

Eliezer Menezes Pereira

**Aspectos relacionados a identificação, virulência,
susceptibilidade antimicrobiana e clonalidade de amostras
clínicas de *Staphylococcus lugdunensis* isoladas de hospitais no
Rio de Janeiro**



Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia)

Orientadores: Kátia Regina Netto dos Santos
Ana Luiza de Mattos Guaraldi



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF PAULO DE GÓES
RIO DE JANEIRO
MARÇO DE 2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

PEREIRA, Eliezer Menezes

Aspectos relacionados a identificação, virulência, susceptibilidade antimicrobiana e clonalidade de amostras clínicas de *Staphylococcus lugdunensis* isoladas de hospitais no Rio de Janeiro/ Eliezer Menezes Pereira – Rio de Janeiro, 2010

Vol I, xii,101

Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)

Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, 2010.

Orientadores: Kátia Regina Netto dos Santos e Ana Luiza de Mattos Guaraldi

Referências bibliográficas: f. 87

1. *Staphylococcus lugdunensis* 2. virulência 3. clonalidade 4. susceptibilidade antimicrobiana

I. Santos, Kátia. II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Doutorado em Ciências Biológicas. III. Aspectos relacionados a identificação, virulência, susceptibilidade antimicrobiana e clonalidade de amostras clínicas de *Staphylococcus lugdunensis* isoladas de hospitais no Rio de Janeiro

Eliezer Menezes Pereira

**Aspectos relacionados a identificação, virulência,
susceptibilidade antimicrobiana e clonalidade de amostras
clínicas de *Staphylococcus lugdunensis* isoladas de hospitais no
Rio de Janeiro**

Rio de Janeiro, 18 de Março de 2010

Kátia Regina Netto dos Santos, PhD, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Sérgio Eduardo Longo Fracallanza, PhD, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Antonio Carlos Campos Pignatari, PhD, Universidade Federal de São Paulo

Raphael Hirata Junior, PhD, Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Walter Martin Roland Oelemann, PhD, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro
Março de 2010

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Infecção Hospitalar, Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação das Professoras Kátia Regina Netto dos Santos e Ana Luiza de Mattos Guaraldi

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por me dar força, discernimento e perseverança para cumprir os objetivos que tracei em minha vida e a todos da minha família - minha mãe Inês, minha avó Marlene, meu irmão Bruno, minha prima Liz, meu pai Eliezer, a minha esposa Priscilla e a minha sogra-mãe, Célia por serem meu pilar de sustentação.

A Universidade do Brasil, em todas as suas instâncias, na pessoa de seu Magnífico Reitor, Prof. Aloísio Teixeira, por ter me formado por esses 10 anos não só farmacêutico, pesquisador e docente, mas acima de tudo, um ser humano que trabalha em prol da sociedade.

Ao Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Goés, na pessoa de sua Diretora, Prof. Dra. Agnes Marie de Sá Figueiredo, pelo acolhimento em meu período de Iniciação Científica, Mestrado e Doutorado.

Ao Departamento de Microbiologia Médica, na pessoa de seu Chefe Prof. Dr. Sérgio Eduardo Longo Fracallanza.

A Prof. Dra. Ana Paula Vieira Colombo, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação do IMPPG, e a todo o seu corpo docente pelos ensinamentos adquiridos durante estes anos.

A Prof. Dra. Kátia Regina Netto dos Santos, por ser orientadora, amiga, mãe e acima de tudo, um exemplo de dedicação, ética e amor ao trabalho. Seus ensinamentos não têm preço e com certeza são as coisas mais valiosas que adquiri. Seu exemplo de endurância guiará meus passos daqui em diante, agora como seu colega de trabalho. Obrigado por tudo, eternamente.

A Prof. Dra. Ana Luiza de Mattos Guaraldi, uma pessoa ímpar, que sempre cativou a todos com seu entusiasmo e bom humor. Muito obrigado pela orientação e paciência a qual a senhora dispôs com um carinho quase que maternal durante todo este processo.

A Prof. Dra. Carla Holandino por todo apoio durante o trabalho com cultura de células.

Ao Prof. Dr. Walter Martin Roland Oelemann, sempre presente e disponível para esclarecer dúvidas e revisar nossos trabalhos. Meus sinceros agradecimentos também por todo apoio pessoal em diversos momentos em minha passagem pelo IMPPG.

A Prof. Dra. Marcia Giambiagi-de-Marval, por ter me apresentado ao Laboratório de Infecção Hospitalar e a Prof. Dra. Marinella Laport, por todo o carinho e atenção durante esta caminhada.

A todos os atuais alunos do Laboratório de Infecção Hospitalar: Ricardo, Gustavo, Pricilla, Dennis, Natalia, Aline, Claudio, Cristiane, Fernanda, Carol e André, pela bela convivência.

Aos alunos dos laboratórios de Microbiologia Molecular (em especial Naira, Elaine, Viviane e Lorayne), Biologia de Anaeróbios (em especial Karla, Rafael, Laís e Lívia), Microbiologia – UERJ (em especial Cíntia e Paula) e Multidisciplinar em Ciências Farmacêuticas por toda ajuda e disposição de equipamentos.

A querida equipe de técnicos do nosso departamento (Helena, Joaquim, Orlando, Antonio, Marlei, Marcos, Marlei, Fernando, Raquel, Cícera, Semíramis, Filó e Sr. Luiz) por terem atendido com paciência e boa vontade, pelo simples prazer de ajudar, a todos os meus pedidos de socorro e urgências.

Ao café da Helena, inigualável, por me manter acordado durante as horas de cansaço extremo.

Ao Instituto Federal do Rio de Janeiro, na pessoa de seu Magnífico Reitor, Prof. Luiz Edmundo Vargas de Aguiar e à Direção do Campus Maracanã, na pessoa de seu Ilmo. Diretor, Sr. Jefferson Amorin, instituição de ensino na qual sou professor, pela disponibilidade concedida para realização deste trabalho.

A equipe de alimentos do IFRJ-Campus Maracanã, em especial aos profs. José Ricardo Hassel e Denise Bello por todo incentivo.

A querida companheira de laboratório, professora e amiga Janaína Nascimento, por todo o companheirismo e por me “safar” nas horas que eu não podia estar presente.

A todos os estagiários do Laboratório de Microbiologia do IFRJ-Maracanã pela ajuda e pela responsabilidade de tocar os trabalhos durante minha ausência.

As minhas estagiárias e “filhas” Aninha, Paulinha, Bruna e Fleming por todo o apoio, carinho e dedicação.

Aos queridos amigos de 40 anos de amizade, César, Thiago e Felipe, pelo companheirismo de sempre.

Ao meu irmão adotado, Tarcízio José e a minha querida amiga, Barbara Eliza, grandes incentivadores da minha vida acadêmica.

Aos queridos amigos do HNMD André Olendzki, Melissa, Setúbal, Beth e Maria pelo auxílio com as amostras do meu trabalho.

Aos professores Aluísio Santa Helena (ABEU) e Antônio Carlos Carreira (UFF) por todo o incentivo.

Ao CNPq, pela bolsa a mim concedida durante os dois primeiros anos do desenvolvimento deste trabalho.

A FAPERJ, FUJB, CAPES, Pronex e FINEP pelo fomento fornecido as pesquisas desenvolvidas no Laboratório de Infecção Hospitalar.

*Não se assinala o caminho apontando-o com
o dedo, mas sim caminhando à frente.*

(Provérbio Macua - Moçambique)

Dedico este trabalho:

A minha amada esposa e perfeita parte de minha costela, Priscilla, por simplesmente existir em minha vida;

Aos amigos do LIH Ricardo Schuenck e Gustavo Zoletti, por todo companheirismo e "corporativismo laboratorial". Esta tese não existiria sem a ajuda de vocês;

Ao meu grande amigo e irmão Cesar e a minha estagiária Aninha Alvarenga, por toda a ajuda no final deste trabalho. A colaboração de vocês foi essencial!

RESUMO

Aspectos relacionados a identificação, virulência, susceptibilidade antimicrobiana e clonalidade de amostras clínicas de *Staphylococcus lugdunensis* isoladas de hospitais no Rio de Janeiro

Eliezer Menezes Pereira

Orientadores: Kátia Regina Netto dos Santos e Ana Luiza de Mattos Guaraldi

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Paulo de Goés da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Doutor em Ciências (Microbiologia)

Staphylococcus lugdunensis é um *Staphylococcus* coagulase-negativo (SCN) raramente isolado de infecções humanas, porém apresenta potencial agressor similar ao de *S. aureus*, pela presença de fatores de virulência em comum. Este estudo avaliou amostras clínicas de *S. lugdunensis* isoladas de diferentes hospitais do Rio de Janeiro quanto a aspectos relacionados a identificação, virulência, susceptibilidade antimicrobiana e clonalidade. Uma amostra tipo (DSMZ 4804) e 23 amostras clínicas foram identificadas por testes bioquímicos e pela técnica de PCR para o gene de virulência espécie-específico *fbl*, que codifica a adesina de ligação a fibrinogênio Fbl. A presença de outros genes de virulência, como: *slush*, que codifica a hemolisina SLUSH e *ica*, que codifica para componentes do biofilme também foi investigada. Os produtos desses genes foram detectados por *Western-blotting* (Fbl), teste de sinergismo (SLUSH) e de aderência em placas de microtitulação (formação de biofilme). Adicionalmente, foi avaliada a susceptibilidade antimicrobiana pelo teste de difusão de disco e pela detecção dos genes *mecA* e *SCCmec*. A composição do biofilme foi avaliada utilizando-se metaperiodato de sódio e enzimas proteolíticas e a aderência e invasão *in vitro* foram analisadas em monocamadas de células epiteliais A549. A técnica de PFGE foi utilizada para avaliar a clonalidade das amostras. Os genes de virulência investigados estavam presentes em todas as amostras, assim como seus produtos, exceto a amostra tipo que não produziu a hemolisina SLUSH, apesar de apresentar o gene correspondente. A formação de biofilme foi detectada em 14 (60,9%) amostras, cuja composição foi demonstrada como sendo protéica. Uma amostra apresentou resistência a metilicina, no entanto, 18 (78,3%) foram sensíveis a todas as drogas testadas. Nós descrevemos um caso de bacteriemia hospitalar causado por uma amostra de *S. lugdunensis* portadora dos genes *mecA* e *SCCmec V*, identificada erroneamente como MRSA (*S. aureus* resistente a metilicina) no hospital de origem. Quatro genótipos foram encontrados entre as 23 amostras clínicas, mas 12 (52,2%) pertenciam ao mesmo genótipo. Dez (83,3%) destas eram produtoras de biofilme. Todas as amostras fortes produtoras de biofilme, incluindo três com morfologia colonial rugosa, foram incluídas no mesmo genótipo prevalente. Foi observada capacidade de adesão e invasão celular similar a de *S. aureus* apenas para amostras de *S. lugdunensis* com morfologia colonial rugosa ($p=1,000$). A amostra rugosa foi também capaz de produzir um tipo de biosurfactante. O grande potencial de virulência observado, tanto em relação aos produtos gênicos detectados quanto à capacidade de adesão/invasão celular poderia justificar a notável habilidade de *S. lugdunensis* em causar infecções agressivas, como *S. aureus*.

Palavras-chave: *Staphylococcus lugdunensis*, identificação, fatores de virulência, susceptibilidade antimicrobiana, PFGE, composição de biofilme, células epiteliais pulmonares

Rio de Janeiro
Março de 2010

ABSTRACT

Aspects related with identification, virulence, antimicrobial susceptibility and clonality of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates from Rio de Janeiro hospitals

Eliezer Menezes Pereira

Orientadores: Kátia Regina Netto dos Santos e Ana Luiza de Mattos Guaraldi

Abstract da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Paulo de Goés da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Doutor em Ciências (Microbiologia)

Staphylococcus lugdunensis is a coagulase-negative staphylococcus rarely isolated from human infections. However, its aggressive potential is similar to that of *S. aureus* due to the presence of several common virulence factors. This study evaluated aspects related to identification, virulence, antimicrobial susceptibility and associated clonality of *S. lugdunensis* clinical isolates from Rio de Janeiro hospitals. One *S. lugdunensis* type strain (DSMZ 4804) and 23 clinical isolates from Rio de Janeiro hospitals were identified by biochemical tests and by species-specific PCR for the *fbl* gene, which encodes the fibrinogen-binding adhesin Fbl. Presence of other virulence genes as *slush*, which encodes SLUSH hemolysin and *ica*, which encodes biofilm-producing components was also investigated. Corresponding gene products were detected by *Western-blotting* (Fbl adhesin), synergic hemolysis (SLUSH hemolysin) or by adherence to polystyrene microtiter plates (biofilm formation). Antimicrobial susceptibility was evaluated by disk-diffusion method and by PCR detection of the *mecA* gene and *SCCmec* typing. Biofilm composition was determined by using sodium metaperiodate and proteolytic enzymes. *In vitro* adherence to and invasion of eukaryotic cells were evaluated in human epithelial cells A549, while clonality was determined by PFGE. All isolates possessed the investigated genes and expressed their products, except the type strain, which did not produce the SLUSH hemolysin although it presented the *slush* gene. Fourteen (60.9%) isolates produced biofilm containing protein components. One isolate was methicillin-resistant, but 18 (78.3%) isolates were sensitive to all drugs tested. We describe a hospital-acquired bacteremia due to *S. lugdunensis* carrying *mecA* and *SCCmec V* that was misidentified as methicillin-resistant *S. aureus* at the hospital of origin. A total of four PFGE genotypes was detected. Twelve (52.2%) isolates belonged to same genotype, and 10 (83.3%) of these were biofilm-producers. All biofilm-producing isolates, including three with rough colony morphology were part of the prevalent PFGE pattern. Cell adherence and invasion ability similar to *S. aureus* was observed only for *S. lugdunensis* isolates that showed rough colony morphology ($p=1,000$). These isolates were also able to produce a kind of biosurfactant. We conclude that the great virulence potential of *S. lugdunensis* shown by the expression of virulence gene products and by cell adhesion/invasion capacity could explain the incredible ability of this pathogen to cause aggressive infections like *S. aureus*.

Keywords: *Staphylococcus lugdunensis*, identification, virulence factors, antimicrobial susceptibility, PFGE, biofilm composition, epithelial lung cells

Rio de Janeiro
Março de 2010

INTRODUÇÃO.....	1
I. Infecção relacionada à assistência a saúde – Aspectos gerais	1
II. <i>Staphylococcus</i> spp.	2
III. <i>Staphylococcus lugdunensis</i>	4
a) Aspectos gerais	4
b) Fatores de Virulência	7
Proteína de ligação a fibrinogênio (Fbl)	7
Hemolisina sinérgica (SLUSH).....	9
Produção de biofilme	10
Outros fatores de virulência.....	11
Ensaio de patogênese in vitro utilizando células eucarióticas....	12
c) Aspectos fenotípicos e identificação	12
d) Susceptibilidade a antimicrobianos	14
e) Epidemiologia molecular	17
OBJETIVO	19
RESULTADOS	20
Artigo 1:	21
Artigo 2:	26
Artigo 3:	48
Artigo 4:	57
DISCUSSÃO	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
ANEXO 1	Erro! Indicador não definido.
ANEXO 2	Erro! Indicador não definido.
ANEXO 3	Erro! Indicador não definido.
ANEXO 4	Erro! Indicador não definido.
ANEXO 5	Erro! Indicador não definido.
ANEXO 6	Erro! Indicador não definido.
ANEXO 7	Erro! Indicador não definido.

LISTA DE ABREVIATURAS

Arg (R) – Arginina

Asp (D) – Aspartato

bap – Gene que codifica Bap

Bap – Proteína associada a biofilme

CA – Adquirido na comunidade

Ccr – Gene que codifica recombinase

CDC – “Center for Diseases Control”

ClfA – Fator *clumping A*

clfA – Gene que codifica ClfA

ClfB – Fator *clumping B*

CLSI – “Comitee for Laboratory Standards Institute”

CMI – Concentração mínima inibitória

D – Aspartato

DNA – Ácido desoxirribonucléico

ELISA – “Enzyme-linked immunosorbent assay”

Fbe – Gene que codifica Fbe

Fbe – Proteína de ligação a fibrinogênio de *S. epidemidis*

fbl – Gene que codifica Fbl

Fbl – Proteína de ligação a fibrinogênio de *S. lugdunensis*

G - Glicina

Gly (G) – Glicina

icaADBC – Operon que codifica componentes para formação de biofilme

IRAS – Infecção associada à assistência a saúde

K - Lisina

Kb – Kilobases

KDa – KiloDáton

L – Leucina

µg – Micrograma (s)

µL – Microlitro (s)

mecA – Gene que codifica PBP2A (resistência a metilina)

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente a metilina

MSCRAMMS – Componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas da matriz extracelular

MSSA - *Staphylococcus aureus* sensível a metilina
NCCLS – National Committee for Clinical and Laboratory Standards
ORF – Sequência de leitura aberta
ORN – Ornitina descarboxilase
P - Prolina
pb – Pares de base
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PFGE – Eletroforese em campo elétrico pulsado
PIA – Polissacarídeo de adesão intercelular
PNAG – Poli-N-acetil-glicosamina
PYR – Pirrolidona arilamidase
rDNA – DNA 16S ribossômico
S – Serina
SCCmec – Cassete cromossômico *mec* de *Staphylococcus*
SCN – *Staphylococcus* coagulase-negativo
SD – Serina-Aspartato
Sdr – Repetições de Serina-Aspartato
SipB – Proteína de invasão de *Salmonella*
SLUSH – Hemolisina sinérgica de *S. lugdunensis*
T - Treonina
Tuf – Fator de alongação
tuf – Gene que codifica o fator de alongação Tuf
UTI – Unidade de terapia intensiva
vWbl – Proteína de ligação ao fator de Von-Willebrand de *S. lugdunensis*
vWf – Fator de von-Willebrand

INTRODUÇÃO

I. Infecção relacionada à assistência a saúde – Aspectos gerais

Ultimamente, o termo Infecção Hospitalar tem sido substituído por Infecção Relacionada à Assistência a Saúde (IRAS), sendo aquela adquirida no curso de um tratamento específico para outra enfermidade dentro de um cenário de cuidados médicos (CDC, 2008). As IRAS contribuem para o aumento das taxas de morbidade e mortalidade, tempo de internação, bem como com a elevação do custo hospitalar, devido principalmente ao elevado uso de agentes antimicrobianos (FAR, MARINO & MEDEIROS, 2001; WHO, 2006).

Estima-se que a incidência mundial de IRAS em hospitais seja cerca de sete a dez casos em cada 100 admissões, sendo a maioria delas adquirida em unidades de terapia intensiva (UTIs), devido aos fatores de risco associados ao paciente envolvido e ao tipo de unidade hospitalar (SMITH, 2006). As UTIs apresentam taxas de infecção cerca de três vezes maiores do que outros setores hospitalares (WEINSTEIN, 1998).

Em relação ao número de óbitos por IRAS, estes podem chegar a 88.000 casos por ano nos Estados Unidos, onerando os cofres do governo norte-americano em cerca de 4,5 bilhões de dólares (SINGH *et al.*, 2006).

No Brasil, as maiores taxas de infecção também são encontradas em UTIs. Unidades de tratamento para grandes queimaduras e enfermarias de clínica cirúrgica encontram-se em segundo e terceiro lugares, respectivamente, também apresentando altos índices de infecção (FERNANDES *et al.*, 2000). Estima-se que cerca de 10% dos pacientes internados que apresentam algum tipo de IRAS em ambiente hospitalar evoluem a óbito. As IRAS mais freqüentes são infecções do trato urinário, pneumonias, infecções do sítio cirúrgico e bacteriemias (BOAS & RUIZ, 2004).

Cada vez mais, o uso de dispositivos médicos invasivos tem contribuído para a emergência de IRAS (LYYTIKÄINEN *et al.* 2002, SAXENA & PAMBOTRA, 2005). Dentre esses dispositivos encontram-se cateteres venosos centrais e periféricos, próteses valvares, articulares e marcapassos (HUEBNER & GOLDMAN, 1999). Outros fatores de risco são: idade avançada e

prematuridade, presença de comorbidades, antibioticoterapia prévia e intervenções cirúrgicas, dentre outras (PITTET, 1999).

As bactérias hospitalares considerados de maior relevância, devido, principalmente ao contínuo aumento de resistência a antimicrobianos são: pneumococos resistentes à penicilina, enterococos resistentes a vancomicina, *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina/oxacilina, bacilos Gram-negativos produtores de β -lactamases de espectro estendido e bacilos Gram-negativos não-fermentadores multirresistentes (NNIS SYSTEM, 2004).

II. *Staphylococcus* spp.

O gênero *Staphylococcus* está alocado na família *Staphylococcaceae*, sendo composto por 41 espécies e 24 subespécies amplamente distribuídas na natureza (EUZEBY, 2010).

Os *Staphylococcus* encontram-se espalhados no ambiente (solo, ar e água) e estão presentes colonizando pele e mucosas de mamíferos e aves (WILKINSON, 1997; JARLOV, 1999). Esses micro-organismos estão entre os principais agentes de infecções adquiridas nos hospitais, que resultam em grande morbidade e mortalidade (BANNERMAN & PEACOCK, 2007).

S. aureus é a espécie bacteriana de maior prevalência em infecções humanas, sendo considerada também a mais patogênica do gênero. *S. aureus* pode causar desde infecções cutâneas superficiais, como impetigo, celulite e abscessos, até infecções graves decorrentes da invasão direta dos tecidos por amostras presentes na pele ou mucosas, como bacteriemia, endocardite, pneumonia e meningite (SMITH & JARVIS, 1999). Além disso, essa espécie está relacionada com patologias associadas à produção de exotoxinas com ação de superantígenos, tais como intoxicações alimentares e síndrome do choque tóxico (LARKIN *et al.*, 2009).

Dados do programa SENTRY de vigilância da resistência antimicrobiana indicam *S. aureus* como o agente etiológico mais freqüente em infecções da corrente sanguínea, pele e tecidos moles, além de ser causa freqüente de infecções do trato respiratório inferior, sendo grande parte destas infecções causadas por amostras resistentes à meticilina (STREIT *et al.*, 2004). Com o aumento das taxas de resistência a esse fármaco nas últimas décadas, a

vancomicina tornou-se uma das únicas alternativas para o tratamento de infecções por amostras multirresistentes (RYBAK, 2006).

Staphylococcus coagulase-negativos (SCN) constituem um grupo no qual é encontrada a maior parte das espécies do gênero *Staphylococcus* (BANNERMAN & PEACOCK, 2007). A capacidade desses micro-organismos de causar infecções tornou-se mais evidente nas últimas décadas, a partir da crescente utilização de recursos mais modernos e invasivos de diagnóstico e terapêutica, como o emprego de dispositivos médicos, que normalmente estão associados à capacidade de formação de biofilme bacteriano (GARCIA *et al.*, 2004). As infecções sanguíneas relacionadas a cateter são a maior causa de sepse, sendo a maioria destas causada por SCN (BOUZA *et al.* 2004). Esse fato, aliado a fatores, como: doença de base grave, tempo de hospitalização prolongado, uso de imunodepressores e idade avançada do paciente têm contribuído para a emergência dos SCN como importantes agentes de infecções hospitalares (CAVALCANTI *et al.*, 2005).

Diferentes espécies de SCN têm sido descritas como causa de infecção, mas muitas delas também pertencem à microbiota humana, como: *S. auricularis*, *S. capitis*, *S. caprae*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. saccharolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. schleiferi*, *S. simulans*, *S. warneri* e *S. xylosus*, sendo as duas últimas espécies normalmente adquiridas de animais domésticos (BANNERMAN & PEACOCK, 2007).

Staphylococcus epidermidis é a espécie de SCN prevalente na microbiota humana, sendo também a mais isolada de bacteriemias e infecções em geral (GARCIA *et al.*, 2004). Essa espécie também tem sido isolada de endocardites, infecções de sítio cirúrgico e do trato urinário, infecções relacionadas a próteses articulares e cateter intravascular, entre outras (OTTO, 2009). Uma das complicações encontradas no uso de dispositivos como próteses é a endocardite bacteriana. As espécies *S. aureus* (infecção agressiva) e *S. epidermidis* (infecção indolente) são as mais isoladas em endocardites de válvulas nativas e de próteses valvares, respectivamente (PATEL *et al.*, 2000).

Outra espécie freqüente em bacteriemias é *S. haemolyticus*, tendo sido implicada também em casos de endocardites, septicemias, peritonites,

infecções geniturinárias, ósseas e articulares (SPANU *et al.*, 2003; OTTO, 2004).

As espécies *S. lugdunensis* e *S. schleiferi* foram descritas em 1988, (FRENEY *et al.*, 1988), a partir de diferentes tipos de infecção. Dentre estas novas espécies, *S. lugdunensis* tem aparecido com notável potencial de virulência, apresentando um modelo de infecção muito semelhante ao da espécie *S. aureus*, representante de maior patogenicidade dentro do gênero (BÖCHER *et al.*, 2009).

III. *Staphylococcus lugdunensis*

a) Aspectos gerais

A espécie *S. lugdunensis* foi descrita pela primeira vez na cidade de Lyon, na França, por Freney e colaboradores (1988). *Lugdunum* é um adjetivo em latim que se refere à cidade onde o micro-organismo fora descrito. Os pesquisadores isolaram 11 amostras de diversos sítios de infecção (endocardite, bacteriemia, infecção de prótese valvar, osteomielite e infecções de pele), e perceberam que se tratava de uma espécie de SCN sensível a novobiocina, produtor de um fator de ligação ao fibrinogênio (fator *clumping*) e capaz de descarboxilar a ornitina, características estas que não tinham sido observadas em conjunto para qualquer outra espécie de *Staphylococcus*.

Em 1991, Herchline & Ayers identificaram 229 (10,1%) amostras de *S. lugdunensis* entre 2260 amostras de SCN não-*S. epidermidis* isoladas em um hospital americano e estocadas por um período de cinco anos. As amostras foram isoladas dos mais diversos sítios, sendo o maior número (65 amostras, 28%) isolado de infecção cutânea. Outros sítios de infecção envolveram o sistema circulatório, sistema nervoso central, trato respiratório, trato urinário e aqueles relacionados a dispositivos médicos implantados, como válvulas cardíacas e próteses, dentre outros. Desta forma, verificou-se que *S. lugdunensis* apresentava grande habilidade em estabelecer infecção em diversos locais.

Em 1999, Fervenza e colaboradores descreveram o caso de um paciente que desenvolveu endocardite de válvula mitral por *S. lugdunensis* após uma

vasectomia em um hospital dos Estados Unidos. Dois anos mais tarde, Sanchez, Buezas e Maestre (2001) isolaram quatro (31%) amostras de *S. lugdunensis* entre 13 obtidas de abscessos inguinais em um hospital de Madri. Uma alta freqüência de amostras de *S. lugdunensis* em infecções de sítio cirúrgico após cirurgias plásticas foi relatada por Van der Mee-Marquet e colaboradores (2003) em um hospital da França. Onze pacientes desenvolveram infecção cutânea sob a forma de abscesso purulento. Um dos aspectos em comum era o fato dos pacientes terem sido submetidos à cirurgia abdominal, com tricotomia da área inguinal. Cerca de 20% de 140 indivíduos saudáveis avaliados neste estudo eram portadores de *S. lugdunensis* nessa região, em ambos os lados (direito e esquerdo). Estes estudos mostraram que um dos possíveis sítios de colonização do *S. lugdunensis* seja a parte inferior do abdômen, provavelmente a região inguinal. Recentemente, em estudo envolvendo 57 indivíduos saudáveis, foram detectados 24 (32%) colonizados por *S. lugdunensis* na área púbica, confirmando este nicho como preferido por este micro-organismo (BIEBER & KAHLMETER, 2009).

Quando comparadas a infecções por outros SCN, as causadas por *S. lugdunensis* têm apresentado maior gravidade. Alguns estudos mostram que essa espécie induz um curso infeccioso muito similar ao de *S. aureus*, provavelmente devido ao fato de ambas apresentarem fatores de virulência similares (KOH, BRECKER & LAYTON, 1996; FARRAG *et al.*, 2000; ZINKERNAGEL *et al.*, 2008; BÖCHER *et al.*, 2009). Estudos em modelo animal, realizados por Lambe e colaboradores (1990), confirmaram o potencial de agressividade da espécie *S. lugdunensis*, principalmente em endocardite induzida em cobaias.

A maior parte dos relatos da literatura relacionada a infecções por *S. lugdunensis* é de endocardites graves em válvulas nativas (mitral e aórtica) e próteses valvares (FRANK, DEL POZO & PATEL, 2008; CELEBI *et al.*, 2009). Em geral, essas infecções cardíacas são extremamente agressivas, causando destruição da válvula (Figura 1), com necessidade de inserção de prótese (BARKER, O'DRISCOLL & BHARGAVA, 1991; KOH, BRECKER & LAYTON, 1996; SEENIVASAN & YU, 2003; ANGUERA *et al.*, 2005; FRANK, DEL POZO & PATEL, 2008). Patel e colaboradores (2000), em um estudo retrospectivo de 20 anos, mostraram que dentre as espécies de SCN, *S. lugdunensis* foi responsável por 18% das endocardites infecciosas e 44% das endocardites valvares nativas.

Normalmente, o paciente é admitido no hospital com sintomas de bacteriemia, como febre, mal-estar, alta contagem leucocitária e altos níveis séricos de proteína C-reativa. No ecocardiograma são detectadas vegetações em válvulas cardíacas, muitas vezes com formação de abscesso. Na maioria dos relatos descritos, esses sintomas são percebidos, embora o paciente possa apresentar a patologia cardíaca sem detecção da bactéria na hemocultura, e com ausência de febre (FARRAG *et al.*, 2000; RENZULLI *et al.*, 2000).

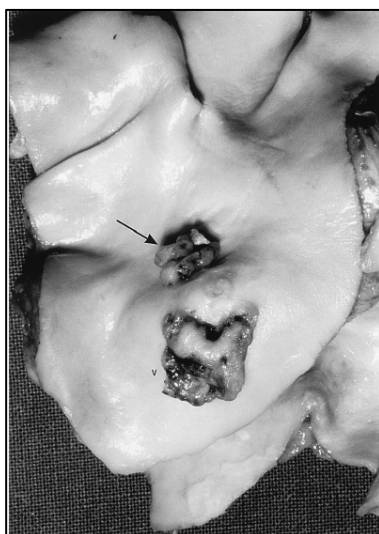


Figura 1: Válvula cardíaca com vegetações causadas por *S. lugdunensis* (LEUNG *et al.*, 1998)

Além de endocardites, esta espécie já foi isolada em casos de meningite (KAABIA *et al.*, 2002), osteomielite (GREIG & WOOD, 2003; THOMAS, HOY & CAPPER, 2006), peritonite (SCHNITZLER *et al.*, 1998), infecções de trato urinário (HAILE *et al.*, 2002), pneumonia (PEREZ *et al.*, 2002), sistema nervoso central (SPANU *et al.*, 2008), dentre outros (HERCHLINE & AYERS, 1991; FRANK, DEL POZO & PATEL, 2008).

A taxa de mortalidade em casos de endocardite por *S. lugdunensis* é extremamente alta. Vandenesch e colaboradores, em 1993, relataram taxa de mortalidade de 70% (14 de 20 casos) entre pacientes de um hospital francês. Em um estudo publicado em 2003, Seenivasan e Yu revisaram 48 casos de endocardite por essa espécie descritos na literatura e verificaram que as taxas de mortalidade foram de 40% em casos de endocardite infecciosa e de 65% naquelas associadas a cirurgia de inserção de prótese devido a destruição da válvula nativa pela bactéria. Os autores relataram complicações em 53% dos

casos, com formação de abscesso em válvulas em 23% e perfuração com destruição das mesmas em 21% dos casos. Normalmente, as vegetações são extensas e a evolução da patologia é extremamente rápida (TAKAHASHI *et al.*, 2009).

b) Fatores de Virulência

Semelhante a *S. aureus*, a espécie *S. lugdunensis* possui fatores de virulência que podem auxiliar na invasão e destruição tecidual. Em um estudo pioneiro realizado em 1990, utilizando 38 amostras de *S. lugdunensis* provenientes da coleção de culturas do CDC e isoladas entre 1971 e 1990, Hebert descreveu que 4 (10%) amostras produziam *slime*, 30 (78%) eram fator *clumping* positivas e 36 (95%) produziam uma hemolisina de ação sinérgica com β -hemolisinas.

→ Proteína de ligação a fibrinogênio (Fbl)

A proteína Fbl (*fibrinogen-binding protein of S. lugdunensis*) parece ser um fator de adesão da espécie *S. lugdunensis*, sendo bem sugestivo que ela seja crucial para o início da infecção. Foi demonstrado que esta proteína e o fator *clumping* de *S. aureus* (ClfA) aderem ao fibrinogênio com a mesma intensidade, o que provavelmente permite que o *S. lugdunensis* tenha grande habilidade de aderir a materiais biológicos e tecidos, podendo ser esta a causa do sucesso deste micro-organismo em infecções invasivas e endocardites bacterianas (GEOGHEGAN *et al.*, 2010).

Nilsson e colaboradores (2004a) descreveram pela primeira vez o gene responsável pela expressão da proteína de ligação ao fibrinogênio, denominado *fbl*. O sequenciamento (Gene Bank – acesso nº AF404823) mostrou que o gene de 2643 pares de base é composto de três domínios N1, N2 e N3. Foi observada na seqüência de aminoácidos 62% de identidade com o ClfA na região correspondente a região ligante da proteína (domínios N2 e N3) e 19% de homologia no domínio N1 (Figura 2) (MITCHELL, TRISTAN & FOSTER, 2004). A região ligante também mostrou 30% de identidade com a proteína Fbe (*fibrinogen-binding protein of S. epidermidis*). No domínio N3, existe uma região de 270 aminoácidos com seqüências repetidas de serina (S)

e aspartato (D), incluindo a Fbl na família Sdr (*SD repetitions*), das proteínas de repetição serino-aspartato (SD). Essas repetições SD funcionam como uma "haste flexível", permitindo que a região ligante da proteína se estenda além da superfície celular (HARTFORD *et al*, 1997).

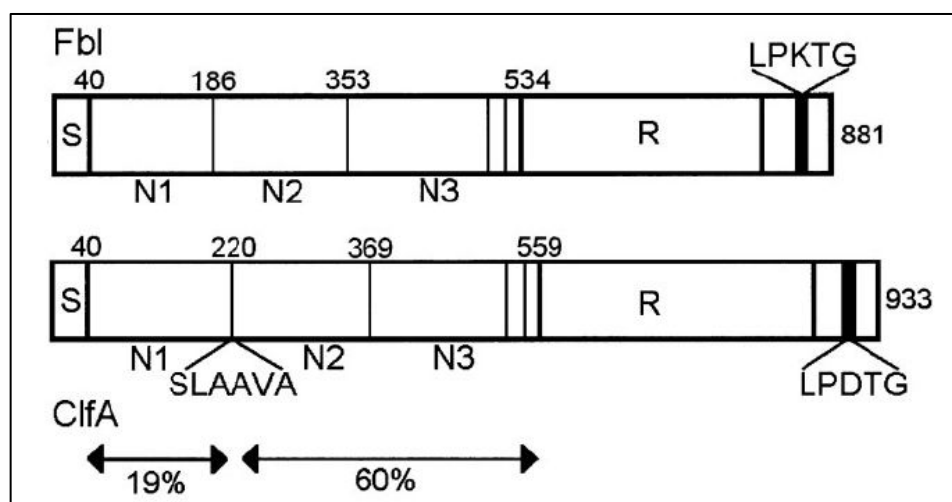


Figura 2: Comparação entre as estruturas das proteínas Fbl (*S. lugdunensis*) e ClfA (*S. aureus*)

Mitchell, Tristan & Foster (2004) realizaram alguns testes comparativos entre as proteínas Fbl (*S. lugdunensis*) e ClfA/ClfB (*S. aureus*). Os genes correspondentes a essas proteínas foram clonados em *Lactobacillus lactis*, gerando estirpes *L. lactis* Fbl⁺, ClfA⁺ e ClfB⁺. Análises de *Southern-blotting* mostraram a hibridização do gene *fbl* com uma sonda correspondente às regiões N2N3 (ligante) do gene *clfA*. Foi observado também que amostras clínicas de *S. lugdunensis* e a estirpe *L. lactis* Fbl⁺ tinham sua aderência a fibrinogênio imobilizado inibida por anticorpos anti-Fbl e anti-ClfA. Esses ensaios confirmaram a grande similaridade dessas proteínas, tanto na seqüência de aminoácidos quanto na estrutura tridimensional, compartilhando epítomos que ativam produção de anticorpos para ambos. Em relação a níveis de expressão, observou-se que a estirpe *L. lactis* Fbl⁺ expressava esta proteína em níveis muitos mais altos do que algumas amostras de *S. lugdunensis* utilizadas no estudo, com uma reação de fator *clumping* positiva igual a da estirpe ClfA⁺, e de amostras de *S. aureus*, sugerindo que o gene *fbl* em *S. lugdunensis* não seja transcrito em níveis consideráveis para detecção em algumas amostras. Isso poderia explicar o fato das taxas de positividade

para o teste variarem na caracterização de amostras de *S. lugdunensis* nos laboratórios de análises clínicas (FRANK, DEL POZO & PATEL, 2008).

→ *Hemolisina sinérgica (SLUSH)*

Outro fator de virulência presente em *S. lugdunensis* são as hemolisinas. Hebert (1990) demonstrou a produção de hemolisinas que apresentavam ação sinérgica com a β -hemolisina de *S. intermedius*. Entre as amostras de *S. lugdunensis* que foram analisadas nesse estudo, 95% apresentavam esta característica hemolítica. Donvito e colaboradores (1997a) descreveram uma hemolisina presente em *S. lugdunensis*, fenotipicamente similar a δ -hemolisina de *S. aureus* e a uma bacteriocina denominada "gonococcal growth inhibitor", produzida por *S. haemolyticus*. A hemolisina fora denominada SLUSH (*Staphylococcus lugdunensis synergistic haemolysin*), produzindo uma hemólise completa dentro de uma zona de hemólise incompleta produzida por uma cepa produtora de β -hemolisina. Em *S. aureus*, o gene que codifica a δ -hemolisina (*hld*) é transcrito seguindo o regulador gênico RNAIII (*agr*-RNAIII), que regula a expressão da maioria das exoproteínas (PENG *et al.*, 1988). Vandenesch e colaboradores (1993) descreveram um *locus agr* em *S. lugdunensis*, similar ao encontrado em *S. aureus*, denominado *agr-sl*. No entanto, não há peptídeos expressos por esse locus que tenham atividades similares a δ -hemolisina, sugerindo que a atividade hemolítica provém de um gene que está fora do *locus agr-sl*. Donvito e colaboradores (1997a) demonstraram a existência de um operon de 1201 pares de base, denominado *slush*, que contém 3 ORF's responsáveis pela transcrição dos peptídeos denominados SLUSH-A, SLUSH-B e SLUSH-C, codificados fora do *locus agr-sl*.

O mecanismo hemolítico desses peptídeos ainda não é claro, podendo ser um fenômeno acessório que acompanha outras atividades. Os peptídeos SLUSH apresentam 34 a 48% de homologia com uma bacteriocina de *S. haemolyticus* com atividade hemolítica (WATSON *et al.*, 1988). Na proteína secretada não há remoção do peptídeo sinal, o que sugere o envolvimento de um sistema de transporte específico. Os peptídeos que compõem a proteína SLUSH têm 32% de homologia com o domínio central de uma invasina

secretada por *Salmonella typhimurium*, denominada SipB, que possui seqüências capazes de atravessar membranas (atividade de porina), sendo significativamente similar a invasina IpaB de *Shigella* e YopB de *Yersinia* spp. (KANIGA *et al.*, 1995). Assim, tem sido sugerido que o sistema SLUSH de *S. lugdunensis* possa ser um modelo conveniente de estudo de bacteriocinas e invasinas com lipossomos ou membranas celulares.

→ Produção de biofilme

Como já relatado anteriormente, amostras de *S. lugdunensis* produzem *slime* (HERBERT, 1990). Foi demonstrado que o glicocálice purificado de culturas de *S. lugdunensis* é forte estimulador da síntese de prostaglandinas E2 (produzidas por monócitos), que por sua vez inibem a proliferação de células T (STOUT *et al.*, 1994). Esta ativação de monócitos também resulta na modulação de macrófagos, ativando secreção de TNF- α e óxido nítrico (LAMBE *et al.*, 1990).

Frank e colaboradores (2007) demonstraram que biofilmes de amostras de *S. lugdunensis* produtoras de *slime* induziram ao aumento das concentrações mínimas inibitórias (CMIs) de diferentes antimicrobianos quando expostos a maioria deles. Além disso, os autores verificaram que concentrações sub-inibitórias de nafcilina (mesma classe da oxacilina e metecilina) eram capazes de induzir a formação de biofilme em *S. lugdunensis*, enquanto antibióticos como tetraciclina e linezolida inibiam esta formação.

Um aspecto interessante é que o biofilme formado por amostras de *S. lugdunensis* que apresentam o operon *icaADBC* (responsável pela produção dos componentes de matriz do biofilme) não tem como componente principal o polímero PIA (polissacarídeo de adesão intercelular), composto de poli-N-acetil-glicosamina (FRANK & PATEL, 2007), como observado em amostras de *S. epidermidis* (OTTO, 2008). Em estudo realizado por Frank e Patel (2007) utilizando 15 amostras portadoras do operon *icaADBC* e fortes produtoras de biofilme, o polímero não foi detectado na matriz do mesmo. Além disso, os biofilmes não foram desagregados por dispersina B e metaperiodato de sódio (agentes desagregadores de biofilmes polissacarídicos). Contudo, a desagregação do biofilme ocorreu com enzimas proteolíticas como proteinase

K e tripsina, demonstrando o envolvimento de proteínas dos biofilmes de *S. lugdunensis*.

→ *Outros fatores de virulência*

Outra proteína de superfície descrita por Nilsson e colaboradores (2004b) é a vWbl (von Willebrand factor binding of *S. lugdunensis*), que como o próprio nome sugere, é uma proteína capaz de se ligar ao fator de von Willebrand (vWf), presente no plasma. Em *S. aureus*, a proteína de superfície que é capaz de se ligar ao vWf é a proteína A, conhecido fator de virulência da espécie, capaz de se unir a porção Fc dos anticorpos, impedindo assim sua opsonização (HARTLEIB *et al.*, 2000). A proteína vWf é essencial na homeostase, visto que esta se liga a colágeno exposto durante lesão endotelial, fornecendo o primeiro arcabouço para ação das substâncias envolvidas na cascata de coagulação, sendo também um carreador e estabilizador do fator VIII, um cofator que acelera a cascata de coagulação (VISCHER & DE MOERLOOSE, 1999). A proteína vWbl de *S. lugdunensis* apresenta 2060 aminoácidos e massa molecular de 226 KDa, sendo codificada pelo gene *vwbl*, composto por uma ORF de 6180 pares de base. Esse peptídeo possui uma região A, uma região R subdividida em 3 sub-regiões (R1, R2 e R3) e uma região W. A região A não apresenta similaridade com outras proteínas do gênero, mas possui um sítio Arg-Gly-Asp (RGD) encontrado em várias proteínas de ligação a integrinas, como fibronectina e laminina (NILSSON *et al.*, 2004b). Ensaios feitos por ELISA demonstraram a ligação entre as proteínas vWbl de *S. lugdunensis* e vWf presente no plasma (NILSSON *et al.*, 2004b). Esse mesmo estudo demonstrou, através da técnica de *Southern-blotting*, a presença do gene *vwbl* em 12 amostras clínicas de *S. lugdunensis* isoladas de diversos hospitais suecos.

Recentemente, Burgeois e colaboradores (2009) descreveram pela primeira vez a produção de autolisinas por *S. lugdunensis*. O gene codificante foi seqüenciado, e denominado *atIL*, podendo o mesmo estar envolvido no mecanismo de tolerância a vancomicina, já relatado na literatura (BURGEOIS *et al.*, 2007).

Outros fatores de virulência como esterases, proteases e lipases também podem ser produzidos por amostras de *S. lugdunensis* (LAMBE *et al.*, 1990).

→ *Ensaio de patogênese in vitro utilizando células eucarióticas*

A avaliação *in vitro* da virulência de *S. lugdunensis* utilizando células eucarióticas não tem sido descrita na literatura, exceto em um relato, onde os autores descrevem a diminuição da viabilidade celular de monocamadas de fibroblastos gengivais frente a amostras clínicas isoladas de abscessos orais (YOU *et al.*, 1999). No entanto, os autores não avaliaram a adesão ou invasão de células eucarióticas por amostras dessa espécie.

Em *S. aureus*, entretanto, estes aspectos já foram abordados. Em 1998, Menviez e Kourteva estudaram a internalização de *S. aureus* por células endoteliais, mostrando a capacidade deste patógeno em induzir apoptose nas células invadidas. Amaral e colaboradores (2005) descreveram a capacidade de aderir e invadir células pulmonares de amostras de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA, "methicillin resistant *S. aureus*") pertencentes ao genótipo prevalente no Brasil, que é largamente isolado em IRAS no ambiente hospitalar. Os autores também verificaram que amostras deste genótipo formavam biofilme em maior quantidade do que aquelas incluídas em outros perfis genotípicos. Em 2008, Bentzmann e colaboradores compararam o potencial de adesão e invasão em células de epitélio respiratório entre amostras de MRSA e MSSA ("methicillin sensitive *S. aureus*"), mostrando que a capacidade de aderir ou invadir não estava relacionada a presença do gene *mecA*.

c) Aspectos fenotípicos e identificação

A escassa incidência de *S. lugdunensis* em espécimes clínicos descrita na literatura pode estar relacionada a uma identificação errônea destes micro-organismos. O fato do *S. lugdunensis* produzir DNase e ser positivo no teste de coagulase em lâmina (fator *clumping*), características também encontradas em *S. aureus*, pode levar a erros de identificação (SANCHEZ, BUEZA & MAESTRE, 2001; HELLBACHER, TÖRNQVIST & SÖDERQUIST, 2006). A

capacidade de *S. lugdunensis* em aglutinar na presença de fibrinogênio imobilizado leva muitas vezes a sua identificação errônea nos laboratórios de rotina clínica, já que o teste de fator *clumping* ou coagulase ligada é um teste preliminar rápido, que associado a catalase e a hemólise em ágar sangue podem caracterizar a espécie como *S. aureus* (PATEL *et al*, 2000; ANGUERA *et al*, 2005). Além disso, assim como *S. aureus*, *S. lugdunensis* pode apresentar colônias com pigmentação amarelada (SEIFERT *et al.*, 2005).

Em estudo realizado na Alemanha, Schnitzler e colaboradores (1998) propuseram uma metodologia simples para identificar corretamente *S. lugdunensis*, utilizando os testes para a enzima pirrolidôn timeramidase (PYR) e descarboxilação da ornitina (ORN), além dos testes de fator *clumping* e coagulase em tubo. Dentre as espécies do grupo de SCN envolvidas em infecções humanas que são positivas para PYR (*S. haemolyticus*, *S. schleiferi*, *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. intermedius*, *S. caprae* e *S. lugdunensis*), apenas *S. lugdunensis* é positivo para ORN (HEBERT, 1990). Com base nesses estudos, ficou demonstrado que o teste de descarboxilação da ornitina seria um teste chave para caracterizar essa espécie (TAN, NG & HE, 2008).

Em 2008, Tang e colaboradores descreveram 12 amostras clínicas provenientes de hemoculturas de cocos gram-positivos catalase-positivos e coagulase-negativos, positivos para PYR e capazes de descarboxilar a ornitina, identificados como *S. lugdunensis* que não foram reconhecidos por uma sonda específica para o fator de alongamento Tuf da espécie. Contudo, após análise detalhada, os autores relataram que se tratava de uma espécie nova, denominada *Staphylococcus pseudolugdunensis*.

Alguns trabalhos na literatura relatam que análises utilizando sistemas comerciais, como o API Staph-Ident (BioMerieux, Paris, França) podem também levar a identificação errônea de *S. lugdunensis*, como *S. hominis* (WALSH & MOUNSEY, 1990) ou *S. warneri* (SHEPPARD & JANKOWSKI, 1992).

Métodos automatizados também têm sido apontados como de utilização duvidosa na identificação de *S. lugdunensis*. Seifert e colaboradores (2005) mostraram um caso de infecção por *S. lugdunensis*, identificado com *S. auricularis* por metodologia automatizada em paciente portador de marcapasso, na Alemanha. Nesse estudo, um paciente portador de marcapasso, implantado há sete anos, apresentou sintomas característicos de bacteriemia. O resultado da hemocultura apontou para *S. lugdunensis* sensível

a todos os antibióticos testados, tendo sido iniciada antibioticoterapia. Durante quatro meses, esse paciente fora internado várias vezes no mesmo hospital, com sintomas recorrentes, sendo tratado com antibióticos diferentes. Em sua última internação, a equipe médica optou por retirar o marcapasso, a partir do qual foi realizada cultura para investigar a colonização bacteriana. Percebeu-se uma população mista de cocos Gram-positivos, tratando-se de *S. lugdunensis* com variação de colônias ("small-colony variants" - SCV), um fenômeno apenas antes relatado em *S. aureus* (PROCTOR, BATES & MCNAMARA, 2001). Quatro variantes de colônias da mesma amostra foram observadas, mas apenas duas delas foram identificadas pelo sistema automatizado. A análise de fragmentação de DNA cromossômico por Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE) mostrou que todas as amostras eram do mesmo clone, demonstrando esta capacidade singular de *S. lugdunensis* e assumir morfologias diferentes. Essa capacidade também fora observada antes por Leung e colaboradores (1998), em uma amostra colhida *post-mortem*, da válvula mitral de um paciente infectado. (Figura 1, Página 6). Alguns autores especulam que a exposição a certos antimicrobianos, como gentamicina, pode induzir a esta variação (SEIFERT *et al.*, 2005). Em ambos os casos descritos, os pacientes fizeram uso desse antimicrobiano, indicado nos casos de infecção por *S. lugdunensis*.

Alguns trabalhos também propõem métodos moleculares para confirmação da identificação de *S. lugdunensis*, envolvendo seqüenciamento de rDNA 16S (TEE *et al.*, 2003; PADA *et al.*, 2009) e PCR (NOGUCHI *et al.*, 2010)

d) Susceptibilidade a antimicrobianos

Em relação ao perfil de susceptibilidade antimicrobiana em *S. lugdunensis*, vários trabalhos demonstram que as amostras isoladas são, na maioria das vezes, sensíveis a todos os antibióticos testados, inclusive a penicilinas. Contudo, Herchline e colaboradores (1990), em um primeiro estudo sobre avaliação do perfil de resistência nessa espécie, descreveram 14 amostras produtoras de β -lactamases dentre 59 amostras clínicas, apresentando CMI's elevadas para penicilina, amoxicilina-clavulanato e ampicilina. Nessa época, CMI's $\geq 0,5$ $\mu\text{g/mL}$ para oxacilina eram associadas a

amostras multirresistentes, similar ao que era descrito para SCN. Porém, Patel e colaboradores, em 2000, isolaram amostras de *S. lugdunensis* com CMI para oxacilina entre 1 e 4 µg/mL, mas sem a presença do gene *mecA*, sendo também negativas para produção de β-lactamases, característico de amostras sensíveis. Outro aspecto determinante era o fato desses pacientes terem sido tratados com penicilinas ou cefalosporinas, o que não seria possível caso as amostras possuísem o gene *mecA*, que codifica resistência a todos os β-lactâmicos. Hussain e colaboradores (2000) também mostraram que amostras de *S. lugdunensis* com CMI $\geq 0,5$ µg/mL eram negativas para o gene *mecA*. Em decorrência dos resultados obtidos em vários estudos, no ano de 2005, o "National Committee for Clinical and Laboratories Standards" (NCCLS, atual CLSI – Committee of Laboratorial Standards Institute) determinou que fosse considerado como *breakpoint* para resistência a oxacilina uma CMI ≥ 4 µg/mL em amostras de *S. lugdunensis*, assim como determinado para a espécie *S. aureus*. A interpretação dos halos de inibição para discos de cefoxitina e oxacilina na determinação da resistência a oxacilina em *S. lugdunensis* também seguiu o estabelecido para a espécie *S. aureus*.

Apesar da grande sensibilidade a antimicrobianos observada em *S. lugdunensis*, amostras apresentando o gene *mecA* já foram descritas. A primeira amostra contendo o gene *mecA* foi isolada na Cingapura, em 2002 (TEE *et al.*, 2003). A amostra fora isolada de um neonato, provavelmente infectado via cateter venoso. Após detecção de *S. lugdunensis* na hemocultura, o bebê fora tratado com cloxacilina e gentamicina, sem resultado. O antibiograma mostrou que a bactéria era multirresistente, e o tratamento foi alterado para vancomicina, mostrando boa resposta. A cultura em ágar sangue mostrou colônias amarelas e hemolíticas, com reação positiva para fator *clumping*, mas teste de coagulase em tubo negativo, o que permitiu a identificação da espécie como *S. lugdunensis*, confirmada depois pelos testes PYR e ORN (ambos positivos). A CMI para oxacilina foi > 256 µg/mL, e o gene *mecA* fora detectado pelo método de PCR. Em estudo recente, Tam, Ng & He (2008) detectaram cinco amostras *mecA* positivas em 106 amostras da coleção de culturas do Hospital de Changi (Cingapura). Destas cinco amostras, quatro apresentavam CMI igual a 16 µg/mL e uma CMI ≥ 32 µg/mL.

Kragstbjerg e colaboradores (2000) relataram um caso de infecção recorrente por *S. lugdunensis*, cuja bactéria desenvolveu resistência a várias

classes de antibióticos durante o tratamento. Por dois anos o paciente fora internado várias vezes, no início com artrite bacteriana no cotovelo esquerdo, desenvolvendo osteomielite, e no final, endocardite fulminante com destruição das válvulas mitral e aórtica. Ao internar pela primeira vez, após detecção de *S. lugdunensis* na hemocultura, o paciente começou o tratamento com benzilpenicilina e dicloxacilina, desaparecendo os sintomas da infecção. Nove dias depois, ele foi readmitido com artrite bacteriana no joelho direito, sendo isolado novamente *S. lugdunensis*, tanto no sangue quanto no líquido sinovial extraído do joelho. O tratamento utilizado nessa segunda internação foi cloxacilina e flucoxacilina, com melhora do quadro. Quatro meses depois, o mesmo paciente voltou a ser internado com problemas cardíacos, com regurgitação nas válvulas mitral e aórtica, sem observação de vegetações. Três meses após esse quadro, o paciente sofreu uma cirurgia de implante de prótese de joelho, após detecção de osteonecrose. A profilaxia foi feita com os mesmos antibióticos utilizados na última internação, cloxacilina e flucoxacilina. Seis meses depois da inserção da prótese, o paciente foi internado com inchaço, dor, efusão e calor no joelho operado. Foi isolado novamente *S. lugdunensis* do líquido sinovial. Porém, testes de susceptibilidade mostraram que a amostra estava resistente a flucloxacilina, sendo o tratamento mudado para ciprofloxacina. Mais tarde, foi visto que a bactéria também adquirira resistência a ciprofloxacina, sendo o tratamento alterado para clindamicina e rifampicina. Um ano depois, o paciente foi readmitido com sintomas de osteomielite vertebral e o ecocardiograma mostrou calcificação nas válvulas aórtica e mitral, sem vegetações. Foi isolado, mais uma vez, *S. lugdunensis*, desta vez com resistência também a rifampicina e clindamicina. Após uma semana de internação, começaram a ser observadas vegetações nas válvulas cardíacas. O tratamento fora mudado para vancomicina. Contudo, um mês depois, o paciente veio a falecer e a necrópsia acusou pneumonia, osteomielite vertebral e vegetações nas válvulas mitral e aórtica, com perfuração de ambas. A análise das amostras por PFGE mostrou que estas pertenciam ao mesmo clone. Este caso demonstra que, mesmo sendo uma bactéria em geral, sensível a maioria dos antibióticos, *S. lugdunensis* pode causar infecções sistêmicas graves e adquirir resistência durante o tratamento.

O tratamento sugerido em infecções pelo patógeno é a vancomicina, visto que algumas penicilinas podem induzir a formação de biofilme em

amostras de *S. lugdunensis*, associadas ou não a aminoglicosídeos, como a gentamicina (VANDENESCH *et al.*, 1993; ANGUERA *et al.*, 2005). Além disso, existem relatos na literatura de tolerância a vancomicina se o tratamento é realizado em combinação com esse aminoglicosídeo (BURGEOIS *et al.*, 2007). Um tratamento alternativo para pacientes com amostras tolerantes a vancomicina é a Linezolida (MERINO *et al.*, 2009).

e) Epidemiologia molecular

Algumas técnicas moleculares vêm sendo utilizadas para a caracterização epidemiológica de amostras hospitalares de *Staphylococcus*. Essas técnicas, por analisarem diretamente o material genômico dos microrganismos, apresentam melhor poder discriminatório do que as técnicas convencionais (STRUELENS *et al.*, 2009). A análise por PFGE dos perfis de fragmentação, após corte do DNA genômico com uma enzima para qual este tenha poucos sítios de clivagem, é uma técnica molecular desenvolvida por Schwartz e colaboradores (1983), a partir de uma variação da eletroforese em gel de agarose convencional.

Em relação ao *S. lugdunensis*, os autores têm detectado uma baixa variabilidade genômica em amostras isoladas de infecções humanas (FRANK, DEL POZO & PATEL, 2008). Van der Mee-Marquet e colaboradores (2003), pesquisando a relação entre infecção e colonização da área inguinal por *S. lugdunensis*, analisaram o perfil de fragmentação de 72 amostras (colonização e infecção) após digestão do DNA cromossômico pela enzima *SmaI*, pela técnica de PFGE. Vinte pulsotipos foram identificados entre as 72 amostras, sendo sete entre as amostras de infecção, enquanto entre as amostras comensais havia representantes de todos os pulsotipos. Foi visto que as amostras apresentavam baixo grau de diversidade, sendo separadas em dois genótipos, com um nível de similaridade entre eles de 65%. Recentemente, Hellbacher, Törnqvist e Söderquist (2006) ao analisarem 39 amostras isoladas de um hospital da Suécia, entre 1999 e 2003, através de PFGE, identificaram 6 genótipos, denominados de A a F, sendo 56% de um mesmo genótipo. Böcher e colaboradores (2009) analisaram 38 amostras (invasivas e não-invasivas) provenientes de hospitais de duas cidades dinamarquesas,

encontrando também alta similaridade entre amostras dos únicos dois clones detectados. Os autores não observaram prevalência de algum clone entre as amostras invasivas ou não-invasivas. Segundo os autores, é possível que o genoma dessa espécie seja altamente conservado, o que explicaria a baixa diversidade clonal entre as amostras.

O potencial patogênico do *S. lugdunensis* parece ser abrangente, e muitos estudos vem sendo realizados com o objetivo de esclarecer porque certas infecções, principalmente as endocardites, são tão graves. Torna-se, portanto, relevante desenvolver um estudo mais detalhado da epidemiologia e virulência desse micro-organismo, aspectos pouco descritos na literatura nos últimos anos, desde a descrição dessa nova espécie. Adicionalmente, não existem publicações nacionais sobre *S. lugdunensis*, o que justifica uma melhor caracterização bacteriana buscando detectar aspectos que expliquem seu poder agressor nas infecções estafilocócicas.

OBJETIVO

I. Avaliar amostras clínicas de *Staphylococcus lugdunensis* isoladas de diferentes hospitais do Rio de Janeiro quanto a aspectos relacionados a identificação, virulência, susceptibilidade antimicrobiana e clonalidade.

II. Estratégias:

1. Utilizar testes fenotípicos para identificação e determinação da susceptibilidade antimicrobiana de *S. lugdunensis* e a técnica de PCR para detecção do gene *mecA* e para tipagem do *SCCmec*;
2. Utilizar as ferramentas OligoExplorer e BioEdit para desenhar sequências oligonucleotídicas específicas para genes que codificam fatores de virulência;
3. Verificar por meio de testes fenotípicos e *Western-blotting* a produção de fatores de virulência e detectar a presença de genes relacionados utilizando PCR, com iniciadores específicos para cada um dos fatores de virulência;
4. Avaliar, através da utilização de monocamadas de células epiteliais A549 a capacidade de adesão e invasão de *S. lugdunensis*;
5. Utilizar a análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico após eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) para determinar a diversidade genômica das amostras.

RESULTADOS

A análise dos dados obtidos permitiu a redação dos seguintes manuscritos:

1. ELIEZER M. PEREIRA, FRED L. OLIVEIRA, RICARDO P. SCHUENCK, GUSTAVO O. ZOLETTI & KÁTIA R. N. DOS SANTOS. 2009. Detection of *Staphylococcus lugdunensis* by a new species-specific PCR based on the *fbl* gene. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010, **58**: 295-98 **(Publicado)**
2. ELIEZER M. PEREIRA, ANA LUIZA M. ALVARENGA, RICARDO P. SCHUENCK, NAIRA ELANE M. OLIVEIRA, MARCIA GIAMBIAGI-DE-MARVAL, ANA LUIZA M. GUARALDI & KÁTIA R. N. DOS SANTOS. 2010. Virulence and associated clonality of *Staphylococcus lugdunensis* isolates from Rio de Janeiro hospitals. *International Journal of Infectious Diseases.* **(Submetido para publicação)**
3. ELIEZER M. PEREIRA; RICARDO P. SCHUENCK, SIMONE A. NOUÉR & KÁTIA R.N. DOS SANTOS. Methicillin-resistant *Staphylococcus lugdunensis* carrying SCCmec type V misidentified as MRSA. 2010. *Journal of Medical Microbiology.* **(Submetido para publicação)**
4. ELIEZER M. PEREIRA, CESAR AUGUSTO A. TEIXEIRA, ANA LUIZA M. ALVARENGA, RICARDO P. SCHUENCK, CARLA HOLANDINO, ANA LUIZA M. GUARALDI & KÁTIA R. N. DOS SANTOS. *Staphylococcus lugdunensis* presenting rough colony morphology is able to adhere and invade lung epithelial cells like *Staphylococcus aureus* **(Manuscrito em preparação)**

Artigo 1: Detection of *Staphylococcus lugdunensis* by a new species-specific PCR based on the *fbl* gene.

Autores: Eliezer M. Pereira, Fred L. Oliveira, Ricardo P. Schuenck, Gustavo O. Zoletti & Kátia R. N. dos Santos.

Revista: *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010, **58**: 295-98.

Resumo:

Staphylococcus lugdunensis é um *Staphylococcus* coagulase-negativo (SCN) raramente isolado de infecções humanas, porém com uma virulência similar a de *S. aureus*. Esse micro-organismo é normalmente isolado de infecções cutâneas, podendo também ser isolado de outros sítios, sendo as endocardites as de maior complicação. Neste trabalho foi desenvolvida uma reação de PCR simples e eficaz para identificação de *S. lugdunensis*, baseada na detecção do gene *fbl*, que codifica uma adesina bacteriana. A reação foi padronizada utilizando-se 79 amostras, sendo 16 controles e 63 clínicas, incluindo: 23 *S. lugdunensis*, 20 *S. aureus* e 20 de outras espécies de SCN (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. schleiferi*, *S. caprae*, *S. intermedius*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii*). Todas as amostras foram identificadas fenotipicamente através do método bioquímico de referência. Adicionalmente, as amostras de *S. lugdunensis* foram avaliadas pela metodologia de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE), tendo sido detectados apenas quatro genótipos, demonstrando baixa diversidade genômica. Os primers foram desenhados utilizando-se ferramentas de bioinformática, e todas as 24 amostras de *S. lugdunensis* apresentaram amplificação de um fragmento de 425 pb correspondente ao gene *fbl*. Não foram observadas ampliações para outras espécies, mostrando 100% de concordância com a identificação fenotípica. Os resultados demonstram que esta reação de PCR espécie-específica pode contribuir para a identificação e/ou confirmação de *S. lugdunensis*.

Detection of *Staphylococcus lugdunensis* by a new species-specific PCR based on the *fbl* gene

Eliezer M. Pereira, Fred L.F. Oliveira, Ricardo P. Schuenck, Gustavo O. Zoletti & Kátia R.N. dos Santos

Laboratory of Hospital Infections, Department of Medical Microbiology, Institute of Microbiology, Rio de Janeiro Federal University, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Correspondence: Kátia R.N. dos Santos, Laboratório de Infecções Hospitalares, Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, CCS, Bloco I, UFRJ, Av. Carlos Chagas Filho, No. 373, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil. Tel.: +55 21 2260 4193; fax: +55 21 2560 8028; e-mail: santoskrn@micro.ufrj.br

Received 27 May 2009; revised 20 October 2009; accepted 21 October 2009.
Final version published online 13 November 2009.

DOI:10.1111/j.1574-695X.2009.00626.x

Editor: Ewa Sadowy

Keywords

Staphylococcus lugdunensis; PCR identification; *fbl* gene.

Staphylococcus lugdunensis has emerged as an agent with notable clinical and microbiological characteristics that stand out among those of other coagulase-negative staphylococci (CNS). *Staphylococcus lugdunensis* is an unusually virulent CNS and can cause many types of infection, ranging from superficial skin infections to life-threatening endocarditis (Frank *et al.*, 2008). *Staphylococcus lugdunensis* colonizes the inguinal area and corresponds to about 10% of all non-*Staphylococcus epidermidis* coagulase-negative isolates. *Staphylococcus lugdunensis* produces an arsenal of virulence factors, such as lipases, DNase, esterases, haemolysins and adhesins (Frank *et al.*, 2008). The fibrinogen-binding protein of *S. lugdunensis* (Fbl) was characterized and sequenced in recent studies (Nilsson *et al.*, 2004). This protein contains a serine-aspartate repeat domain (Sdr) and is encoded by the *fbl* gene. It is closely related to *Staphylococcus aureus* clumping factor A, showing 60% similarity in the N2N3 fibrinogen-binding domain (Nilsson *et al.*, 2004). Other species of CNS produce similar proteins, such as Fbe/SdrG (*S. epidermidis*), SdrI (*Staphylococcus saprophyticus*) and SdrY (*Staphylococcus caprae*) (Nilsson *et al.*, 2004). In order

Abstract

Staphylococcus lugdunensis are unusually virulent coagulase-negative staphylococci associated with skin infections and endocarditis. We developed an accurate and simple PCR assay to identify *S. lugdunensis* isolates based on detection of the *fbl* gene, which encodes a fibrinogen-binding protein involved in pathogen adhesion. The PCR assay was established using 16 reference strains of different *Staphylococcus* species and further validated with a collection of 63 clinical staphylococcal isolates that were also phenotypically characterized. Reliable results for the detection of *S. lugdunensis* isolates were obtained for 100% of the strains evaluated, indicating that this PCR assay can be used in the routine of microbiology laboratories as one more tool for correct species differentiation.

to understand the clinical significance of *S. lugdunensis* in infections and to provide data for control and epidemiological measures, reliable detection and identification of this organism is crucial. In the present work, we designed primers for amplification of the *S. lugdunensis fbl* gene.

Amplification conditions were established using 16 bacterial strains that included the reference strains *S. lugdunensis*, *S. aureus* and other species of CNS (Table 1). PCR was validated with 63 clinical strains isolated from different sites: blood (52%), surgical sites (23%), nares (7%), urine (3%) and others (15%), from patients hospitalized between 1996 and 2008 at seven Brazilian hospitals. Twelve species of *Staphylococcus* were evaluated (Table 1). All 79 control and clinical isolates were phenotypically characterized to the genus and species level by the reference biochemical method considered the gold standard (Bannerman & Peacock, 2007). Three tests were performed initially to characterize the *Staphylococcus* genus: gram staining, catalase production and bacitracin resistance. Next, 22 tests were used to identify the *Staphylococcus* species: production of coagulase, clumping factor (Pastorex Staph-Plus; Bio-Rad, WA), pyrrolidonyl

Table 1. Results of the clumping factor test and *fbl* gene PCR detection for *Staphylococcus* species

<i>Staphylococcus</i> species	Clumping factor test*	<i>fbl</i> gene PCR
Reference strains		
<i>S. lugdunensis</i> DSMZ 4804 (type strain)	+	+
<i>S. aureus</i> ATCC 12600 (type strain)	+	–
<i>S. aureus</i> ATCC 25923 (susceptibility test strain)	+	–
<i>S. aureus</i> ATCC 33591 (MRSA strain)	+	–
<i>S. schleiferi</i> ssp. <i>schleiferi</i> DSMZ 4807 (type strain)	+	–
<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990 (type strain)	–	–
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	–	–
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984 (slime producer strain)	–	–
<i>S. haemolyticus</i> ATCC 29970 (type strain)	–	–
<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305 (type strain)	–	–
<i>S. xylosus</i> ATCC 29971 (type strain)	–	–
<i>S. cohnii</i> ATCC 29974 (type strain)	–	–
<i>S. hominis</i> ATCC 27844 (type strain)	–	–
<i>S. warneri</i> ATCC 10209	–	–
<i>S. intermedius</i> ATCC 29663 (type strain)	–	–
<i>S. capitis</i> ATCC 27840 (type strain)	–	–
Clinical isolates identified by the conventional method (no. of isolates)		
<i>S. lugdunensis</i> strains (23)	+	+
<i>S. aureus</i> strains (20)	+	–
Other staphylococci† (20)	–	–

*Pastorex Staph-Plus, Bio-Rad.

†*Staphylococcus epidermidis* (eight), *Staphylococcus haemolyticus* (three), *Staphylococcus schleiferi* ssp. *coagulans* (two), *Staphylococcus capitis* (one), *Staphylococcus intermedius* (one), *Staphylococcus saprophyticus* (one), *Staphylococcus warneri* (one), *Staphylococcus caprae* (one), *Staphylococcus cohnii* (one) and *Staphylococcus simulans* (one).

ATCC, American Type Culture Collection; DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; +, presence of gene; –, absence of gene.

arylamidase, urease, alkaline phosphatase, ornithine and arginine decarboxylase, acetoin, haemolysis, nitrate reduction and susceptibility to novobiocin, polymyxin B and desferrioxamine and acid production from D-trehalose, sucrose, D-ribose, D-cellobiose, D-xylose, α -lactose, D-mannitol, maltose and D-mannose. In addition, 30 (47%) strains evaluated in this study, including four *S. lugdunensis* isolates, were also identified previously by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *groEL* gene (Barros *et al.*, 2007), showing 100% concordant results with the reference method. For PCR, the strains were initially grown on agar base (Oxoid, Basingstoke, UK) supplemented with 5% sheep blood. Rapid DNA extraction was achieved by suspending five to six bacterial colonies in 100 μ L of TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.8) buffer and heating to 100 °C for 10 min. After centrifugation at 7000 g for 30 s, the supernatant was collected and 3 μ L was used in PCR.

Primers for the *fbl* detection were designed on the basis of the sequence obtained from the GenBank (accession number: AF404823) using the OLIGOANALYZER (Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA) and BIOEDIT (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA) software. The primers *fbl*-F (5' GTA AATAGCGAGGCACAAGC 3') and *fbl*-R (5' GGTAATCG TATCTGCCGCT 3') were located within parts of the gene, encoding the N2N3 (conserved fibrinogen-binding consensus) and R (not conserved) domains of Fbl. The specificity of primers was verified by the BLAST search of the GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). These primers were used to amplify a 425-bp fragment of the *fbl* gene. Reactions were performed on a Programmable Thermal Controller (Eppendorf Mastercycler Gradient, Hamburg, Germany) in a volume of 25 μ L containing 200 μ M of each dNTP (Life Technologies), 1.0 U of *Taq* DNA polymerase (Biotools, Madrid, Spain), buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl and 2 mM MgCl₂; Biotools), 1 μ M of *fbl*-F and *fbl*-R primers (Integrated DNA Technologies Inc.). Amplification conditions were as follows: denaturation for 3 min at 94 °C, followed by 30 cycles of 94 °C for 1 min, 60 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, with a final extension at 72 °C for 5 min. Amplified products were analysed on 1% agarose gel, stained with ethidium bromide and visualized on a UV transilluminator. To confirm the presence of DNA in extracts, PCR described by Frebourg *et al.* (2000) was used to amplify a 478-bp fragment of bacterial 16S rRNA gene.

Additionally, all *S. lugdunensis* isolates were typed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of whole-cell DNA digested with *Sma*I, as described previously (Vivoni *et al.* 2005). Differences between isolates were determined by visual inspection of the bands, as recommended by Tenover *et al.* (1995) and by the MOLECULAR ANALYST FINGERPRINTING PLUS software package (version 1.12) of the Image Analysis System (Bio-Rad), using the Dice index and the unweighted pair group method with arithmetic averages for estimation of similarity and clustering. Similar PFGE genotypes were defined using a coefficient of similarity up to 70%.

As shown in Table 1, all 63 clinical isolates and 16 reference *Staphylococcus* strains were identified at the species level using conventional methods. The staphylococcal clinical isolates were identified as: *S. lugdunensis* (23 isolates), *S. aureus* (20), *S. epidermidis* (eight), *Staphylococcus haemolyticus* (three), *Staphylococcus schleiferi* ssp. *coagulans* (two), *Staphylococcus capitis* (one), *Staphylococcus intermedius* (one), *S. saprophyticus* (one), *Staphylococcus warneri* (one), *S. caprae* (one), *Staphylococcus cohnii* (one) and *Staphylococcus simulans* (one). Results from the amplification of the *S. lugdunensis*-specific *fbl* gene showed that all 24 (100%) clinical and reference strains used in the present study were detected, in accordance with the results of phenotypic identification.

PFGE analysis detected 20 different pulsotypes within four genotypes, with A as the most frequent genotype (12

Table 2. Characteristics of 24 *Staphylococcus lugdunensis* isolates clustered according to PFGE typing

Isolate no.	Origin*	Clinical specimen	Isolation date (month/year)	PFGE pulsotype
4804 (control strain)	DSMZ	–	–	C ₂
10	HGB	Blood	08/1996	C ₄
21	HUAP	Catheter tip	01/1997	D ₁
33	HUCFF	Blood	01/1997	C ₁
97	HNMD	Blood	03/1999	A ₁
98	HNMD	Surgical site	03/1999	A ₂
142	HNMD	Blood	08/2002	C ₃
157	HNMD	Blood	10/2002	A ₈
451	HNMD	Urine	06/2004	A ₄
632	HNMD	Blood	02/2005	A ₇
468	HUCFF	Blood	04/2005	A ₁₁
633	HNMD	Blood	09/2005	B ₄
469	LSF	Skin wound	01/2006	C ₁
515	INTO	Blood	01/2006	B ₃
540	HNMD	Skin wound	03/2006	A ₇
541	HNMD	Blood	07/2006	A ₆
543	HNMD	Blood	12/2006	B ₄
545	HNMD	Skin wound	06/2007	B ₁
546	HNMD	Blood	06/2007	A ₃
611	HNMD	Blood	10/2007	A ₉
612	HNMD	Blood	05/2008	B ₂
619	HNMD	Blood	06/2008	A ₁₀
644	HNMD	Prosthesis secretion	09/2008	A ₅
645	IFF	Nare	10/2008	D ₁

*DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; HGB, Hospital Geral de Bonsucesso; HUAP, Hospital Universitário Antônio Pedro; HUCFF, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho; HNMD, Hospital Naval Marçílio Dias; LSF, Laboratório Sergio Franco; INTO, Instituto Nacional de Traumatologia-ortopedia; IFF, Instituto Fernandes Figueira. All hospitals are located in Rio de Janeiro, Brazil.

isolates that presented 11 pulsotypes), followed by the B genotype (five isolates, four pulsotypes), the C genotype (seven isolates, five pulsotypes) and D (two isolates within one pulsotype) (Table 2), showing a relatively low diversity within *S. lugdunensis* isolates. Similar results were obtained by Hellbacher and coworkers (2006), who analysed 39 isolates obtained from clinically significant infections. Although the isolates in our study were obtained from different patients in different hospitals during a 4-year period, 56% belonged to one predominant genotype, suggesting that low genomic variability could be characteristic for the species.

In a clinical setting, *S. lugdunensis* frequently causes illness that has been described as acute, aggressive and destructive – more in keeping with coagulase-positive staphylococci than characteristically indolent coagulase-negative staphylococcal infections, especially in endocarditis, where the majority of infections involve native or prosthetic valves, and high mortality rates (Frank *et al.*, 2008). It has been suggested that *S. lugdunensis* should be suspected when

a staphylococcal isolate shows a positive reaction for clumping factor (bound coagulase), but negative in the tube coagulase test (free coagulase) (Mateo *et al.*, 2005). However, some clinical laboratories do not perform the tube coagulase test, using only clumping factor production, colony morphology and sometimes the DNase test to characterize staphylococcal isolates. Interestingly, *S. lugdunensis* and *S. aureus* present similar colony morphology, blood-agar haemolysis and a positive reaction for clumping factor and DNase (Bannerman & Peacock, 2007). Moreover, *S. schleiferi*, a less frequent CNS species, can be clumping factor and/or coagulase test positive. These facts would contribute to misidentification of *S. lugdunensis* strains (Schnitzler *et al.*, 1998), and could explain its low isolation frequencies in clinical laboratories. In this study, all 24 *S. lugdunensis* isolates tested were coagulase-negative and positive for clumping factor and the *fbl* gene in PCR. No unspecific amplification was observed. Only *S. lugdunensis* strains were *fbl*-positive, suggesting that this gene could be used for molecular identification of *S. lugdunensis* isolates in clinical laboratories.

The enhanced virulence and destructive nature of *S. lugdunensis* are compelling reasons for the prompt identification of this organism at the species level when it is suspected during infection, especially when isolated from sterile sites (Frank *et al.*, 2008). Therefore, the PCR proposed here to identify *S. lugdunensis* isolates may be an additional tool for correct characterization of strains in a routine microbiology laboratory.

Acknowledgments

We thank Dr Walter Oelemann for his assistance in this work. This study was supported by grants from Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Universitária José Bonifácio (FUJB) and Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX).

References

- Bannerman TL & Peacock SJ (2007) *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase-positive cocci. *Manual of Clinical Microbiology* (Murray PR, Baron EJ, Tenover JC, Tenover FC, eds), pp. 390–411. ASM Press, Washington, DC.
- Barros EM, Iorio NLP, Bastos MCF, dos Santos KRN & Giambiagi-de-Marval M (2007) Species-level identification of clinical staphylococcal isolates based on polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism analysis of a partial *groEL* gene sequence. *Diagn Microbiol Infect Dis* **59**: 251–257.

- Frank KL, Del Pozo JL & Patel R (2008) From clinical microbiology to infection pathogenesis: how daring to be different works for *Staphylococcus lugdunensis*. *J Clin Microbiol* **21**: 111–133.
- Frebourg NB, Lefebvre S, Baert S & Lemeland JF (2000) PCR-based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. *J Clin Microbiol* **38**: 877–880.
- Hellbacher C, Törnqvist E & Söderquist B (2006) *Staphylococcus lugdunensis*: clinical spectrum, antibiotic susceptibility, and phenotypic and genotypic patterns of 39 isolates. *Clin Microbiol Infect* **12**: 43–49.
- Mateo M, Maestre JR, Aguilar L, Cafini F, Puente P, Sánchez P, Alou L, Giménez MJ & Prieto J (2005) Genotypic versus phenotypic characterization, with respect to susceptibility and identification, of 17 clinical isolates of *Staphylococcus lugdunensis*. *J Antimicrob Chemoth* **56**: 287–291.
- Nilsson M, Bjerketorp J, Guss B & Frykberg L (2004) A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiol Lett* **241**: 87–93.
- Schnitzler N, Meilicke R, Conrads G, Frank D & Haase G (1998) *Staphylococcus lugdunensis*: report of a case of peritonitis and an easy-to-perform screening strategy. *J Clin Microbiol* **36**: 812–813.
- 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**: 2233–2239.
- Vivoni AM, Santos KRN, de-Oliveira MP, Giambiagi-deMarval M, Ferreira ALP, Riley LW & Moreira BM (2005) Mupirocin for controlling methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: lessons from a decade of use at a university hospital. *Infect Cont Hosp Ep* **26**: 662–667.

Artigo 2: Virulence and associated clonality of *Staphylococcus lugdunensis* isolates from Rio de Janeiro hospitals

Autores: Eliezer M. Pereira, Ana Luiza M. Alvarenga, Ricardo P. Schuenck, Naira Elane M. Oliveira, Marcia Giambiagi-de-Marval, Ana Luiza M. Guaraldi & Kátia R. N. dos Santos.

Revista: *International Journal of Infectious Diseases* **(Submetido para publicação)**

Resumo:

S. lugdunensis é um SCN com considerável virulência e baixo índice de isolamento entre amostras deste grupo. No presente trabalho, foi avaliada a presença dos genes *fbl* (codifica a proteína Fbl de ligação a fibrinogênio), *slush* (codifica uma hemolisina sinérgica) e *ica* (codifica a formação de biofilme) através de PCR, bem como seus respectivos produtos em 23 amostras clínicas e na amostra tipo DSMZ 4804 de *S. lugdunensis*, associando estes resultados com a diversidade clonal bacteriana, avaliada através de PFGE. A determinação da susceptibilidade antimicrobiana também foi realizada. Todas as amostras apresentaram os genes investigados. Os produtos gênicos, detectados pela técnica molecular de *Western-blotting* (Fbl), e teste fenotípico de detecção de hemólise sinérgica (SLUSH) foram observados em todas as amostras, apesar da amostra tipo DSMZ 4804 não apresentar a hemolisina SLUSH. A formação de biofilme em placas de poliestireno foi detectada em 14 amostras (60,9%). Uma amostra apresentou resistência a meticilina e carregava o gene *mecA*, no entanto, 18 amostras (78,3%) foram sensíveis a todas as drogas testadas. De quatro perfis genotípicos encontrados, 12 (52,2%) amostras pertenciam ao mesmo genótipo e 10 (83,3%) destas eram produtoras de biofilme. Todas as amostras fortes produtoras de biofilme, incluindo três com morfologia colonial rugosa, foram incluídas no mesmo genótipo prevalente. A detecção de fatores de virulência em todas as amostras de *S. lugdunensis* avaliadas, em especial no genótipo prevalente, poderia explicar a notável habilidade deste patógeno em causar infecção agressiva como àquelas causadas por *S. aureus*.



Fwd: Manuscript submission received

1 mensagem

K tia Regina Netto dos Santos <santoskrn@micro.ufrj.br>

8 de março de 2010
13:23

----- Forwarded message -----

From: **International Journal of Infectious Diseases** <ijid@elsevier.com>

Date: 2010/3/8

Subject: Manuscript submission received

To: santoskrn@micro.ufrj.br

Article Title: Virulence and associated clonality of Staphylococcus lugdunensis isolates from Rio de Janeiro hospitals
International Journal of Infectious Diseases

08 Mar 2010

Dear Dr. dos Santos,

Your submission entitled "Virulence and associated clonality of Staphylococcus lugdunensis isolates from Rio de Janeiro hospitals" has been received by the International Journal of Infectious Diseases

You will be notified shortly of the reference number assigned to your manuscript and the name of the Corresponding Editor who will be dealing with your paper

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial Systems as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/ijid/>.

Thank you for submitting your work to the International Journal of Infectious Diseases.

Kind regards,

International Journal of Infectious Diseases

For further assistance, please visit our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

1 **Virulence and associated clonality of *Staphylococcus lugdunensis* isolates**
2 **from Rio de Janeiro hospitals**

3
4 Eliezer M. Pereira^{1,2}, Ana Luiza M. Alvarenga^{1,2}, Ricardo P. Schuenck^{1,2}, Naira Elaine M.
5 Oliveira¹, Marcia Giambiagi-de-Marval¹, Ana Luiza Mattos Guaraldi³ & Kátia R. N. dos
6 Santos¹

7
8 ¹*Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Goés, Universidade Federal do Rio de Janeiro,*
9 *Rio de Janeiro;* ²*Laboratório de Microbiologia, Instituto Federal de Educação, Ciência e*
10 *Tecnologia do Rio de Janeiro – Campus Maracanã, Rio de Janeiro;* ³*Centro Biomédico,*
11 *Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro,*
12 *Brazil*

13
14 Running title: *S. lugdunensis* isolates characterization

15
16
17 Corresponding author: Kátia R. N. dos Santos

18 Address:

19 Laboratório de Infecções Hospitalares
20 Departamento de Microbiologia Médica
21 Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes
22 CCS, Bloco I, UFRJ
23 Av. Carlos Chagas Filho, No. 373
24 Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ, Brazil
25 CEP: 21941-590
26 E-mail: santoskrn@micro.ufrj.br
27 Phone: 55-21-2260-4193
28 Fax: 55-21-2560-8028

29
30

1 **Abstract**

2 *Staphylococcus lugdunensis* is an unusually virulent coagulase-negative species,
3 which causes infection and is as aggressive as *S. aureus*. We evaluated the presence of
4 genes coding for virulence factors such as fibrinogen-binding protein (Fbl), hemolysin
5 (SLUSH) and biofilm and their respective proteins in one *S. lugdunensis* type strain and 23
6 clinical isolates from Rio de Janeiro hospitals. PFGE clonality data were associated.
7 Antimicrobial susceptibility was also evaluated by the disk-diffusion test. The PCR method
8 detected the presence of *fbl*, *slush* and *ica* virulence genes in all isolates. Protein products
9 were detected by Western-blotting, synergistic hemolytic activity and polystyrene
10 adherence in microtiter plates, respectively. All isolates produced the Fbl protein and, with
11 the exception of the type strain, all isolates also produced the SLUSH hemolysin. Fourteen
12 (60.9%) isolates produced biofilm. One isolate was methicillin-resistant and carried the
13 *mecA* gene, but 18 (78.3%) isolates were sensitive to all drugs tested. Four different PFGE
14 genotypes were detected and 12 (52.2%) isolates belonged to genotype A. Ten (83.3%) of
15 these were biofilm-producers. All strong biofilm-producing isolates, including three with
16 rough colony morphology showed the same prevalent PFGE pattern. The extensive
17 presence of virulence factors in the *S. lugdunensis* isolates evaluated, with highlight for the
18 prevalent genotype, could explain the incredible ability of this pathogen to cause infection
19 as aggressive as *S. aureus*.

20 **Key words:** *S. lugdunensis*, virulence, Fbl, SLUSH, biofilm, drug susceptibility, PFGE

21

22

23

24

25

1 **Introduction**

2 Coagulase-negative staphylococci (CNS), which often occur as skin commensals,
3 are rare opportunistic pathogens of low virulence¹. *Staphylococcus lugdunensis* was first
4 described in 1988². It colonizes the inguinal area and is an unusually virulent CNS, being
5 both a skin commensal and a pathogen responsible for nosocomial and community-
6 acquired infections. These infections can range from superficial skin lesions to life-
7 threatening endocarditis, that proceed aggressively and with a level of severity reminiscent
8 of that of *S. aureus* infections³.

9 Like *S. aureus*, this pathogen can produce clumping factor, a thermostable DNase
10 and a variable percentage of these strains produce extracellular slime, esterase, protease,
11 lipase and hemolysin⁴. The fibrinogen binding protein of *S. lugdunensis* (Fbl) was already
12 described⁵ and contributes to cell adhesion to extracellular matrix and appears to be an
13 important factor in *S. lugdunensis* endocarditis⁶. The protein is encoded by the *fbl* gene,
14 being closely related with the *S. aureus* clumping factor A⁷.

15 *S. lugdunensis* can also produce a synergistic hemolysin (SLUSH – *S. lugdunensis*
16 synergistic hemolysin) non-*agr* (*accessory gene regulator*) regulated and phenotypically
17 similar to the delta-hemolysin of *S. aureus*. Biofilm formation is widely reported in the
18 literature and has long been associated with staphylococcal virulence⁸. Like *S. aureus* and
19 *S. epidermidis*, *S. lugdunensis* is able to form biofilm, but the Poly-N-Acetylglucosamine
20 (PNAG), also called polysaccharide intercellular adhesin (PIA) and codified by the
21 *icaADBC* locus, is not the major component of *S. lugdunensis* biofilm matrix⁹.

22 In relation to genotypic diversity of strains, a few profiles have been described for
23 this staphylococcal species. In a previous work, six genotypes among 39 isolates evaluated
24 demonstrated a relatively low diversity. In Brazil, no data are available on characterization
25 of *S. lugdunensis* strains isolated from clinical specimens. In this study we evaluated by

1 molecular and phenotypic methods virulence factors in 23 *S. lugdunensis* clinical isolates
2 from Rio de Janeiro hospitals, and associated PFGE clonality data. Antimicrobial
3 susceptibility was also evaluated.

4

5 **Materials and Methods**

6

7 ***Bacterial strains***

8 We evaluated 23 *S. lugdunensis* clinical strains identified previously¹¹ from the
9 collection of the Laboratório de Infecções Hospitalares that were obtained from seven
10 hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. Some general data related to these isolates are listed in
11 Table 1.

12 The following control strains were used: *S. lugdunensis* DSMZ 4804 (type strain),
13 *S. aureus* ATCC 25923 and 29213¹²; *S. intermedius* ATCC 49052 (β -haemolysin
14 producer)¹³, *S. epidermidis* ATCC 35984 (biofilm positive control) and ATCC 12228
15 (biofilm negative control), *S. haemolyticus* ATCC 29970 (*slush* gene negative control) and
16 *E. coli* ATCC 25920 (negative control for Fbl production).

17

18 ***Detection of genes that encode virulence factors***

19 ***a) Primer design***

20 The sequences of the primers for detection of *fbl* and *ica* genes were previously
21 published^{11,14}. Primers for *slush* gene detection were designed in this study. The *slush* gene
22 sequence was obtained from GenBank sequence database (accession number: **U73444**).
23 Primers were designed by using the OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies,
24 Coralville, IA, USA) and BioEdit (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA) primer
25 specificity was tested against data base sequences using blast searches

1 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Oligonucleotides were purchased from Bioneer, Inc
2 (Alameda, CA, USA).

3 *b) DNA extraction*

4 Five to six bacterial colonies previously grown on agar base (Oxoid) supplemented
5 with 5% sheep blood were suspended in 100µl of TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 7.8)
6 buffer and heated to 100°C for 10min. After centrifugation at 20,000 x g for 30sec, the
7 supernatant was collected for the PCR reaction¹⁵.

9 *c) PCR detection*

10 PCR was performed according to published protocols for detection of a *fbl* gene
11 fragment of 425 bp¹¹ and an *ica* gene fragment of 287 bp¹⁴. For *slush* gene fragment
12 amplification, the PCR mix component concentrations were the same as used for the *fbl*
13 amplification reaction. The primers used were slush-F
14 (5'GAGGCACACAATAAAGGAG3') and slush-R (5'CCTGACATGTAAATCCACTC3').
15 The amplification conditions were: denaturation for 3min at 92°C, followed by 30 cycles of
16 92°C for 1min, 56°C for 1min and 72°C for 1min, with final extension at 72°C for 3 min. A
17 203 bp amplicon was expected. Amplified products were analyzed by 1% agarose gel
18 electrophoresis, stained with ethidium bromide and visualized on UV transilluminator

20 ***Analysis of virulence factors production***

22 *a) Fibrinogen-binding protein (Fbl)*

23 The Western-blotting technique was performed as published previously¹⁶ with
24 modifications. Membranes were incubated with *S. lugdunensis* anti-Fbl polyclonal
25 antibodies diluted 1:1000 for 2h. Immune reactivity was detected by incubation with

1 peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G diluted 1:2000 (KPL,
2 Gaithersburg MD, USA) for 40 minutes. Bound antibodies were detected using a solution
3 of DAB [3.3 Diamino benzidine tetrahydrochloride, Sigma] (0.5 mg/mL) and hydrogen
4 peroxide (0.01%) in PBS (pH=7.4).

5

6 *b) Synergic hemolysis (SLUSH)*

7 Detection of SLUSH production was performed as published previously¹³. Briefly, a
8 strain of *S. intermedius* (ATCC 49052) was streaked vertically on the center of a base agar
9 plate containing 5% of sheep blood, and test strains of *S. lugdunensis* were streaked
10 perpendicularly, without touching the *Staphylococcus intermedius* inoculum. The plates
11 were incubated aerobically at 35°C for 18 to 20 h and then kept at room temperature for 4
12 to 6 h before the reactions were read. A zone of complete hemolysis (where the test strain
13 was growing) within the zone of incomplete hemolysis caused by the beta lysin from the *S.*
14 *intermedius* growth was considered a positive test.

15

16 *c) Biofilm formation*

17 The ability of *S. lugdunensis* to attach and form biofilm on sterile 96-well polystyrene
18 microtiter plates (TPP® 92096) were tested as follows¹⁷: An aliquot of 10⁴ CFU was added
19 to 100 µL of TSB supplemented with 1% glucose (w/v), previously distributed in the
20 wells. The plates were incubated at 35°C for 24h. The contents of each well was gently
21 aspirated with a multichannel pipette and discarded, and the biofilms remained on the
22 well's surface. The plates were washed twice with Phosphate Saline Buffer (PBS) pH 7.4
23 and the adherent organisms were stained with violet crystal (2%) for 15 min. The
24 absorbance at 570 nm was determined in a Microplate Reader Benchmark (Bio-Rad). Each
25 assay was performed in triplicate and repeated three times. Strains were divided into the

1 following categories: no biofilm producer (-), weak biofilm producer (+), moderate
2 biofilm producer (++) , and strong biofilm producer (+++) , using as control the wells
3 inoculated with non-biofilm producing strain (*S. epidermidis* ATCC 12228).

4

5 ***PFGE profile analysis***

6 All *S. lugdunensis* isolates were typed by PFGE, as published previously¹¹.

7

8 ***Susceptibility tests***

9 *S. lugdunensis* isolates were evaluated by the disk diffusion test¹⁸, using the
10 antimicrobial agents chloramphenicol, ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin,
11 gentamicin, penicillin, rifampin, teicoplanin, tetracycline, trimethoprim–sulfamethoxazole
12 and vancomycin (Cecon, São Paulo, Brazil), and cefoxitin, oxacillin, linezolid, mupirocin
13 and tigecycline (Oxoid, Cambridge, UK). All results were analyzed according to pre-
14 defined guidelines¹⁸, except for mupirocin¹⁹.

15 Detection of the *mec* gene was performed by PCR¹⁵.

16

17 **RESULTS**

18 **Phenotypic and molecular analysis of virulence factors**

19 Fbl protein production was detected by Western-blot analysis using *S. lugdunensis*
20 lysates and anti-*S. lugdunensis* -Fbl polyclonal antibodies (Figure 2A). The test revealed
21 the presence of two bands (~160 and ~120 KDa) in all 23 clinical isolates and the reference
22 strain DSMZ 4804. The bands were characteristic for the Fbl precursor and Fbl,
23 respectively, as reported previously¹⁶. Protein lysates of *S. aureus* ATCC 25923, *S.*
24 *epidermidis* ATCC 12228 and *E. coli* ATCC 25922 were used as negative controls. Two

1 discrete protein bands (~60 and ~220 KDa) characteristic of *S. aureus* and *S. epidermidis*
2 were observed. All strains were positive for the *fbl* gene as shown in Table 1.

3 Detection of SLUSH production was performed using the synergic hemolysis test.
4 Figure 2B shows a plate with SLUSH producing *S. lugdunensis* isolates. All 23 *S.*
5 *lugdunensis* clinical isolates produced hemolysin and, curiously, the type strain did not
6 express SLUSH. The *slush* gene fragment was detected in all isolates (Table 1).

7 All isolates were positive by PCR for the *ica* gene. Fourteen (60.9%) clinical
8 isolates produced biofilm, 5 (21.8%) being strong biofilm-producers, 4 (17.4%) moderate
9 biofilm-producers and 5 (21.8%) weak biofilm-producers. These results are shown in Table
10 1 and Figure 2C. Three strong biofilm-producers presented rough colony morphology
11 (Figure 3).

12

13 **PFGE profile analysis**

14 Twenty different restriction profiles distributed over four genotypes (A to D) were
15 described (Table 1). PFGE patterns and the dendogram are shown in Figure 1. Genotype A
16 was the most frequent (12 isolates, 11 pulsotypes). Among the isolates from this genotype,
17 10 (83.3%) were biofilm-producers. All five strong biofilm-producers belonged to this
18 genotype.

19

20 **Susceptibility tests**

21 Eighteen (78.3%) isolates were sensitive to all drugs tested. Resistance was found
22 for five isolates, two being only resistant to penicillin, one resistant to penicillin and
23 tetracycline, one resistant to erythromycin and clindamycin (inducible phenotype detected by
24 the D test) and one resistant to oxacillin, cefoxitin, penicillin and chloramphenicol (Table 1).
25 The cefoxitin-resistant isolate carried the *mecA* gene, which was detected by PCR.

1

2 **Discussion**

3 *S. lugdunensis* is an unusually virulent CNS able to produce an arsenal of
4 substances that contribute to its virulence and aggressiveness, with an infection pattern
5 similar to that described for *S. aureus*³. Some studies have described virulence factors in *S.*
6 *lugdunensis* isolates associated with adhesion (Fbl, von Willebrand-factor binding protein
7 and biofilm production)^{5,9,16} and invasion (hemolysins, esterase, lipase and proteases)^{20,21}.
8 However, although this staphylococcal species was first described more than two decades
9 ago, virulence genes and their products in association have been rarely detected among
10 clinical isolates. In this study, we detected in all 23 *S. lugdunensis* clinical isolates
11 evaluated the *fbl*, *slush* and *ica* genes. Although 39% of the isolates did not form biofilm,
12 all expressed the Fbl and SLUSH proteins. The Fbl protein is an important adhesion factor
13 that contributes to the virulence model of *S. lugdunensis*. The exceptional ability of Fbl to
14 interact with fibrinogen was described in a recent study⁷, where the authors evaluated its
15 fibrinogen binding performance by isothermal titration calorimetry (ITC), and found it to
16 be similar to that of ClfA protein from *S. aureus*. Since all strains in our study were able to
17 produce the Fbl protein, it is possible that the protein is expressed constitutively by *S.*
18 *lugdunensis*, contributing to its adhesion in host tissues and prosthetic materials.

19 As expected, anti-*S. lugdunensis* -Fbl antibodies reacted weakly with proteins (~60
20 and ~220 KDa) of *S. aureus* and *S. epidermidis*, probably due to extensive similarity of Fbl
21 of *S. lugdunensis* with ClfA and Fbe proteins of *S. aureus* and *S. epidermidis*,
22 respectively⁵. Although the predicted molecular weight of Fbl protein is about 90 KDa the
23 signal corresponding to Fbl protein was observed in ~170 KDa. As ClfA and other
24 fibrinogen-binding proteins, Fbl migrates aberrantly in SDS-PAGE at close to twice the
25 predicted size²².

1 All strains in our study were positive for synergic hemolytic activity (SLUSH).
2 Although all strains presented the *slush* gene, firstly detected by PCR in a collection of
3 clinical isolates, the type strain DSMZ 4804 was PCR negative for SLUSH, suggesting that
4 this strain was not expressing the corresponding protein. In a previous report²³, this gene
5 was detected by southern-blotting in a group of 14 clinical strains, whereas Hebert (1990)
6 observed the SLUSH production among clinical isolates from several clinical sites. The
7 authors believe that the production of this hemolysin can be relevant for the pathogenicity
8 of *S. lugdunensis*. The SLUSH peptides share 32% homology with a part of the central
9 domain (aa 300 to 450) of the SipB invasion protein from *Salmonella typhimurium*, which
10 contains a potential membrane-spanning region, suggesting that this molecular complex
11 can be a tool for a *S. lugdunensis* infection model²¹.

12 Biofilm formation was previously characterized, either by detecting the presence of
13 the *ica* gene^{9,24} or by the detecting biofilm production on microtiter plates⁹. In this study,
14 we observed that *S. lugdunensis* is able to produce large amount of biofilm matrix. This
15 finding could explain the success of this pathogen in causing native and prosthetic valve
16 endocarditis⁶. An interesting result of our work was the isolation of strong-biofilm
17 producer strains showing a singular rough colony morphology, like *Bacillus* colonies but
18 uncommon for staphylococcal colonies, and high hydrophobicity (data not shown). To our
19 knowledge, this is the first report of this kind of staphylococcal colony morphology.
20 Further studies on these isolates are in progress in order to verify if this morphology
21 difference and/or biofilm production can influence in interaction with eukaryotic cells.
22 Biofilm production can increase bacterial adherence, invasion and persistence in the host²⁵.

23 Although the isolates in our study were obtained from patients in different hospitals
24 during a 4-year period, 56% belonged to one predominant genotype, suggesting that a low
25 genomic variability could be characteristic for this species. It is curious that among the 12

1 isolates from the prevalent genotype, 10 (83.3%) were biofilm-producers. Moreover, all
2 five strong biofilm producers found in this study were classified within this genotype,
3 suggesting an increased virulence for these isolates.

4 The almost universal sensibility to antimicrobials in *S. lugdunensis* has been shown
5 previously^{10,26}. We found low rates of resistance in the clinical isolates evaluated.
6 Interesting, one isolate carried the *mecA* gene, showing resistance to β -lactams and
7 cloramphenicol. A few publications relate the presence of *mecA* gene in *S. lugdunensis*²⁷⁻
8 ²⁹, but in Brazil, this is the first report.

9 In conclusion, we have shown that all clinical isolates of *S. lugdunensis* evaluated
10 carried the virulence markers *fbl*, *slush* and *ica* genes, and, except for biofilm production,
11 all isolates produced the associated virulence factors, which probably contribute to their
12 unusual infection course. Biofilm formation was not detected in all isolates, but its elevated
13 frequency among isolates from a prevalent genotype is relevant. Further studies related to
14 the pathogenicity of *S. lugdunensis* are necessary to understand the incredible ability of this
15 pathogen to cause aggressive infection, like *S. aureus*.

16

17 **Acknowledgments and Funding Source**

18 We thank Dr. Timothy Foster (Trinity College, Dublin, Ireland) for kindly provided
19 the Anti-Fbl antibodies and Dr. Walter Oelemann for his assistance in this work. This
20 study was supported by grants from: Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa
21 do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico
22 e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior
23 (CAPES), Fundação Universitária José Bonifácio (FUJB), and Programa de Núcleos de
24 Excelência (PRONEX).

25

1 **Conflict of Interests Statements**

2 None to declare

3

4 **Ethical Approval**

5 *In vivo* analysis using animals were not performed in this work.

6

7 **References**

8

- 9 1. Huebner J, Goldmann DA. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens.
10 *Annu Rev Med* 1999; **50**:223–236.
- 11 2. Freney J, Brun Y, Bes M, Meugnier H, Grimont F, Grimont PAD et al.
12 *Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., two
13 species from human clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol* 1988; **38**:168-72.
- 14 3. Frank KL, Del Pozo JL, Patel R. From clinical microbiology to infection
15 pathogenesis: how daring to be different works for *Staphylococcus lugdunensis*. *J*
16 *Clin Microbiol* 2008; **21**:111-33.
- 17 4. Piette A, Verschraegen G. Role of coagulase-negative staphylococci in human
18 disease. *Vet Microbiol* 2009; **134**:45-54.
- 19 5. Nilsson M, Bjerketorp J, Guss B, Frykberg L. A fibrinogen-binding protein of
20 *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiol Lett* 2004; **241**: 87-93.
- 21 6. Anguera I, Del Río A, Miró JM, Matínez-Lacasa X, Marco F, Gumá JR et al.
22 *Staphylococcus lugdunensis* infective endocarditis: description of 10 cases and
23 analysis of native valve, prosthetic valve, and pacemaker lead endocarditis clinical
24 profiles. *Heart* 1994; **91**: e10.

- 1 7. Geoghegan JA, Ganesh VK, Smeds E, Liang X, Hook M, Foster TJ. Molecular
2 characterization of the interaction of staphylococcal MSCRAMMS CLFA and FBL
3 with fibrinogen. *J Biol Chem* 2010 [Epub ahead of print]
- 4 8. Otto M. Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; **322**:207-28.
- 5 9. Frank KL, Patel R. Poly-N-acetylglucosamine is not a major component of the
6 extracellular matrix in biofilms formed by *icaADBC*-positive *Staphylococcus*
7 *lugdunensis* isolates. *Infect Immun* 2007; **75**:4728-42.
- 8 10. Hellbacher C, Törnqvist E & Söderquist B. *Staphylococcus lugdunensis*: clinical
9 spectrum, antibiotic susceptibility, and phenotypic and genotypic patterns of 39
10 isolates. *Clin Microbiol Infect* 2006; **12**:43-9.
- 11 11. Pereira EM, Oliveira FL, Schuenck RP, Zoletti GO, Dos Santos KR. Detection of
12 *Staphylococcus lugdunensis* by a new species-specific PCR based on the *fbl* gene.
13 *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010; **58**: 295-98
- 14 12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for
15 Antimicrobial Susceptibility Testing: Ninth Informational Supplement M100-S19.
16 *CLSI*, Wayne, PA, USA, 2009.
- 17 13. Hebert GA. Hemolysins and other characteristics that help differentiate and biotype
18 *Staphylococcus lugdunensis* and *Staphylococcus schleiferi*. *J Clin Microbiol* 1990;
19 **28**:2425–31.
- 20 14. Potter A, Ceotto H, Giambiagi-Demarval M, dos Santos KR, Nes IF, Bastos MC.
21 The gene *bap*, involved in biofilm production, is present in *Staphylococcus* spp.
22 strains from nosocomial infections. *J Microbiol* 2009; **47**:319-26.
- 23 15. Schuenck RP, Pereira EM, Iorio NL, dos Santos KR. Multiplex PCR assay to
24 identify methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *FEMS Immunol Med*
25 *Microbiol* 2008; **52**:431-5.

- 1 16. Mitchell J, Tristan A, Foster TJ. Characterization of the fibrinogen-binding surface
2 protein Fbl of *Staphylococcus lugdunensis*. *Microbiology* 2004; **150**: 3831-41.
- 3 17. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, Ruzicka
4 F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and
5 practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci.
6 *APMIS* 2007; **115**:891-9.
- 7 18. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for
8 Antimicrobial Disc Susceptibility Test – Tenth Edition: Approved Standards: M02-
9 A10. *CLSI*, Wayne, PA, USA, 2009.
- 10 19. Fuchs PC, Jones RN, Barry AL. Interpretive criteria for disk diffusion susceptibility
11 testing of mupirocin, a topical antibiotic. *J Clin Microbiol* 1990; **28**:608–09.
- 12 20. Lambe DW, Ferguson KP, Keplinger JL, Gemmell CG, Kalbfleisch JH.
13 Pathogenicity of *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus schleiferi*, and three
14 other coagulase-negative staphylococci in a mouse model and possible virulence
15 factors. *Can J Microbiol* 1990; **36**:455–63.
- 16 21. Donvito B, Etienne J, Greenland T, Mouren C, Delorme V, Vandenesch F.
17 Distribution of the synergistic haemolysin genes *hld* and *slush* with respect to *agr* in
18 human staphylococci. *FEMS Microbiol Lett* 1997; **151**:139-44.
- 19 22. Hartford O, Francois P, Vaudaux P & Foster TJ. The dipeptide repeat region of the
20 fibrinogen-binding protein (clumping factor) is required for functional expression of
21 the fibrinogen-binding domain on the *Staphylococcus aureus* cell surface. *Mol*
22 *Microbiol* 1997; **25**, 1065–76.
- 23 23. Donvito B, Etienne J, Denoroy L, Greenland T, Benito Y, Vandene Synergistic
24 hemolytic activity of *Staphylococcus lugdunensis* is mediated by three peptides
25 encoded by a non-*agr* genetic locus. *Infect Immun* 1997; **65**:95-100.

- 1 24. Chokr A, Watier D, Eleaume H, Pangon B, Ghnassia JC, Mack D, Jabbouri S.
2 Correlation between biofilm formation and production of polysaccharide
3 intercellular adhesin in clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *Int J*
4 *Med Microbiol* 2006; **296**:381–88.
- 5 25. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural
6 environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2004; **2**:95–108.
- 7 26. Böcher S, Tønning B, Skov RL, Prag J. *Staphylococcus lugdunensis*, a common
8 cause of skin and soft tissue infections in the community. *J Clin Microbiol* 2009;
9 **47**:946-950.
- 10 27. Kawaguchi E, Minamide W, Mori H, Igmi H. The taxonomic distribution,
11 characteristic and susceptibility against antimicrobial agents of methicillin-resistant
12 *Staphylococci* isolated from blood. *Kansenshogaku Zasshi* 1996; **70**:1147–53.
- 13 28. Tee WS, Soh SY, Lin R, Loo L. *Staphylococcus lugdunensis* carrying the *mecA*
14 gene causes catheter-associated bloodstream infection in premature neonate. *J Clin*
15 *Microbiol* 2003; **41**:519-20.
- 16 29. Tan TY, Ng SY, He J. Microbiological characteristics, presumptive identification,
17 and antibiotic susceptibilities of *Staphylococcus lugdunensis*. *J Clin Microbiol*
18 2008; **46**: 2393-5.
- 19
20
21
22
23
24
25

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1: (A) Dendrogram resulting from the computer-assisted analysis on the *S. lugdunensis* PFGE profiles. (B) PFGE genotypes of 1 *S. lugdunensis* type strain and 23 clinical strains isolated from Rio de Janeiro hospitals.

Figure 2: Analysis of virulence factors production in staphylococcal strains (A) Fbl protein detected by Western-blotting. Lines 1 - 4: *S. lugdunensis* clinical isolates; 5 and 6: – *S. aureus* (ATCC 25923) and *S. epidermidis* (ATCC 12228) strains, respectively; (B) Synergic hemolytic activity. A delta-hemolysin producer (*S. intermedius* ATCC 49052) was streaked perpendicularly to the strains; Lines 1 and 2: SLUSH producer *S. lugdunensis* strains; Lines 3 and 4: SLUSH non-producer strains (*S. lugdunensis* type strain and *S. aureus* ATCC 25923, respectively). (C) Biofilm formation analysis on polystyrene plate in 1 type and 23 clinical strains of *S. lugdunensis* and *S. epidermidis* (ATCC 35984, biofilm producer and ATCC 12228, non- biofilm-producer).

Figure 3: Colony morphology of smooth (A) and rough colonies (B) of *S. lugdunensis* strong biofilm-producer clinical strains that were clustered in genotype A.

FIGURE 1

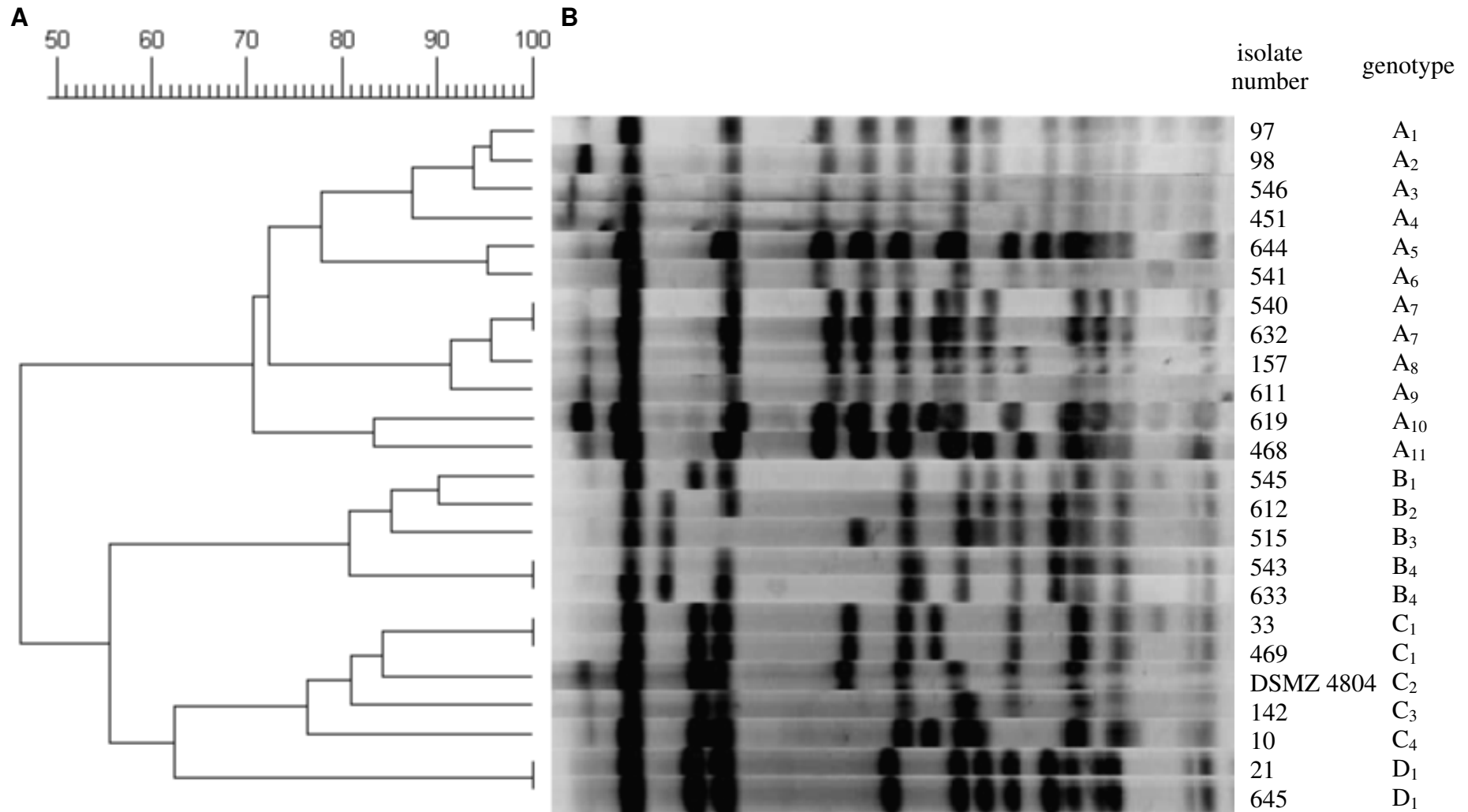


FIGURE 2

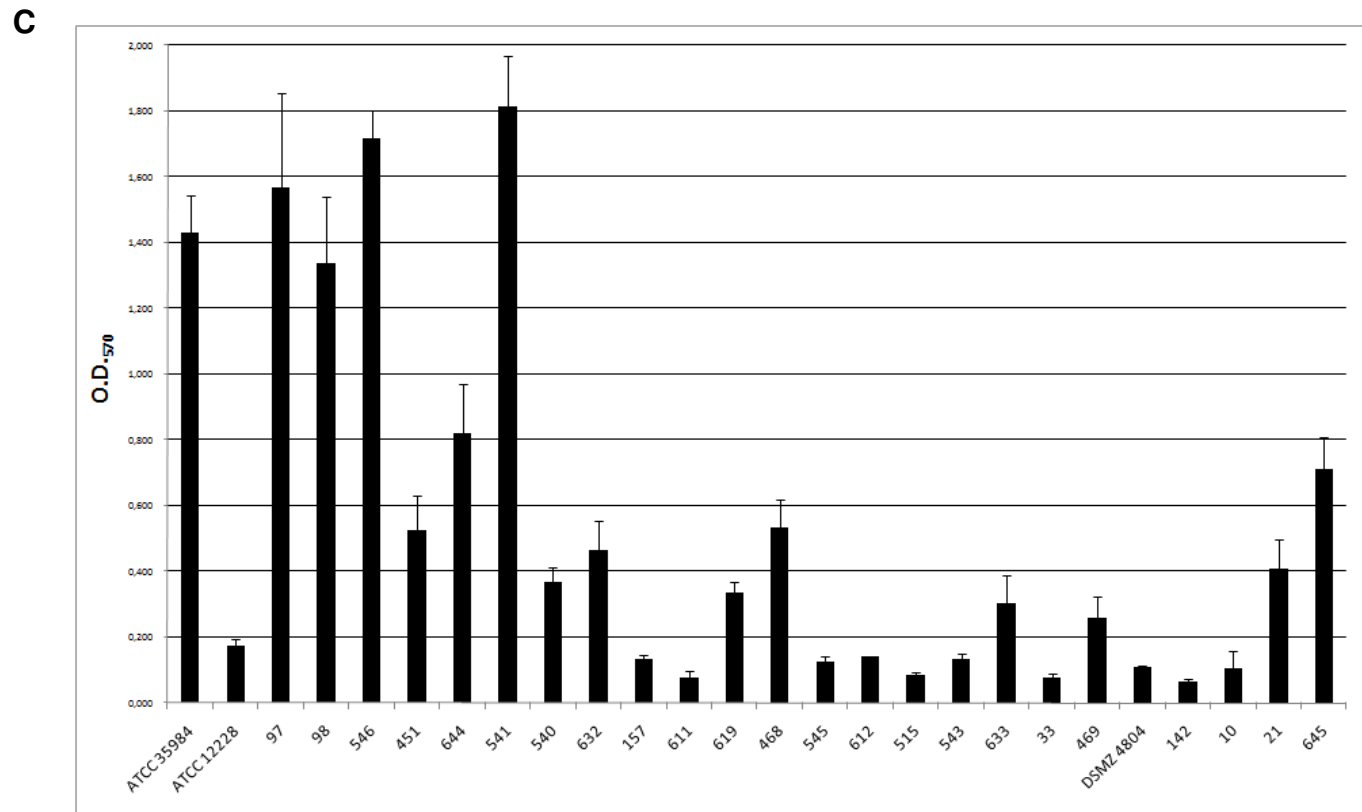
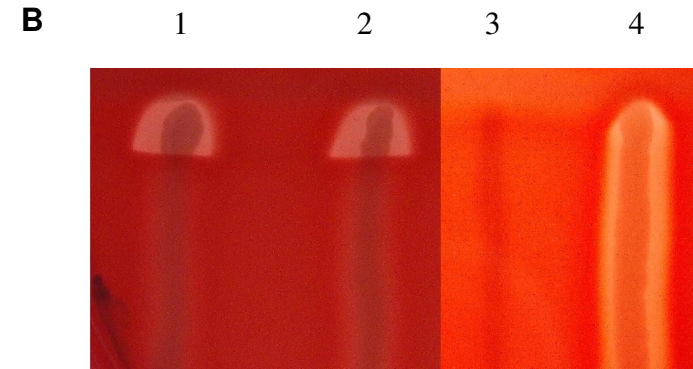
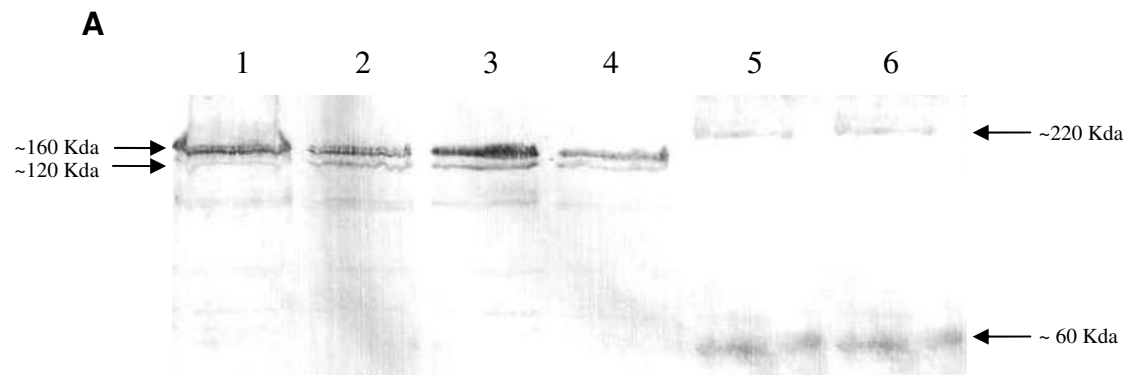


FIGURE 3

A



B

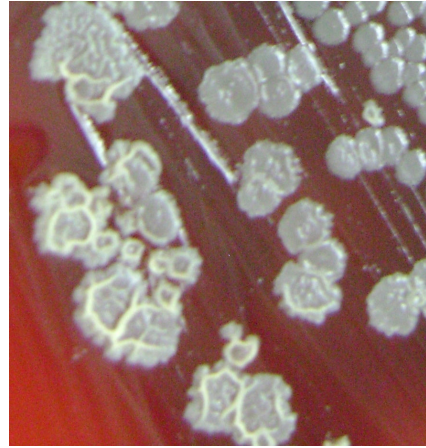


Table 1 – Antimicrobial susceptibility and virulence factors related to 24 *Staphylococcus lugdunensis* isolates clustered according to PFGE types

Isolate no.	Origin	Clinical specimen	Isolation date (month/year)	Resistance patterns	Virulence patterns						PFGE patterns
					Fbl ^a		SLUSH ^b		Biofilm formation		
					<i>fbl</i> <i>gene</i>	Phenotypic expression ^c	<i>slush</i> <i>gene</i>	Phenotypic expression ^d	<i>ica gene</i>	Phenotypic expression ^e	
97	HNMD	Blood	03/1999	- ^g	+	+	+	+	+	+++	A ₁
98	HNMD	Surgical site	03/1999	-	+	+	+	+	+	+++	A ₂
546	HNMD	Blood	06/2007	-	+	+	+	+	+	+++	A ₃
451	HNMD	Urine	06/2004	-	+	+	+	+	+	++	A ₄
644	HNMD	Prosthesis secretion	09/2008	-	+	+	+	+	+	+++	A ₅
541	HNMD	Blood	07/2006	-	+	+	+	+	+	+++	A ₆
540	HNMD	Skin wound	03/2006	TET, PEN	+	+	+	+	+	+	A ₇
632	HNMD	Blood	02/2005	PEN	+	+	+	+	+	++	A ₇
157	HNMD	Blood	10/2002	-	+	+	+	+	+	-	A ₈
611	HNMD	Blood	10/2007	-	+	+	+	+	+	-	A ₉
619	HNMD	Blood	06/2008	-	+	+	+	+	+	+	A ₁₀
468 ^f	HUCFF	Blood	04/2005	OXA, FOX, PEN, CLO	+	+	+	+	+	++	A ₁₁
545	HNMD	Skin wound	06/2007	-	+	+	+	+	+	-	B ₁
612	HNMD	Blood	05/2008	-	+	+	+	+	+	-	B ₂
515	INTO	Blood	01/2006	-	+	+	+	+	+	-	B ₃
543	HNMD	Blood	12/2006	-	+	+	+	+	+	-	B ₄
633	HNMD	Blood	09/2005	-	+	+	+	+	+	+	B ₄
33	HUCFF	Blood	01/1997	-	+	+	+	+	+	-	C ₁
469	LSF	Skin wound	01/2006	ERI, CLI (D+)	+	+	+	+	+	+	C ₁
4804	DSMZ	-	-	-	+	+	+	-	+	-	C ₂
142	HNMD	Blood	08/2002	-	+	+	+	+	+	-	C ₃
10	HGB	Blood	08/1996	PEN	+	+	+	+	+	-	C ₄
21	HUAP	Catheter tip	01/1997	-	+	+	+	+	+	+	D ₁
645	IFF	Nare	10/2008	-	+	+	+	+	+	++	D ₁

DSMZ = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; HGB = Hospital Geral de Bonsucesso; HUAP = Hospital Universitário Antônio Pedro; HUCFF = Hospital Universitário Clementino Fraga Filho; HNMD = Hospital Naval Marcílio Dias; LSF = Laboratório Sergio Franco; INTO = Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia; IFF = Instituto Fernandes Figueira. All hospitals are located in Rio de Janeiro state, Brazil; a – Fibrinogen-binding protein; b – Synergistic haemolysin; c – determined by Western-blotting analysis; d – determined by synergic haemolysis assay; e – determined by microtiter-plate method: no biofilm producer (-), weak biofilm producer (+), moderate biofilm producer (++), and strong biofilm producer (+++); f – *S. lugdunensis* isolate carrying the *meA* gene; g – susceptibility to all 13 drugs evaluated.

Artigo 3: Methicillin-resistant *Staphylococcus lugdunensis* carrying SCCmec type V misidentified as MRSA.

Autores: Eliezer M. Pereira; Ricardo P. Schuenck, Simone A. Nouér & Kátia R.N. dos Santos.

Revista: Journal of Medical Microbiology (**Submetido para publicação – carta em anexo**)

Resumo:

Staphylococcus lugdunensis é um SCN raro, capaz de causar infecções que lembram *S. aureus* em seu curso clínico, devido à presença de vários fatores de virulência em comum. Nesse estudo é descrito um caso de bacteriemia causado por uma amostra de *S. lugdunensis* portadora do gene *mecA*, identificado erroneamente como MRSA (*S. aureus* resistente a meticilina) no hospital de origem. Apesar da amostra ser positiva para o teste de fator *clumping*, a coagulase não foi detectada. A identificação foi confirmada pelo teste fenotípico de descarboxilação da ornitina e pela detecção do gene *fbl* por PCR, caracterizando a amostra como *S. lugdunensis*. A CMI para oxacilina foi 16 µg/mL e o gene *mecA* e o SCCmec tipo V foram detectados por PCR. A vancomicina foi utilizada na terapia, porém a paciente veio a falecer em decorrência da patologia de base. Este é o primeiro caso relatado na literatura de infecção por *S. lugdunensis* carreando o SCCmec tipo V e identificado erroneamente como MRSA, demonstrando que é importante a identificação correta da espécie.

De: submit.jmm@sgm.ac.uk ()
Para: Kátia Regina Netto dos Santos
Data: Terça-feira, 9 de Fevereiro de 2010 12:41:28
Cc: Eliezer Menezes Pereira; Ricardo Pinto Schuenck; Simone Aranha Nóuer
Assunto: JMM paper no. JMM/2010/019562 - Manuscript submission

Dear Professor Dr Kátia Regina Netto dos Santos

JMM paper no. JMM/2010/019562: Methicillin-resistant *Staphylococcus lugdunensis* carrying SCCmec type V misidentified as MRSA

Receipt of your submission to JMM is acknowledged. You will receive a confirmatory message from the Editorial Office when your paper has been checked and assigned to an Associate Editor.

Please note that future correspondence will be sent to the Corresponding author only.

IMPORTANT:

(i) Papers in Press

The journal has a Papers in Press feature where accepted manuscripts appear online in an unedited format before they are scheduled to appear in print. Unless you inform us otherwise, we will assume that you agree to your manuscript being used in this way.

Please make sure you check the details you have entered into the Bench>Press site very carefully, particularly the manuscript title, subject category and author details, as these will be used to generate the Papers in Press record. The final PDF used for the peer-review of a paper that is subsequently accepted will be the version of the manuscript used for Papers in Press.

(ii) Copies of files

If your paper is rejected, withdrawn or deleted the source files will automatically be deleted from the system. Please make sure you keep your own copies of any files you upload to the site.

This is an automated message: please do not reply to it.

Journal of Medical Microbiology Editorial Office
Society for General Microbiology, Marlborough House, Basingstoke Road, Spencers Wood, Reading RG7 1AG, UK

Phone: +44 118 988 1800. Fax: +44 118 988 1834. jmm@sgm.ac.uk <http://jmm.sgmjournals.org/>
<http://www.sgm.ac.uk/>

Society for General Microbiology. Registered as a Charity in England and Wales, no. 264017. A charity registered in Scotland, no. SC039250.
Company Limited by Guarantee. Registered in England No. 1039582. Registered Office as above.

1 CASE REPORT

2
3 **Methicillin-resistant *Staphylococcus lugdunensis* carrying SCCmec type V**
4 **misidentified as MRSA**

5
6 †Eliezer M. Pereira^{1,3}; †Ricardo P. Schuenck¹, Simone A. Nouér² & Kátia R.N. dos
7 Santos^{1*}.

8
9 ¹ *Laboratório de Infecção Hospitalar, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes,*
10 *Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil*

11 ² *Faculdade de Medicina and Hospital Universitário Clementino Fraga Filho,*
12 *Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil*

13 ³ *Laboratório de Microbiologia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do*
14 *Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil*

15 †**The authors contributed equally for this work**

16
17 Running title: methicillin-resistant *Staphylococcus lugdunensis*

18
19 * To whom correspondence should be addressed

20 Address:

21 Laboratório de Infecção Hospitalar

22 Departamento de Microbiologia Médica

23 Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, CCS, Bloco I, UFRJ

24 Av. Carlos Chagas Filho, No. 373

25 Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, CEP: 21941-590

26 Phone: 55-21-2560-8344 / 135 Fax: 55-21-2560-8028

27 E-mail: santoskrn@micro.ufrj.br

1 **Abstract**

2 *Staphylococcus lugdunensis* is a rare cause of severe infections and clinical manifestations
3 are similar to those related to *S. aureus*. We describe a hospital-acquired bacteremia due to
4 methicillin-resistant *Staphylococcus lugdunensis*, misidentified as methicillin-resistant *S. aureus*.
5 The oxacillin MIC was 16 µg/mL and the *mecA* gene and SCCmec type V were determined by
6 PCR. Although treatment had been appropriated, the patient died after rapid progressive
7 respiratory failure and another nosocomial sepsis. It is important not only to identify *S.*
8 *lugdunensis* in view of its clinical course, but also to determine its susceptibility to oxacillin by
9 detecting the *mecA* gene or its product.

10 *Key words:* *Staphylococcus lugdunensis*, methicillin resistance, SCCmec V, bacteremia

11

12 **CASE REPORT**

13

14 A 73-year old female with systemic arterial hypertension and chronic obstructive
15 pulmonary disease (COPD) gold IV was admitted to the Emergency Department of the
16 University Hospital ‘Clementino Fraga Filho’ (HUCFF), in March 2005. HUCFF, a
17 tertiary-care teaching hospital with 490 beds, is affiliated to the Federal University of Rio
18 de Janeiro, Rio de Janeiro city, Brazil. The patient had asthenia, cough, fever, purulent
19 secretions and worsening of dyspnea, but the chest X-ray showed no pulmonary infiltrates.
20 Diagnosis of acute exacerbation and upper respiratory infection were made.
21 Bronchodilators, glucocorticoids, gatifloxacin and non-invasive ventilation were initiated.
22 Respiration did not recover, and mechanical ventilation was needed. After completing the
23 course of antimicrobial therapy the patient recovered. However, two cultures from blood
24 collected at day 7 of therapy detected Gram positive bacteria. Bacterial contamination of

1 blood was initially suspected since the patient had improved and precise identification of
2 the sites of blood collection was not possible. Initially, methicillin-resistant *S. aureus*
3 (MRSA) and *Streptococcus alpha hemolytic* were identified in the hospital laboratory three
4 days after blood collection and the strains were sent to our laboratory for confirmation.
5 After the initial clinical improvement, the patient presented fever, leucocytosis and
6 hypotension. The central line catheter was removed, and vancomycin and amikacin were
7 included in the treatment, according to the local microbiology pattern and the previous
8 isolation. The nosocomial sepsis was probably related to the central line catheter (Mermel
9 *et al.*, 2009), although abdominal images were not performed. The transthoracic
10 echocardiogram result was normal. Another set of blood cultures drawn on the day when
11 sepsis was diagnosed detected *Escherichia coli* and *S. epidermidis*. The patient had fast
12 and progressive respiratory failure and despite intense medical treatment she expired on
13 day 18 of hospitalization.

14 The isolate obtained from the first blood culture was characterized as MRSA in
15 hospital laboratory by VITEK (BioMerieux). Gram staining, catalase test and latex
16 agglutination clumping factor and DNase detection were performed as complementary
17 tests. Antimicrobial susceptibility testing (VITEK, BioMerieux) revealed resistance to
18 oxacillin, penicillin and cloramphenicol.

19 In our laboratory, the isolate presented slightly yellow colonies and showed beta-
20 hemolysis on sheep blood agar. It gave a positive reaction for clumping factor, but the tube
21 coagulase test was negative. Then, the isolate was evaluated using the method based on the
22 conventional reference tests (Pereira *et al.*, 2009) and the ornithine decarboxylase
23 production, an enzyme produced only by *S. lugdunensis* strains (Herchline & Ayers, 1991).
24 To confirm the species identification, the *fbl* gene, which encodes a fibrinogen binding
25 protein of *S. lugdunensis* was amplified by PCR according to Pereira and coworkers

1 (2009). A 425 bp amplicon was obtained after PCR amplification of template DNA
2 extracted from reference strain *S. lugdunensis* DSMZ 4804 and the clinical isolate.
3 Antimicrobial susceptibility was evaluated according to CLSI guidelines. The isolate was
4 resistant to oxacillin, ceftazidime, penicillin and cloramphenicol by disk diffusion test.
5 Oxacillin MIC, determined by the E-test method, was 16 µg/mL. Initially, the *mecA* gene
6 was detected by PCR, and the SCC*mec* typing was performed by multiplex PCR of the *ccr*
7 type and *mec* class, using the method described by Kondo and coworkers (2007). The
8 isolated was *ccr* type 5 and *mec* class C, characterizing the SCC*mec* type V. The 804 bp
9 amplicon (corresponding to *ccr5* gene) and 518 bp (corresponding to class C *mec* gene)
10 generated in PCR reaction were confirmed by sequencing and comparison with GenBank
11 database.

12 This is the first case reported of a methicillin-resistant *S. lugdunensis* (MRSL)
13 isolate carrying the SCC*mec* type V causing a systemic infection. To our knowledge, this is
14 the fourth manuscript in the literature describing *S. lugdunensis* carrying the *mecA* gene.
15 Kawaguchi and coworkers, in 1996, detected the *mecA* gene in one of two strains of *S.*
16 *lugdunensis* isolated from blood during a laboratorial surveillance in Japan, but no
17 description of clinical infection was provided by them. In 2003, Tee and coworkers
18 reported a case of MRSL causing bloodstream infection in a neonate. In 2008, Tan, Ng and
19 He found five (4.7%) *S. lugdunensis* strains carrying the *mecA* gene in a collection of 106
20 clinical isolates. In Brazil, this is a first report of a MRSL isolate.

21 *S. lugdunensis* was firstly described by Freney (1988) and is associated with several
22 infections, mainly skin/soft tissues infections and endocarditis (Frank, Del Pozo & Patel,
23 2008). In a clinical setting it frequently causes illness that has been described as acute,
24 aggressive and destructive - more in keeping with coagulase-positive staphylococci than
25 characteristically indolent coagulase-negative staphylococcal infections, especially

1 endocarditis, where the majority of infections involve native or prosthetic valves, being the
2 mortality rates high (Ebright, Penugonda & Brown, 2004). Therefore, its aggressive nature
3 resembles *S. aureus*. *S. lugdunensis* should be suspected when a staphylococcal isolate is
4 positive in the clumping factor test but negative in the tube coagulase test (Tee *et al.*,
5 2003). The isolation rates of *S. lugdunensis* are about 10% for non-*S. epidermidis*
6 coagulase negative isolates (Herchline & Ayers, 1991). However, in a recent study, Böcher
7 and coworkers (2009) showed that the misidentification of *S. lugdunensis* could be
8 contributing to this low rate. They improved the identification of *S. lugdunensis* using the
9 Columbia sheep-horse agar inoculation as an additional test. To reinforce this fact we
10 evaluated the bacterial diagnostic provided for 5360 blood cultures performed in our
11 hospital, between 2000 and 2009 (data not shown). No *S. lugdunensis* isolate was detected,
12 suggesting that this pathogen is being misidentified.

13 In the present case reported we observed a clear misidentification of a MRSL
14 isolate as community MRSA. Both species present similar colony morphology and blood-
15 agar hemolysis. Interestingly, in addition to being positive by the clumping factor
16 agglutination test, *S. lugdunensis* strains are also positive for DNase, like *S. aureus* strains.
17 This shows the importance to employ tube coagulase testing for staphylococcal
18 characterization. For confirmation the ornithine-decarboxylase test is also important, since
19 *S. lugdunensis* is the only staphylococcus positive in this assay. The susceptibility pattern
20 of the isolate indicated a community-associated pathogen. Only resistance for β -lactams
21 and cloramphenicol were observed. Moreover, this non-multiresistance has been related to
22 the SCCmec type V, often found in community isolates. This case report confirms the
23 isolation of non-multiresistant *S. lugdunensis* carrying the SCCmec V as a cause of a
24 serious hospital-acquired infection and was misdiagnosed as non-multiresistant MRSA in a
25 setting with nosocomial transmission of the latter.

1 REFERENCES

2
3 **Böcher, S., Tønning, B., R.L. Skov & Prag J.** (2009). *Staphylococcus lugdunensis*, a
4 common cause of skin and soft tissue infections in the community. *J Clin Microbiol* **47**,
5 946-950.

6
7 **Ebright, J. R., Penugonda N. & Brown, W.** (2004). Clinical experience with
8 *Staphylococcus lugdunensis* bacteremia: a retrospective analysis. *Diagn Microbiol*
9 *Infec Dis* **48**, 17-21.

10
11 **Frank, K. L., Del Pozo, J. L. & Patel, R.** (2008). From clinical microbiology to
12 infection pathogenesis: how daring to be different works for *Staphylococcus*
13 *lugdunensis*. *Clin Microbiol Rev* **21**, 111-133.

14
15 **Freney, J., Brun, Y., Bes, M., Meugnier, H., Grimont, F., Grimont, P. A. D., Nervi**
16 **C., & Fleurette, J.** (1988). *Staphylococcus lugdunensis* and *Staphylococcus schleiferi*
17 sp. nov, two species from human clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol* **38**, 168-72.

18
19 **Herchline, T. E. & Ayers, L. W.** (1991). Occurrence of *Staphylococcus lugdunensis*
20 in consecutive clinical cultures and relationship of isolation to infection. *J Clin*
21 *Microbiol* **29**, 419-421.

22
23 **Kawaguchi, E., Minamide, W., Mori, H. & Igmi, H.** (1996). The taxonomic
24 distribution, characteristic and susceptibility against antimicrobial agents of
25 methicillin-resistant *Staphylococci* isolated from blood. *Kansenshogaku Zasshi* **70**,
26 1147–1153.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

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

Mermel, L. A., Allon, M., Bouza, E., Craven, D. E., Flynn, P., O'Grady, N. P., Raad, I. I., Rijnders, B. J., Sherertz, R. J. & Warren, D. K. (2009). Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **49**, 1-45.

Pereira, E. M., Oliveira, F. L., Schuenck, R. P., Zoletti, G. O. & dos Santos K. R. (2009) Detection of *Staphylococcus lugdunensis* by a new species-specific PCR based on the *fbl* gene. *FEMS Immunol Med Microbiol*. Epub ahead of print.

Tan, T. Y., Ng, S. Y. & He, J. (2008). Microbiological characteristics, presumptive identification, and antibiotic susceptibilities of *Staphylococcus lugdunensis*. *J Clin Microbiol* **46**, 2393-2395.

Tee, W. S., Soh, S. Y., Lin, R. & Loo, L. (2003). *Staphylococcus lugdunensis* carrying the *mecA* gene causes catheter-associated bloodstream infection in premature neonate. *J Clin Microbiol* **41**, 519-520.

Artigo 4: *Staphylococcus lugdunensis* presenting rough colony morphology is able to adhere and invade lung epithelial cells like *Staphylococcus aureus*

Autores: Eliezer M. Pereira, Cesar Augusto A. Teixeira, Ana Luiza M. Alvarenga, Ricardo P. Schuenck, Carla Holandino, Ana Luiza M. Guaraldi & Kátia R. N. dos Santos.

Revista: Manuscrito em preparação

Resumo:

Staphylococcus lugdunensis é reconhecido como um patógeno humano importante, causando principalmente endocardites valvares clinicamente agressivas, semelhante às causadas por *S. aureus*. Neste trabalho foi avaliada a capacidade de adesão e invasão de amostras clínicas de *S. lugdunensis*, incluindo amostras formadoras de biofilme e com morfologia rugosa, utilizando células epiteliais pulmonares A549. Adicionalmente, foi avaliada a composição do biofilme bacteriano, cujo ensaio de desagregação foi realizado em placas de poliestireno de 96 poços, utilizando metaperiodato de sódio (desagregador de biofilme glicídico) e as enzimas proteolíticas proteinase K e tripsina (desagregadoras de biofilme protéico). A composição do biofilme foi demonstrada como sendo protéica. Apenas a amostra rugosa de *S. lugdunensis* foi capaz de aderir e invadir células epiteliais A549, similar ao observado com amostras de *S. aureus* ($p=1,000$). Essas amostras também produziram um tipo de biosurfactante quando em solução com n-hexadecano. Aderência e invasão significativas não foram observadas nas demais amostras, independente da formação de biofilme ou clonalidade, mostrando que a rugosidade colonial está associada com a capacidade de aderência e invasão deste patógeno em células humanas.

1 **RESEARCH PAPER**

2
3 ***Staphylococcus lugdunensis* presenting rough colony morphology is able to adhere and**
4 ***invade lung epithelial cells like Staphylococcus aureus***

5
6 †Eliezer M. Pereira^{1,2}, †Cesar Augusto A. Teixeira³, Ana Luiza M. Alvarenga^{1,2}, Ricardo P.
7 Schuenck¹, Carla Holandino³, Ana Luiza de Mattos-Guaraldi⁴ & Kátia R. N. dos Santos¹

8
9 ¹*Laboratório de Infecção Hospitalar, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Goés,*
10 *Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro;* ²*Laboratório de Microbiologia,*
11 *Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro – Campus*
12 *Maracanã, Rio de Janeiro;* ³*Laboratório Multidisciplinar de Ciências Farmacêuticas,*
13 *Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro;* ⁴*Centro Biomédico,*
14 *Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Brazil*

15
16
17 †**The authors contributed equally for this work**

18
19 Running title: *S. lugdunensis* interaction with epithelial cells

20
21 Corresponding author: Kátia R. N. dos Santos

22 Address:

23 Laboratório de Infecções Hospitalares
24 Departamento de Microbiologia Médica
25 Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes
26 CCS, Bloco I, UFRJ
27 Av. Carlos Chagas Filho, No. 373
28 Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ, Brazil
29 CEP: 21941-590
30 E-mail: santoskrn@micro.ufrj.br
31 Phone: 55-21-2260-4193
32 Fax: 55-21-2560-8028

33

1 **ABSTRACT**

2

3 *Staphylococcus lugdunensis* has been recognized as an important human pathogen,
4 causing especially endocarditis of native or prosthetic valves. In this study we evaluated
5 biofilm-compositon and ability to adhere and invade human epithelial lung cells of five
6 hospital isolates analyzed previously, including one that formed rough colonies.
7 Detachment assay was performed using sodium metaperiodate or proteolytic enzymes to
8 analyze the biofilm composition, whereas A549 cells monolayers were used in adherence
9 and invasion tests. Two biofilm producer isolates analyzed showed protein-mediated
10 biofilm. Only the *S. lugdunensis* isolate that formed rough colonies was able to adhere and
11 invade A549 cells at the same proportion as that observed for a *S. aureus* isolate ($p=1.000$).
12 No significant adhesion or invasion was observed for the other isolates evaluated,
13 independent of biofilm-production or clonality. Our results show that despite different
14 virulence factors, including ability to form biofilm, had just been observed in *S.*
15 *lugdunensis* isolates, the characteristic of a rough colony surface was a differential marker
16 for the isolate that was able to adhere and invade human cells.

17

18

19 **Key words:** *S. lugdunensis*, adherence, invasion, biofilm-composition, lung epithelial
20 cells.

21

22 **INTRODUCTION**

23 *Staphylococcus lugdunensis* is a coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS) that has
24 emerged as a recognized important human pathogen, causing occasionally serious
25 infections like a highly destructive form of native valve endocarditis (Anguera *et al*, 2005;

1 Frank, del Pozo & Patel, 2008). Like *Staphylococcus aureus*, this organism may express
2 several virulence components, such as fibrinogen-binding protein, hemolysins and biofilm-
3 production (Donvito *et al.*, 1997; Mitchell, Tristan & Foster, 2004; Frank & Patel, 2007;
4 Pereira *et al.*, 2010).

5 According to Otto (2008), biofilm production is an important factor in
6 staphylococcal pathogenesis. The major component is staphylococcal biofilm are Poly-*N*-
7 acetylglucosamine (PNAG) or polysaccharide intercellular adhesin (PIA), a protein coded
8 by the *icaADBC* locus (Otto, 2008). However, in *S. lugdunensis* species the biofilm seems
9 to be constituted of protein (Frank & Patel, 2007). The ability of *S. aureus* to produce
10 protein-mediated biofilm is reported in literature, and is associated with the presence of
11 *bap* gene (Cucarella *et al.*, 2004). Biofilm production is also an important factor which can
12 enhance bacterial adherence and consequently invasion in host tissue. This correlation has
13 been described for some pathogenic bacteria, such as *S. aureus* (Amaral *et al.*, 2005),
14 *Moraxella* (Perez-Vidakovics & Riesbeck, 2009) and *Escherichia coli* (Martinez-Medina
15 *et al.*, 2009). The ability to adhere to and invade eukaryotic cells is also extensively
16 described for *S. aureus* (de Bentzmann *et al.*, 2004; Karazaum *et al.*, 2008). Additionally,
17 Amaral and coworkers (2005) showed the enhanced ability of epithelial cell invasion by
18 the prevalent genotype of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) isolated from Brazilian
19 hospitals. Only one report describes the analysis of *S. lugdunensis* interaction with
20 eukaryotic cells, but the authors only evaluated the loss of viability of fibroblasts in a
21 monolayer after exposure to clinical isolates (You *et al.*, 1999).

22 Recently, we found 14 biofilm-producers among 23 Brazilian *S. lugdunensis*
23 hospital isolates (Pereira *et al.*, 2010). Three of them were strong biofilm-producer isolates
24 and presented an interesting variant in colony morphology, similar to *Bacillus* colonies,
25 rough and hydrophobic. In the present work, we selected some of these isolates to evaluate

1 their biofilm-composition and ability to adhere and to invade human respiratory epithelial
2 cells, comparing with an invasive MRSA belonging to the prevalent Brazilian genotype.

3 4 **MATERIALS AND METHODS**

5 6 ***Bacterial strains***

7 In this study we evaluated five *S. lugdunensis* isolates from Rio de Janeiro hospitals
8 and characterized previously by our group (Pereira et al, 2010). Characteristics associated
9 with these isolates are listed in Table 1. Two of these isolates were strong biofilm
10 producers and one of them presented rough colony morphology and high hydrophobicity.

11 12 ***Biofilm detachment assay***

13 Biofilms formed by two strong biofilm producing *S. lugdunensis*, isolates 546 and 541,
14 presenting rough and smooth colony morphology, respectively (Table 1) were evaluated to
15 verify if they were carbohydrate or protein-mediated. Biofilm detachment assay was
16 performed according Frank & Patel (2007). Briefly, after biofilm formation by the isolates
17 in 96-well polystyrene microtiter plates (TPP® 92096), three different reagents were added
18 to provoke its detachment: 40 mM sodium metaperiodate (NaIO₄) (Vetec, São Paulo,
19 Brazil) in water; 100 µg/mL proteinase K in 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) or 10 U/mL trypsin
20 in 10 mM Tris-HCl (pH 7.5). Heat-inactivated proteinase K and trypsin (by boiling for 40
21 min) were also added as controls. *S. epidermidis* ATCC 35984 (a well characterized
22 carbohydrate biofilm-producer, *ica* positive, *bap* negative) and *S. aureus* V389 (protein-
23 mediated biofilm-producer, *ica* negative, *bap* positive) (Cucarella *et al.*, 2001) were used
24 as controls. All tests were performed in triplicate.

25

1 ***Adherence and invasion assays***

2 Adherence and invasion ability of the *S. lugdunensis* isolates (Table 1) was evaluated
3 according to Menzies & Kourteva (2000) using the human lung carcinoma cell line A549
4 (ATCC CCL-185). This cell line presents many of the characteristics of type II alveolar
5 epithelial cells, with modifications. One milliliter of a cell suspension in Dulbecco's
6 Modified Eagle Medium (DMEM) at a concentration of 5×10^5 cells/mL were plated in 24-
7 well cell tissue plates (TPP® 92024) and incubated for 24 h at 37°C in a 5% CO₂
8 atmosphere to obtain semiconfluent monolayers. Cells were washed once with sterile
9 phosphate saline buffer (PBS, pH 7.4), and 1 mL of each bacterial suspension in DMEM
10 (10^7 CFU/mL) was added to the wells containing A549 monolayers and incubated for 2
11 hours at 37°C in 5% CO₂. After this period, the supernatants were discarded after
12 collecting aliquots for bacterial quantification. Monolayers were washed twice with sterile
13 PBS, pH 7.4. To quantify adherent and internalized bacteria, monolayers were lysed using
14 sterile Triton X-100 0.1% solution and aliquots were obtained for bacterial counts. This
15 assay differentiates between adherent and invasive bacteria. To quantify only invasive
16 bacteria, epithelial cells were treated with lysostaphin (10 µg/mL) and lysozyme (0.5
17 mg/mL) for 60 min to kill extracellular bacteria, before cell lysis. *S. aureus* HU25 (MRSA
18 ST239 – prevalent genotype in Brazilian hospitals) (Vivoni *et al.*, 2006) was used as
19 positive control for adhesion and invasion tests. Assays were performed in triplicate.

20 For a qualitative morphological analysis of bacteria-cell interaction, the cells were
21 prepared as described above, stained by the May-Grunwald-Giemsa method and examined
22 under a light microscope (Carl Zeiss, Thornwood, USA) at 100x magnification.

23
24
25

1 ***Statistical analysis***

2 All results are shown as means of three independent experiments with respective
3 standard deviations, unless otherwise indicated. Data were analyzed by ANOVA and
4 Student's t-tests for statistical significance assessment of the differences, which was
5 considered when $p < 0.05$.

6

7 **RESULTS**

8

9 ***Biofilm detachment assay***

10 Biofilm detachment results are shown in Figure 1. The strong biofilm producing *S.*
11 *lugdunensis* clinical isolates 546 (rough morphology) and 541 (smooth morphology)
12 produced protein-mediated biofilms. The results were similar to those found for *S. aureus*
13 V389 (protein-mediated biofilm-producer) and different to *S. epidermidis* ATCC 35984
14 (carbohydrate-mediated biofilm-producer). Treatment with sodium metaperiodate was not
15 able to detach biofilms produced by these isolates, while proteolytic enzymes were
16 effective in detaching this bacterial component, showing statistically significant results
17 ($p < 0,05$). Moreover, incubation with pre-heated proteolytic enzymes, indicated a proteic
18 nature of the *S. lugdunensis* biofilm.

19

20 ***Adherence and Invasion assays***

21 Five *S. lugdunensis* isolates were evaluated by the adherence and invasion assays,
22 three non-biofilm producers and two strong biofilm producers. One biofilm producing
23 isolate (isolate 546), which also presented rough colony morphology was the only one able
24 to adhere and invade A549 cells at the same proportion as *S. aureus* HU25 isolate (p
25 $=1.000$), as shown in Figure 2A. All other *S. lugdunensis* isolates evaluated (isolates 541,

1 611, 612 and 142) showed low adherence and invasion in comparison to 546 and HU25 (*S.*
2 *aureus*) ($p < 0.005$). Figure 2B shows adhesion of HU25 and 546 isolates analyzed by
3 optical microscopy, using Giemsa staining. *S. aureus* adheres homogeneously all over the
4 cell surface, while *S. lugdunensis* adheres as a local aggregate on the eukariotic cell
5 membrane

6

7 **DISCUSSION**

8 The unusual virulence of *S. lugdunensis* in comparison to other CNS species can
9 contribute to its aggressiveness in an infection pattern similar to that described for *S.*
10 *aureus* (Frank, del Pozo & Patel, 2008). Some authors have described the ability of *S.*
11 *lugdunensis* to cause abscess in mice, associated or not with prosthetic insertion (Frank,
12 Del Pozo & Patel, 2008), showing the enhanced virulence of this pathogen when compared
13 with other CNS. Another study published by You and coworkers (1999) evaluated the
14 viability of monolayers of human gingival fibroblasts after incubation with *S. lugdunensis*
15 clinical isolates obtained from oral abscess or osteomyelitis. Viability of the cells reduced
16 after exposure to this organism. However, cell adherence or invasion by *S. lugdunensis* was
17 not evaluated in these studies.

18 Since *S. aureus* is the species recognized as the most pathogenic in the
19 *Staphylococcus* genera, and its ability to adhere and invade host cells is largely reported
20 (Sinha *et al.*, 2000; Amaral *et al.*, 2005; Karauzum *et al.*, 2008), its clinically aggressive
21 potential similar to *S. lugdunensis* led us to investigate if this species was able to adhere
22 and/or to invade cells in the same proportion. We used five *S. lugdunensis* isolates, biofilm
23 producers or not, being one isolate a strong biofilm producer with rough colony
24 morphology, characterized previously (Pereira *et al.*, 2010). We supposed that biofilm
25 producing isolates, specially these strong producers, could show high levels of cell

1 adherence. We observed that biofilm production was not the determining factor for cell
2 adhesion and/or invasion. The only isolate able to adhere and invade A549 cell was *S.*
3 *lugdunensis* 546, a strong biofilm producer that forms rough colonies (Figure 2A). The
4 other strong biofilm producing isolate (isolate 541) which forms smooth colonies,
5 presented low rates of adhesion and invasion. Results from isolates belonging to the same
6 and other genotypes, but no biofilm producers (isolates 611, 612 and 142) were similar to
7 those obtained for isolate 541 (data not shown). To confirm our results, another isolate
8 with rough colony morphology from the same genotype was evaluated, and the results
9 were similar to those obtained for isolate 546 (data not shown). Based on these findings,
10 we suggest that *S. lugdunensis* isolates presenting rough morphology have enhanced ability
11 to adhere and invade A549 cells, at the same proportion as observed for *S. aureus*.

12 The increased virulence of *S. aureus* had been associated with its adhesive
13 properties that enable bacterial colonization of mucosal and skin surfaces (Karauzum *et al.*,
14 2008; Feng *et al.*, 2008). It is also known that disseminated infections by the pathogen are
15 related to its ability to invade epithelial (Bayles, Wesson & Liu, 1998; Amaral *et al.*, 2005)
16 and endothelial cells (Menziez & Bourteva, 2000). The Fbl protein had been described as
17 an adherence factor in *S. lugdunensis* (Nilsson *et al.*, 2004), whereas invasion factors
18 reported are esterases, proteases, lipase (Lambe *et al.*, 1990) and hemolysins (Donvito *et*
19 *al.*, 1997). In our study all strains evaluated presented the Fbl adhesin and SLUSH
20 hemolysin (Pereira *et al.*, 2010). However, only rough colony morphology isolates were
21 able to adhere to A549 cells. Moreover, like adhesion, the invasiveness was also related
22 with the rough colony morphology of this organism. There is no data on this colony
23 morphology in the literature. However, we observed that these rough isolates were able to
24 produce a biosurfactant, forming micelles when the bacterial suspension was agitated with
25 n-hexadecane (data not shown). Fujita, Akino & Yoshioka (1988) report that

1 *Pseudomonas aeruginosa* isolates that produce the biosurfactant rhamnolipid, showed
2 enhanced invasion of erythrocytes, probably do to interaction of the rhamnolipids with cell
3 membrane phospholipids. Moreover, analysis by optical microscopy allowed verifying the
4 ability of this isolate to form clusters on cell surfaces like a cellular aggregative adhesion,
5 showing that this bacterial characteristic can be involved in adherence and invasion of
6 eukaryotic cell.

7 Two biofilm producing *S. lugdunensis* isolates, one with rough colony and another
8 with smooth colony morphology, were analyzed in the present study, and the biofilm
9 composition was characterized by the detachment assay with sodium metaperiodate (a
10 carbohydrate degrading agent) or proteolytic enzymes proteinase K and trypsin. The
11 detachment occurred during treatment with the proteases, showing that biofilms produced
12 by *S. lugdunensis* isolates are protein-mediated. When proteolytic enzymes were added
13 after an inactivation step (boiling for 40 minutes), no detachment were observed,
14 reinforcing our data. Additionally, treatment with sodium metaperiodate did not detach
15 biofilms produced by *S. lugdunensis*. Our data are in agreement with those described by
16 Frank & Patel (2007) who detected protein-mediated biofilms in all 15 biofilm producing
17 clinical isolates of *S. lugdunensis* isolated from several clinical sites, including endocarditis
18 and prosthetic infections. Moreover, this proteic biofilm matrix has been described for *S.*
19 *aureus* isolates (Cucarella *et al*, 2004), demonstrating once more a similarity between these
20 two staphylococcal species.

21 In conclusion, the ability of *S. lugdunensis* to adhere to and invade human cells is
22 notable, and confirms the enhanced virulence of this uncommon SCN. Additionally, it is
23 necessary to clearly understand how colony morphology surface contributes to *S.*
24 *lugdunensis* adherence and invasion in eukaryotic cells.

25

1 **Acknowledgments and Founds**

2 We thank Dr. Walter Oelemann for his assistance in this work. This study was
3 supported by grants from: Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado
4 do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
5 Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior
6 (CAPES), Fundação Universitária José Bonifácio (FUJB), and Programa de Núcleos de
7 Excelência (PRONEX).

8

9 **References**

- 10 1. Amaral MM, Coelho LR, Flores RP, Souza RR, Silva-Carvalho MC, Teixeira LA,
11 Ferreira-Carvalho BT, Figueiredo AM. The predominant variant of the Brazilian
12 epidemic clonal complex of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has an
13 enhanced ability to produce biofilm and to adhere to and invade airway epithelial
14 cells. *J Infect Dis.* 2005. 192:801-10.
- 15 2. Anguera I, Del Río A, Miró JM, Matínez-Lacasa X, Marco F, Gumá JR, Quaglio G,
16 Claramonte X, Moreno A, Mestres CA, Mauri E, Azqueta M, Benito N, García-de
17 la María C, Almela M, Jiménez-Expósito MJ, Sued O, De Lazzari E, Gatell JM &
18 the Hospital Clinic Endocarditis Study Group. *Staphylococcus lugdunensis*
19 infective endocarditis: description of 10 cases and analysis of native valve,
20 prosthetic valve, and pacemaker lead endocarditis clinical profiles. *Heart.* 2005. 91:
21 e10.
- 22 3. Bayles KW, Wesson CA, Liou LE, et al. Intracellular *Staphylococcus aureus*
23 escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect Immun* 1998.
24 66:336–42.

- 1 4. Cucarella C, Tormo MA, Ubeda C, Trotonda MP, Monzón M, Peris C, Amorena B,
2 Lasa I, Penadés JR. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of
3 bovine *Staphylococcus aureus*. Infect Immun. 2004. 72(4):2177-85.
- 4 5. de Bentzmann S, Tristan A, Etienne J, Brousse N, Vandenesch F, Lina G.
5 *Staphylococcus aureus* isolates associated with necrotizing pneumonia bind to
6 basement membrane type I and IV collagens and laminin. J Infect Dis. 2004.
7 190:1506-15.
- 8 6. Donvito B, Etienne J, Denoroy L, Greenland T, Benito Y, Vandene Synergistic
9 hemolytic activity of *Staphylococcus lugdunensis* is mediated by three peptides
10 encoded by a non-*agr* genetic locus. Infect Immun. 1997. 65:95-100.
- 11 7. Feng Y, Chen CJ, Su LH, Hu S, Yu J, Chiu CH. Evolution and pathogenesis of
12 *Staphylococcus aureus*: lessons learned from genotyping and comparative
13 genomics. FEMS Microbiol Rev. 2008. 32:23-37.
- 14 8. Frank KL, Del Pozo JL & Patel R. From clinical microbiology to infection
15 pathogenesis: how daring to be different works for *Staphylococcus lugdunensis*. J
16 Clin Microbiol. 2008. 21:111-133.
- 17 9. Frank KL, Patel R. Poly-N-acetylglucosamine is not a major component of the
18 extracellular matrix in biofilms formed by *icaADBC*-positive *Staphylococcus*
19 *lugdunensis* isolates. Infect Immun. 2007. 75:4728-42.
- 20 10. Fujita K, Akino T, Yoshioka H. Characteristics of heat-stable extracellular
21 hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun. 1988. 56:1385-7.
- 22 11. Karauzum H, Ferry T, de Bentzmann S, Lina G, Bes M, Vandenesch F, Schmalder
23 M, Berger-Bächli B, Etienne J, Landmann R. Comparison of adhesion and virulence
24 of two predominant hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

- 1 clones and clonal methicillin-susceptible *S. aureus* isolates. *Infect Immun.* 2008.
2 76:5133-8.
- 3 12. Lambe DW Jr, Ferguson KP, Keplinger JL, Gemmell CG, Kalbfleisch JH.
4 Pathogenicity of *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus schleiferi*, and three
5 other coagulase-negative staphylococci in a mouse model and possible virulence
6 factors. *Can J Microbiol.* 1990. 36:455–463.
- 7 13. Martinez-Medina M, Naves P, Blanco J, Aldeguer X, Blanco JE, Blanco M, Ponte
8 C, Soriano F, Darfeuille-Michaud A, Garcia-Gil LJ. Biofilm formation as a novel
9 phenotypic feature of adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC). *BMC Microbiol.*
10 2009. 21;9:202.
- 11 14. Menzies BE, Kourteva I. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin induces apoptosis in
12 endothelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2000. 29:39-45.
- 13 15. Nilsson M, Bjerketorp J, Guss B & Frykberg L. A fibrinogen-binding protein of
14 *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2004. 241: 87-93.
- 15 16. Otto M. Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008. 322:207-28.
- 16 17. Pereira EM, Alvarenga ALM, Schuenck RP, Oliveira NEM, Giambiagi-de-Marval
17 M, Guaraldi ALM, dos Santos, KRN. Virulence and associated clonality of
18 *Staphylococcus lugdunensis* isolates from Rio de Janeiro hospitals. *Int J Infect Dis.*
19 2010. In Press
- 20 18. Perez-Vidakovics ML, Riesbeck K. Virulence mechanisms of *Moraxella* in the
21 pathogenesis of infection. *Curr Opin Infect Dis.* 2009 22:279-85.
- 22 19. Sinha B, Francois P, Que YA, et al. Heterologously expressed *Staphylococcus*
23 *aureus* fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infect*
24 *Immun* 2000; 68:6871–8.

1 20. Vivoni AM, Diep BA, Magalhães ACG, Santos KRN, Riley LW, Sensabaugh GF,
2 Moreira BM. Clonal composition of *Staphylococcus aureus* isolates at a Brazilian
3 university hospital: identification of international circulating lineages. J Clin
4 Microbiol. 2006. 44:1686–1691.

5 21. You YO, Kim KJ, Min BM, Chung CP. *Staphylococcus lugdunensis* - a potential
6 pathogen in oral infection. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.
7 1999. 88:297-302.

8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

Legends to figures

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

Figure 1: Biofilm detachment assay using carbohydrate-degrading agents (A) and proteases (B and C). *S. epidermidis* ATCC 35984: carbohydrate-mediated biofilm producer; *S. aureus* V389: protein-mediated biofilm producer; 546: rough colony morphology *S. lugdunensis* isolate; 541: smooth colony morphology *S. lugdunensis* isolate. Bars represent the average stained biofilm remaining in three wells after treatment. Error bars shows the standard deviation. Asterisks indicate significant increase in biofilm detachment after treatment compared with untreated wells ($p < 0.05$ by Student's *t* test). Data are representative of three replicate experiments with similar results.

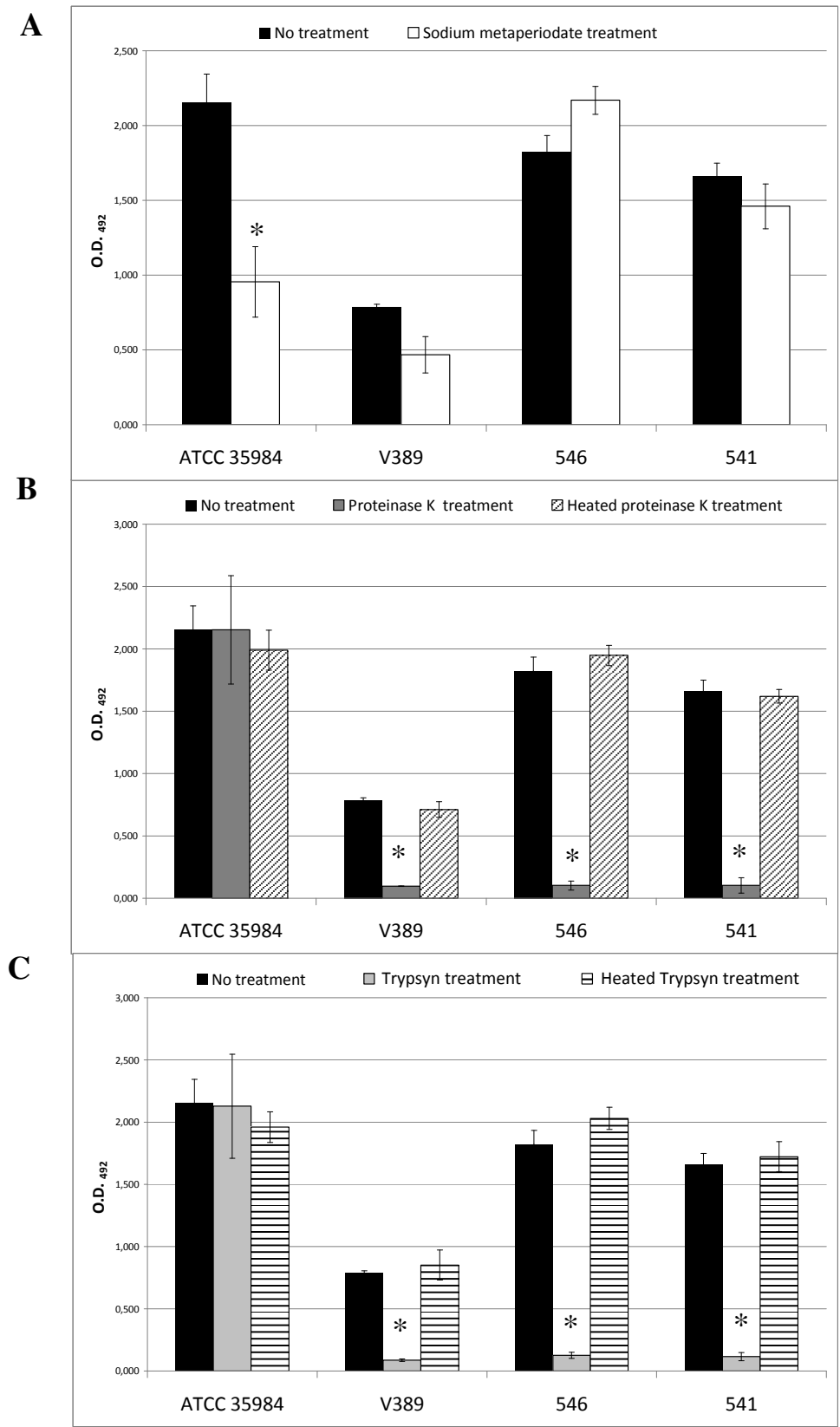
Figure 2: Evaluation of adhesion and invasion of *S. lugdunensis* in A549 cell monolayers (A) Analysis of adherent (black bars) and invasive (white bars) bacteria. HU25: MRSA isolate; 546: rough colony morphology and biofilm producing *S. lugdunensis* isolate; 541: smooth morphology morphology and biofilm producing *S. lugdunensis* isolate; 142: smooth colony morphology and no-biofilm producer *S. lugdunensis* isolate. Bars represent the CFU percentage of three wells. The error bars show the standard deviations. Asterisks indicates comparison with HU25, being different (*, with $p < 0.005$) or similar (**, $p = 1,000$). P values were obtained by ANOVA test. Data are representative of three replicate experiments with similar results. (B) Bacterial interaction with A549 cell observed by optical microscopy after Giemsa staining. Single and double arrows show adherent and invasive bacteria, respectively.

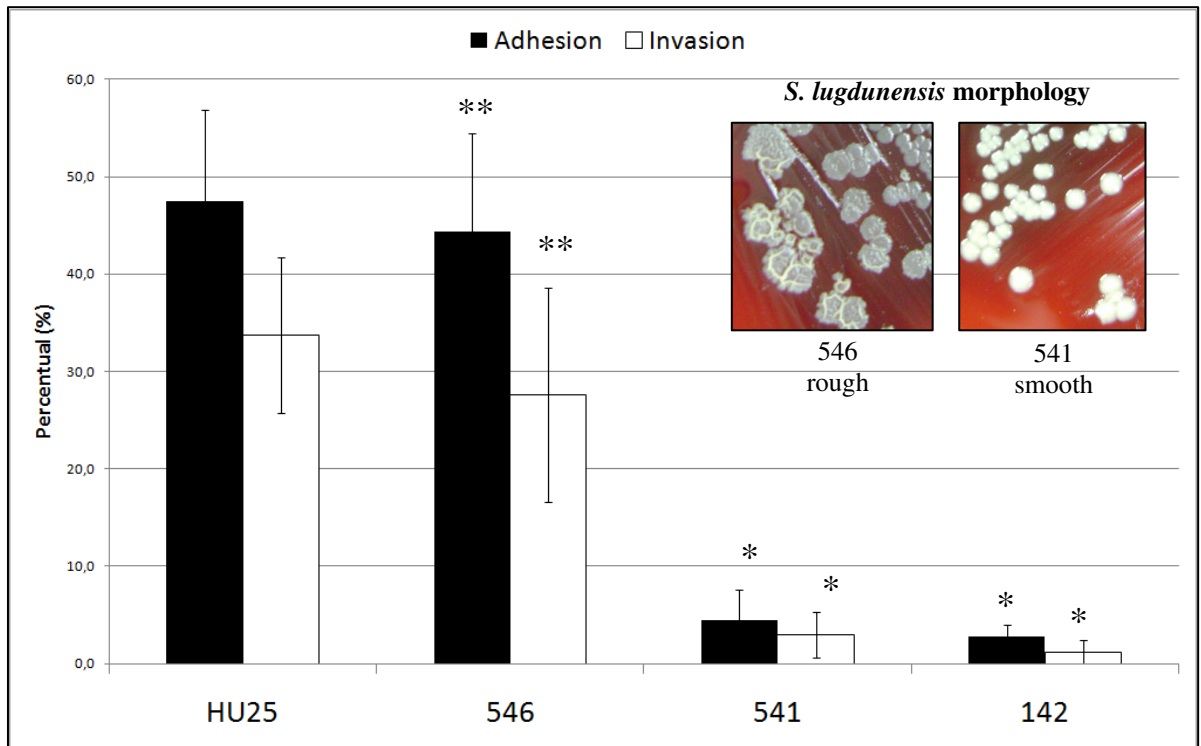
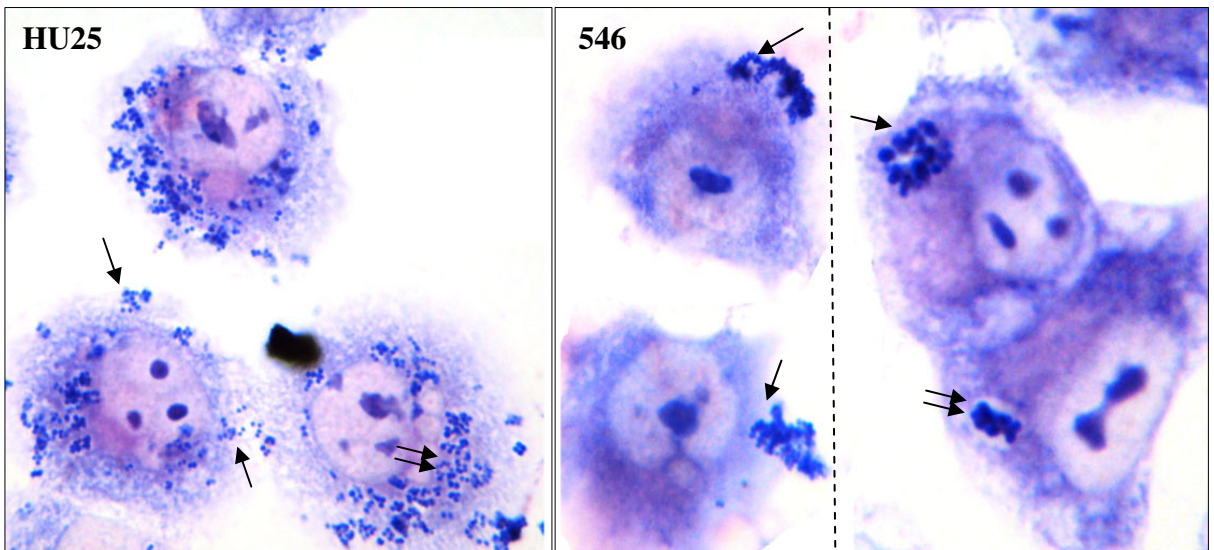
Table 1 – Characteristics of *Staphylococcus lugdunensis* isolates evaluated in this study

Isolate number*	Isolation date	<i>ica</i> gene	Biofilm production	Colony Morphology	PFGE genotype
546	06/2007	+	strong	rough	A
541	07/2006	+	strong	smooth	A
611	10/2007	+	no	smooth	A
612	05/2008	+	no	smooth	B
142	02/2002	+	no	smooth	C

*All isolates were obtained from blood cultures

FIGURE 1



A**FIGURE 2****B**

DISCUSSÃO

Apesar das taxas de isolamento baixas, representando cerca de 10% entre os SCN não-*S. epidermidis* (HERCHLINE & AYERS, 1991), infecções pela espécie *S. lugdunensis* vem sendo cada vez mais descritas na literatura científica (PATEL *et al.*, 2000; EBRIGHT, PENUGONDA & BROWN, 2004; FRANK, DEL POZO & PATEL, 2008; BÖCHER *et al.*, 2009), devido, principalmente ao seu potencial patogênico, incomum dentro do grupo (LAMBE *et al.*, 1990). Uma explicação para baixos percentuais de isolamento seria a identificação errônea de amostras de *S. lugdunensis*, devido ao fato desta espécie compartilhar semelhanças fenotípicas com *S. aureus*, tais como produção de fator *clumping* e DNase termoestável (SANCHEZ, BUEZA & MAESTRE, 2001), além de pigmentação colonial amarelada (SEIFERT *et al.*, 2005). Adicionalmente, muitos laboratórios de análise clínica tem utilizado apenas o teste de fator *clumping*, também denominado “coagulase-ligada”, para identificação rápida de *S. aureus*, não realizando o teste de coagulase-livre, que auxilia na diferenciação das duas espécies (PATEL *et al.*, 2000).

Em nosso estudo foram avaliadas, inicialmente, 26 amostras clínicas identificadas como *S. lugdunensis* e/ou *S. aureus* nos hospitais de origem, no Rio de Janeiro (Tabela 1, Anexo 1). Destas, 23 amostras foram confirmadas em nosso laboratório através da metodologia bioquímica de identificação de *Staphylococcus*, utilizando 22 testes (BANNERMAN & PEACOCK, 2007). Todas as 23 amostras foram positivas para a produção de pirrolidonil-arilamidase (PYR) e de desoxirribonuclease (DNase) e descarboxilação da ornitina (ORN) (Tabela 1, Anexo 1). O teste de ORN é considerado chave para a identificação bioquímica de *S. lugdunensis*, já que todas as amostras isoladas até o momento foram capazes de descarboxilar a ornitina (SCHNITZLER *et al.*, 1998; FRANK, DEL POZO & PATEL, 2008; BÖCHER

et al., 2009). As outras três amostras que foram negativas para o teste, foram identificadas como *S. aureus* (uma amostra) e *Staphylococcus spp.* (duas amostras). Todas as nossas amostras também foram capazes de produzir PYR e DNase (Figura 1, Anexo 2). Contudo, existem outras espécies de *Staphylococcus* positivas para PYR (*S. haemolyticus*, *S. schleiferi* e *S. simulans*), enquanto *S. aureus* é capaz de produzir DNase (BANNERMAN & PEACOCK, 2007). Portanto, o teste de ORN deveria ser considerado o mais adequado para identificação de amostras clínicas de *S. lugdunensis*.

Schnitzler e colaboradores (1998) propuseram o uso de ORN associado aos testes de PYR e fator *clumping*, que detecta aglutinação do patógeno ao fibrinogênio para a caracterização bioquímica simplificada da espécie. A detecção da aderência ao fibrinogênio em *S. lugdunensis* tem sido realizada utilizando-se sistemas comerciais contendo fibrinogênio imobilizado em látex, para detecção do fator *clumping* de *S. aureus* (ClfA), devido a grande homologia entre estas proteínas (MITCHELL, TRISTAN & FOSTER, 2004; GEOGHEGAN *et al.*, 2010). Em nosso estudo, as amostras analisadas foram testadas quanto à presença do fator *clumping* utilizando o sistema comercial "Pastorex Staph" (Bio-Rad). Considerando os critérios de positividade estabelecidos pelo fabricante (observação de aglutinação em até 30 segundos após o início do teste), 18 (78,3%) das 23 amostras de *S. lugdunensis* foram consideradas positivas. Apesar de cinco amostras terem sido consideradas negativas, com discreta aglutinação em 60 segundos (Figura 2, Anexo 2), todas produziram a proteína Fbl, detectada através de *Western-blotting* (Tabela 1 e Figura 2(A), Artigo 2), sugerindo que a interpretação do teste está contribuindo para a perda na sensibilidade do método, já que muitas amostras de *S. lugdunensis* não estão sendo detectadas. Hebert (1990) encontrou 79% de amostras positivas para o fator *clumping*, utilizando o sistema "BBL Staphyloslide" (BD) e Vandenesch e colaboradores (1993), utilizando o "Staphslide" (BioMérieux) encontraram 82% de amostras positivas.

Recentemente, Frank e colaboradores (2007), analisando 15 amostras clínicas encontraram apenas duas amostras positivas, quando utilizaram o sistema comercial "Staphaurex" (Remel). Com base nestes dados, sugere-se que os critérios de interpretação dos sistemas comerciais sejam revistos para inclusão de amostras de SCN capazes de formar grumos em fibrinogênio imobilizado, tais como o *S. lugdunensis*.

Ferramentas de identificação molecular como a PCR deveriam, contudo, ser consideradas para confirmação da detecção da espécie *S. lugdunensis*. Em nosso estudo foi desenvolvida uma reação de PCR para o gene *fbI*, que confirmou a identificação do patógeno (Artigo 1; Figura 1, Anexo 3). Em 2009, Tang e colaboradores descreveram 12 amostras isoladas de bacteriemias e identificadas inicialmente como *S. lugdunensis*, que foram positivas para os testes de ORN e PYR. Após seqüenciamento do gene *tuf*, foi observado que essas amostras não eram *S. lugdunensis*. Na verdade, os autores sugerem tratar-se de uma espécie nova, denominada *S. pseudolugdunensis*, também produtora de PYR e ORN. Estas amostras apresentaram ampla variação nos testes bioquímicos, não sendo possível determinar um padrão de identificação. No entanto, todas foram negativas para o fator *clumping* e apresentaram resistência intermediária ou plena ao antibiótico novobiocina, diferentemente do que se tem observado para *S. lugdunensis*, que é sensível a este agente.

A utilização apenas dos testes de fator *clumping* e DNase pode levar à identificação errônea de *S. lugdunensis* como *S. aureus* (SANCHEZ, BUEZA & MAESTRE, 2001). Isto foi observado em uma amostra deste estudo (amostra 468) que apresentava resistência à oxacilina e foi identificada como CA (*community acquired*) – MRSA no local de origem. No entanto, quando o teste de coagulase livre foi realizado em nosso laboratório, verificamos que se tratava de um SCN. Através de identificação bioquímica e confirmação por PCR, a amostra fora identificada como *S. lugdunensis*. A detecção do gene *mecA* e do cassete *SCCmec* tipo V, também por PCR, caracterizou o primeiro

isolamento de uma amostra de *S. lugdunensis* resistente a meticilina (MRSL) com *SCCmec* tipo V (Artigo 3).

Ainda em relação à resistência antimicrobiana, a maioria (19 [78,3%] de 23) das amostras foi sensível a todos os antimicrobianos, conforme mostrado na Tabela 1 do Artigo 2. Nossos dados estão de acordo com a literatura científica, que mostra a grande sensibilidade antimicrobiana desta espécie estafilocócica (HELLBACHER, TÖRNQVIST & SÖDERQUIST, 2006; TAN, NG & HE, 2008). Os maiores índices de resistência são encontrados para o antibiótico penicilina, devido à produção de β -lactamases (PATEL *et al.*, 2000; HERCHLINE & AYERS, 2001; TAN, NG & HE, 2008). Da mesma forma, o maior índice de resistência encontrado nas amostras avaliadas neste estudo foi para esse antimicrobiano (quatro [17%] amostras de 23). Como já citado anteriormente, uma amostra (amostra 468) foi positiva para o gene *mecA* e o *SCCmec* tipo V (Figura 1, Anexo 4), apresentando resistência a oxacilina, cefoxitina, penicilina e cloranfenicol, sendo este perfil de resistência característico de amostras MRSA associadas a comunidade (ITO *et al.*, 2004). Não há relatos na literatura de identificação do cassete *SCCmec* em amostras de *S. lugdunensis*, embora a presença do gene *mecA* já tenha sido relatada em poucos trabalhos (KAWAGUCHI *et al.*, 1996; TEE *et al.*, 2003; TAN, NG & HE, 2008). No entanto, somente Tee e colaboradores relataram um MRSL (*methicillin-resistant S. lugdunensis*) isolado de bacteriemia. Em nosso estudo nós apresentamos um caso clínico de bacteriemia hospitalar por MRSL, identificado erroneamente como MRSA (*S. aureus* resistente à meticilina) no hospital de origem, mostrando que *S. lugdunensis* pode ser um carreador em potencial de genes de resistência. Apesar da amostra ser positiva para o teste de fator *clumping*, a coagulase não foi detectada. A identificação foi confirmada pelo teste ORN e pela detecção do gene *fbl*, caracterizando a amostra como *S. lugdunensis*. Embora já tenham sido descritas na literatura amostras com CMIs aumentados para vancomicina (BURGEOIS *et al.*, 2007), todas as 23 amostras

clínicas de *S. lugdunensis* avaliadas neste estudo foram sensíveis a vancomicina e teicoplanina (Tabela 1, Artigo 2).

Na tentativa de esclarecer o notável potencial virulento de amostras clínicas de *S. lugdunensis*, foi realizada a pesquisa de genes relacionados à adesão (*fbl* e *ica*) e agressão (*slush*), bem como de seus produtos. Os oligonucleotídeos desenhados em nosso estudo para identificação de *fbl* e *slush* detectaram a presença dos referidos genes em todas as amostras clínicas avaliadas (Tabela 1, Artigo 2). O gene *fbl*, que codifica a proteína Fbl, parece ser um dos fatores de maior importância para adesão do *S. lugdunensis* em tecidos vivos e biomateriais (NILSSON *et al.*, 2004a), visto que essa proteína é semelhante às adesinas "MSCRAMMS", como o ClfA de *S. aureus* e Fbe de *S. epidermidis* (MITCHELL, TRISTAN & FOSTER, 2004), sendo capaz de se ligar ao fibrinogênio com a mesma intensidade que o ClfA (GEOGHEGAM *et al.*, 2010). O amplicon de 425 pb correspondente ao gene *fbl* (Figura 1, Anexo 3) foi observado em todas as 23 amostras clínicas e na amostra tipo de *S. lugdunensis*, e não houve amplificação quando utilizado DNA extraído de amostras clínicas de *S. aureus* e de outros SCN (Tabela 1, Artigo 1), confirmando que esta reação pode ser usada como ferramenta auxiliar na identificação de amostras clínicas deste micro-organismo. Em relação a produção da proteína correspondente Fbl, todas as amostras clínicas avaliadas no presente estudo foram positivas usando a técnica de *Western-blotting*. Portanto, sugere-se que essa proteína seja expressa constitutivamente em *S. lugdunensis*.

Assim como o gene *fbl*, um amplicon de 203 pb correspondente ao gene *slush* (Figura 1, Anexo 5) também foi detectado em todas as 23 amostras clínicas avaliadas neste trabalho (Tabela 1, Artigo 2). Embora o gene *slush* tenha sido descrito previamente em amostras de *S. lugdunensis* (DONVITO *et al.* 1997a) não se deve considerar que este seja exclusivo deste micro-organismo. Em estudo realizado por Donvito e colaboradores (1997b), utilizando diversas amostras clínicas

de várias espécies estafilocócicas, foi observada através da técnica de *Southern-blotting* hibridização com sondas desenhadas para o gene *slush* em amostras de *S. lugdunensis*, *S. caprae*, *S. haemolyticus* e *S. xylosus*. Baseado nesta observação, o gene *slush*, diferentemente do *fbl*, não deveria ser utilizado para fins de identificação molecular da espécie *S. lugdunensis*, embora em nosso trabalho não tenhamos detectado amplicons ao submeter amostras tipo das espécies supracitadas à reação de PCR. Adicionalmente, não há relatos na literatura de seqüenciamento deste gene em outras amostras de SCN. No estudo de Donvito e colaboradores (1997b), todas as 14 amostras de *S. lugdunensis* avaliadas apresentaram o gene *slush*, inclusive amostras não-produtoras de hemolisinas. Em nosso estudo, apenas uma amostra (amostra tipo DSMZ 4804) não foi produtora de SLUSH pelo teste fenotípico (Tabela 1 e Figura 2(B), Artigo 2). Em 1990, Hebert também encontrou 5% de amostras não produtoras desta hemolisina entre amostras clínicas isoladas de infecção e colonização, porém, a presença do referido gene não foi avaliada. Como todas as amostras clínicas avaliadas em nosso estudo foram capazes de produzir SLUSH, é possível que este fator possa estar associado ao sucesso deste patógeno como agente de infecção em humanos, além do fato desta hemolisina apresentar homologia com regiões da invasina SigB de *Salmonella enteritidis*, podendo ser este um indício do papel deste fator na patogênese de *S. lugdunensis* (DONVITO *et al.*, 1997a).

Sabe-se atualmente que a produção de biofilme é um fator crucial para a persistência de *Staphylococcus* em infecções, devido a maior capacidade de aderência a proteínas de matriz extracelular (colágeno, fibronectina, dentre outros) e biomateriais, como o poliestireno, muito utilizados em próteses (OTTO, 2008). Alguns estudos descrevem amostras de *S. lugdunensis* capazes de produzir *slime* (HEBERT, 1990; FRANK *et al.*, 2007; FRANK & PATEL, 2007). Contudo, a presença do gene *ica* nessa espécie tem sido pouco relatada. Em 2007, Frank e Patel detectaram o gene *ica* em todas as 15 amostras clínicas de *S.*

lugdunensis avaliadas, sendo todas produtoras de biofilme. Em nosso estudo todas as amostras avaliadas apresentaram o amplicon de 287 pb (Figura 1, Anexo 6) correspondente ao gene *ica*, contudo, apenas 14 (60%) das 23 amostras foram produtoras de biofilme. Entre estas, cinco foram classificadas como forte produtoras, segundo critério estabelecido por Stepanovic e colaboradores (2007), e todas foram agrupadas no mesmo genótipo (Tabela 1 e Figura 1, Artigo 2). Outro fato interessante foi o fato de 10 das 12 amostras pertencentes ao genótipo de maior prevalência serem produtoras de biofilme, sugerindo que este grupo clonal esteja relacionado a amostras com maior virulência. Nosso estudo é o primeiro que relaciona clonalidade com a produção de biofilme em *S. lugdunensis*. Uma curiosidade foi o fato de encontrarmos três amostras clínicas (amostras 97, 98 e 546) com características morfológicas incomuns àquelas observadas em amostras de *Staphylococcus*, apresentando-se rugosas, como colônias de *Bacillus* spp. (Figura 3, Artigo 2). Essas três amostras estão entre as cinco fortes produtoras de biofilme.

Duas dessas amostras (97 e 98) foram isoladas na mesma época e de pacientes diferentes da mesma instituição de saúde, sendo geneticamente relacionadas (Tabela 1, Artigo 2), podendo este evento estar associado à transmissão cruzada do micro-organismo no ambiente hospitalar. A amostra 546 foi isolada oito anos depois (2007), sendo também geneticamente relacionada às outras duas. O dendrograma apresentado no Artigo 2 (Figura 1) mostra que estas três amostras apresentaram similaridade genética acima de 90%.

A avaliação de perfis genômicos em *S. lugdunensis* tem mostrado baixa diversidade entre eles (VAN DER MEE-MARQUET *et al.*, 2003; HELLBACHER, TÖRNDQVIST & SODEQUIST, 2006; BÖCHER *et al.*, 2009). No presente estudo, foram detectados 20 diferentes perfis de restrição, agrupados em quatro genótipos (A a D), em 23 amostras clínicas, sendo 12 (52,2%) amostras pertencentes ao genótipo prevalente (genótipo A). Assim como descrito na literatura, nós

confirmamos a baixa diversidade existente entre amostras de *S. lugdunensis*.

Como descrito por Frank e Patel (2007) e com base em nossos resultados, o gene *ica* parece estar presente em todas as amostras de *S. lugdunensis* associadas à infecção em humanos. O operon *icaADBC*, largamente estudado em amostras de *S. aureus* e de *S. epidermidis* codifica componentes responsáveis pela produção do polissacarídeo de adesão intercelular (PIA), composto por poli-N-acetil-glicosamina (PNAG) (CRAMTON *et al.*, 1999). Em *S. lugdunensis*, no entanto, o biofilme parece não ser mediado por carboidratos. Frank e Patel (2007) descreveram a natureza protéica de biofilmes produzidos por 15 amostras de *S. lugdunensis*, todas portadoras do gene *ica*. Nossos resultados confirmam os dados desses autores, já que o biofilme de *S. lugdunensis* foi desagregado pelos agentes proteolíticos proteinase K e tripsina, não havendo desagregação pelo metaperiodato de sódio, um agente dissociador de biofilmes glicídicos (KAPLAN *et al.*, 2004). Adicionalmente, não foram observadas diferenças entre composição de biofilmes formados por amostras lisas e rugosas (Figura 1, Artigo 4), demonstrando que a rugosidade e a hidrofobicidade, verificada pelo teste de aderência ao hidrocarboneto (dados não mostrados) apresentado por amostras com colônias rugosas não estão relacionadas com diferenças na estrutura do biofilme.

A expressão do gene *ica* em amostras de *S. lugdunensis* e sua relevância na estrutura do biofilme produzido por amostras desta espécie ainda não estão bem esclarecidas. No estudo de Frank e Patel (2007), os genes do operon *ica* de *S. lugdunensis* foram seqüenciados e encontravam-se intactos nas 15 amostras analisadas e, interessante, não foi detectado o gene *icaR*, responsável pela regulação da expressão do operon *icaADBC*, sugerindo uma correlação com a ausência de PNAG nas amostras avaliadas. Nós mostramos no Artigo 4 os perfis de desagregação de biofilme frente aos agentes metaperiodato de sódio, proteinase K e tripsina das amostras 546 e 541

(fortes produtoras de biofilme) em relação às amostras padrão *S. epidermidis* ATCC 35984 (produtora de biofilme glicídico, *ica+* e *bap-*) (*bap* - *biofilm associated protein*) e *S. aureus* V389 (produtor de biofilme protéico, *bap+* e *ica-*), e verificamos que os biofilmes formados por *S. lugdunensis* se assemelham ao biofilme produzido pela amostra de *S. aureus*, mas diferem do biofilme de *S. epidermidis*, confirmando a hipótese da natureza protéica de biofilmes produzidos por *S. lugdunensis*. Não há na literatura descrição do gene *bap* para a espécie *S. lugdunensis*.

Alguns autores especulam sobre a virulência e agressividade de *S. lugdunensis*, porém, são poucos os estudos *in vitro* e *in vivo* que analisam seu potencial agressor. Em 1990, Lambe e colaboradores descreveram o potencial de amostras clínicas de *S. lugdunensis* em causar abscessos em camundongos. Alguns destes animais tinham próteses implantadas em seu organismo, e o patógeno fora isolado destas, mostrando sua capacidade de colonizar implantes. No presente estudo, ao analisarmos amostras representantes de cada um dos principais genótipos entre 23 amostras clínicas avaliadas, percebemos que apenas colônias rugosas do clone prevalente eram capazes de aderir e invadir células epiteliais A549 em proporções similares ($p=1,000$) a um MRSA pertencente ao clone prevalente no Brasil (Figura 2, Artigo 4), cujo grande potencial de adesão e invasão celular já havia sido relatado antes (AMARAL *et al.*, 2005). Amostras desse genótipo, cuja morfologia colonial era lisa, mesmo sendo produtores de biofilme, não foram capazes de aderir ou invadir as células na mesma proporção que a amostra rugosa. As amostras dos clones B e C também apresentaram o mesmo resultado, não havendo diferença estatística entre elas e amostras lisas do clone A, sugerindo que apenas a morfologia colonial foi determinante para o processo agressivo. Interessantemente, estas amostras com morfologia rugosa foram capazes de emulsionar hidrocarbonetos, sugerindo que estas produzam algum tipo de biosurfactante (Figura 1, Anexo 7). Sugere-se que este

possa ser um fator importante que contribua para a incrível capacidade de adesão e invasão desta amostra. Pouco se sabe sobre a participação deste tipo de substância como um possível fator de virulência. No entanto, Fujita, Akino & Yoshioka (1988) descreveram o potencial agressor de ramnolipídios (biosurfactantes produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*) em hemácias, provavelmente por interagir com fosfolipídios da membrana celular, desestruturando-a.

Com base nos resultados apresentados, concluímos que a identificação molecular de amostras de *S. lugdunensis* através da amplificação do gene *fbl* pode ser uma ferramenta adicional para a caracterização correta desta espécie, em virtude da similaridade com amostras de *S. aureus*. Além disso, a resistência à oxacilina raramente descrita nessa espécie poderia induzir a detecção errônea como MRSA. A presença dos genes de virulência *fbl*, *slush* e *ica* e, exceto pela produção de biofilme, a detecção dos produtos gênicos relacionados em todas as amostras analisadas, aliado ao fato de amostras rugosas apresentarem capacidade de adesão e invasão a células epiteliais em níveis similares a *S. aureus*, mostra o elevado potencial agressor deste SCN. Estudos mais aprofundados sobre a virulência desta espécie devem ser realizados, visando compreender o curso clínico de suas infecções causadas por esta espécie, principalmente as endocardites bacterianas.

CONCLUSÕES

1. Dentre 26 amostras clínicas identificadas como *S. lugdunensis* e/ou *S. aureus* nos hospitais de origem e recebidas no laboratório, 23 foram confirmadas bioquimicamente, apesar de cinco delas terem sido negativas para fator *clumping*. Contudo, todas produziram a adesina Fbl, detectada por *Western-blotting*, demonstrando que a interpretação deste resultado deve ser revista nos sistemas comerciais de diagnóstico. Adicionalmente, todas as amostras foram positivas para o gene *fbl*, detectado através de PCR, podendo este teste molecular auxiliar na confirmação da espécie;
2. Todas as amostras analisadas, incluindo a amostra tipo, carregavam os genes de virulência *fbl*, *slush* e *ica*, mostrando que *S. lugdunensis* pode conter estes genes em seu cromossoma. Os produtos gênicos Fbl (adesina) e SLUSH (hemolisina) também foram detectados em todas as amostras clínicas, exceto na amostra tipo que não produziu a hemolisina. A formação de biofilme foi detectada em 14 (60,9%) amostras, sendo cinco fortes produtoras.
3. Susceptibilidade a todos os antimicrobianos testados foi observada para 73% das amostras. Resistência foi verificada principalmente para penicilina em 17% das amostras, sendo uma delas também resistente a oxacilina, cefoxitina e cloranfenicol. Esta amostra apresentou o gene *mecA* e o *SCCmec* tipo V e foi isolada de um caso de bacteriemia hospitalar, demonstrando que *S. lugdunensis* pode ser um carreador em potencial de genes de resistência.
4. A análise genômica por PFGE mostrou baixa diversidade entre as amostras de *S. lugdunensis*, tendo sido observados 20 perfis de restrição em quatro genótipos (A a D). O genótipo A foi o prevalente, encontrado em 12 (52,2%) amostras, sendo 10 (83,3%) destas produtoras de biofilme, sugerindo que este grupo clonal esteja relacionado a amostras com maior virulência;

5. A análise da composição do biofilme produzido por amostras de *S. lugdunensis* sugere que o mesmo seja mediado por proteína, similar ao biofilme de *S. aureus*, ainda que todas as amostras tenham apresentado o gene *ica*;
6. Amostras de *S. lugdunensis* com morfologia colonial rugosa do genótipo prevalente são capazes de aderir e invadir células epiteliais A549 na mesma proporção que amostras de MRSA do clone prevalente no Brasil ($p=1,000$), podendo este potencial de adesão/invasão estar associado a uma possível produção de biosurfactante por estas amostras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, M.M.; COELHO, L.R.; FLORES, R.P.; SOUZA, R.R.; SILVA-CARVALHO, M.C.; TEIXEIRA, L.A.; FERREIRA-CARVALHO, B.T. & FIGUEIREDO, A.M. **The predominant variant of the Brazilian epidemic clonal complex of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has an enhanced ability to produce biofilm and to adhere to and invade airway epithelial cells.** J. Infect. Dis. 192:801-810, 2005.
- ANGUERA, I.; DEL RÍO, A.; MIRÓ, J.M.; MATÍNEZ-LACASA, X.; MARCO, F.; GUMÁ, J.R.; QUAGLIO, G. *et al.* ***Staphylococcus lugdunensis* infective endocarditis: description of 10 cases and analysis of native valve, prosthetic valve, and pacemaker lead endocarditis clinical profiles.** Heart. 91:e10, 2005.
- BANNERMAN, T.L. & PEACOCK, S.J. ***Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase-positive cocci.** In: Manual of Clinical Microbiology (Murray PR, Barron EJ, Jorgensen J, Landry ML, Pfaller MA, eds), 390-411. ASM press, Washington, DC, 2007.
- BARKER, K.F.; O'DRISCOLL, J.C. & BHARGAVA, A. ***Staphylococcus lugdunensis*.** J. Clin. Pathol. 44:873-4, 1991.
- BIEBER, L. & KAHLMETER, G. ***Staphylococcus lugdunensis* in several niches of the normal skin flora.** Clin. Microbiol. Infect., 2009 (In press)
- BOAS, P.J. & RUIZ, T. **Occurrence of hospital infection among interned elderly in a university hospital.** Rev. Saude Publica. 38:372-378, 2004.
- BÖCHER, S., TØNNING, B., SKOV, R.L. & PRAG J. ***Staphylococcus lugdunensis*, a common cause of skin and soft tissue infections in the community.** J. Clin. Microbiol. 47:946-950, 2009.
- BOURGEOIS, I.; PESTEL-CARON, M.; LEMELAND, J. F.; PONS, J. L. & CARON, F. **Tolerance to the glycopeptides vancomycin and teicoplanin in coagulase-negative staphylococci.** Antimicrob. Agents Chemother. 51:740-743, 2007.
- BOURGEOIS, I; CAMIADE, E; BISWAS, R; COURTIN, P; GIBERT, L; GÖTZ, F; CHAPOT-CHARTIER, MP; PONS, J.L. & PESTEL-CARON, M. **Characterization of AtlL, a bifunctional autolysin of *Staphylococcus lugdunensis* with N-acetylglucosaminidase and N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase activities.** FEMS Microbiol. Lett. 290:105-113, 2009.
- BOUZA E.R.; SAN JUAN P.; MUNOZ J.; PASCAU A. & VOSS M. **A European perspective on intravascular catheter-related infections: report on the microbiology workload, etiology, and antimicrobial susceptibility (ESGNI-005 study).** Clin. Microbiol. Infect. 10:838-842, 2004.
- CAVALCANTI, S.M.; FRANCA, E.R.; CABRAL,C.; VILELA, M.A.; MONTENEGRO, F.; MENEZES, D. & MEDEIROS, A.C. **Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a University Hospital.** Braz. J. Infect. Dis. 9:56-63, 2005.

CELEBI, G.; BÜYÜKATES, M.; DOGAN, S.M.; PISKIN, N.; AYDEMIR, H.; OZTOPRAK, N.; AKTAS, E.; BEKTAS, S.; KESKIN, A. & AKDUMAN, D. **Necrotising endocarditis of mitral valve due to *Staphylococcus lugdunensis***. Mikrobiol. Bul. 43:319-323, 2009.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC, 2008). Disponível em <http://www.cdc.gov/ncidoc/healthDis.html>, Acessado em 16/03/2009

CRAMTON, S. E.; GERKE, C.; SCHNELL, N.F.; NICHOLS, W.W. & GOTZ, F. **The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation**. Infect. Immun. 67:5427-5433, 1999.

DE BENTZMANN, S; TRISTAN, A.; ETIENNE, J.; BROUSSE, N; VANDENESCH, F., & LINA, G. ***Staphylococcus aureus* isolates associated with necrotizing pneumonia bind to basement membrane type I and IV collagens and laminin**. J. Infect. Dis. 190:1506-15, 2004.

DONVITO, B.; ETIENNE, J.; DENOROY, L.; GREENLAND, T.; BENITO, Y. & VANDENESCH, F. **Synergistic hemolytic activity of *Staphylococcus lugdunensis* is mediated by three peptides encoded by a non-*agr* genetic locus**. Infect. Immun. 65:95-100, 1997a.

DONVITO, B.; ETIENNE, J; GREENLAND, T.; MOUREN, C. ; DELORME, V. & VANDENESCH, F. **Distribution of the synergistic haemolysin genes *hld* and *slush* with respect to *agr* in human staphylococci**. FEMS Microbiol. Lett. 151:139-144, 1997b.

EBRIGHT, J.R.; PENUGONDA, N. & BROWN, W. **Clinical experience with *Staphylococcus lugdunensis* bacteremia: a retrospective analysis**. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 48:17-21, 2004.

EUZÉBY, J.P. 2010. **List of Prokaryotic Names with Standing in nomenclature – Genus *Staphylococcus***. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>> Acesso em: 29/01/2010

FAR, F.E.; MARINO, C.G. & MEDEIROS, E.A. **The organization of hospital infection control committees and their importance in Brazil**. Braz. J. Infect. Dis. 5 :290-293, 2001.

FARRAG, N.; LEE, P.; GUNNEY, R. & VIAGAPPAN, G.M. ***Staphylococcus lugdunensis* endocarditis**. Postgrad. Med. J. 77:259-60, 2000.

FARRAG, N.; LEE, P.; GUNNEY, R. & VIAGAPPAN, G.M. ***Staphylococcus lugdunensis* endocarditis**. Postgrad. Med. J. 77:259-260, 2000.

FERNANDES, A.T.; FURTADO, J.J.D.; PORFÍRIO, F.M.V. & CAVALCANTE, N.J.F. **Infecção Hospitalar da Corrente Sanguínea**. In: Infecção Hospitalar e suas Interfaces na Área de Saúde (Fernandes, A.T., ed.). Atheneu. Rio de Janeiro - RJ, Brasil, p. 580-606, 2000.

FERVENZA, F.C.; CONTRERAS, G.E.; GARRATT, K.N. & STECKELBERG, J.M. ***Staphylococcus lugdunensis* endocarditis: a complication of vasectomy?** Mayo Clin. Proc. 74:1227-1230, 1999.

FRANK, K.L. & PATEL, R. **Poly-N-acetylglucosamine is not a major component of the extracellular matrix in biofilms formed by *icaADBC*-positive *Staphylococcus lugdunensis* isolates**. Infect. Immun. 75:4728-4742, 2007.

FRANK, K.L.; DEL POZO, J.L. & PATEL, R. **From clinical microbiology to infection pathogenesis: how daring to be different works for *Staphylococcus lugdunensis***. J. Clin. Microbiol. 21:111-133, 2008.

FRANK, K.L.; REICHERT, E.J.; PIPER, K.E. & PATEL, R. **In vitro effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates**. Antimicrob. Agents Chemother. 51:888-895, 2007.

FRENEY, J.; BRUN, Y.; BES, M.; MEUGNIER, H.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A. D.; NERVI, C. & FLEURETTE, J. ***Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., two species from human clinical specimens**. Int. J. Syst. Bacteriol. 38:168-172, 1988.

FUJITA, K.; AKINO, T. & YOSHIOKA, H. **Characteristics of the heatstable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa***. Infect. Immun. 56:1385-1387, 1988.

GARCIA, P.; BENITEZ, R.; LAM, M.; SALINAS, A.M.; WIRTH, H.; ESPINOZA, C.; GARAY, T.; DEPIX, M.S.; LABARCA, J. & GUZMAN, A.M. **Coagulase-negative staphylococci: clinical, microbiological and molecular features to predict true bacteraemia**. J. Med. Microbiol. 53:67-72, 2004.

GEOGHEGAN, J.A.; GANESH, V.K.; SMEDS, E.; LIANG, X; HOOK, M. & FOSTER, T.J. **Molecular characterization of the interaction of staphylococcal MSCRAMMS CLFA and FBL with fibrinogen**. J. Biol. Chem. 2010 (in Press)

GREIG, J.M. & WOOD, M.J. ***Staphylococcus lugdunensis* vertebral osteomyelitis**. Clin. Microbiol. Infect. 9:1139-1141, 2003.

HAILE, D.T.; HUGHES, J.; VETTER, E.; KOHNER, P.; SNYDER, R.; PATEL, R. & COCKERILL, F.R. 3RD. **Frequency of isolation of *Staphylococcus lugdunensis* in consecutive urine cultures and relationship to urinary tract infection**. J. Clin. Microbiol. 40:654-656, 2002.

HARTFORD, O; FRANCOIS, P; VAUDAUX, P. & FOSTER, T.J. **The dipeptide repeat region of the fibrinogen-binding protein (clumping factor) is required for functional expression of the fibrinogen-binding domain on the *Staphylococcus aureus* cell surface**. Mol. Microbiol. 25:1065-1076, 1997.

HARTLEIB, J.; KÖHLER, N.; DICKINSON, R.B.; CHHATWAL, G.S.; SIXMA, J.J.; HARTFORD, O.M; *et al.* **Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus***. Blood. 2000 96:2149-2156, 2000.

HEBERT, G.A. **Hemolysins and other characteristics that help differentiate and biotype *Staphylococcus lugdunensis* and *Staphylococcus schleiferi***. J. Clin. Microbiol. 28:2425-2431, 1990.

HELLBACHER, C.; TÖRNQVIST, E. & SÖDERQUIST B. ***Staphylococcus lugdunensis*: clinical spectrum, antibiotic susceptibility, and phenotypic and genotypic patterns of 39 isolates**. Clin. Microbiol. Infect. 12:43-49, 2006.

HERCHLINE, T.E. & AYERS, L.W. **Occurrence of *Staphylococcus lugdunensis* in consecutive clinical cultures and relationship of isolation to infection**. J. Clin. Microbiol. 29:419-421, 1991.

HERCHLINE, T.E.; BARNISHAN, J.; AYERS, L.W. & FASS, R.J. **Penicillinase production and *in vitro* susceptibilities of *Staphylococcus lugdunensis*.** Antimicrob. Agents Chemother. 34:2434-2435, 1990.

HUEBNER, J. & GOLDMANN, D. A. **Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens.** Annu. Rev. Med. 50:223-236, 1999.

HUSSAIN, Z.; STOAKES, L.; MASSEY, V.; DIAGRE, D.; FITZGERALD, V.; EL SAYED, S. & LANNIGAN, R. **Correlation of oxacillin MIC with *mecA* gene carriage in coagulase-negative staphylococci.** J. Clin Microbiol. 38:752-754, 2000.

ITO, T.; MA, X.X.; TAKEUCHI, F.; OKUMA, K.; YUZAWA, H. & HIRAMATSU, K. **Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccr*.** Antimicrob. Agents Chemother., 48, 2637-2651, 2004.

JARLOV, J.O. **Phenotypic characteristics of coagulase-negative staphylococci: typing and antibiotic susceptibility.** APMIS. 107: 1S-42S, 1999.

KAABIA, N.; SCAUARDA, D.; LENA, G. & DRANCOURT, M. **Molecular identification of *Staphylococcus lugdunensis* in a patient with meningitis.** J. Clin. Microbiol. 40:1824-1825, 2002.

KANIGA, K.; TUCKER, S.; TROLLINGER, D. & GALÁN, J.E. **Homologs of the *Shigella* IpaB and IpaC invasins are required for *Salmonella typhimurium* entry into cultured epithelial cells.** Bacteriol. 177:3965-3971, 1995.

KAPLAN, J.B.; RAGUNATH, C.; VELLIYAGOUNDER, K.; FINE, D.H. & RAMASUBBU, N. **Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms.** Antimicrob. Agents. Chemother. 48:2633-2636, 2004.

KAWAGUCHI, E.; MINAMIDE, W.; MORI, H. & IGMI, H. **The taxonomic distribution, characteristic and susceptibility against antimicrobial agents of methicillin-resistant *Staphylococci* isolated from blood.** Kansenshogaku Zasshi. 70, 1147-1153, 1996.

KOH, T.W.; BRECKER, S.J.; LAYTON, C.A. **Successful treatment of *Staphylococcus lugdunensis* endocarditis complicated by multiple emboli: a case report and review of the literature.** Int. J. Cardiol. 55:193-197, 1996.

KONDO, Y.; ITO, T.; MA, X.X.; WATANABE, S.; KREISWIRTH, B.N.; ETIENNE, J. & HIRAMATSU, K. **Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions.** Antimicrob. Agents Chemother. 51: 264-274, 2007.

KRAGSBJERG, P.; BOMFIM-LOGGNA, J.; TÖRNQVIST, E. & SÖDERQUIST, B. **Development of antimicrobial resistance in *Staphylococcus lugdunensis* during treatment-report of a case of bacterial arthritis, vertebral osteomyelitis and infective endocarditis.** Clin. Microbiol. Infect. 6:496-499, 2000.

LAMBE, D.W.; FERGUSON, K.P. JR.; KEPLINGER, K.L.; GEMMEL, C.G. & KALBFLEISCH, J.H. **Pathogenicity of *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus schleiferi* and three others coagulase-negative staphylococci in a mouse model and possible virulence factors.** Can. J. Microbiol. 36: 455-463, 1990.

LARKIN, E.A.; CARMAN, R.J.; KRAKAUER, T. & STILES, B.G. ***Staphylococcus aureus*: the toxic presence of a pathogen extraordinaire.** Curr. Med. Chem. 16:4003-4019, 2009.

LEUNG, M.J.; NUTTALL, N.; PRYCE, T.M.; COOMBS, G.W. & PEARMAN JW. **Colony variation in *Staphylococcus lugdunensis*.** J. Clin. Microbiol. 36:3096-3098, 1998.

LYYTIKÄINEN, O.; LUMIO, J.; SARKKINEN, H.; KOLHO, E.; KOSTIALA, A. & RUUTU, P. & the Hospital Infection Surveillance Team. **Nosocomial bloodstream infections in finish hospitals during 1999-2000.** Clin. Infect. Dis. 35: e14-e19, 2002.

MENZIES, B.E. & KOURTEVA, I. ***Staphylococcus aureus* alpha-toxin induces apoptosis in endothelial cells.** FEMS Immunol. Med. Microbiol. 29:39-45, 2000.

MERINO, P.; ARRIBI, A.; GESTOSO, I.; PICAZO, J.; GIMENO, L. & DEL POTRO, E. **Linezolid treatment of a prosthetic joint infection with *Staphylococcus lugdunensis* in a patient with multiple myeloma.** Int. J. Antimicrob. Agents. 2009 (in Press).

MITCHELL, J; TRISTAN, A. & FOSTER, T.J. **Characterization of the fibrinogen-binding surface protein Fbl of *Staphylococcus lugdunensis*.** Microbiology. 150:3831-3841, 2004.

NILSSON, M.; BJERKETORP, J.; GUSS, B. & FRYKBERG, L. **A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus lugdunensis*.** FEMS Microbiol. Lett. 241:87-93, 2004a.

NILSSON, M.; BJERKETORP, J.; WIEBENSJÖ, A.; LJUNGH, A.; FRYKBERG, L. & GUSS, B. **A von Willebrand factor-binding protein from *Staphylococcus lugdunensis*.** FEMS Microbiol. Lett. 234:155-161, 2004b.

NNIS SYSTEM. **National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) system report, data summary from january 1992 through june 2004, issued august 2003.** Am. J. Infect. Control. 32: 470-485, 2004.

NOGUCHI, N.; GOTO, K.; RO, T.; NARUI, K.; KO, M.; NASU, Y.; UTSUMI, K.; TAKAZAWA, K.; MORIYASU, F. & SASATSU, M. **Using the tannase gene to rapidly and simply identify *Staphylococcus lugdunensis*.** Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 66:120-123, 2010.

OTTO, M. **Virulence factors of coagulase-negative staphylococci.** Front. Biosci. 9:841-863, 2004.

OTTO, M. **Staphylococcal biofilms.** Curr. Top. Microbiol. Immunol. 322:207-228, 2008.

OTTO, M. ***Staphylococcus epidermidis*--the 'accidental' pathogen.** Nat. Rev. Microbiol. 7:555-567, 2009.

PADA, S.; LYE, D.C.; LEO, Y.S. & BARKHAM, T. **Utility of 16S ribosomal DNA sequencing in the diagnosis of *Staphylococcus lugdunensis* native valve infective endocarditis: case report and literature review.** Int. J. Infect. Dis. 13:e511-513, 2009.

PATEL, R.; PIPER, K.E.; ROUSE, M.S.; UHL, J.R.; COCKERILL, F.R. 3RD & STECKELBERG, J.M. **Frequency of isolation of *Staphylococcus lugdunensis* among staphylococcal isolates causing endocarditis: a 20-year experience.** J. Clin. Microbiol. 38:4262-4263, 2000.

PENG, H.L.; NOVICK, R.P.; KREISWIRTH, B.; KORNBLUM, J. & SCHLIEVERT P. **Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*.** J. Bacteriol. 170:4365-4372, 1988.

PÉREZ, J.C.; APOLINARIO, R.M.; PEÑA, P.; SUÁREZ, M. & GÓMEZ, J. ***Staphylococcus lugdunensis* pneumonia.** Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 20:39-40, 2002.

PINSKY, B.A.; SAMSON, D.; GHAFGHAICHI, L.; BARON, E.J. & BANAEI, N. **Comparison of real-time PCR and conventional biochemical methods for identification of *Staphylococcus lugdunensis*.** J. Clin. Microbiol. 47:3472-3477, 2009.

PITTET, D., HARBARTH, S., RUEF, C., FRANCIOLI, P., SUDRE, P., PÉTIGNAT, C., TRAMPUZ, A. & WIDMER, A. **Prevalence and risk factors for nosocomial infections in four university hospitals in Switzerland.** Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 20: 37-42, 1999.

PROCTOR, R.A.; BATES, D.M. & MCNAMARA, P.J. **Electron transport-deficient *Staphylococcus aureus* small-colony variants as emerging pathogens.** In: Emerging Infections (Sched, W.M; Craig, W.A.; Hughes, J.M., eds) Washington: ASM Press, 2001. p 95-110, 2001.

RENZULLI, A.; DELLA CORTE, A.; TORELLA, M.; DIALETTO, G. & COTRUFO, M. **Mitral and aortic valve endocarditis due to *Staphylococcus lugdunensis*.** Tex. Heart. Inst. J. 27:67-9, 2000.

RYBAK, M.J. **The pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of vancomycin.** Clin. Infect. Dis. 42: 35-39, 2006.

SÁNCHEZ, P.; BUEZAS, V. & MAESTRE, J.R. ***Staphylococcus lugdunensis* infection: Report of thirteen cases.** Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 19:475-478, 2001.

SAXENA A.K. & PANBOTRA B.R. **Haemodialysis catheter-related bloodstream infections: current treatment options and strategies for prevention.** Swiss. Med. Wkly. 135:127-138, 2005.

SCHNITZLER, N.; MEILICKE, R.; CONRADS, G.; FRANK, D. & HAASE, G. ***Staphylococcus lugdunensis*: report of a case of peritonitis and an easy-to-perform screening strategy.** J. Clin. Microbiol. 36:812-813, 1998.

SCHWARTZ, D.C.; SAFFRAN, W.; WELSH, J.; HAAS, R.; GOLDENBERG, M. & CANTOR, C.R. **New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging.** Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 47: 189-195, 1983.

SEENIVASAN, M.H. & YU, V.L. ***Staphylococcus lugdunensis* endocarditis - the hidden perfil of coagulase-negative staphylococcus in blood cultures.** Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 22:489-491, 2003.

SEIFERT, H.; OLTMANN, D.; BECKER, K.; WISPLINGHOFF, H. & VON EIFF, C. ***Staphylococcus lugdunensis* pacemaker-related infection.** Emerg. Infect. Dis. 11:1283-1286, 2005.

SHEPPARD, M. & JANKOWSKI, S. ***Staphylococcus lugdunensis* endocarditis.** J. Infect. 25:116-117, 1992.

SINGH A., GOERING R.V., SIMJEE S., FOLEY S.L. & ZERVOS M.J. **Application of molecular techniques to the study of hospital infection.** Clin. Microbiol. Rev. 19:512-530, 2006.

SMITH, R.L. **Prevention of infection in the intensive care unit.** Curr. Opin. Infect. Dis. 19:323-6, 2006.

SMITH, T. & JARVIS, W. **Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*.** Microb. Infect. 1: 795-805, 1999.

SPANU, T.; RIGANTE, D.; TAMBURRINI, G.; FIORI, B.; D'INZEO, T.; POSTERARO, B.; POLICICCHIO, D.; SANGUINETTI, M. & FADDA, G. **Ventriculitis due to *Staphylococcus lugdunensis*: two case reports.** J. Med. Case Reports. 11:267, 2008.

SPANU, T.; SANGUINETTI, M.; CICCAGLIONE, D.; D'INZEO, T.; ROMANO, L.; LEONE, F. & FADDA, G. **Use of the VITEK 2 system for rapid identification of clinical isolates of staphylococci from bloodstream infections.** J. Clin. Microbiol. 41:4259-4263, 2003.

STEPANOVIĆ, S; VUKOVIĆ, D; HOLA, V; DI BONAVENTURA, G; DJUKIĆ, S; CIRKOVIĆ, I; & RUZICKA, F. **Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci.** APMIS. 115:891-899, 2007.

STOUT, R.D. ; LI, Y. ; MILLER, A.R & LAMBE, D.W. **Staphylococcal glyocalix activates macrophage prostaglandin E2 and interleukin 1 production and modulates tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production.** Infect. Immun. 62:4160-4166, 1994.

STREIT, J.M., JONES, R.N., SADER, H.S. & FRITSCH, T.R. **Assessment of pathogen occurrences and resistance profiles among infected patients in the intensive care unit: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (North America, 2001).** Intern. J. Antimicrob. Agents. 24: 111-118, 2004.

STRUELENS, M.J.; HAWKEY, P.M.; FRENCH, G.L.; WITTE, W. & TACCONELLI, E. **Laboratory tools and strategies for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* screening, surveillance and typing: state of the art and unmet needs.** Clin. Microbiol. Infect. 15:112-119, 2009.

TAKAHASHI, N.; SHIMADA, T.; ISHIBASHI, Y.; YOSHITOMI, H.; SUGAMORI, T.; SAKANE, T.; SATO, H.; OYAKE, N. & MURAKAMI, Y. **The pitfall of coagulase-negative staphylococci: A case of *Staphylococcus lugdunensis* endocarditis.** Int. J. Cardiol. 137:e15-e17, 2009.

TAN, T.Y.; NG, S.Y. & HE, J. **Microbiological characteristics, presumptive identification, and antibiotic susceptibilities of *Staphylococcus lugdunensis*.** J. Clin. Microbiol. 46:2393-2395, 2008.

TANG, Y.W.; HAN, J.; MCCORMAC, M.A.; LI, H. & STRATTON, C.W. ***Staphylococcus pseudolugdunensis* sp. nov., a pyrrolidonyl arylamidase/ornithine decarboxylase-positive bacterium isolated from blood cultures.** Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 60:351-359, 2008.

TEE, W.S.; SOH, S.Y.; LIN, R. & LOO, L.H. ***Staphylococcus lugdunensis* carrying the *mecA* gene causes catheter-associated bloodstream infection in premature neonate.** J. Clin. Microbiol. 41:519-520, 2003.

- THOMAS, S.; HOY, C. & CAPPER, R. **Osteomyelitis of the ear canal caused by *Staphylococcus lugdunensis***. J. Infect. 53:227-229, 2006.
- VAN DER MEE-MARQUET, N.; ACHARD, A.; MEREGHETTI, L.; DANTON, A; MINIER, M. & QUENTIN, R. ***Staphylococcus lugdunensis* infections: high frequency of inguinal area carriage**. J. Clin. Microbiol. 41:1404-1409, 2003.
- VANDENESCH, F.; ETIENNE, J; REVERDY, M.E. & EYKYN, S.J. **Endocarditis due to *Staphylococcus lugdunensis*: Report of 11 cases and review**. Clin. Infect. Dis. 17:871-876, 1993.
- VISCHER, U.M. & DE MOERLOOSE, P. **von Willebrand factor: From cell biology to the clinical management of von Willebrand disease**. Crit. Rev. Onc. Hematol. 30:93-109, 1999.
- WALSH, B. & MOUNSEY, J.P. ***Staphylococcus lugdunensis* and endocarditis**. J. Clin. Pathol. 43:171, 1990.
- WATSON, D.C. ; YAGUCHI, M. ; BISAILLON, J.G. ; BEAUDET, R. & MOROSOLI, R. **The amino acid sequence of a gonococcal growth inhibitor from *Staphylococcus haemolyticus***. Biochem. J. 252:87-93, 1988.
- WEINSTEIN, R.A. **Nosocomial infection update**. Emerg. Infect. Dis. 4: 416-420, 1998.
- WHO (World Health Organization). **Prevention of hospital-acquired infection: a practical guide**. 2nd edition, 2006.
- WILKINSON, B.J. **Biology**. In: The staphylococci in human disease (Crossley K.B & Archer, G.L., eds), Churchill Livingstone, New York, USA. p. 1-38, 1997.
- YOU, Y.O.; KIM, K.J.; MIN, B.M. & CHUNG, C.P. ***Staphylococcus lugdunensis* - a potential pathogen in oral infection**. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. 88:297-302, 1999.
- ZINKERNAGEL, A.S.; ZINKERNAGEL, M.S.; ELZI, M.V.; GENONI, M.; GUBLER, J.; ZBINDEN, R. & MUELLER, N.J. **Significance of *Staphylococcus lugdunensis* bacteremia: report of 28 cases and review of the literature**. Infection. 36:314-321, 2008.

ANEXO 1

Tabela 1 – Características fenotípicas de 26 amostras clínicas de *S. lugdunensis* inicialmente avaliadas

Número da Amostra	Hospital	Sítio de Isolamento	Ano de Isolamento	Identificação no Hospital de Origem / Método	Morfologia Colonial	Identificação bioquímica - Laboratório IH					Resultado Final
						Coag.	FC	PYR	ORN	DNase	
10	HGB	Sangue	1996	<i>S. lugdunensis</i> /Bioquimica	lisa	-	+	+	+	+	<i>S. lugdunensis</i>
21	HUAP	Ponta cateter	1997	<i>S. lugdunensis</i> /Bioquimica	lisa	-	+	+	+	+	<i>S. lugdunensis</i>
33	HUCFF	Sangue	1997	<i>S. lugdunensis</i> /Vitek	lisa	-	+	+	+	+	<i>S. lugdunensis</i>
97	HNMD	Sangue	1999	<i>S. lugdunensis</i> /MicroScan	rugosa	-	+	+	+	+	<i>S. lugdunensis</i>
98	HNMD	Sítio cirurgico	1999	<i>S. lugdunensis</i> /MicroScan	rugosa	-	+	+	+	+	<i>S. lugdunensis</i>
142	HNMD	Sangue	2002	<i>S. lugdunensis</i> /MicroScan	lisa	-	+	+	+	+	<i>S. lugdunensis</i>
157	HNMD	Sangue	2002	<i>S. lugdunensis</i> /MicroScan	lisa	-	+	+	+	+	<i>S. lugdunensis</i>
451	HNMD	Urina	2004	<i>S. lugdunensis</i> /MicroScan	lisa	-	+	+	+	+	<i>S. lugdunensis</i>
468	HUCFF	Sangue	2005	<i>S. aureus</i> /Bioquimica ^b	lisa	-	+	+	+	+	<i>S. lugdunensis</i>
632	HNMD	Sangue	2005	<i>S. lugdunensis</i> /MicroScan	lisa	-	+	+	+	+	<i>S. lugdunensis</i>
633	HNMD	Sangue	2005	<i>S. lugdunensis</i> /MicroScan	lisa	-	+	+	+	+	<i>S. lugdunensis</i>
469	LSF	Punção	2006	<i>S. lugdunensis</i> /Vitek	lisa	-	+	+	+	+	<i>S. lugdunensis</i>
515	INTO	Sec. Ferida	2006	<i>S. lugdunensis</i> /MicroScan	lisa	-	+	+	+	+	<i>S. lugdunensis</i>
516	INTO	Sangue	2006	<i>S. lugdunensis</i> /MicroScan	lisa	+	+	-	-	+	<i>S. aureus</i>
540	HNMD	Sec. Mama	2006	<i>S. lugdunensis</i> /MicroScan	lisa	-	+	+	+	+	<i>S. lugdunensis</i>
541	HNMD	Sangue	2006	<i>S. lugdunensis</i> /MicroScan	lisa	-	+	+	+	+	<i>S. lugdunensis</i>
542	HNMD	Sangue	2006	<i>S. lugdunensis</i> /MicroScan	lisa	-	-	-	-	-	<i>Staphylococcus spp.</i>
543	HNMD	Sangue	2006	<i>S. lugdunensis</i> /MicroScan	lisa	-	+	+	+	+	<i>S. lugdunensis</i>
544	HNMD	Sangue	2007	<i>S. lugdunensis</i> /MicroScan	lisa	-	-	-	-	-	<i>Staphylococcus spp.</i>
545	HNMD	Sec. ferida	2007	<i>S. lugdunensis</i> /MicroScan	lisa	-	+	+	+	+	<i>S. lugdunensis</i>
546	HNMD	Sangue	2007	<i>S. lugdunensis</i> /MicroScan	rugosa	-	+	+	+	+	<i>S. lugdunensis</i>
611	HNMD	Sangue	2007	<i>S. lugdunensis</i> /MicroScan	lisa	-	+	+	+	+	<i>S. lugdunensis</i>
612	HNMD	Sangue	2008	<i>S. lugdunensis</i> /MicroScan	lisa	-	+	+	+	+	<i>S. lugdunensis</i>
619	HNMD	Sangue	2008	<i>S. lugdunensis</i> /MicroScan	lisa	-	+	+	+	+	<i>S. lugdunensis</i>
644	HNMD	Infec. Prótese	2008	<i>S. lugdunensis</i> /MicroScan	lisa	-	+	+	+	+	<i>S. lugdunensis</i>
645	IFF	Swab nasal	2008	<i>S. lugdunensis</i> /Vitek	lisa	-	+	+	+	+	<i>S. lugdunensis</i>

HGB = Hospital Geral de Bonsucesso; HUAP = Hospital Universitário Antônio Pedro; HUCFF = Hospital Universitário Clementino Fraga Filho; HNMD = Hospital Naval Marcílio Dias; LSF = Laboratório Sergio Franco; INTO = Instituto Nacional de Traumatologia-Ortopedia; IFF = Instituto Fernandes Figueira; Coag.= teste da coagulase; FC = fator *clumping*; PYR = produção de pirrolidônio-amilidase; ORN = produção de ornitina-descarboxilase; * Teste fracamente positivo, detectado entre 30s e 60s após início do teste.

ANEXO 2

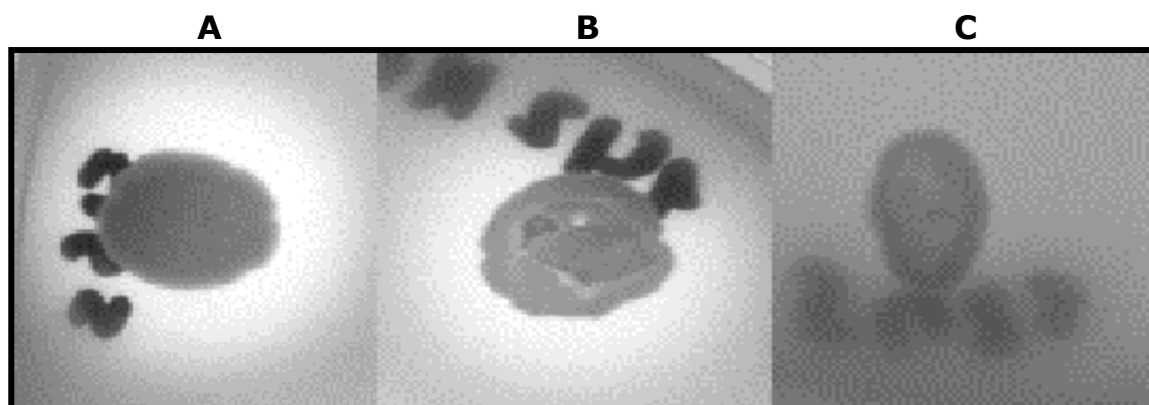


Figura 1 – Teste para detecção de DNase em amostras de *S. aureus* (A), *S. lugdunensis* (B) e *S. epidermidis* (C) utilizando Agar DNase (Gibco). As amostras A e B foram consideradas positivas no teste, e a amostra C considerada negativa (observação de halo transparente após adição de HCl 1N no meio de cultura).

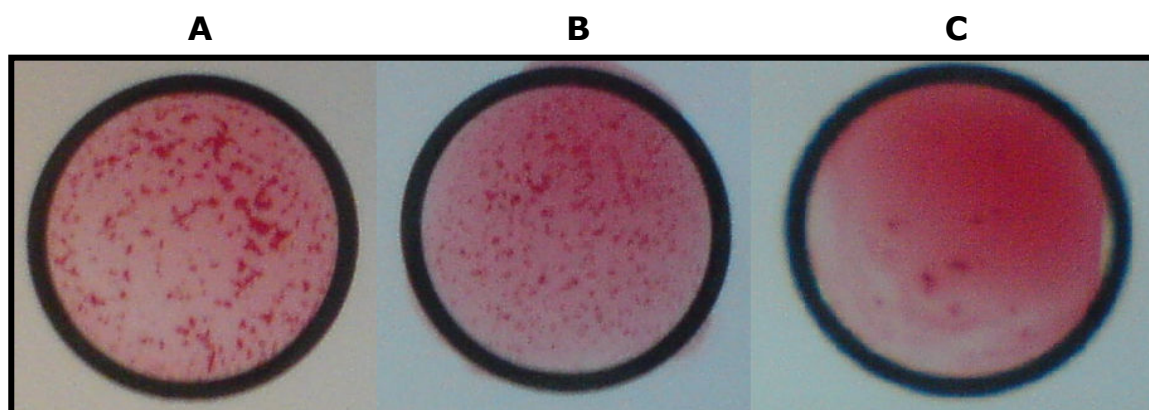


Figura 2 – Teste para detecção do fator *clumping* em amostras de *S. aureus* (A) e *S. lugdunensis* (B, C) utilizando o kit "Partorex StaphPlus" (Bio-Rad). As amostras A e B foram consideradas positivas no teste, e a amostra C considerada negativa, conforme interpretação baseada nas instruções do fabricante (observação de aglutinação em até 30 s). No entanto, pode-se observar formação de aglutinação na amostra C, quando observada em 60 s.

ANEXO 3

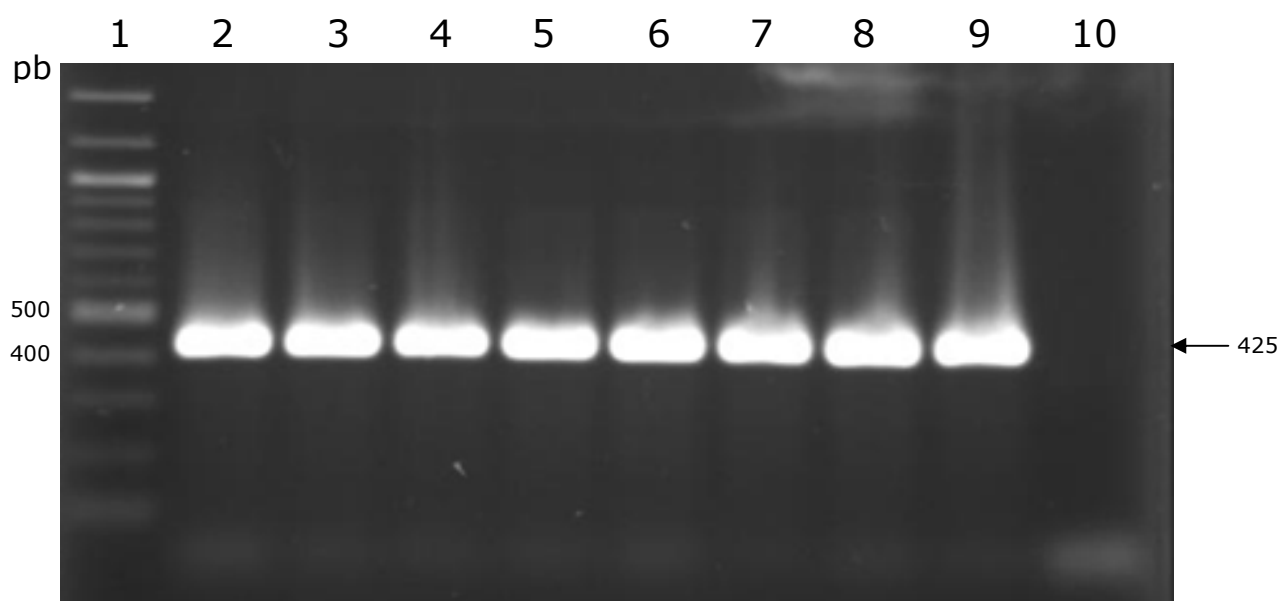


Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose evidenciando um segmento de 425 pb do gene *fbl* em amostras de *S. lugdunensis* após reação de PCR: Linha 1 - padrão de tamanho de DNA em pares de bases (100pb *ladder*); Linha 2: controle positivo (amostra tipo DSMZ 4804); Linhas 3 a 9 - amostras clínicas; Linha 10 - controle negativo (*S. aureus* ATCC 25923)

ANEXO 4

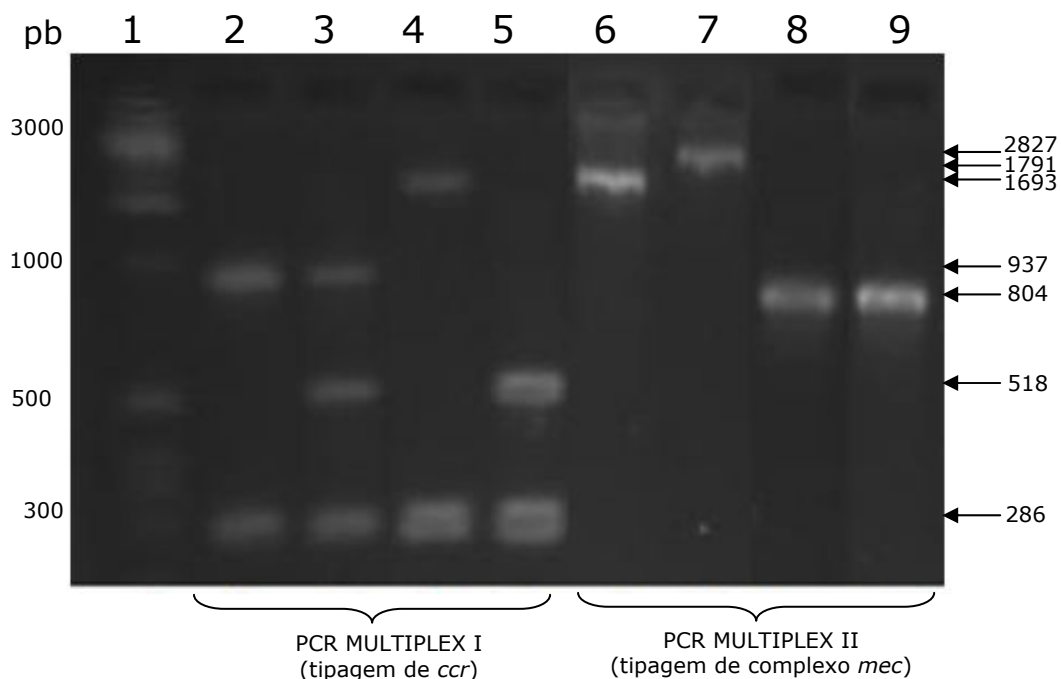


Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose evidenciando segmentos de duas reações de PCR multiplex para detecção do SCC*mec*: segmento de 286 pb (gene *mecA*), 937 pb (gene *ccr* tipo 2), 1791 pb (gene *ccr* tipo 3), 518 pb (gene *ccr* tipo 5 (PCR Multiplex 1) e 1693 pb (gene *mec* classe A), 2827 pb (gene *mec* classe B) e 804 pb (gene *mec* classe C) (PCR Multiplex 2); Linha 1 – padrão de tamanho de DNA em pares de bases (1 Kb DNA *ladder*); Linhas 2 a 4: controles dos tipos de *ccr*: 2, 2+5 e 3, respectivamente, em conjunto com o fragmento correspondente ao gene *mecA* (286 pb); Linhas 6 a 8: controles das classes *mec*: A, B e C, respectivamente; Linhas 5 e 9: Amostra 468, *ccr* tipo 5 e *mec* classe C, respectivamente. (KONDO *et al.*, 2007)

ANEXO 5

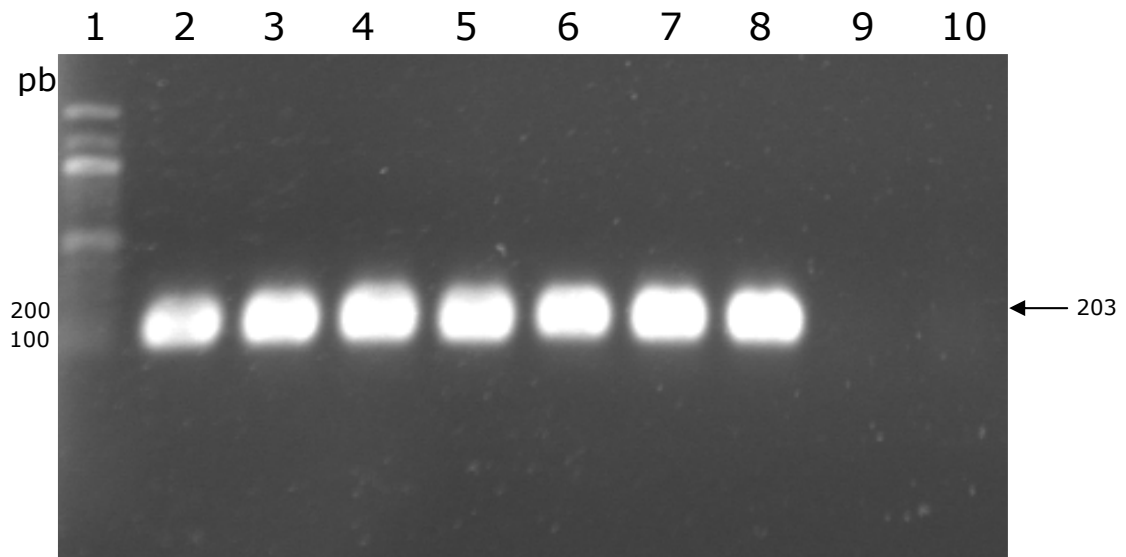


Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose evidenciando um segmento de 203 pb do gene *slush* em amostras de *S. lugdunensis* após reação de PCR. Linha 1 – padrão de tamanho de DNA em pares de bases (100pb *ladder*); Linha 2: amostra tipo (DSMZ 4804); Linhas 3 a 8 – amostras clínicas; Linha 9 – controle negativo (*S. aureus* ATCC 25923); Linha 10: controle negativo da reação

ANEXO 6

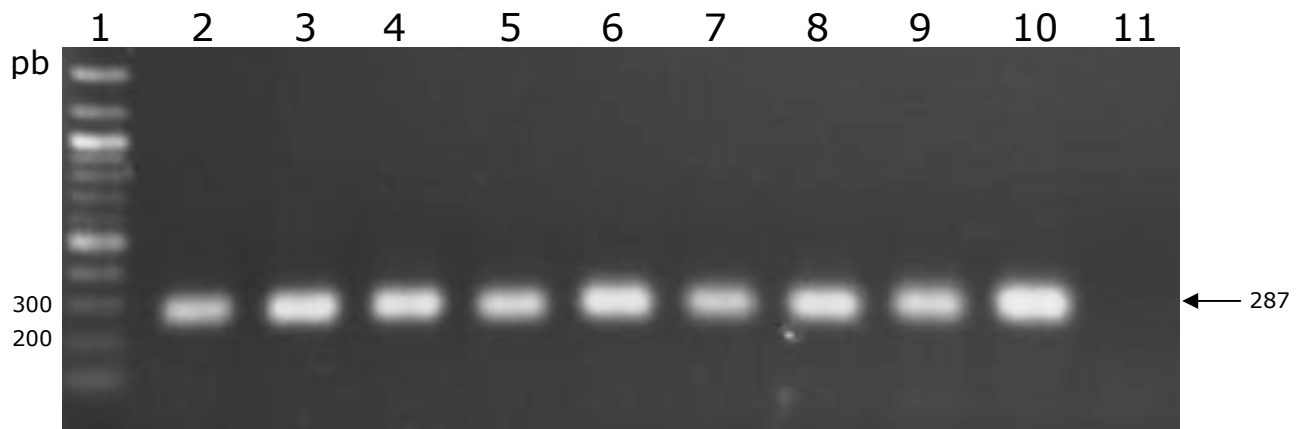


Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose evidenciando um segmento de 287 pb do gene *ica* em amostras de *S. lugdunensis* após reação de PCR. Linha 1 - padrão de tamanho de DNA em pares de bases (100pb *ladder*); Linha 2: controle positivo (*S. epidermidis* ATCC 35984); Linha 3: Amostra tipo (*S. lugdunensis* DSMZ 4804); Linhas 4 a 10 - amostras clínicas de *S. lugdunensis*; Linha 11 - controle negativo (*S. epidermidis* ATCC 12228).

ANEXO 7



Figura 1 – Evidência da produção de biosurfactante por *S. lugdunensis*. Após mistura de uma suspensão bacteriana (turbacão correspondente à escala Mc Farland 0,5) com n-hexadecano observa-se a formação de emulsão por amostra formadora de colônias rugosas (tubo à direita). À esquerda temos uma amostra de formadora de colônias lisas.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)