNS	119	14	3	22	17	2	4	2	4	3	-	-	-	-	-	48
%	100	11.7	2.5	18.5	14.3	1.7	3.4	1.7	3.4	2.5	-	-	-	-	-	40.3

MR-CoNS; methicillin resistant coagulase negative staphylococci

Overall, MDR was seen among 106/136 (78%) isolates. There was a significant association between the presence of SCC mec and MDR ($p = 0.005$). However, an association between individual SCC mec types and positive MDR were significant only for type III ($p < 0.001$), and type V ($p = 0.011$). As the frequency of some SCC mec types were too low to perform safe statistic tests, and since we observe several combinations of SCC mec types in our isolates (Table 1), the types were divided in three categories: single, multiple, and non-typable. The association between the different categories and MDR is presented in Table 2. For CoNS as a whole and *S. haemolyticus* as single species there is an association between the presence of single SCC mec and MDR while *S. epidermidis* showed similar results but without significance. For *S. hominis* and other less prevalent species there were not enough isolates for reliable statistical calculation.

Table 2. Association between MDR and SCC mec category in CoNS.

Specie	MDR (n)	SCC _{mec}						p value
		Single (%)		Multiple (%)		Non-typable (%)		
		n (%)	AR	n (%)	AR	n (%)	AR	
<i>S. epidermidis</i>	Pos (39)	27 (69.2)	1.0	6 (15.4)	-1.8	6 (15.4)	0.7	0.198
	Neg (13)	7 (53.8)	-1.0	5 (38.5)	1.8	1 (7.7)	-0.7	
<i>S. haemolyticus</i>	Pos (36)	26 (72.3)	2.3	6 (16.5)	-3.1	4 (11.2)	0.8	0.008
	Neg (5)	1 (20.0)	-2.3	4 (80.0)	3.1	0 (0.0)	-0.8	
<i>S. hominis</i>	Pos (13)	9 (69.3)	- ^a	1 (7.7)	- ^a	3 (23.0)	- ^a	- ^a
	Neg (6)	4 (66.6)	- ^a	1 (16.7)	- ^a	1 (16.7)	- ^a	
Other species	Pos (8)	1 (12.5)	- ^a	1 (12.5)	- ^a	6 (75.0)	- ^a	- ^a
	Neg (6)	1 (16.7)	- ^a	0 (0.0)	- ^a	5 (83.3)	- ^a	
Total	Pos (96)	63 (65.6)	2.1	14 (14.6)	-2.3	19 (19.8)	-0.3	0.045
	Neg (30)	13 (43.3)	-2.1	10 (33.4)	2.3	7 (23.3)	0.3	

-^a unreliable results; AR Adjusted residual. The AR value $\geq [2.0]$ is considered statistically significant.

Biofilm formation

Twenty eight (45%) of the 62 *S. epidermidis* isolates had an OD of ≥ 0.12 and were considered biofilm producers. Of these, 26 (93%) were *icaD* positive and 2 (7%), *icaD* negative. On the other hand, of the 34 non biofilm producers 24 (71%) were *icaD* positive and 10 (29%) *icaD* negative (Table 3). The overall prevalence of *icaD* genes were 81% (50/62) and of biofilm formation were 45% (28/62). There were no associations found between biofilm production or *icaD* presence with the MDR phenotype ($p = 0.494$ and $p = 0.389$, respectively).

Table 3. Biofilm formation and presence of *icaD* among *S. epidermidis* isolates

<i>icaD</i>	Biofilm formation		Total
	Producer	Non-producer	
Positive	26	24	50
Negative	2	10	12
Total	28	34	62

PFGE

PFGE analysis of 62 *S. epidermidis* clustered 40 isolates (64%) in 14 groups. The remaining 24 isolates (36%) were considered sporadic strains (Table 4). The largest cluster (PFGE type 11; n = 7) showed a positive association with MDR (p = 0.037); 4 of these 7 isolates harboured SCCmec type III and were identified as ST6. The second largest cluster (PFGE type 7; n = 4) showed a positive association between biofilm formation and the presence of *icaD* (both p = 0.034). For the remaining PFGE types there were no difference between clustered and sporadic strains regarding MDR (p = 0.055), biofilm formation (p = 0.223), and the presence of *icaD* (p = 0.741). PFGE types 5, 6, 8, and 12 were triplets, and the remaining 8 types found (1, 2, 3, 4, 9, 10, 13, 14) comprised only two isolates. Two pair of isolates showed identical banding-patterns (isolates BRA526/575 and BRA246/267).

MLST

All 62 *S. epidermidis* isolates were typed by MLST. In total, 29 different sequence types (ST) were identified of which 12 are new (STs 499 to 510). Figure 1 illustrates the distribution of our isolates in *S. epidermidis* clonal complex 2 (CC2). Fifty two percent (32/62) of the isolates were identified as ST2 (n = 17), ST6 (n = 7), ST59 (n = 4), and ST23 (n = 4). The majority of these most frequent STs were MDR (84%), *icaD* positive (87%), and biofilm negative phenotypically (59%). STs 2 and 6 were associated with SCCmec type III, and ST59, with SCCmec III and IVa (p < 0.05). The remaining isolates were assigned as singletons, pairs, or triplets of different STs. The new STs were mainly positive for *icaD* and biofilm formation, but not MDR (Table 4).

Table 4 Main characteristics of the 62 *S. epidermidis* isolates included in this study

Strain ID	ST	PFGE type	SCCmec	MDR	icaD	Biofilm
BRA354	2	3	III	+	+	-
BRA208	2	4	V	-	-	-
BRA302	2	4	V	-	+	-
BRA363	2	5	III	+	+	+
BRA530	2	6	III	+	+	-
BRA566	2	6	NT	+	+	-
BRA634	2	6	NT	+	+	-
BRA406	2	7	NT	+	+	+
BRA532	2	7	III, IVa	+	+	+
BRA291	2	8	V	+	+	+
BRA379	2	8	III	+	+	+
BRA608	2	14	III	+	+	+
BRA554	2	14	IVd	-	+	-
BRA373	2	S	III	+	+	+
BRA496	2	S	III	+	+	+
BRA618	2	S	III	+	+	+
BRA645	2	S	II, III, V	+	+	+
BRA513	22	10	III	+	+	-
BRA650	22	10	III	+	+	+
BRA385	237	7	III	+	+	+
BRA364	501	8	IVd	+	+	-
BRA524	6	9	I, V	+	+	+
BRA514	6	11	III	+	+	-
BRA526	6	11	III	+	-	-
BRA539	6	11	III	+	-	+
BRA575	6	11	III	+	-	-
BRA384	6	11	V	+	-	-
BRA694	6	S	II, V	-	+	-
BRA253	101	11	IVa	+	-	-
BRA689	510	11	III	+	+	-
BRA290	20	S	III, IVa	+	+	+
BRA641	20	S	III, IVa	-	+	+
BRA531	89	S	NT	-	-	-
BRA389	23	3	V	+	+	-
BRA507	23	13	NT	+	+	-
BRA533	23	13	NT	+	+	-
BRA632	23	S	NT	+	+	-
BRA378	503	S	IVd	+	+	+
BRA234	499	9	MSSE	-	+	+
BRA240	7	S	III	+	+	+
BRA557	17	S	III	+	+	-
BRA614	59	5	IVa	-	+	-
BRA205	59	12	III, IVa	-	+	-
BRA267	59	12	III, IVa	+	+	-
BRA246	59	12	IVa	+	+	-
BRA542	81	S	IVd	-	-	-
BRA340	53	S	MSSE	-	+	+
BRA602	72	S	MSSE	-	+	+
BRA370	193	5	MSSE	-	+	-
BRA488	307	S	III	-	+	+
BRA510	340	S	III	-	+	-
BRA538	340	1	III, IVd	-	-	+
BRA582	340	S	IVa	+	-	-
BRA258	500	S	MSSE	-	-	-
BRA555	500	S	MSSE	-	+	-
BRA557	502	S	MSSE	-	+	+
BRA509	504	S	MSSE	-	+	+
BRA543	505	S	IVd	-	-	-
BRA544	506	1	III, IVd	-	+	-
BRA553	507	2	MSSE	-	+	+
BRA556	508	2	III, IVd	+	+	+
BRA595	509	7	MSSE	-	+	+

Abbreviations used: S: sporadic strain; NT: non-typeable; MSSE: methicillin susceptible *S. epidermidis*.

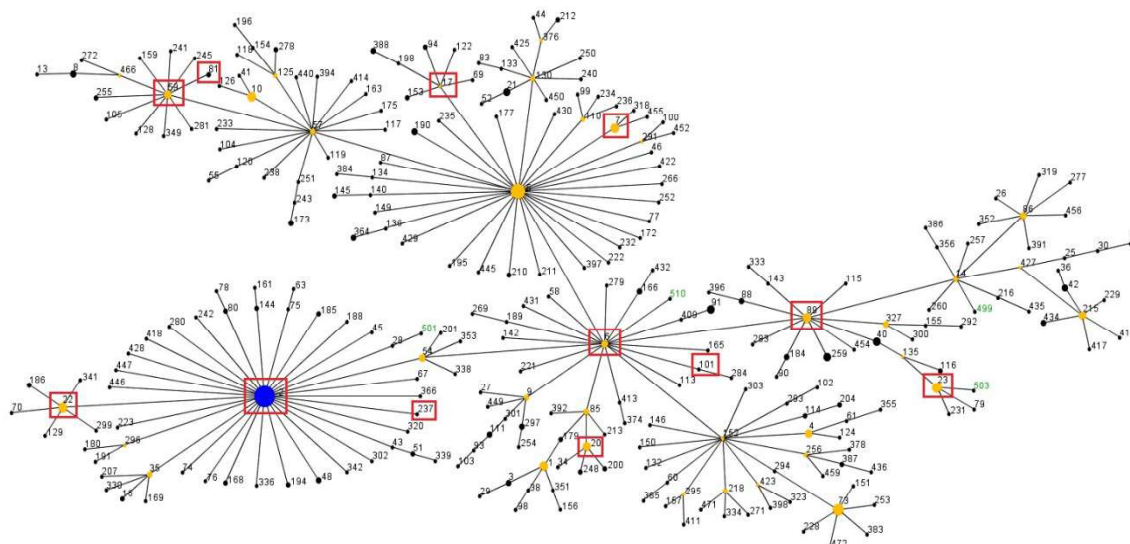


Figure 1. eBurst V3 analysis of *S. epidermidis* CC2 adding our MLST data to all isolates available in the MLST database on January 2014. Each ST is represented by a dot, and lines connect single locus variants. Blue dot represents the founder of CC2 and yellow dots represent subgroup founders. Green numbers represent new STs found in this study. Red squares represents STs reported in previous studies also found in this study.

Discussion

In this study we compared the *SCCmec* characteristics of two CoNS collections isolated in the same institution but collected with 6-8 years interval (Reiter, 2011). We found that the prevalence of *SCCmec* types was changing quickly. Comparing the results from the different periods we observe an increase in the number of different *SCCmec* types and non-typable isolates and the decreasing presence of multiple cassettes in the same isolate. Typing of the *S. epidermidis* isolates revealed a great genetic diversity and some differences and similarities in STs distribution when compared with *S. epidermidis* isolates from other institutions in Brazil (Martins, 2013; Iorio, 2012; Almeida, 2012) and around the world (Cherifi, 2013; Hellmark, 2013; Mendes, 2012; Li, 2009; Ibrahim, 2008; Miragaia, 2007). There was no statistical association with *icaD* and biofilm formation, indicating that other genes than *icaD* could be responsible for biofilm formation in these isolates, or that the induction of the *ica* genes were not promoted under the biofilm inducing conditions used in this study.

We used the same *SCCmec* multiplex PCR as Reiter *et al.* (2011) to enable comparisons between CoNS isolates collected in the same hospital with an 6-8 year interval. We found statistically significant differences in the prevalence of all *SCCmec* types except for

the subtype IVd. Overall, comparing our results with Reiter *et al.* (2011), we observed over the years a decreasing prevalence of SCC*mec* types II, III, and V ($p < 0.0001$), and an increasing prevalence of SCC*mec* types I and IV ($p < 0.0001$). Noteworthy is the presence of just one isolate harboring SCC*mec* type I and none harboring types IVb and IVc in the 2004 collection (Table 1). The 2010 collection investigated by Reiter *et al.* (2011) reported the emergence of 2 and 4 isolates, respectively, harbouring SCC*mec* types IVb and IVc and the presence of 14 isolates harboring type I (Table 1). We consider the appearance of new SCC*mec* types previously not found in this hospital especially worrying because this reflects the ongoing horizontal gene transfer between species. Unfortunately, the SCC*mec* typing scheme used failed to classify 26 out of 126 (20.6 %) a large proportion of the CoNS isolates (Shore, 2013; Bouchami, 2011; Hanssen, 2007; Svensson, 2011).

The acquisition and accumulation of resistance genes through mobile elements like SCC*mec* is enabled by integration into regions of the SCC*mec* element called joining (J) regions (IWG-SCC, 2009). Antibiotic resistant determinants like *tet* (tetracycline), *aacA-aphD* (aminoglycosides), or *ermA* (erythromycin) genes for instance, may be carried within J regions originating MDR strains (Turlej, 2011; Miragaia, 2008). In our isolates, there was a strong association between SCC*mec* presence and MDR. However, when we grouped our results to analyze the presence of more than one SCC*mec* type in the same isolate (multiple), we observed that the presence of multiple SCC*mec* type is associated with non-MDR and on the other hand, presence of single SCC*mec* is associated with MDR. Interestingly, no such associations were found when analysing *S. epidermidis* separately (Table 2).

The ability to form biofilm is considered to be the most important pathogenic factor for *S. epidermidis*, and the *ica* genes are recognized as one of the most important genes involved in biofilm formation (Otto, 2008). In our *S. epidermidis* isolates, despite the high prevalence of *icaD* (81%), we did not find a high prevalence of *in vitro* biofilm expression (Table 3). As suggested by Mertens and Ghebremedhin (2013), natural occurrence of insertion sequence elements like IS256 might be one of the reasons for this divergence. We also found two isolates producing biofilm in absence of *icaD* gene, confirming that although *icaD* is important for the development of biofilm, other factors and genes like *aap* and *bhp* (Otto, 2008) could be involved in the process.

As reported in other studies (Rolo, 2012; Miragaia, 2007), analysis of our *S. epidermidis* strains by two reliable typing methods reveal a high degree of genetic diversity;

our isolates showed high Simpson's index of diversity (SID) levels in PFGE (SID = 97.7%), and MLST (SID = 91.1%) (Data not shown). PFGE analysis revealed several small clusters as well as a considerable number of sporadic strains and MLST presented a range of different STs and several new alleles and STs (Figure 1 and Table 4). The proportion of different STs observed in this study (29 STs among 62 isolates) was higher than that previously reported by Mendes *et al.* in 2012 (27 STs among 71 isolates) and Miragaia *et al.* in 2007 (74 STs among 217 isolates). SCCmec typing also amplified all the SCCmec types searched and some different combinations of SCCmec types in individual strains, confirming the high variability of SCCmec types in *S. epidermidis* (Miragaia, 2007; Miragaia, 2005; Hanssen, 2004). Despite the presence of 2 clones revealed by PFGE, a large cluster indicating an epidemic outbreak was not detected.

The only two major clusters found in our study were assigned by MLST and match two very common MLST types detected worldwide: ST2 (n = 17) and ST6 (n = 6). Furthermore, our MLST results agree with the increasing high prevalence of STs 20, 22, 23, and 89 detected in several countries (Mendes, 2012; Cherifi, 2013; Hellmark, 2013; Ibrahim, 2008; Miragaia, 2007; Li, 2009). Interestingly, we did not find any ST5 isolates which is a very frequent type worldwide; however, we found two ST5 single locus variants (ST7 and ST17) (Figure 1). Finally, the second most common ST worldwide (ST23) (Miragaia, 2007) was only the fourth most prevalent ST in our collection. As suggested previously, genetic diversity of *S. epidermidis* nosocomial isolates may be caused by the need to adapt to different environments in hospital setting, leading to increased frequency of horizontal gene transfer and dissemination of mobile genetic elements (Bouchami, 2011).

Comparing the overall results generated by PFGE with the results of MDR, biofilm formation, and gene *icaD* no difference was observed between clustered and sporadic strains. The high diversity of our isolates might be the reason for this since other studies have shown cluster isolates identified by PFGE with higher rates of antibiotic resistance and biofilm formation than non-cluster isolates (Li, 2009; Klingenberg, 2007). There is currently lacking data concerning the epidemiology of both nosocomial and community *S. epidermidis* isolates from Brazil. Further studies need to be conducted in order to determine if there exist two different populations in these two setting as previously reported for *S. epidermidis* in Europe (Cherifi, 2013; Hellmark, 2013).

This study has limitations. The multiplex PCR employed is easy to use, however, the detection of only a single locus of each SCCmec type gives to this assay less discriminatory power when compared with the current recommended methodology (www.sccmec.org). Besides that, isolates were not stratified according to hospital ward, period of time or source of culture, and it is not possible to evaluate the clinical relevance of analysed strains. Novel typing studies with more recent isolates from the same institution and/or from the local community could be very useful and elucidate several epidemiological aspects of CoNS from south Brazil.

Conclusions

This study confirms that CoNS isolates have high genetic diversity despite being isolated from the same institution. We did not find an epidemic clone using well established molecular tools. A rapid shift in the prevalence of SCCmec types from our study and to a study from the same hospital 6-8 years later indicate a high degree of horizontal gene transfers which confirms that CoNS may be a permanent reservoir of genetic material that can be exchanged within and between Staphylococcal species.

Acknowledgements

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

References

- Almeida LM, Lincopan N, Araújo MRE, Mamizuka EM (2012) Dissemination of the linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* clone ST2 exhibiting the G2576T mutation in the 23S rRNA gene in a tertiary-care hospital, Brazil. *J Antimicrob Chemother* 67: 768–84.
- Antunes ALS, Secchi C, Reiter KC, Perez LRR, Freitas ALP, d’Azevedo PA (2007) Evaluation of oxacillin and cefoxitin disks for detection of resistance in coagulase negative staphylococci. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 (6): 719-23.

Bouchami O, Achour W, Mekni MA, Rolo J, Hassen AB (2011) Antibiotic resistance and molecular characterization of clinical isolates of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci isolated from bacteremic patients in oncohematology. *Folia Microbiol* 56: 122-30.

Caierão J, Superti S, Dias CAG, d'Azevedo PA (2006) Automated systems in the identification and determination of methicillin resistance among coagulase negative staphylococci. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101(3): 277-9.

Cherifi S, Byl B, Deplano A, Nhonhoff C, Denis O, Hallind M (2013) Comparative Epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* Isolates from Patients with Catheter-Related Bacteremia and from Healthy Volunteers. *J Clin Microbiol* 51 (5): 1541–7.

Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH (1985) Adherence of Coagulase-Negative Staphylococci to Plastic Tissue Culture Plates: a Quantitative Model for the Adherence of Staphylococci to Medical Devices *J Clin Microbiol* 22 (6): 996-1006.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing, 17th informational supplement. Wayne, PA: CLSI, 2007.

d'Azevedo PA, Siquiera I, Gugel J, Antunes ALS, Secchi C, Pasternak J, Martino MDV (2009) Evaluation of the Automated System Vitek2 for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Brazilian Gram-Positive Cocci Strains. *Braz J Infect Dis* 13(2): 107-10.

Fluit AC, Carpaïj N, Majoor EA, Bonten MJ, Willems RJ (2009) Shared reservoir of *ccrB* gene sequences between coagulase-negative staphylococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. [*J Antimicrob Chemother*](#) 68 (8): 1707-13.

Fredheim EGA, Klingenberg C, Rohde H, Frankenberger S, Gaustad P, Flægstad T, Sollid JE (2009) Biofilm Formation by *Staphylococcus haemolyticus*. *J Clin Microbiol* 47 (4): 1172–80.

Hanssen A, Sollid JUE (2007) Multiple Staphylococcal Cassette Chromosomes and Allelic Variants of Cassette Chromosome Recombinases in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci from Norway. *Antimicrob Agents Chemother* 51 (5): 1671–7.

Hanssen A, Kjeldsen G, Sollid JUE (2004) Local Variants of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* in Sporadic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci: Evidence of Horizontal Gene Transfer? *Antimicrob Agents Chemoter* 48 (1): 285–96.

Hellmark B, Söderquist B, Unemo M, Nilsson-Augustinsson A (2013) Comparison of *Staphylococcus epidermidis* isolated from prosthetic joint infections and commensal isolates in regard to antibiotic susceptibility, agr type, biofilm production, and epidemiology. *Int J Med Microbiol* 303: 32–9.

Ibrahim S, Salmenlinna S, Lyytikäinen O, Vaara M, Vuopio-Varkila J. (2008) Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strains from bacteraemic patients. *Clin Microbiol Infect* 14 (11):1020-7.

International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC) (2009) Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*): Guidelines for Reporting Novel SCC*mec* Elements *Antimicrob Agents Chemoter* 53 (12): 4961–7.

Iorio NLP, Caboclo RF, Azevedo MB, Barcellos AG, Neves FPG, Domingues RMCP, dos Santos KRN (2012) Characteristics related to antimicrobial resistance and biofilm formation of widespread methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* ST2 and ST23 lineages in Rio de Janeiro hospitals, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 72: 32-40.

Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K (2003) Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist Updat* 6: 41-52.

Klingenberg C, Rønnestad A, Anderson AS, Abrahamsen TG, Zorman J, Villaruz A, Flægstad T, Otto M, Sollid JE (2007) Persistent strains of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: virulence factors and invasiveness. *Clin Microbiol Infect* 13: 1100–11.

Li M, Wang X, Gao Q, Lu Y (2009) Molecular characterization of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from a teaching hospital in Shanghai, China. *J Med Microbiol* 58: 456–61.

Martins A, Riboli DFM, Camargo CH, Pereira VC, Sampaio RA, Cunha MLRS (2013) Antimicrobial resistance and persistence of *Staphylococcus epidermidis* clones in a Brazilian university hospital. [*Diagn Microbiol Infect Dis* 77 \(2\): 164-8.](#)

Mendes RE, Deshpande LM, Costello AJ, Farrell DJ (2012) Molecular Epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* Clinical Isolates from U.S. Hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 56 (9): 4656–61.

Mertens A and Ghebremedhin B (2013) Genetic determinants and biofilm formation of clinical *Staphylococcus epidermidis* isolates from blood cultures and indwelling devices. [*Eur J Microbiol Immunol* 3 \(2\): 111-9.](#)

Miragaia M, Carriço JA, Thomas JC, Couto I, Enright MC, Lencastre H (2008) Comparison of Molecular Typing Methods for Characterization of *Staphylococcus epidermidis*: Proposal for Clone Definition. *J Clin Microbiol* 46 (1): 118–29.

Miragaia M, Thomas JC, Couto I, Enright MC, Lencastre H (2007) Inferring a Population Structure for *Staphylococcus epidermidis* from Multilocus Sequence Typing Data. *J Bacteriol* 189 (6): 2540–52.

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

Miragaia M, Couto I, Pereira SFF, Kristinsson KG, Westh H, Jarlöv JO, Carriço J, Almeida J, Santos-Sanches I, Lencastre H (2002) Molecular Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Clones: Evidence of Geographic Dissemination *J Clin Microbiol* 40 (2): 430–8.

S. epidermidis MLST database: <http://sepidermidis.mlst.net>

Otto M (2008) Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 322: 207-28.

Oliveira CF, Paim TGS, Reiter KC, Rieger A, d’Azevedo PA (2014) Evaluation of four different DNA extraction methods in coagulase-negative staphylococci clinical isolates. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 56 (1): 29-33.

Pereira CAP, Marra AR, Camargo LFA, Pignatari ACC, Sukiennik T, et al. (2013) Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Pediatric Patients: Microbiology, Epidemiology, and Clinical Features. *PLoS ONE* 8(7): e68144.

Reiter KC, Paim TGS, Oliveira CF, d'Azevedo PA (2011) High biofilm production by invasive multiresistant staphylococci. *Act Pathol Microbiol Immunol Scand* 119: 776-81.

Rogers KL, Fey PD and Rupp ME (2009) Coagulase-negative staphylococcal infections. *Infect Dis Clin North Am* 23: 73–98.

Rolo J, Lencastre H, Miragaia M (2012) Strategies of adaptation of *Staphylococcus epidermidis* to hospital and community: amplification and diversification of SCCmec. *J Antimicrob Chemother* 67: 1333–41.

SCCmec website: www.sccmec.org.

Shore AC, Coleman DC (2013) Staphylococcal cassette chromosome mec: Recent advances and new insights. *Int J Med Microbiol* 303 (6-7): 350-9.

Svensson K, Hellmark B, Söderquist B (2011) Characterization of SCCmec elements in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolated from blood cultures from neonates during three decades. *APMIS* 119: 885-93.

Takeuchi F, Watanabe S, Baba T, Yuzawa H, Ito T, Morimoto Y, Kuroda M, Cui L, Takahashi M, Ankai A, Baba S, Fukui S, Lee JC e Hiramatsu K (2005) Whole-genome sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* uncovers the extreme plasticity of its genome and evolution of human-colonizing staphylococcal species. *J Bacteriol* 187: 7292-308.

Thomas JC, Vargas MR, Miragaia M, Peacock SJ, Archer GL, Enright MC (2007) Improved Multilocus Sequence Typing Scheme for *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Microbiol* 45 (2) 616-9.

Turlej A, Hryniewicz W, Empel J (2011) Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec) Classification and Typing Methods: an Overview. *Pol J Microbiol* 60 (2): 95-103.

Uckay I, Pittet D, Vaudaux P, Sax H, Lew D, Waldvogel F (2009) Foreign body infections due to *Staphylococcus epidermidis*. *Ann Med* 41: 109–19.

Vuong C, Otto M (2002) *Staphylococcus epidermidis* Infections. *Microbes Infect* 4 (4): 481-9.

Widerström M, Monsen T, Karlsson K, Edebro H, Johansson A, Wiström J (2009) Clonality among multidrug-resistant hospital-associated *Staphylococcus epidermidis* in northern Europe. *Scand J Infect Dis* 41: 642-9.

Zhang K, McClure J, Elsayed S, Louie T, Conly JM (2005) Novel Multiplex PCR Assay for Characterization and Concomitant Subtyping of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Types I to V in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 43 (10): 5026–33.

Ziebuhr W, Hennig S, Eckart M, Kranzler H, Batzilla C, Kozitskaya S (2006) Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. *Int J Antimicrob Agents* 28 Suppl 1: S14–20.

4. Considerações finais

A grande utilização de técnicas de biologia molecular no estudo de microrganismos tem aumentado a procura por métodos de extração de DNA eficientes e de custo baixo. Entretanto, a escolha do método ideal não é tarefa fácil, pois são inúmeros os fatores que podem influenciar esta decisão. Em se tratando de SCoN existe ainda uma barreira adicional: a resistência à lise de sua parede celular. A partir dos métodos testados neste estudo podemos concluir que todos foram eficazes na extração do DNA de SCoN. Embora existam diferenças bastante significativas em termos de qualidade, quantidade e custo, os quatro métodos testados forneceram material capaz de ser amplificado em uma PCR convencional. Entretanto, cabe-se ressaltar que não foram realizadas técnicas moleculares adicionais e nada pode ser afirmado com relação ao rendimento do DNA fornecido por estes métodos em outras técnicas de biologia molecular.

Os SCoN possuem altos índices de resistência aos antimicrobianos e um dos principais fatores responsáveis por isso é a presença do cassete *SCCmec*. Com relação aos tipos de *SCCmec*, comparando os resultados obtidos neste estudo com o estudo de Reiter *et al.* (que utilizou a mesma metodologia em SCoN do mesmo hospital), observamos que a prevalência dos principais tipos de *SCCmec* está mudando significativamente no hospital estudado. Esta observação pode ser resultado de alguns fatores como, por exemplo, um reflexo do perfil de antimicrobianos e desinfetantes utilizados no período na instituição. Mas, além disso, não podemos esquecer que os SCoN são microrganismos ubíquos e bastante “flexíveis” geneticamente. Sua constante presença como parte da microbiota humana favorece a transferência de material genético entre as diversas espécies presentes em nosso organismo. Neste sentido, a descoberta de novos tipos de *SCCmec* diretamente relacionados à resistência aos antimicrobianos é preocupante e deve continuar a ser monitorada constantemente.

Entre as espécies de SCoN, *S. epidermidis* é considerado o principal responsável por infecções em humanos. A grande diversidade genética revelada nos isolados deste estudo já havia sido relatada anteriormente, mas não com tanta intensidade. Este fato pode explicar, em parte, a baixa correlação evidenciada entre

os clusters encontrados pelos métodos de tipagem molecular e os resultados de resistência aos antimicrobianos e formação de biofilme; esta correlação tem sido mais alta nos estudos que encontram maior clonalidade entre os isolados de *S. epidermidis*. Além disso, esta alta diversidade também aumenta a curiosidade a respeito das características dos isolados comunitários em nossa região, pois nos permite imaginar que talvez não sejam tão diferentes dos isolados nosocomiais.

Por fim, a comparação dos STs dos isolados de *S. epidermidis* deste estudo com outros estudos brasileiros e de outros países do mundo revelou um perfil interessante. Por um lado, verificou-se semelhança em alguns dos tipos mais frequentes e disseminados mundialmente como, por exemplo, ST2. Entretanto, ao mesmo tempo ficou evidenciado um considerável número de novos alelos e novos STs, contribuindo significativamente para a grande diversidade dos isolados encontrados no hospital estudado.

5 Anexos

5.1 Demais produções científicas

5.1.1 Artigos científicos como coautor

Significantly higher level of biofilm production of invasive multi-drug resistant staphylococci

Reiter KC, Paim TGS, Oliveira CF, d'Azevedo PA.

[APMIS](#). 2011 Nov;119(11):776-81.

Enhancement of anti-staphylococcal activities of six antimicrobials against sasG-negative methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: an *in vitro* biofilm model

Reiter KC, Villa B, Paim TGS, Sambrano GE, Oliveira CF, d'Azevedo PA.

[Diagn Microbiol Infect Dis](#). 2012 Oct;74(2):101-5.

Bacterial skin colonization and infections in patients with atopic dermatitis.

[Petry V](#), [Bessa GR](#), [Poziomczyck CS](#), [Oliveira CF](#), [Weber MB](#), [Bonamigo RR](#), [d'Azevedo PA](#).

[An Bras Dermatol](#). 2012 Sep-Oct;87(5):729-34.

Rifampicin fails to eradicate mature biofilm formed by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*

Reiter KC, Sambrano GE, Villa B, Paim TGS, Oliveira CF, d'Azevedo PA.

[Rev Soc Bras Med Trop](#). 2012 Jul-Aug;45(4):471-4.

Inhibition of biofilm maturation by linezolid in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates: comparison with other drugs.

Reiter KC, Villa B, Paim TG, de Oliveira CF, d'Azevedo PA.

J Med Microbiol. 2013 Mar;62(Pt 3):394-9.

5.1.2 Resumos publicados em eventos

SCCmec Profile Changes of Coagulase Negative Staphylococci: A Ten Year Period In A Hospital From Porto Alegre, Brazil

Oliveira CF, Mott MP, Batista BG, Reiter KC, Rieger A, d'Azevedo PA

Encontro da Sociedade Americana de Microbiologia (ASM), 18-21 maio 2013, Denver, CO.

Detecção da Resistência Induzível à Clindamicina em Isolados Catarinenses de *Staphylococcus aureus* Resistentes à metilina (MRSA)

Silveira ACO, Batista BG, Oliveira CF, d'Azevedo PA

Congresso Brasileiro Análises Clínicas, 16-19 junho 2013, Costão do Santinho, SC.

Linezolid inhibition of mature biofilm in methicillin-resistant *S. epidermidis* clinical isolates: comparison with other drugs

Reiter KC, Villa B, Paim TGS, Oliveira CF, d'Azevedo PA

Encontro da Sociedade Americana de Microbiologia (ASM), 16-19 junho 2012, São Francisco, CA.

Detecção de Resistência Induzível à Clindamicina em Amostras de *Staphylococcus aureus* de Porto Alegre

Mallmann ES, Grandi M, Batista BG, Mott MP, Pilger K, Oliveira CF, Dias CA

Congresso Gaúcho de Infectologia, 26-27 outubro 2012, Porto Alegre, RS.

Caracterização de Biofilme em Amostras de Staphylococcus epidermidis Isoladas na Cidade de Porto Alegre

Paim, TGS, Santos O, Oliveira CF, Mello, AL, Slockzinski AA, d'Azevedo PA

Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2-6 outubro 2011, Foz do Iguaçu, PR.

Avaliação de três diferentes metodologias na extração de DNA de isolados clínicos de Staphylococcus coagulase-negativos

Oliveira CF, Paim TGS, Reiter KC, Silveira ACO, Rieger A, d'Azevedo PA

Simpósio Internacional Microbiologia Clínica, 29 set-02 out 2010, Florianópolis-SC.

5.1.3 Aspectos éticos

O projeto do presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) conforme documento abaixo.

Parecer Consubstanciado de Projeto de P

Título do Projeto: Caracterização molecular de Staphylococcus coagula		
Pesquisador Responsável Pedro D'Azevedo		Parecer 1063/
Data da Versão 11/03/2010	Cadastro 594/10	Data do P
Grupo e Área Temática III - Projeto fora das áreas temáticas esp		

Objetivos do Projeto

Caracterização molecular de Sthaphylococcus coagulas e negativos já in fenotipicamente e analisados em relação ao perfil de resistência, prover Hopitalar.

Sumário do Projeto

Não apresenta

Itens Metodológicos e Éticos	Situação
Título	Adequado
Autores	Adequados
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não
Aprovação no país de origem	Anexo ao p
Local de Realização	Outro (citar
Outras instituições envolvidas	Sim
Condições para realização	Adequadas

Comentários sobre os itens de Identificação

Introdução	Adequada
------------	----------

Comentários sobre a Introdução

Objetivos	Adequados
-----------	-----------

Comentários sobre os Objetivos

Pacientes e Métodos	
Delineamento	Comentário
Tamanho de amostra	Total 0 Lo
Cálculo do tamanho da amostra	Não inform
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Comentário
Crterios de inclusão e exclusão	Comentário
Relação risco-benefício	Não se apli
Uso de placebo	Não utiliza

Comentários sobre as Referências Bibliográficas***Recomendação*****Aprovar****Comentários Gerais sobre o Projeto****No Objetivo não precisa aparecer o nome da Instituição Santa Casa - Hospitalar.****O projeto não apresenta sumário (resumo).**

5.1.4 Normas da revista que será submetido o artigo 2

Instructions to authors



General Information

The International Journal of Medical Microbiology publishes reviews, mini-reviews, original articles, and case reports covering the following areas:

1. Pathogenicity mechanisms of bacteria, fungi and protozoa
2. Microbial gene regulation
3. Ecology and taxonomy of microbes
4. Genome structure and gene transfer of pathogens
5. Genomics/proteomics/transcriptomics
6. Role of host factors in infection
7. Cellular microbiology
8. New antimicrobials and resistance mechanisms
9. Clinical microbiology and new diagnostic tools
10. Molecular epidemiology

Submissions

All manuscripts must be written in clear and grammatically correct English. The text of the manuscript must be provided in Microsoft Word format. Submit illustration files separately from text files. Files for full color images must be in a CMYK color space. All illustration files should be in TIFF or EPS formats. Journal quality reproduction will require greyscale and color files at resolutions yielding approximately 300 dpi. Bitmapped line art should be submitted at resolutions yielding 600–1200 dpi. For detailed information on artwork instructions, please refer to <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Any comments for the editor, e.g. a statement outlining the basic findings of the paper and their significance, requests to exclude some individuals from the review process, or suggestions for up to four competent reviewers (including e-mail address) can be submitted via the respective "Comments to the Editor" text field during online submission. Manuscripts should be submitted online at:

<http://ees.elsevier.com/ijmm/>

There are no submission fees or page charges.

Manuscripts are accepted for review on the understanding that the same work has not been published, that it is not under consideration for publication elsewhere, and that its submission for publication has been approved by all of the authors and by the appropriate authority at the institution where the work was carried out. Authors must verify the wording of any cited personal communication with the persons who supplied the information and obtain approval for the use of their names in connection with the quoted information or for the citation of unpublished work.

Organisation of manuscripts

1. Length: Illustrations and tables should be kept to the minimum necessary for understanding of the article.

Mini-reviews should be no longer than ten typewritten pages (DIN A4) excluding figures and references.

2. Form: The first page should contain the title of the article, authors' first names (one first name of each author in full spelling) and surnames, affiliation, name and address (including phone, fax and e-mail) of corresponding author.

The manuscript (excluding mini-reviews!) should be organized as follows: Abstract, Keywords (5–6), Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Legends to illustrations.

The mini-reviews should be organized as follows: Summary, Key words (5–6), Introduction, Main chapters (headlines for every chapter), Conclusions, Acknowledgements, References, Legends to illustrations. Special note for short communications: Length: 6 pages including references, in addition one table and one figure (alternatively two figures or two tables are allowed).

Do not capitalize title, authors' names or any headings. Headings and subheadings should be printed in bold. Italics should be used only for names of species and genes. No italics for other Latin expressions (e.g. in situ, in vivo, etc.).

3. Abbreviations must be kept to the minimum and should be explained in full spelling in parentheses when used for the first time.

4. Footnotes must be avoided.

5. Illustrations: The maximum type area is 18 cm width and 24 cm height. Figures should be designed to fit either one-column size (8.8 cm) or two-columns size (18 cm) in width. Figures must be ready for reproduction with clear lettering in suitable size. Color figures can be printed only if part of the costs are covered by the author (350 EUR for the first color figure, and 250 EUR for every following color figure).

In exceptional cases color figure fees may be waived at the editor's discretion.

6. New nucleotide or amino acid sequences to be published must be deposited at a standard data base (e.g. GenBank or others) and the accession number must be mentioned in the text.

7. References should be quoted in the text by author's name and by year. If there is more than one article by the same author(s) per year use a and b after the year of publication.

For two authors, both should be named (Smith and Miller, 1999); for more than two authors, use first author's name followed by et al.

The list of references should be given in alphabetical order. References to unpublished data, manuscripts in preparation, manuscripts submitted or personal communications should be made parenthetically in the text and not included in the list of references. Examples for the style to be used for the list of references are given below.

Zaharik, M.L., Gruenheid, S., Perrin, A.J., Finlay, B.B., 2002. Delivery of dangerous goods: Type III secretion in enteric pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* 291, 593–603.

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Copyright

Once a paper is accepted, authors will be asked to transfer copyright (for more information on copyright, see <http://www.elsevier.com/authorsrights>). A form facilitating transfer of copyright will be provided after acceptance. If material from other copyrighted works is included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Proofs

Proofs will be sent to the author. To avoid delay in publication, proofs should be returned promptly. No alterations should be made other than those needed to correct typographical errors. Costs for extensive additional alterations will be charged to the authors.

Reprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

Abstracted/Indexed in

Biological Abstracts; BIOSIS database; CSA-Cambridge Scientific Abstracts; Current Awareness in Biological Sciences (CABS); Chemical Abstracts Service (CAS); Current Contents-Life Science; Elsevier BIOBASE/Helminthological Abstracts; EMBASE / Excerpta Medica; Index to Dental Literature; Medical Documentation Service; Medline; NISC - National Information Services Corporation; Poultry Abstracts; Research Alert; Review of Applied Entomology; Science Citation Index; SciSearch; SCOPUS®; ZEBASE