

Enterotoxinas, biofilm y resistencia a los agentes antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus coagulasa* negativa aisladas de hemocultivos

Enterotoxins, Biofilm and Resistance to Antimicrobial Agents of Coagulase-Negative Staphylococcus Strains Isolated from Blood Cultures

**Karelis Lilibeth Nava Terán¹,
Dalialba María Sánchez Galvis¹,
Gladis Colina López ²,
Kutchynskaya Valero Leal ³.**

¹Estudiantes de Bioanálisis. ²Laboratorio de Bacteriología, Escuela de Bioanálisis. ³Cátedra de Bacteriología Clínica, Escuela de Bioanálisis. Universidad del Zulia.
kutchynskaya@gmail.com

Resumen

Staphylococcus coagulasa negativa (SCN) es el microorganismo que se aísla con mayor frecuencia en los hemocultivos. Sin embargo, es poco el conocimiento que se tiene sobre los factores de virulencia producidos por SCN que contribuyen a la patogénesis de las infecciones causadas por estos microorganismos. El presente estudio se realizó para determinar la producción de enterotoxinas estafilocócicas, la producción de biofilm y la resistencia a los agentes antimicrobianos. Con este propósito, un total 48 cepas de SCN aisladas de hemocultivo en el Hospital Universitario de Maracaibo, Zulia, Venezuela fueron estudiadas. Las enterotoxinas estafilocócicas fueron detectadas por aglutinación en látex pasiva reversa. La producción de biofilm fue evaluada por un ensayo cuantitativo usando microplacas. La susceptibilidad contra los agentes antimicrobianos fue probada por el método de difusión del disco. Seis cepas (12,5%) aisladas de estafilococos fueron enterotoxigénicas. De estas, 3 fueron positivas para enterotoxina estafilocócica D (EED), 2 para enterotoxina estafilocócica A (EEA) y 1 de los aislamientos fueron positivos para enterotoxina estafilocócica B (EEB), enterotoxina estafilocócica C (EEC) y EED. Veintiuno de los aislamientos (44%) fueron productores de biofilm. Alta frecuencia de resistencia fue observada contra oxacilina (90%), gentamicina (83%) y eritromicina (67%). Ningún aislamiento mostró resistencia a vanco-

Recibido: 10-09-13 / Aceptado: 28-11-13

micina. Teniendo en cuenta que la importancia etiológica de SCN a menudo ha sido ignorada, la presente investigación confirmó que estos microorganismos no deben ser ignorados o clasificados como contaminantes.

Palabras clave: *Staphylococcus* coagulasa-negativa, enterotoxinas, biofilm, resistencia, hemocultivo.

Abstract

Coagulase-negative staphylococci (CNS) have been identified as the etiological agent in various infections and are currently the microorganisms most frequently isolated in blood cultures. However, little is known about the virulence factors produced by CNS that contribute to the pathogenesis of infections caused by these microorganisms. This study was designed to determine the production of staphylococcal enterotoxins, biofilm production and resistance to antimicrobial agents. For this purpose, a total of 48 CNS strains isolated from blood cultures at the University Hospital in Maracaibo, Zulia, Venezuela, were studied. Staphylococcal enterotoxins were detected by reversed passive latex agglutination. Biofilm production was assessed in a quantitative assay using a microtiter-plate. Susceptibility against antimicrobial agents was tested by the disk diffusion method. Six strains of staphylococci isolates (12.5%) were found to be enterotoxigenic. Of these, 3 strains were positive for staphylococcal enterotoxin D (SED), 2 for SEA and 1 of the isolates was positive for SEB, SEC and SED. Twenty-one isolates (44%) were found to be biofilm producers. A high frequency of resistance was observed with oxacillin (90%), gentamicin (83%) and erythromycin (67%). None of the isolates showed resistance to vancomycin. Taking into consideration that the etiological importance of CNS has often been neglected, the present investigation confirmed that these microorganisms should not be ignored or classified as mere contaminants.

Key words: Coagulase-negative, staphylococcus, enterotoxins, biofilm, resistance, blood culture.

Introducción

Por muchos años, se consideró como contaminante la presencia de *Staphylococcus* coagulasa negativa (SCN) en hemocultivos motivo por el cual no se le daba importancia al aislamiento de este tipo de microorganismo en las muestras de sangre (1). No obstante, en las últimas décadas se ha definido el papel patógeno que tienen los SCN en el torrente sanguíneo. Actualmente, son la principal causa de bacteriemia y sepsis en niños recién nacidos, en los pacientes ingresados en centros hospitalarios, especialmente en las áreas donde el uso de catéteres venosos centrales es muy frecuente (2).

Las especies de SCN más involucradas en patología humana son: *Staphylococcus epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus*, que en conjunto alcanzan hasta el 80% de los casos; el resto se debe a *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus hominis* subsp. *hominis*, *S. warneri*, *S. simulans*, *S. capitis* subsp. *ureolyticus*, *S. auricularis*, *S. cohnii* subsp. *urealyticum*, entre otras (3).

El factor de virulencia más importante de las especies de SCN asociadas a procesos infecciosos es la capacidad de producir biofilm. El biofilm beneficia a los microorganismos que lo forman, al conferirle protección frente a los mecanismos de defensa del hospedador y pro-

tegerlos de la acción de los agentes antimicrobianos (4). En los últimos años, se ha reportado un incremento de la resistencia a los agentes antimicrobianos por parte de los SCN especialmente contra los antibióticos b-lactámicos (5), siendo actualmente uno de los microorganismos multiresistentes que ocupa los primeros lugares como patógeno intrahospitalario en todo el mundo (6).

Recientemente, se le ha atribuido a los SCN su papel enterotoxigénico en los procesos infecciosos en los que está involucrado al demostrarse la presencia del gen *se* y la producción de enterotoxinas (SE) en estas cepas (7-9). La presente investigación se realizó con el fin de determinar la capacidad enterotoxigénica, la producción de biofilm y la resistencia a los agentes antimicrobianos en cepas de SCN aislados en hemocultivos de pacientes hospitalizados en el Hospital Universitario de Maracaibo.

Materiales y Métodos

Se estudiaron un total de 48 cepas de SCN aisladas de hemocultivo. Los hemocultivos fueron analizados bacteriológicamente por el personal que labora en el Centro Regional de Referencia Bacteriológica del Hospital Universitario de Maracaibo, para ello utilizaron técnicas de diagnóstico convencionales descritos por Koneman y col. (10). Para la identificación a nivel de especie se utilizó el sistema automatizado VITEK (GPI-bioMérieux, Lyon, France). Las 48 cepas se recolectaron durante los meses de abril a julio del año 2010 y los meses de septiembre a octubre del año 2012; y fueron identificadas de la siguiente manera: *S. epidermidis* (20), *S. hyicus* (6), *S. hominis* (3), *S. sciuri* (3), *S. simulans* (1), *S. saprophyticus* (1), *S. capitis* (1), *S. lentus* (1) y 12 cepas de SCN que no pudieron identificarse por VITEK. Para la selección de

las cepas de SCN no se tomó en cuenta ni la edad ni el sexo de los pacientes. Los criterios de inclusión de las cepas fueron: a) aislamientos provenientes de hemocultivos positivos (2 frascos por pacientes); y b) aislamientos procedentes de pacientes sin catéter.

La sensibilidad y la resistencia a los agentes antimicrobianos se determinaron por el método de difusión del disco en agar de Bauer-Kirby siguiendo los lineamientos del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (IECL) (11). El inóculo se preparó por el método de suspensión directa de colonias en solución fisiológica estéril, la turbidez se ajustó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 625nm, cuando la suspensión bacteriana presentó una absorbancia entre 0,08 y 0,1, equivalente al patrón 0,5 de MacFarland. El inóculo estandarizado se sembró en placas de agar Mueller Hinton en forma homogénea por toda la superficie, posteriormente se colocaron los discos impregnados de antibióticos a concentraciones ya estandarizadas, para luego incubar las placas a 37°C por 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a medir en milímetros los halos formados alrededor de cada disco impregnado con el antibiótico. Como control se utilizó la cepa de *S. aureus* ATCC 25923. Los antibióticos utilizados incluyeron: penicilina (10 UI, OXOID), oxacilina (1 µg, OXOID), vancomicina (30 µg, OXOID), tetraciclina (30 µg, BBL), gentamicina (10 µg, BBL), tobramicina (10 µg, BBL), ampicilina (30 µg, BBL), eritromicina (15 µg, BBL), clindamicina (2 µg, BBL), cloranfenicol (30 µg, BBL), ciprofloxacina (5 µg, BBL) levofloxacina (5 µg, BBL), lomefloxacina (10 µg, BBL), norfloxacina (10 µg, BBL), trimetoprim sulfametoxazol (1,25 µg/23,75 µg, BBL) y rifampicina (5 µg, BBL). El criterio de sensibilidad o resistencia a cada agente se determinó según las especificaciones del IECL (11).

Para la determinación inmunológica de enterotoxinas (SEs) las cepas de SCN se inocularon en caldo soya tripticasa (CST) e incubaron a 37°C durante 18-24 horas. Tras el crecimiento, el caldo se centrifugó a 900g durante 20 minutos, el sobrenadante se utilizó para la detección de las enterotoxinas A, B, C y D mediante la técnica de aglutinación en látex en fase reversa, SET-RPLA (Oxoid, Ltd., Basingstoke, United Kingdom), siguiendo las especificaciones del fabricante.

Con el método en microplaca reseñado por Christensen y col. (12) se determinó en forma cuantitativa la producción de biofilm. Previo a este ensayo las cepas fueron activadas en CST suplementado con 0,25% p/v de glucosa y crecidas toda una noche a $36 \pm 2^\circ\text{C}$. Al siguiente día, las cepas se diluyeron en proporción 1:1000 en CST glucosado (0,25%), para lo cual 200 µl de la suspensión microbiana se inoculó por triplicado en los pozos de las placas de microtitulación y se incubó por 48 horas a $36 \pm 2^\circ\text{C}$, como control negativo y de esterilidad, se colocaron 200 µl de CST glucosado sin inocular y como control de adhesión positivo se colocaron 200 µl de una dilución 1:1000 en CST glucosado de la cepa de *S. aureus* ATCC 25923®. Transcurrido el tiempo, los cultivos se decantaron y los pozos se lavaron tres veces con buffer PBS pH 7.4, con el fin de remover del sistema las bacterias planctónicas. El biofilm formado por las bacterias adheridas a las paredes de cada pozo se fijó con acetato de sodio al 2% p/v por 15 minutos y seguidamente fueron teñidas con cristal violeta al 1% p/v. El exceso de colorante se eliminó con cuatro lavados con agua desionizada. Finalmente, las placas se dejaron secar a temperatura ambiente.

Para la cuantificación de adhesión, las placas se llevaron a un lector de ELISA (Bio-rad, modelo 680) para medir la densidad óptica a una longitud de onda de 630 nm

(DO₆₃₀). Los valores promedios de DO₆₃₀ obtenidos de cada cepa se consideró como el índice de adhesión bacteriana a la superficie de cada pozo al producir biofilm, cuyos valores previamente se corrigieron al restarles el promedio de la DO₆₃₀ obtenidas en los pozos controles no inoculados. Para cuantificar el poder de adhesión y formación de biofilm sobre las microplacas se siguió lo propuesto por Manijeh y col. (13) con las modificaciones de Rivera y Zabala (14): - Cepa no productora de biofilm: cepas con $\text{DO}_{630} < \text{DO}_{630c}$; - Cepa débil productora de biofilm: $\text{DO}_c < \text{DO}_{630} \leq 2(\text{DO}_c)$; - Cepa moderadamente productora de biofilm: $2\text{DO}_c < \text{DO}_{630} \leq 3(\text{DO}_c)$ y Cepa fuerte productora de biofilm: $3\text{DO}_c < \text{DO}_{630}$.

Resultados

De las 48 cepas de SCN examinadas para la detección de SEs clásicas, 6 (12,5%) resultaron ser productoras de uno o más tipos de SEs, la SE más frecuentemente detectada en las 6 cepas enterotoxigénicas fue la SED (3/6; 50,0%), seguida por la SEA (2/6; 33,3%), mientras que una cepa (1/6; 16,6%) se caracterizó por sintetizar tres tipos diferentes de SEs (SEB+SEC+SED) (Tabla 1). Las especies enterotoxigénicas fueron 2 de *S. epidermidis*, 2 de *S. simulans* y 2 de SCN sin identificar.

En la Tabla 2 se puede apreciar que el 44,0% (21/48) de las cepas fueron productoras de biofilm, siendo el 86,0% (18/21) de las cepas débiles productoras, cuyos valores de DO₆₃₀ oscilaron entre 0,06 – 0,12 mientras que, el 14,0% (3/21) fueron catalogadas como moderadas formadoras de biofilm al arrojar valores de DO₆₃₀ en el rango de 0,13 – 0,18; ninguna cepa resultó ser fuerte productora de biofilm. Las especies productoras fueron: *S. epidermidis* (57%), *S. hominis* (10%), *S. sciuri* (10%), *S. haemolyticus* y *S. Simulans*

Tabla 1. Distribución de las 48 cepas de SCN en base a la producción de enterotoxinas.

Producción SEs	Nº (%)	Tipo de Enterotoxina				
		SEA	SEB	SEC	SED	SEB+SEC+SED
Cepas no productoras	42 (87,5)*	-	-	-	-	-
Cepas productoras	6 (12,5)*	2 (33,3)**	0 (0,0)**	0 (0,0)**	3 (50,0)**	1 (16,6)**

* Porcentaje en base a las 48 cepas. ** Porcentaje en base a las cepas enterotoxigénicas.

Tabla 2. Distribución de las 48 cepas de SCN en base a la producción de biofilm por el método de microplaca.

Producción de biofilm	Nº (%)	Tipo de Producción		
		Débil	Moderada	Fuerte
Cepas no productoras	27 (56,0)	-	-	-
Cepas productoras	21 (44,0)	18 (86,0)*	3 (14,0)*	0 (0,0)
Total	48 (100)	18 (38)**	3 (6)**	0 (0)

* Porcentaje en base a las cepas productoras de biofilm. ** Porcentaje en base al total de cepas.

(5%, respectivamente) y SCN no identificados (13%). No se detectó adherencia sobre las placas de poliestireno en las cepas de *S. capitis*, *S. lentus* y *S. saprophyticus*.

Las frecuencias fenotípicas de resistencia y susceptibilidad a los diferentes antibióticos evaluados sobre las cepas de SCN se resumen en la Tabla 3; donde se observa que el 100% de cepas fueron susceptibles solo a vancomicina y resistentes a penicilina, siendo el fenotipo de resistencia más frecuente, seguido por la resistencia a oxacilina (43/48, 90%), gentamicina (40/48, 83%), eritromicina (32/48, 67%) y trimetoprim/sulfametoxazol (30/48, 63%).

Discusión

El primer estudio que reportó el aislamiento de SCN productores de SEs en humanos fue el trabajo de Crass y Bergdoll (15), los cuales describieron cepas de *S. epidermidis* capaces de producir SEC, además de otros SCN productores de SEA. Posteriormente, Cunha y col. (16), encontraron capacidad enterotoxigénica en 44 cepas (37,6%) de SCN

aislados de hemocultivos de recién nacidos en Brasil. Por otra parte, De Oliveira y col. (7), al estudiar el perfil toxigénico en aislamientos clínicos de SCN obtuvieron que el 54,4% de las cepas presentaban uno o más genes de enterotoxinas.

El porcentaje de cepas de SCN enterotoxigénicas detectado en este estudio (12,5%) es un hallazgo importante si tomamos en cuenta que se utilizó el método de SET-RPLA, el cual sólo permite detectar las enterotoxinas clásicas (SEA, SEB, SEC y SED); la SEE y el resto de las 18 enterotoxinas recientemente descritas no son detectadas por SET-RPLA (17), desconociéndose la verdadera capacidad enterotoxigénica de las cepas estudiadas. Además, hay que considerar que cuando se usan métodos inmunológicos, estos no detectan SEs cuando son producidas en una concentración por debajo del límite de detección del método utilizado (0,5 ng/mL).

Las SEs no solo ocasionan intoxicación alimentaria, ellas se caracterizan por ser superantígenos (SAGs). Los SAGs a diferencia de los antígenos convencionales, se unen a

Tabla 3. Susceptibilidad y resistencia a los agentes antimicrobianos de las 48 cepas de *Staphylococcus coagulasa negativa* aisladas de hemocultivos.

Antimicrobianos	Resistencia (%)	Susceptibilidad (%)
Penicilina	48 (100)	0 (0)
Oxacilna	43 (90)	5 (10)
Amicacina	18 (38)	30 (62)
Tobramicina	25 (52)	23 (48)
Gentamicina	40 (83)	8 (17)
Tetraciclinas	8 (17)	40 (83)
Rifampicina	14 (29)	34 (71)
Vancomicina	0 (0)	48 (100)
Cloramfenicol	6 (13)	42 (87)
Eritromicina	32 (67)	16 (33)
Clindamicina	13 (27)	35 (73)
Levofloxacina	27 (56)	21 (44)
Lomefloxacina	23 (48)	25 (52)
Ciprofloxacina	25 (52)	23 (48)
Norfloxacina	18 (38)	30 (62)
Trimetoprim/ sulfametoxazol	30 (63)	18 (37)

ciertas regiones de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II de las células presentadoras de antígenos, fuera de la hendidura clásica de unión del antígeno. Esta interacción da lugar a una masiva activación de las células T, que se traduce en la producción y secreción de grandes cantidades (anormales) de citoquinas las cuales actúan normalmente a nivel local pero, cuando existen altas concentraciones de citoquinas proinflamatorias como interleucina 2 (IL-2), interferón gamma (INF- γ) y factor de necrosis tumoral (TNF- α) por vía sanguínea pueden desencadenar una respuesta inflamatoria intensa causando daño a los tejidos del huésped, produciendo una variedad de síntomas como náuseas, vómitos, fiebre alta, daño capilar, insuficiencia multiorgánica, shock y muerte, la magnitud de las citoquinas liberadas determina la gravedad del paciente (17).

Con relación a la producción de biofilm diversos estudios han mostrado que la proporción de cepas de SCN productoras de este mecanismo de patogenicidad en muestras clínicas pueden variar de 22 a 89% (16, 18-21).

En el pasado se pensaba que la capacidad de adherirse y crecer en las superficies de plástico era exclusiva de las cepas de *Staphylococcus* involucradas en las infecciones asociadas con catéteres u otro tipo de dispositivo médico (12). Sin embargo, la producción de biofilm también ha sido observada en cepas provenientes de pacientes con ausencia de material protésico, en portadores y en cepas ambientales (20). Incluso se han reportado clones endémicos de SCN asociados con enfermedad productores de biofilm y que han sido persistentes por 10 años en una unidad de cuidados intensivos (22).

Aunque los estudios relacionados con determinantes de virulencia como el biofilm principalmente se han enfocado en *S. epidermidis* (18, 23, 24) por ser la especie más común, la producción de biofilm ha sido reportada también en *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. simulans*, *S. sciuri*, *S. xylosum*, *S. warneri* (4, 25-27).

Es importante enfatizar que en el estudio conducido por Iorio y col. (28) en Brasil, los autores determinaron que el 77,8% de las cepas de *S. epidermidis* productoras de biofilm estaban relacionadas con bacteremia verdadera, demostrando así la relevancia del aislamiento de esta especie en hemocultivos. Del mismo modo, Granslo y col. (29) ya habían reportado en Noruega en el año 2008, que los aislamientos de SCN en catéteres intravasculares presentaban una mayor incidencia de producción de biofilm que los aislados de la piel, argumentando los autores que la capacidad de producir biopelícula puede ser utilizado para distinguir cepas de SCN contaminantes de los SCN "reales" o asociados al proceso infeccioso.

En cuanto a la susceptibilidad y resistencia a los agentes antimicrobianos, actualmente más del 99% de los aislados de SCN son productores de b-lactamasa y por ello son resistentes a penicilina (1), la resistencia a oxacilina se observa con mayor frecuencia en las diferentes especies de SCN (1, 21, 23, 25, 29-31), que en *S. aureus*. Esta resistencia se debe a la adquisición del gen *mecA* que codifica la proteína fijadora de penicilina (PBP) PBP2a, que posee baja afinidad por los betalactámicos (5). Más del 70% de los aislamientos de SCN a nivel mundial son resistentes a oxacilina, en forma adicional estas cepas tienden a ser resistentes a otros agentes antimicrobianos (31).

La elevada resistencia de las cepas estudiadas frente a oxacilina y gentamicina, es similar a lo reportado por Klingenberg y col. (24) en aislamientos de SCN provenientes de neonatos reclusos en unidad de cuidado intensivo. Estos dos grupos de antibióticos forman parte del esquema de tratamiento empírico en pacientes con bacteriemia, los fenotipos de resistencia observados son el reflejo de la presión de selección ejercida debido al uso de antimicrobianos. La resistencia a gentamicina es atribuida a enzimas modificadoras de aminoglucósidos las cuales son codificadas por genes localizados en plásmidos o transposones, por lo tanto, la adquisición o la pérdida de resistencia puede ocurrir mucho más rápido que con otros antibióticos (32).

Afortunadamente, no se observó resistencia a vancomicina su uso debe estar restringido, siendo justificado solo en aquellos pacientes con infecciones graves por cepas resistentes a oxacilina, comprobadas mediante antibiograma y concentración inhibitoria mínima (33).

Se observó la capacidad enterotoxigénica y de producción de biofilm en las cepas estudiadas las cuales además se caracterizaron por ser resistentes a diversos antimicrobianos, estos resultados contribuyen a determinar la relevancia clínica de estas cepas en los aislados de cultivos de sangre. Se recomienda realizar otras investigaciones para caracterizar genotípicamente los aislamientos clínicos de SCN.

Referencias Bibliográficas

- (1) Álvarez M, Velazco E, Nieves B, Alviarez E, Araque M, Salazar E, et al. Caracterización fenotípica de cepas de *Staphylococcus coagulasa* negativa aisladas de una unidad de alto riesgo neonatal. *Kasmera* 2008; 36: 7 – 16.
- (2) Fajardo M, Hidalgo E, Rodríguez S, Gaona C, Sánchez R, Hernández R, et al. Actividad de vancomicina, teicoplanina y linezolid en

- Staphylococcus* coagulas-negativos resistentes a meticilina en aislados de hemocultivos pediátricos. *Rev Esp Quimioter* 2012; 25: 25-30.
- (3) Predari S. Estafilococo coagulasa negativo: el enemigo silente. *Rev Argent Microbiol* 2007; 39:1-3.
 - (4) Aarag E, Klingenberg C, Rohde H, Frankenberg S, Gaustad P, Flægstad T, et al. Biofilm Formation by *Staphylococcus haemolyticus*. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1172-1180.
 - (5) Lowy F. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 2003; 111: 1265-1273.
 - (6) Lee J, Jeong J, Park Y, Choi S, Kim Y, Chae J, et al. Evaluation of the Methicilin- Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)- Screen latex agglutination test for detection of MRSA of animal origen. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2780-2782.
 - (7) De Oliveira R, Cataneli V, Pessoa J, Ribeiro M. Determination of toxigenic capacity by reverse transcription polymerase chain reaction in coagulase-negative staphylococci and *Staphylococcus aureus* isolated from newborns in Brazil. *Microbiol Immunol* 2011; 55: 394-407.
 - (8) Hira V, Sluijter M, Goessens W, Ott A, Groot R, Hermans P, et al. Coagulase-Negative Staphylococcal Skin Carriage among Neonatal Intensive Care Unit Personnel: from Population to Infection. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 3876-3881.
 - (9) Vasconcelos N, Pereira V, Araujo J, Da cunha L. Deteccion molecular de enterotoxinas E, G, H e I en *Staphylococcus aureus* y coagulasa- negativos aislados de muestras clínicas de los recién nacidos en Brazil. *Appl Microbiol* 2011; 111: 749-62.
 - (10) Koneman E, Hallen S, Dowell V, Jand W, Sommers H, Winn W. Konemán Diagnóstico Microbiológico: texto y atlas en color. Capítulo 12. Cocos grampositivos. Parte I Estafilococos y cocos grampositivos relacionados. 6ta ed. Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires, Argentina.; 2008 p. 593-638.
 - (11) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eighteenth edition. Document M100-S18. 2008; 28 (1):1-188. Pennsylvania, USA.
 - (12) Christensen G, Simpson W, Bisno A, Beachey H. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun.* 1985; 37:318-26.
 - (13) Manijeh M, Mohammad J, Kermanshashi K. The assessment of biofilm formation in Iranian meat processing environments. *Res J Micobiol.* 2008; 3:181-186.
 - (14) Rivera J, Zabala, I. Caracterización fenotípica y genotípica de cepas de *Staphylococcus* spp. productoras de biofilm aisladas de quesos. Trabajo de Grado. Universidad del Zulia Facultad Experimental de Ciencias. Maestría en Microbiología. 2009.
 - (15) Crass B, Bergdoll M. Involvement of coagulase-negative staphylococci in toxic shock syndrome. *J Clin Microbiol.* 1986; 23: 43-5.
 - (16) Cunha M, Rugolo L, Lopes C. Study of virulence factors in coagulase negative staphylococci isolated from newborns. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101: 661-668.
 - (17) Podkowik M, Park J, Seo K, Bystron J, Bania J. Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. *Int J Food Microbiol.* 2013; 163: 34-40.
 - (18) Arciola C, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol.* 2001; 39:2151-2156.
 - (19) Foka A, Chini V, Petinaki E, Kolonitsiou F, Anastassiou D, Dimitracopoulos G, et al. Clonality of slime producing methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci disseminated in the neonatal intensive care unit of a university hospital. *J Clin Microbiol Infect* 2006; 12:1230-1233.
 - (20) Satorres S, Alcaráz L. Prevalence of *icaA* and *icaD* genes in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from patients and hospital staff. *Cent Eur J Public Health.* 2007; 15: 87-90.
 - (21) Sharma P, Lahiri K, Kapila K. Conventional and molecular characterization of coagulase-negative *Staphylococcus* in hos-

- pital isolates. *Indian J Pathol Microbiol* 2011; 54 (1): 85-89.
- (22) Huebner J, Pier G, Maslow J, Muller E, Shiro H, Parent M, et al. Endemic nosocomial transmission of *Staphylococcus epidermidis* bacteremia isolates in a neonatal intensive care unit over 10 years. *J Infect Dis*. 1994; 169:526-531.
- (23) Fuenmayor A, Martínez A, Galué N, Luengo H. *Staphylococcus* coagulasa negativo: distribución de especies producción de limo (silme) y susceptibilidad a los agentes antimicrobianos. *Kasmera* 1998; 26: 111-135.
- (24) Klingenberg A, Rønnestad A, Anderson T, Abrahamsen J, Zorman A, Villaruz T, et al. Persistent strains of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: virulence factors and invasiveness. *Clin Microbiol Infect*. 2007; 13: 1100-1111.
- (25) Arslan S, Özkardes F. Slime production and antibiotic susceptibility in staphylococci isolated from clinical samples. *Mem Inst Oswaldo* 2007; 102: 29-33.
- (26) Bernardi A, Pizzolitto E, Pizzolitto, A. Detecção da produção de slime por estafilococos coagulase-negativa isolados de catéter venoso central. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 2007; 28: 57-66.
- (27) Boynukara B, Gulhan T, Gurturk K, Alisarli M, Ogun E. Evolution of slime production by coagulase negative Staphylococci and enterotoxigenic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from various human clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 2007; 56: 1296-1300.
- (28) Iorio N, Lopes A, Schuenck R, Barcellos A, Olendzki A, Lopez, G, et al. A combination of methods to evaluate biofilm production may help to determine the clinical relevance of *Staphylococcus* in blood cultures. *Microbiol Immunol*. 2011; 55: 28-33.
- (29) Granslo H, Gammelsrud K, Fredheim E, Flægstad T, Klingenberg C. Biofilm og antibiotikaresistens hos coagulase negative stafylococcus. *Tidsskr Nor Lægeforen*. 2008; 128:2746-2749.
- (30) Aslan S, Citak C, Yis R, Degirmenci S, Arman D. Bacterial spectrum and antimicrobial susceptibility pattern of bloodstream infections in children with febrile neutropenia: experience of single center in south-east of Turkey. *Indian J Microbiol*. 2012; 52: 203-208.
- (31) Cortes J, Leal A, Montañez A, Buitrago G, Castillo J, Guzman, L. Frequency of microorganisms isolated in patients with bacteremia in intensive care units in Colombia and their resistance profiles. *Braz J Infect Dis*. 2013; 17: 346-52.
- (32) Berger-Bächi B. Resistance mechanisms of Gram positive bacteria. *Int J Med Microbiol*. 2002; 292: 27-35.
- (33) Fernández-Rufete A, García-Vázquez E, Hernández-Torres A, Canteras M, Ruiz J, Gómez J. Bacteriemias por *Staphylococcus coagulasa* negativa: análisis de factores pronóstico e influencia del tratamiento antibiótico. *Rev Esp Quimioter* 2012; 25(3): 199-205.