Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Faculdade de Ciências Médicas

Paula Marcele Afonso Pereira Ribeiro

Aspectos fenotípicos e genotípicos da formação de biofilme e interação com superfícies abióticas no potencial de virulência de *Staphylococcus haemolyticus* relacionados com quadros de bacteremias

Rio de Janeiro
2018

Paula Marcele Afonso Pereira Ribeiro

Aspectos fenotípicos e genotípicos da formação de biofilme e interação com superfícies abióticas no potencial de virulência de *Staphylococcus haemolyticus* relacionados com quadros de bacteremias

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientadores: Prof.ª Dra. Ana Luíza de Mattos Guaraldi

Prof. Dr. José Augusto Adler Pereira

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇAO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

R484 Ribeiro, Paula Marcele Afonso Pereira.
Aspectos fenotípicos e genotípicos da formação de biofilme e interação com superfícies abióticas e bióticas no potencial de virulência de *Staphylococcus haemolyticus* relacionados com quadros de bacteremias / Paula Marcele Afonso Pereira Ribeiro. – 2018.
94 f.

Orientadora: Ana Luiza de Mattos Guaraldi.
Coorientador: José Augusto Adler Pereira.
Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Microbiologia.

1. *Staphylococcus haemolyticus*. 2. Biofilme - Teses. 3. Infecções neonatais - Teses. 4. Infecções estafilocócicas - Teses. 5. Eletroforese em gel – Teses. 6. Drogas – Resistência em microorganismos – Teses. 7. Antibióticos – Teses. 8. Fômites. 9. Farmacorresistência Bacteriana Múltipla. I. Guaraldi, Ana Luiza de Mattos. II. Pereira, José Augusto Adler. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.98:579.86

Bibliotecária: Kalina Silva CRB7/4377

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

_____ _____

Assinatura Data

Paula Marcele Afonso Pereira Ribeiro

Aspectos fenotípicos e genotípicos da formação de biofilme e interação com superfícies abióticas no potencial de virulência de *Staphylococcus haemolyticus* relacionados com quadros de bacteremias

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 29 de março de 2018.

Coorientador: Prof. Dr. José Augusto Adler Pereira
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora: _____
Prof.ª Dra. Ana Luiza de Mattos Guaraldi (Orientadora)
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

_____
Prof. Dr. José Luíz Muniz Bandeira Duarte
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

_____
Prof.ª Dra. Cintia Silva dos Santos
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

_____
Prof.ª Dra. Renata Garcia Costa
Fundação Oswaldo Cruz

_____
Profª. Dra. Verônica Viana Vieira
Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz

Rio de Janeiro
2018

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, que me apoiam incondicionalmente e que me ensinaram a base de valorização da família.

Ao meu esposo Felipe e meu filho Eduardo que me dão força e apoio em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, quando pensamos em desistir.

A fé em Deus que me da força para atravessar todos os obstáculos!

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas contribuíram para a minha evolução profissional e pessoal, desde a minha caminhada no mestrado e agora nesta fase tão importante para mim, muitas delas continuam ao meu lado. Agradeço a todos que participaram deste percurso, carinhosamente, a minha gratidão a estas pessoas tão especiais.

À Deus, pois sem fé, eu não chegaria em lugar nenhum.

Minha família, que sempre me incentivou na busca de uma evolução profissional, principalmente meu marido Felipe Ribeiro que sempre me apoiou em tudo, me dando força, suporte, atenção e confiança para seguir em frente sempre.

Meu filho Eduardo, que é a minha força para alcançar novas conquistas.

Aos meus pais, Paulo e Sueli, que me ensinaram a caminhar pelo lado bom da vida e a nunca desistir.

Minha irmã, me ajudando sempre em que precisei, e meu cunhado Rafael pelo apoio.

Aos meus orientadores, Professora Ana Luiza de Mattos Guaraldi, que confiou em mim e me ensinou tudo que sei, e pelo seu apoio nas horas em que precisei, por seu enorme carinho e atenção sempre, e professor José Augusto Adler Pereira, que me acompanha desde a graduação e agora nesta etapa da minha vida.*

Ao Professor Raphael Hiratta Junior, pela orientação, apoio, carinho e ajuda nos momentos mais complicados.

Ao Professor Eduardo A. Castro por me orientar em relação a coleta das amostras e obtenção dos dados clínicos dos pacientes.

Ao Professor José Luíz Muniz Bandeira Duarte, pela oportunidade de conhecer a UTI Neonatal do HUPE e permitir que eu realizasse esse trabalho.

Meus verdadeiros amigos que sempre compartilham momentos importantes como este, em especial minha amiga Bruna Sued, que está sempre presente, nunca me deixa desanimar, só tenho que te agradecer por estar sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis, me ajudando e apoiando, obrigada por tudo em especial por sua amizade.

Minhas amigas Vanessa, Barbara, Julianna e Renata, por me apoiarem sempre e toda equipe do laboratório 3 que me ajudaram, em especial Cintia Santos, Mônica, Sabrina, Yuri.

Aos professores da DIMI, representados pela professora Ana Claudia de Paula Rosa, bem como seu corpo docente, funcionários e colegas, pela contribuição pela concretização deste projeto.

Ao CNPq, FAPERJ, CAPES, PRONEX e SR2-UERJ pelo apoio financeiro oferecido para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos *Staphylococcus* sp. por me ajudarem a concluir este trabalho e auxiliar na ciência. Vocês são realmente incríveis!!!!!!

Viver é acalentar sonhos e esperanças, fazendo da fé a nossa inspiração maior. E buscar nas pequenas coisas, um grande motivo para ser feliz!

Mário Quintana

RESUMO

RIBEIRO, Paula Marcele Afonso Pereira. *Aspectos fenotípicos e genotípicos da formação de biofilme e interação com superfícies abióticas no potencial de virulência de Staphylococcus haemolyticus relacionados com quadros de bacteremias*. 2018. 94f. Dissertação (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Staphylococcus haemolyticus resistente à oxacilina (ORSH) é o micro-organismo mais comumente isolado entre os espécimes clínicos de estafilococos resistentes à meticilina. *S. haemolyticus* é um importante patógeno oportunista causando infecções adquiridas no hospital em todo o mundo, incluíndo doenças como, peritonite, otite, infecções do trato urinário, septicemia e infecções associadas a próteses. A medida em que os fômites contribuem para a disseminação deste patógeno através de pacientes e enfermarias ainda é desconhecida. Além disso, *S. haemolyticus* tem uma grande capacidade de formação de biofilme e muitas vezes é associado a multi-resistência (MDR), e único entre as espécies de estafilococos pronto para desenvolver resistência aos glicopeptídeos. O objetivo deste estudo foi avaliar os aspectos fenotípicos e genotípicos da interação com superfícies abióticas e bióticas de diferentes tipos clonais de *S. haemolyticus* isolados de hemoculturas de neonatos e adultos, e cepas isoladas de fômites, bem como a capacidade de produzir biofilme na presença de antimicrobianos. A distribuição clonal foi avaliada pela técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). As concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos antimicrobianos foram avaliadas através do método de microdiluição em caldo. Os ensaios de reação em cadeia da polimerase (PCR) foram realizados para detectar os genes *mec*A, *ica*A, *aap*, *atl*E, *atl* e *fbp*. Cepas de *S. haemolyticus* crescidas na presença dos antibióticos foram testadas e investigadas para a formação de biofilme em superfícies de vidro, poliestireno e catéter. Os isolados de sangue de cepas de neonatos foram confirmados como *S. haemolyticus* por seqüenciamento do 16S e agrupados em 6 tipos de eletroforese em gel de campo pulsado, nas cepas de adultos foram encontrados 12 tipos de PFGE ,e para as cepas de fômites, 5 tipos de PFGE. Os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos identificaram fenótipos MDR na maioria das cepas. A formação de biofilme foi independente da presença dos genes *ica*A e *mec*A, e tipo de PFGE. Vancomicina, Oxacilina e os demais antimicrobianos testados não inibiram a formação do biofilme em superfícies abióticas. As cepas isoladas de fômites apresentaram susceptibilidade apenas a linezolida e vancomicina e foram caracterizadas como MDR. A afinidade e capacidade desta espécie na formação de biofilme pode contribuir para o estabelecimento e disseminação de infecção nosocomial. Os mecanismos moleculares de formação de biofilmes nesta espécie não foram elucidados, particularmente na presença de agentes antimicrobianos. Uma dose sub-letal de vancomicina pode favorecer a formação de biofilme por ORSH de fômites e superfícies de catéter. Outros estudos sobre a presença e expressão do gene i*ca* podem esclarecer os diferentes mecanismos de adesão na patogênese de infecções causadas por *S. haemolyticus*, incluindo casos associados a dispositivos médicos.

Palavras-chave: *Estafilococos haemolyticus*. Neonatos. Fômites. PFGE. Multiresistência. Biofilme. Antimicrobianos.

ABSTRACT

RIBEIRO, Paula Marcele Afonso Pereira. *Phenotypic and genotypic aspects of biofilm formation and interaction with abiotic surfaces on the virulence potential of Staphylococcus haemolyticus related to bacteremia*. 2018. 94f. Dissertação (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Oxacillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* (ORSH) is the most common microrganism among clinical isolates of methicillin-resistant staphylococci. S. haemolyticus plays an important role in hospital-acquired opportunistic infections worldwide, including peritonitis, otitis, urinary tract infections, septicemia and prosthetic-device-associated infections. The range of fomites contributing to this pathogen dissemination through patients and hospital wards remains unknown. Among staphylococcal species, *S. haemolyticus* present a unique and large capacity to biofilm formation, often associated to multi-drug resistant (MDR), and may develop resistance to glycopeptides. The aim of this study was to evaluate the interactions of abiotic and biotic surfaces by phenotypic and genotypic aspects with *S. haemolyticus* different clonal types isolated from blood culture from neonates and adults and strains fomites isolates, as well as the ability to produce biofilm in the presence of antibiotics. Clonal distribution was assessed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibiotics were evaluated via broth microdilution method. Polymerase chain reaction (PCR) assays were performed to detect *mec*A, *ica*A, *aap*, *atl*E, *atl* and *fbp* genes. *S.haemolyticus* strains grown in the presence of the antibiotics tested and were investigated for biofilm formation on glass, polystyrene and catheter surfaces. The neonate strains blood isolates were confirmed as *S. haemolyticus* by sequencing of the 16S gene and clustered in 6 pulsed-field gel electrophoresis types, in the adults stains, 12 pulsed-field gel electrophoresis types and for strains fomites isolates 5 pulsed-field gel electrophoresis types. Antimicrobial susceptibility tests identified most strains as MDR phenotype. Biofilm formation were independent of the presence of the *ica*A and *mec*A genes and PFGE type. On abiotic surfaces, antibiotics tested, including vancomycin and oxacillin did not inhibit the biofilm formation. Fomites isolated strains were characterized as MDR showing susceptibility only to linezolid and vancomycin. The affinity and ability of this species on biofilm-formation may contribute to the establishment and dissemination of nosocomial infection. The molecular mechanisms of biofilm formation in this specie have not been elucidated, particularly in the presence of antimicrobial agents. A sub-lethal dose of vancomycin may favor biofilm formation by ORSH on fomites and catheter surfaces. Further studies related to the presence and expression of ica gene may elucidate different mechanisms of adhesion related to the pathogenesis of infections caused by *S. haemolyticus*, including cases associated with medical devices.

Keywords: *Staphylococcus haemolyticus*. Neonates. Fomites. PFGE. Multi-drug resistance. Biofilm. Antimicrobials.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aap	Proteína associada ao acúmulo
aap	Proteína associada ao acúmulo *gene*
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
AMR	Resistência antimicrobiana
ATCC	American Type Culture Collection
AtlE	Gene que codifica a principal autolisina de *S.epidermidis*
Bap	Proteína associada ao biofilme
CCIH	Centro de controle de infecção hospitalar
CDC	Disease control and prevention
CLSI	National commitee for clinical laboratory standards
CVC	Catéter venoso central
D.O	Densidade ótica
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Embp	Extracelular matrix-binding protein (proteína de ligação a fibronectina)
Fbe	Fibrinogen-binding adhesion (proteína de ligação ao fibrinogênio)
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
ica	Intercelular adhesin gene (gene que codifica a síntese de PIA)
ICS	Infecções da corrente sanguínea
IRASs	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
LZD	Linezolida
MDR	Multiresistência
*mec*A	Gene que codifica resistência a meticilina/oxacilina
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MXF	Moxifloxacina
MR	Multiresistência
MRSA	*S.aureus* resistente a meticilina
MR-SCN	Staphylococcus coagulase negativo resistente a meticilina
MRSH	*Staphylococcus haemolyticus* resistente a meticilina
MSSH	*Staphylococcus haemolyticus* sensível a meticilina

NNIS	Vigilância Nacional das Infecções Nosocomiais
ORSH	*Staphylococcus haemolyticus* resistente a oxacilina
OSSH	*Staphylococcus haemolyticus* sensível a oxacilina
OXA	Oxacilina
PBP	Penicillin-binding protein (proteína de ligação a penicilina)
PCR	Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)
PIA	Polissacharide intercellular adhesion (adesina polissacarídica intercelular)
PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis (Eletroforese em gel submetido a Campo Pulsado)
PBS	Tampão salina fosfato
R	Resistente
RFLP	*Restriction Fragment-Length Polymorphism*
RIF	Rifampicina
RNA	Ácido ribonucleico
SCC*mec*	Staphylococcal cassete chromosome mec
SCN	Staphylococcus coagulase negativo
S	Sensível
TEC	Teicoplanina
TGC	Tigeciclina
TSB	Trypic Soy Broth (Caldo Tripticaseína Soja)
UERJ	Universidade do estado do Rio de Janeiro
UFMG	Universidade federal de Minas Gerais
UFPA	Universidade federal do Paraná
UTI	Unidade de terapia intensiva
UTIN	Unidade de tratamento intensivo neonatal
VAN	Vancomicina
VRE	Enterococcus resistant a vancomicina
SUS	Sistema único de saúde

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	12
1	**REVISÃO DA LITERATURA**	13
1.1	***Staphylococcus* coagulase-negativa** ……...	13
1.2	***Staphylococcus haemolyticus***	14
1.3	**Infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS)**	15
1.4	**Disseminação de infecções nosocomiais por fômites**	20
1.5	**Resistência aos antimicrobianos (AMR)**.....	21
1.6	**Biofilme**	25
1.7	**Caracterização de SCN e epidemiologia molecular**	27
2	**OBJETIVOS**	29
2.1	**Objetivo Geral**	29
2.2	**Objetivos Específicos**	29
3	**RESULTADOS**	31
3.1	***Staphylococcus haemolyticus* disseminated among neonates with bacteremia: phenotypic and molecular characterization of isolates from a neonatal intensive care unit in Rio de Janeiro, Brazil (Artigo Cientifico 1)**…..	31
3.2	**Sphygmomanometers and thermometers as potential fomites of *Staphylococcus haemolyticus*: biofilm formation in the presence of antibiotics (Artigo Cientifico 2)** ……...	40
3.3	**Influence of antibiotics on biofilm formation by different clones of nosocomial multidrug-resistant *Staphylococcus haemolyticus* from catheter-related infections (Artigo Cientifico 3)** ……...	50
4	**DISCUSSÃO**	69
	CONCLUSÕES	80
	REFERÊNCIAS	82
	ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética.....	92
	ANEXO B - Produção Científica Durante o Período de Realização do Doutorado.	93

INTRODUÇÃO

O gênero *Staphylococcus* é composto de 52 espécies e 28 subespécies (LPSN, 2017) e foram isolados e descritos, pela primeira vez, em 1878, por Robert Koch, sendo em 1879 cultivado em meio líquido por Louis Pasteur. Em 1884 Anton Julius F. Rosenbach, obteve colônias puras em seus estudos, e fez a primeira descrição taxonômica, dividindo o gênero em duas espécies com base na presença de pigmento na colônia – *Staphylococcus pyogenes aureus* e *Staphylococcus pyogenes albus* (FELIX JUNIOR, 2007; KEIM, 2005). Corresponde a cocos Gram-positivos, de cerca de 0,5µm a 1,5µm de diâmetro, são imóveis, na maioria das vezes aeróbios (estritos), produtores da enzima catalase, não formam esporos, fermentam a glicose com produção de ácido e são divididos em dois grupos com base na produção da enzima coagulase, na qual tem a capacidade de coagular o plasma sanguíneo. São capazes de crescer em meios que contenham alta concentração de cloreto de sódio e a temperaturas que variam de 18ºC a 40ºC, sendo sua temperatura excelente, entre 30ºC a 37ºC (FELIX JUNIOR, 2007; KONEMAN et al., 2008; PODKOWIK et al., 2013; LPSN, 2017).

Os *Staphylococcus* conhecidos, como *Staphylococcus* coagulase-positiva, são aqueles que produzem a enzima coagulase, sendo a espécie *Staphylococcus aureus* a mais conhecida e estudada por produzir muitas toxinas que contribuem para a virulência dessa bactéria, aumentando sua habilidade de invadir o corpo e danificar os tecidos, provocando desde infecções superficiais, como foliculite e abscessos até infecções sistêmicas. Os *Staphylococcus* conhecidos como *Staphylococcus* coagulase-negativa (SCN), não produzem a enzima coagulase e eram considerados comensais, mas nas últimas décadas foram reconhecidos como agentes causadores de diversas doenças humanas (KONEMAN et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2014).

1 **REVISÃO DA LITERATURA**

1.1 **Staphylococcus *coagulase-negativa***

Os SCN são encontrados na pele e mucosas de seres humanos, contudo, raramente causam doenças em hospedeiros sadios. São considerados micro-organismos oportunistas e são responsáveis por doenças como: endocardites, osteomielites, infecções do trato urinário, entre outras. Hoje em dia, os SCN têm recebido grande atenção, já que são considerados micro-organismos oportunistas (SOARES et al., 2008; ABADI et al., 2015; TABELI et al., 2015; KORNIENKO *et al.*, 2016).

Nas últimas décadas, a capacidade dos SCN causarem infecções tornou-se ainda mais acentuada em decorrência da ampla utilização de dispositivos médicos invasivos (catéteres intravasculares, urinários e de diálise, marca-passos, válvulas protéticas e articulares) e a maior capacidade de suporte clínico para indivíduos imunocomprometidos e consequente aumento de internações nos hospitais (BRITO et al., 2006; CASEY et al., 2007; SADER et al., 2016). As altas taxas de resistência entre os SCN reduziram a capacidade dos cuidados de saúde no tratamento de infecções no qual estão associados. Atualmente, o número de relatos de casos de infecções hospitalares causadas por SCN ultrapassou o número de casos por *S. aureus*, havendo também, evidências crescentes de infecções nas unidades de terapia intensiva neonatal (UTIN) (BERNARDI, 2005; KORNIENKO et al., 2016).

As espécies de maior importância clínica, dentre os SCN são: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus hominis* e *Staphylococcus saprophyticus* (CAMPOS-PEÑA et al., 2014).

S. epidermidis é a espécie mais prevalente e persistente da pele e membranas mucosas (narinas), representando 65% a 90% das amostras de estafilococos observadas nesses sítios. *S. haemolyticus,* a segunda espécie mais isolada de hemoculturas humanas, sendo uma das espécies que apresenta uma múltipla resistência aos antimicrobianos. *S. saprophyticus* é a segunda espécie isolada de infecções do trato urinário, mas também pode ser encontrada no sistema gastrointestinal. *S. lugdunensis* é geralmente associado à endocardite de válvulas naturais e protéticas, celulite da pele, peritonite, osteomielite, infecções do trato urinário, dentre outras infecções. *S. hominis* é comumente encontrado nas amostras clínicas, e não costuma

causar doenças no homem, porém, está sendo cada vez mais reconhecida como oportunista e ocasionalmente causam infecção em pacientes com sistema imunológico comprometido ou deficiente, e *S. saprophyticus* coloniza um nicho específico (trato geniturinário) (BERNARDI, 2005; SCHLAG et al., 2010; PARK et al., 2010; JIANG et al., 2012; PEREIRA et al., 2012).

1.2 ***Staphylococcus haemolyticus***

Entre os SCN, *S. haemolyticus* desempenha um importante papel em infecções hospitalares em todo o mundo, inclusive na Suécia (NYSTROM et al., 1992; MONSEN et al., 2005), Itália (TUO et al., 1995), Federação Russa (VORONINA et al., 2011) e Brasil (BARROS et al., 2012; BOTELHO et al., 2012). *S. haemolyticus* é um patógeno oportunista que coloniza a pele humana, sendo a mais frequente espécie de SCN associada com resistência antimicrobiana isolados de infecções nosocomiais, e é comumente confundido com o *S. aureus*, pois apresenta hemólise na placa de ágar sangue de carneiro (SZCZUKA et al., 2015; CAVANAGH et al., 2014; SZCZUKA et al., 2016).

S. haemolyticus é a segunda espécie apenas depois de *Staphylococcus epidermidis* em frequência de isolamento de culturas de sangue humano (ING et al., 1997; FALCONE et al., 2006; CHAMON et al., 2014; BARROS et al., 2015), podendo, também, causar peritonite, otite, infecções do trato urinário e septicemia (KUMARI et al., 2001). *S. haemolyticus* resistentes a meticilina (MRSH) tem sido associado com infecções por dispositivos médicos invasivos (FALCONE et al., 2006; SUED et al., 2017).

S. haemolyticus estão entre os SCN capazes de colonizar e causar bacteriemias em pacientes internados em UTIN (TUO et al., 1995; BJORKQVIST et al., 2002; VORONINA et al., 2011; DONG et al., 2017). Uma alta proporção de *S. haemolyticus* (32%) causando infecção nosocomial em prematuros foi descrita por NEUMEISTER e colaboradores (1995). Cepas de *S. haemolyticus* constituem 6% de todos os isolados da corrente sanguínea, segundo KRISTOF e colaboradores (2011), em seu estudo é a espécie mais prevalente em unidades de terapia intensiva, em especial em recém-nascidos, do que nos outros departamentos. Vários autores indicam que *S. haemolyticus* são responsáveis por 5-38% de todos os isolados clínicos de SCN.

Embora os mecanismos de patogenicidade do *S. haemolyticus* ainda serem pouco explanados, acredita-se que sua habilidade de causar infecção está diretamente relacionada a

sua capacidade de formar biofilme (FREDHEIM et al., 2009; KRZYMINSKA et al., 2015). Contudo, alguns estudos têm indicado, que em sua maioria, as cepas produzem biofilme *ica*-independente (BARROS et al., 2012; SZCZUKA; GRABSKA; KAZNOWSKI, 2015).

A capacidade de invadir células e tecidos dos hospedeiros é um dos mais importantes fatores de virulência relacionadas a infecções persistentes. Cepas de *S. haemolyticus* de origem clínica e resistentes a meticilina foram testadas quanto a alguns fatores de virulência como: capacidade de aderir, invadir, causar toxicidade e quanto a sua atividade apoptótica em cultura de células (HEp-2) (KRZYMINSKA et al., 2015).

A caracterização molecular de *S. haemolyticus* tem demonstrado que as infecções em hospitais são causadas por um número limitado de tipos de clones que possuem a capacidade de persistir por vários anos em setores específicos. Além disso, a disseminação geográfica dos clones de MRSH tem sido observada (BOUCHAMI et al., 2011). Na Grécia, a análise de clonalidade de SCN produtor de biofilme e resistentes à meticilina (MRSCN) disseminadas entre os recém-nascidos na UTIN de um hospital universitário revelou que todas as cepas MRSCN foram multirresistentes, e 89% produziram biofilme. Um clone principal foi identificado entre os isolados de *S. epidermidis*, e 10 de 16 isolados de *S. haemolyticus* também pertenciam a um único clone (FOKA et al., 2006). Um clone de *S. haemolyticus* multiresistente foi descrito durante um estudo em pacientes com infecções da pele e tecidos moles em duas clínicas de saúde locais em um hospital de referência no Sudoeste da Nigéria. Medidas cuidadosas no controle de infecção são urgentemente necessárias para limitar a propagação de cepas multiresistentes dentro e fora das unidades de saúde, assim como, a tipagem das cepas é também necessária para entender a epidemiologia das espécies (SHITTU et al., 2005).

1.3 **Infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS)**

O termo infecção hospitalar vem sendo substituído pelo termo IRAS, corresponde a toda infecção adquirida durante a internação hospitalar e, geralmente, provocada pela própria microbiota bacteriana humana, que se desequilibra com os mecanismos de defesa anti-infecciosos em decorrência da doença, dos procedimentos invasivos (COUTO; PEDROSA, 2012).

As IRAS representam um problema de saúde no mundo, constituindo uma das principais causas de mortalidade, morbidade e de custos, uma vez que aumentam as complicações e exigem tratamentos que prolongam a estadia do paciente no hospital. Segundo o Centro para Controle de Doença (CDC), as IRAS prolongam a permanência de um paciente no hospital em pelo menos quatro dias. Como prioridade entre os epidemiologistas, hoje, está o controle dessas infecções (MASUNARI; TAVARES, 2006; MARQUES et al., 2011).

Apesar do problema ser antigo, somente a partir da década de 1970 que as instituições hospitalares começaram a fazer estudos a respeitos das IRAS. Em 1976, os programas de controle de IRAS foram organizados no Brasil, porém somente em 1983 o Governo Federal tornou obrigatória a implantação de CCIH (Centro de Controle de Infecção Hospitalar) (COUTO; PEDROSA, 2012).

Por intermédio do Sistema de Vigilância Nacional das Infecções Nosocomiais (NNIS), o CDC, sugere o sistema de componentes para a avaliação das taxas de infecção hospitalar. O monitoramento dessas taxas relacionadas aos fatores de risco ajuda a definir as medidas de controle a serem praticadas e avaliar sua eficácia. Na UTIN, o peso de nascimento serve como marcador da gravidade da doença de base. Além disso, é necessário determinar o grau de exposição ao risco de infecção através do tempo de permanência na unidade. Estima-se que no Brasil, 60% da mortalidade infantil ocorra no período neonatal, sendo a sepse neonatal uma das principais causas (ANVISA, 2015; COUTO; PEDROSA, 2012).

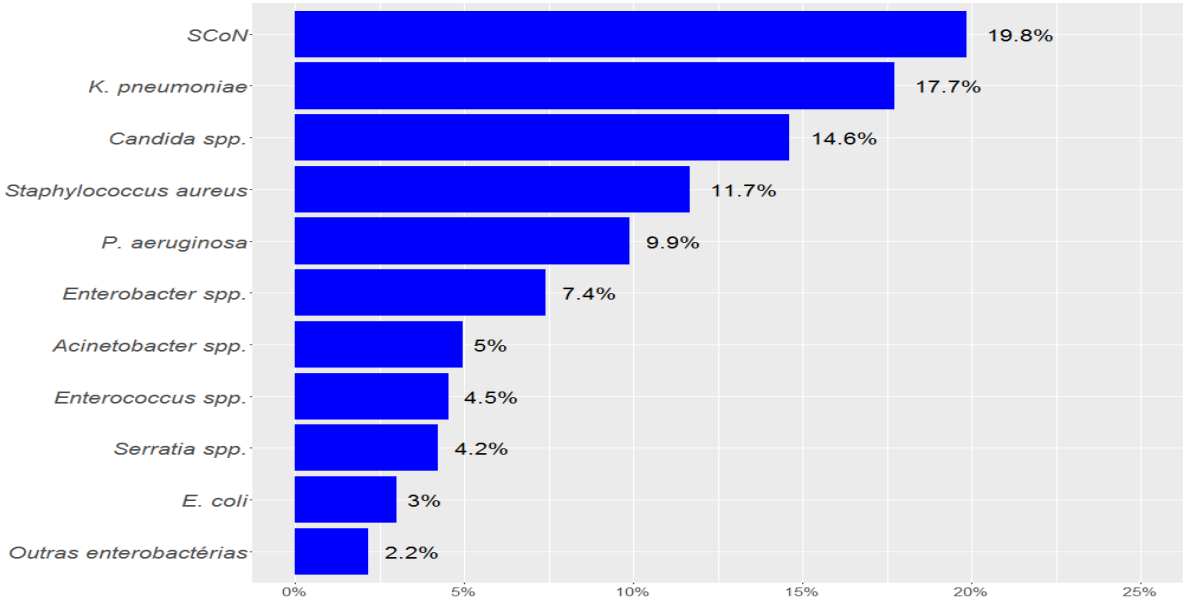
A sepse é uma doença extremamente grave durante o período neonatal e permanece entre as principais causas da morte neonatal. Os recém-nascidos admitidos na UTIN estão em condição crítica. A prevalência de sepses entre crianças hospitalizadas por longos prazos pode atingir 30%, com uma taxa de mortalidade elevada, podendo chegar a 50%, e as crianças que sobrevivem, geralmente ficam com graves sequelas. Na China, os principais agentes patogênicos isolados de neonatos são bactérias Gram positivas, particularmente *Staphylococcus* spp. (DONG et al., 2017).

As taxas de mortalidade pela incidência de IRAS podem variar em função de diversos fatores de risco: unidade hospitalar, maior tempo de internação, presença de doenças crônicas, administração prévia de antibióticos, utilização de dispositivos invasivos, imunossupressão e idade avançada ou prematura (PARKINS et al., 2010).

A incidência de IRAS em neonatos variam mundialmente entre 5 e 30 casos por 1.000 pacientes dia, sendo que no Brasil a taxa encontra-se em torno de 29,8 por 1.000 pacientes-dia. Sepse é a principal infecção correspondendo de 25 a 50% dos casos notificados e o principal

agente etiológico descrito na literatura é o SCN (Gráfico 1). A Unidade Neonatal é considerada Unidade Crítica e de vigilância obrigatória, que demanda cuidados especializados para pacientes criticamente doentes e de maior exposição aos riscos. A prevenção e o controle das IRAS nessa população representam um desafio para os hospitais e para definir intervenções é necessário manter um sistema de vigilância ativa das infecções (ANVISA, 2008 e 2015).

Gráfico 1 – Distribuição dos micro-organismos notificados como agentes etiológicos associada a CVC em pacientes pediátricos hospitalizados em UTIs (Brasil, 2015)



Fonte: GVIMS/GGTES/ANVISA, 2016.

Os procedimentos invasivos são os principais fatores de risco para infecções hospitalares. As IRAS constituem um importante problema de saúde pública, devido não somente ao alto índice de morbidade e mortalidade como também aos custos elevados (ZAID et al., 2009)

Em muitos países, incluindo o Brasil, os SCN tem papel de maior destaque entre as infecções da corrente sanguínea (ICS). Este fato deve ser bem avaliado, pois este micro-organismo pode ser apenas um contaminante e, portanto, estar relacionado a um procedimento inadequado de coleta, sendo superestimado. Mesmo assim, em situações específicas, como pacientes com catéteres implantados ou neonatos, este patógeno pode aparecer entre os mais

frequentes. Observa-se que o SCN apresenta elevada resistência à oxacilina, sendo causa comum da necessidade do uso de glicopeptídeos no paciente grave. A redução do uso dos glicopeptídeos é um fator importante, pois seu uso tem-se mostrado como fator independente relacionado ao aparecimento de *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE) (ANVISA, 2008 e 2015; PARKINS et al., 2010; DONG et al., 2017).

Segundo a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), nos dias de hoje *Staphylococcus aureus* e coagulase-negativa são as espécies bacterianas mais frequente em diferentes casos de infecções hospitalares tanto no Brasil quanto em outros países da América Latina e dos demais continentes, estes patógenos são responsáveis por grande parte das IRAS em nosso país. Um estudo realizado em 2014 pela (ANVISA), através da Rede de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços da Saúde (Rede RM), no qual se investigaram 18.233 casos de ICS em 908 UTIs do Sistema Único de Saúde (SUS), observou-se que do total de casos estudados, os SCN mostraram-se a majoritários, estando presente em 16,5% dos pacientes, conforme mostrado no Gráfico 2 e Tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição dos micro-organismos notificados como agentes etiológicos em pacientes hospitalizados em UTI adulto (Brasil, 2015)

Ordem de frequência	**Micro-organismos**	**Número**	**%**
1ª	*Klebisiella. pneumoniae*	3.805	16,9
2ª	*SCN*	3.703	16,5
3ª	*Staphylococcus aureus*	2.959	13,2
4ª	*Acinetobacter spp.*	2.734	12,2
5ª	*Peseudomonas aeruginosa*	2.242	10,0
6ª	*Candida spp.*	1.711	7,6
7ª	*Escherichia coli*	1.631	7,2
8ª	*Enterococcus spp.*	1.226	5,4
9ª	*Enterobacter spp.*	1.089	4,8
10ª	Outras enterobactérias	856	3,8
11ª	*Serratia spp.*	543	2,4
TOTAL		22.499	100,0

Fonte: Adaptado de GVIMS/GGTES/ANVISA, 2016.

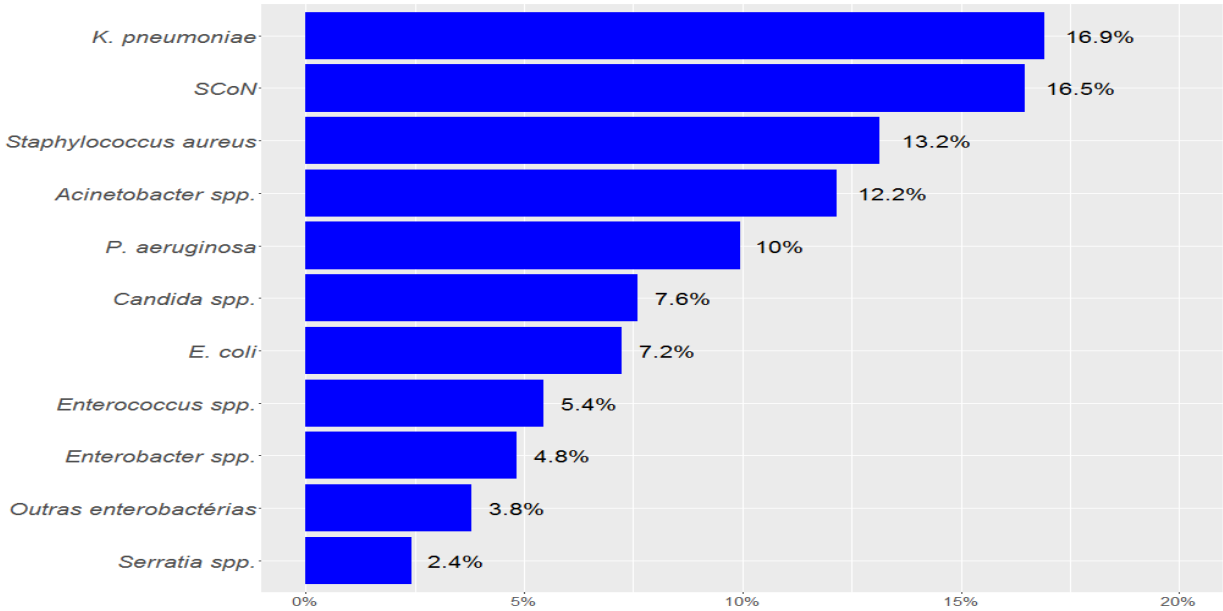
Nos Estados Unidos, IRAS afetam em média 1,7 milhões de pacientes a cada ano e as taxas de ICS atribuídas a SCN são de 30 a 40%, sendo a maioria destes episódios relacionados à colonização de catéteres intravasculares (ROGERS; FE; RUPP, 2009).

Ressalta-se ainda, que além das informações e dados de infecções relacionadas à assistência à saúde no Brasil serem escassos, utilizam-se critérios variados e, muitas vezes, critérios

internacionais definidos pelo *National Healthcare Safety Network* (NHSN) do CDC dos Estados Unidos (FERREIRA et al., 2013).

Baseadas em evidências da literatura, medidas para prevenção de IRAS devem ser adotadas em todos os estabelecimentos de assistência à saúde, quer no âmbito hospitalar, em estabelecimentos de cuidados de pacientes crônicos, ou na assistência domiciliar. Pesquisas mostram que, quando as unidades de assistência à saúde e suas equipes conhecem a magnitude do problema das infecções e passam a aderir aos programas para prevenção e controle de IRAS, redução de até 70% pode ocorrer para algumas das IRAs, como por exemplo, para as ICSs (CDC, 2016).

Gráfico 2 – Distribuição dos micro-organismos notificados como agentes etiológicos associada a CVC em pacientes adultos hospitalizados em UTIs (Brasil, 2015)



Fonte: GVIMS/GGTES/ANVISA, 2016.

1.4 **Disseminação de infecções nosocomiais por fômites**

Fômites são objetos inanimados, que podem servir como possível via de transmissão para diversos patógenos, além de absorvê-los e abrigá-los (SUED et al., 2017). Equipamentos e dispositivos médicos utilizados com vários pacientes, são reconhecidos como importante fonte de transmissão de agentes potenciais de infecção, porém, pouca atenção tem sido dada aos fômites, mesmo sabendo que eles são uma fonte importante de infecção nosocomial (BRENNAN et al., 2009; WOLFE et al., 2009). A transmissão por dispositivos médicos contaminados já foi demonstrada em termômetros, esfigmomanômetros, estetoscópios, luvas descartáveis, máscaras, canetas, crachás e jalecos. Incluindo também os telefones celulares, estes apesar de serem armazenados em bolsas ou bolsos, são frequentemente mantidos perto do rosto, o que aumenta o risco de transmissão de patógenos. E a contaminação das mãos ainda é o principal fator envolvido na transmissão de infecções nosocomiais (MESQUITA et al., 2016).

As superfícies podem ser contaminadas diretamente pelo contato com secreções e fluídos corporais ou indiretamente pela transferência de micro-organismos, ou por outros veículos. Nesse contexto, uma vez que as superfícies foram contaminadas, elas podem ser fonte de contaminação de outras superfícies, tais como, maçanetas e mãos. Partículas virais infecciosas têm sido detectadas em amostras coletadas das mãos naturalmente contaminadas pelos profissionais de saúde (CARDUCCI et al., 2002; GALLIMORE et al., 2004, RAMANI et al., 2008).

MERLIN et al. (2009), relataram em seu estudo a contaminação por *S. aureus*, em estetoscópios utilizados no departamento de emergência acadêmica. BRENNAN et al. (2009) descreveram em seu estudo a contaminação de torniquetes ortopédicos por SCN e por *S. aureus*. NWANKWO (2012) descreveu que 28,3% dos fômites pesquisados, eram contaminados por SCN. KIM et al. (2012) pesquisando contaminação por *S. aureus*, em cassetes de raio-X, descobriram que 51,4% desses cassetes, foram contaminados também, por *S. haemolyticus*.

Para que ocorra a disseminação de uma doença, deve haver fontes contínuas de micro-organismos, que pode ser um organismo vivo ou um objeto inanimado que forneça ao patógeno condições adequadas para sobreviver e se multiplicar, como também, oportunidade de transmissão (reservatório de infecção). Esses reservatórios podem ser humanos, animais e objetos inanimados. Objetos inanimados são considerados fômites pela sua capacidade de

adesão, colonização e formação de biofilme (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005; FREITAS et al., 2007).

Após década de 1970, poucos estudos foram realizados a respeito da contaminação de fômites, e a maioria desses estudos, estão relacionados com contaminação por *S. aureus*, poucos são os estudos envolvendo a contaminação de fômites por SCN. As infecções envolvendo as superfícies hospitalares demonstram um risco iminente à segurança do paciente no ambiente hospitalar. Falhas nos processos de limpeza e desinfecção de superfícies podem ter como consequência a disseminação e transferência de micro-organismos nos ambientes dos serviços de saúde (ANVISA, 1998).

1.5 **Resistência aos antimicrobianos (AMR)**

A emergência de bactérias cada vez mais resistentes aos antimicrobianos é um problema de saúde pública, e o uso não racional desses antimicrobianos seleciona cepas resistentes (CIDRAL, 2016). Estudos recentes indicam que não tomar um curso completo de antibióticos aumenta o risco de AMR. Segundo Philips, a adesão aos regimes de medicamentos é importante, uma grande proporção de prescrições de antimicrobianos são receitadas pelo clínico por um período maior do que o necessário. Uma multiplicidade de estudos observou que cursos mais curtos de administração de antimicrobianos (7 dias ou menos) são tão efetivos como cursos longos para infecções comuns administradas na comunidade (por exemplo, infecções do trato urinário, pneumonia, exacerbações da doença pulmonar obstrutiva crônica). Há evidências de que cursos mais longos de antimicrobianos levem a maiores taxas de AMR (PHILIPS, 2018).

A presença de *Staphylococcus* resistentes aos antimicrobianos foi constatada, na década de 1940, logo após a introdução da penicilina na prática clínica. A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno, na maioria das vezes, de base genética, relacionado à existência de genes contidos no micro-organismo que codificam a expressão de diferentes estruturas e mecanismos bioquímicos que impedem a ação dos antimicrobianos (TERASAWA, 2006; TAVARES, 2009). As cepas com resistência à meticilina ou à oxacilina, relacionadas com o gene *mec*A, apresentam resistência simultânea aos demais betalactâmicos (cefalosporinas, cefamicinas, oxacefemas e carbapenêmicos). Entre os SCN, *S. haemolyticus*

tem a maior tendência para desenvolver resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos (SZCZUKA et al., 2016).

A resistência à oxacilina é determinada, na grande maioria das vezes, pelo gene *mec*A, que é carreado pelo cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCCmec). Este gene é responsável pela síntese da proteína ligadora de penicilina modificada (PBP2a), que apresenta uma diminuição de sua afinidade com a maioria dos antimicrobianos β-lactâmicos (ABADI et al., 2015; KAISER et al., 2010; SZCZUKA et al., 2016).

Este segmento de DNA, variando de 21-67 Kb, carreia o gene *mec*A e os genes *mecR1* e *mecI* que codificam o indutor MecR e a proteína repressora MecI, respectivamente (complexo gene *mec*). Em adição, esse elemento carreia ainda o complexo gene *ccr*, o qual codifica recombinases responsáveis pela mobilidade do SCC*mec*. Além do gene *mec*A, o SCC*mec* pode carrear outros genes de resistência a drogas. Assim, devido às características citadas acima, o SCC*mec* pode ser definido como uma ilha de resistência a antimicrobianos. A presença do gene *mec*A, no entanto, não é exclusivo dos *S. aureus*, uma vez que outras espécies deste mesmo gênero também o adquiriram. Acredita-se que foram os SCN, em especial os *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, os principais responsáveis pela transferência desse gene para o *S. aureus* (HIRAMATSU et al., 2002).

Os tipos de SCC*mec* são classificados de acordo com a combinação de dois elementos: o complexo *ccr* e o complexo *mec*, resultando em diferentes tipos de SCC*mec*. Foram relatados também vários subtipos de SCC*mec*. As sequências entre os complexos ou depois deles foram classificadas como regiões “junkyard” ou região J (Hanssen et al., 2005). Segundo dados do IWG-SCC, 2017, são descritos onze tipos de SCC*mec*, tipo I ao XI, classificados de acordo com o tipo do complexo *mec* e do complexo *ccr* (Quadro 1).

Estudo realizado na Tunísia (2011) com cepas de *S. haemolyticus* em pacientes neutropênicos evidenciou a prevalência do SCC*mec* tipo V em 28% das amostras de *S. haemolyticus.* (BOUCHAMI et al., 2011). Recentemente, Salgueiro e colaboradores (2014) verificaram que a grande maioria das cepas de *S. haemolyticus* isoladas de neonatos em uma maternidade pública na cidade do Rio de Janeiro eram não tipáveis (63,7%) e que 36,4% carreavam o SCC*mec* tipo V.

Quadro 1- Tipos de SCC*mec*

Tipos de SCC*mec*	Tipo de complexo *ccr*	Tipo de complexo *mec*
I	1	B
II	2	A
III	3	A
IV	2	B
V	5	C2
VI	4	B
VII	5	C1
VIII	4	A
IX	1	C2
X	7	C1
XI	8	E

Fonte: Adaptado de IWG-SCC, 2017

Cepas resistentes à oxacilina têm sido associadas a dispositivos implantáveis. Seguida de *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* tem sido frequentemente relacionado com quadros de bacteremias em pacientes fazendo uso de catéteres. O CLSI (National Commite for Clinical Laboratory Standards) recomenda que isolados com oxacilina apresentando zonas inibitórias ≤ 25 mm sejam categorizadas como sensíveis, e quando mostrando zonas ≥ 24 mm, sejam considerados resistentes. Isolados com a concentração inibitória mínima (CIM) ≤ 0.25 µg/mL são definidos como sensíveis, e a CIM ≥ 0.5 µg/mL são definidos como resistentes a oxacilina (CLSI, 2016).

A vancomicina foi introduzida em 1958 e é a escolha terapêutica para tratar as infecções estafilocócicas, quando o *Staphylococcus* é resistente a oxacilina (meticilina) (ANTUNES et al., 2011; SCHITO, 2006). Nesta mesma época, outros agentes anti-estafilococos passaram a ser utilizados, recebendo uma aceitação clínica muito maior que a vancomicina, tendo-se em conta a toxicidade desta. Avanços em processos e técnicas de separação permitiram a produção de vancomicina com alta pureza, resultando na eliminação de muitos dos seus efeitos colaterais. A vancomicina é ativa contra cocos Gram-positivos, porém não possui atividade contra bactérias Gram-negativas (SILVEIRA et al., 2006; SCHITO, 2006).

Dentre os SCN, *S. haemolyticus* foi a primeira espécie a ser detectada com susceptibilidade diminuída a teicoplanina e à vancomicina sendo em particular, a resistência à

teicoplanina mais comum do que a resistência à vancomicina (FALCONE et al., 2006; BAKTHAVATCHALAM et al., 2017). A heteroresistência à vancomicina é cada vez mais reportada em ambientes hospitalares, e no caso de *S. haemolyticus* o fenômeno é comum em ORSH, porém é raramente relatado em *S. haemolyticus* suscetível a oxacilina (OSSH) (BAKTHAVATCHALAM et al., 2017). Além disso, *S. haemolyticus* parece ter grande capacidade de desenvolver resistência a várias classes de antimicrobianos. A frequência de infecções hospitalares por ORSH pode chegar a 90%, sendo a grande maioria das cepas multirresistentes (BOUCHAMI et al., 2011).

S.haemolyticus também pode servir como um doador de genes de resistência para a espécie de estafilococos mais virulenta, como *S. aureus*. *S. haemolyticus* foi o primeiro patógeno Gram-positivo a adquirir resistência aos glicopeptídeos, mais cedo do que outras espécies de *Staphylococcus* e *Enterococcus*, e tem sido sugerido por ser o único entre os SCN a desenvolver resistência a glicopeptídeos (KRISTOF et al., 2011).

O uso contínuo de antimicrobianos está fortemente associado à emergência de patógenos multirresistentes no ambiente hospitalar. Os SCN de forma geral têm adquirido resistência a uma grande variedade de antimicrobianos, com diferentes mecanismos e espectros de ação, incluindo rifampicina, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, tetraciclinas, cloranfenicol, macrolídeos, clindamicina e sulfonamidas (ROGERS; FEY; RUPP, 2009). A linezolida é uma nova classe de antibiótico desenvolvida nas últimas décadas e disponível no mercado com atividade efetiva. É usada como último recurso contra infecções causadas por micro-organismos Gram positivos, e apesar do pouco tempo de uso, a resistência a linezolida tem sido identificada entre amostras de SCN. A resistência é mediada pela aquisição do gene *cfr* e também por mutações em proteínas ribossômicas (BECKER et al., 2014; RAJAN et al., 2017).

Para os SCN, as cepas que desenvolvem crescimento *in vitro* na presença de vancomicina, particularmente em uma concentração de 8 µg/ml, depois de serem submetidas a seleção positiva com beta-lactâmicos, são considerados heteroresistentes. *S. haemolyticus* com sensibilidade reduzida a glicopeptídeos tem sido notado em algumas populações, os padrões de heteroresistência a vancomicina estão associados com falhas terapêuticas e, informalmente se discute o tratamento com esquemas que incluem rifampicina tentando diminuir a exposição dos SCN aos glicopeptídeos. Há 12 anos, já se utilizava vancomicina como a droga de escolha junto com cefotaxima, antes da suspeita de infecção sistêmica nosocomial. Considera-se relevante

avaliar a ocorrência, em nosso meio, de cepas de *S. haemolyticus* heteroresistentes a vancomicina (MASHALY; EL-MAHDY, 2017).

1.6 **Biofilme**

A capacidade de formar biofilme é considerada o mais importante fator de virulência dos SCN em infecções associadas a dispositivos médicos invasivos (FREDHEIM et al., 2009; SZCZUKA; GRABSKA; KAZNOWSKI, 2015). O biofilme é composto por agregados de células microbianas sésseis, organizadas em várias camadas, e incorporados em uma matriz extracelular (que pode ser composta de polissacarídeos, proteínas ou DNA extracelular produzidos pelas próprias bactérias), facilitando, a aderência do micro-organismo, além de fornecer proteção contra os mecanismos de defesa do hospedeiro, assim como contra a ação de antimicrobianos, agindo também, como foco para disseminação do patógeno (FEY; OLSON, 2010; SZCZUKA; GRABSKA; KAZNOWSKI, 2015; HONG et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2016).

Sua formação se dá em quatro etapas: adesão, agregação intercelular, maturação e dispersão a partir do biofilme maduro (FEY; OLSON, 2010). A formação do biofilme compreende um processo que tem sido descrito em detalhes para a espécie *S. epidermidis*. O ataque inicial é mediado por uma série de fatores, como da parede celular que se ancora a proteínas de superfície (Fbe e Bhp) e da parede celular da enzima lítica, autolisina E (Atle). Em *S. epidermidis*, a fase de acúmulo é mediada pela produção de uma adesina polissacarídica intercelular (PIA), o qual é sintetizado por proteínas codificadas *ica*ADBC (KEIM, 2005). A adesão inicial é mediada por interações específicas e inespecíficas, podendo ocorrer em superfícies abióticas ou em superfícies bióticas (FEY; OLSON, 2010).

Estudo da presença e expressão de genes *ica* pode esclarecer os diferentes mecanismos de adesão na patogênese de infecções associadas a dispositivos médicos, e contribuir no desenvolvimento de novas medidas preventivas e terapêuticas para a erradicação de biofilme em hospitais. No entanto, tornou-se claro que o PIA não é nem essencial nem necessariamente o componente principal de biofilmes em SCN (FITZPATRICK et al., 2005; KOGAN et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2010).

Os genes que codificam as principais proteínas envolvidas na formação do biofilme fazem parte do *operon ica*ADBC que codifica a produção da PIA, que faz a mediação entre a adesão intercelular de bactérias e a acumulação de multicamadas de biofilme e a adesina polissacarídica capsular ("Capsular polysaccharide adhesin", PSA). Cada gene (*ica*A, *ica*D, *ica*B e *ica*C) é responsável por fatores patogênicos e de virulência relevantes envolvidas na síntese da PIA. A transcrição do *operon ica*ADBC é regulada negativamente por um gene regulatório de uma sequência adjacente, o gene *ica*R que afeta a capacidade de formação de biofilme pela repressão do operon icaADBC. A evidência da importância do gene *ica*R foi estabelecida através de deleção do mesmo, havendo então, um aumento da produção de PIA. O gene *ica*A codifica uma proteína transmembranar que trabalha em conjunto com o gene *ica*D. A presença do gene *ica*C, aumenta o comprimento de N-acetilglicosamina e permite a translocação do polissacarídeo através da membrana citoplasmática para a superfície da célula. A expressão dos genes *ica*A, *ica*D e *ica*C é um requisito necessário para a produção de PIA. A presença do gene *ica*B, é importante para catalisar a desacetilação da sequência poli-N-acetilglicosamina, aumentando a virulência e as propriedades adesivas da PIA. (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005; LAVERTY et al., 2014). Adesão intercelular mediada pela proteína associada ao acúmulo (aap), de forma independente ou em cooperação com o operon *ica*, é bem descrito (KLINGENBERG et al., 2007; OCAL et al., 2017).

A expressão do *operon ica*ADBC é controlada por uma complexa variedade de condições e fatores como: anaerobiose, alta temperatura, estresse, tensão de oxigênio, níveis de glicose e osmolaridade. Esses fatores também influenciam a produção do biofilme, se analisado fenotipicamente (HERNÀNDEZ et al., 2010).

Pouco é conhecido sobre o processo de maturação do biofilme, entretanto, diversos estudos demonstram que células de *Staphylococcus* presentes no interior do biofilme apresentam alterações fisiológicas e um metabolismo anaeróbio ou microaerófilo, além de regularem negativamente a síntese de proteínas, parede celular e DNA (STEWART; FRANKLIN, 2008).

Acredita-se que a produção do biofilme mediado pela PIA forneça vantagem seletiva na colonização dos dispositivos associados (WEISSER et al., 2010). *S. haemolyticus* pode produzir biofilme, através de uma via *ica*-independente. A adesão intercelular mediada pelas proteínas *aap* e *bap*, está bem descrita em espécies de *Staphylococcus*, porém, componentes adicionais como: DNA, RNA e outros polissacarídeos, tem sido sugeridos como importantes na formação do biofilme (BARROS et al., 2015).

1.7 **Caracterização de SCN e epidemiologia molecular**

Nas últimas décadas, estudos epidemiológicos utilizando análises moleculares têm avançado, apresentando vários métodos de tipagem bacteriana que detectam as características expressas pelas bactérias, e técnicas genotípicas, envolvendo diretamente o DNA bacteriano, têm sido utilizados. Para os estafilococos, os métodos de caracterização molecular mais comumente utilizados são baseados na análise do polimorfismo dos tamanhos dos fragmentos de DNA, clivados com enzima de restrição (RFLP: *Restriction Fragment-Length Polymorphism*) ou na amplificação de sequência do DNA genômico, através do PCR (KLOOS, 1997).

Outra técnica que também utiliza o princípio de RFLP é o sistema de eletroforese em gel a campo pulsado - PFGE, que após clivagem com enzimas de restrição cortam o cromossomo bacteriano em fragmentos grandes, os quais são separados sob um campo elétrico alternado. O PFGE é considerado técnica de referência, apresentando um excelente poder discriminatório (TENOVER et al., 1997).

A técnica de PFGE, também conhecida como eletroforese em gel de campo pulsado, foi desenvolvida em 1983 como uma técnica molecular que consiste na mudança de pulsos elétricos periodicamente, permitindo a separação de grandes fragmentos de DNA. Esses fragmentos são obtidos após tratamento do DNA total com enzima de restrição que apresentam poucos sítios específicos de ligação ao longo da molécula de DNA, essa técnica é bastante utilizada em função de seu alto poder discriminatório (MCDOUGAL et al., 2003; BARROS et al., 2012).

Os métodos moleculares podem apresentar alta sensibilidade e especificidade para a identificação de estafilococos, porém, ainda são pouco disponíveis em laboratórios de microbiologia clínica, esses métodos são baseados na detecção de espécie-específicas, ou nas variações de sequência de elementos (BARROS et al., 2007).

Em 1995, a publicação de uma proposta de padronização da interpretação dos resultados, obtidos através do emprego da técnica de PFGE, veio facilitar a utilização da mesma em estudos epidemiológicos. Os estudos, porém, envolviam estirpes isoladas de uma mesma localidade, e em períodos curtos de tempo (TENOVER et al., 1995). Em 2009, VAN BELKUM e colaboradores propuseram um novo critério para análise dos resultados obtidos na técnica de PFGE, e, segundo os autores, as estirpes poderiam ser agrupadas em um mesmo clone caso

apresentassem até quatro bandas de diferença e até 80% de similaridade entre si. Esse novo critério é mais amplo do que aquele proposto por TENOVER e colaboradores (1995), pois permite tipagem de estirpes coletadas em intervalo de tempo mais longo.

A técnica de PFGE vem sendo utilizada em estudos epidemiológicos com o objetivo de determinar a prevalência de clones de *Staphylococcus* spp. entre amostras hospitalares, incluindo tanto amostras de SCN quanto *S. aureus* (TOLDOS et al., 1997; NUNES et al., 2005; BARROS et al., 2012).

LINHARDT e colaboradores (1992) demonstraram pela primeira vez a importância do PFGE como método de análise epidemiológica de amostras de SCN. Desde então, está análise tem ajudado a definir linhas de transmissão e formas mais eficazes de controlar a disseminação da resistência entre os *Staphylococcus* (MIRAGAIA et al., 2002). Os autores verificaram que a técnica discriminou sete genótipos de *S. epidermidis* em 13 amostras comensais isoladas de profissionais da saúde. Desde então, essa técnica vem sendo utilizada em estudos epidemiológicos com o objetivo de determinar a prevalência de clones de SCN entre amostras hospitalares (TOLDOS et al., 1997; NUNES et al., 2005).

Poucos estudos relatam características que justifiquem a disseminação de genótipos de *S.epidermidis* caracterizados por PFGE no ambiente hospitalar (MIRAGAIA et al., 2002; KLINGENBERG et al., 2007).

2 **OBJETIVOS**

2.1 **Objetivo geral**

O presente estudo tem como objetivo geral, a avaliação de aspectos fenotípicos e genotípicos da interação com superfícies abióticas e bióticas de diferentes tipos clonais de *S. haemolyticus* relacionados a quadros com bacteriemias.

Neste sentido, amostras de *S. haemolyticus* previamente isoladas de pacientes adultos e neonatos internados no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE/UERJ) e fômites, foram utilizadas no desenvolvimento dos seguintes objetivos específicos:

2.2 **Objetivos específicos:**

a) Identificação de amostras de *S. haemolyticus* previamente isoladas de hemoculturas e de fômites por técnicas fenotípicas e moleculares;
b) Determinação dos perfis de resistência aos agentes antimicrobianos através do teste de disco-difusão, determinação de CIMs e pesquisa do gene codificador de resistência a meticilina;
c) Análise dos perfis clonais pela técnica de PFGE*;*
d) Pesquisa de produção de *slime*;
e) Avaliação da capacidade de produção de biofilme em superfícies abióticas diversas: ensaios de aderência ao vidro, poliestireno, catéteres de poliuretano e de silicone;
f) Análise da produção de biofilme em vidro e poliestireno na presença de antimicrobianos, incluindo Oxacilina, Vancomicina e Linezolida;
g) Ensaios de PCR para a pesquisa dos genes *ica, atl, atlE, fbp e aap* codificador de produção de *slime* e formação de biofilme;

h) Análise ultraestrutural pela técnica de microscopia eletrônica de varredura da formação de biofilme em superfície de catéteres (poliuretano e silicone) na presença e ausência de oxacilina e vancomicina;
i) Sequenciamento genômico da cepa SH-9N, representante do clone predominante encontrado no HUPE em colaboração com grupo de pesquisadores de outras instituições brasileiras (UFMG e UFPA);
j) Correlação dos resultados com os dados clínico-epidemiológicos das infecções hematogênicas causadas por *S. haemolyticus* em pacientes neonatos e adultos internados no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE/UERJ).

3 **RESULTADOS**

Os resultados obtidos permitiram a publicação e/ou redação de 03 artigos científicos em periódicos qualificados pela CAPES apresentados a seguir.

3.1 **Artigo 1: *Staphylococcus haemolyticus* disseminated among neonates with bacteremia: phenotypic and molecular characterization of isolates from a neonatal intensive care unit in Rio de Janeiro, Brazil (Artigo Cientifico 1)**

Autores: Pereira PMA, Binatti VB, Sued BPR, Ramos JN, Peixoto RS, Simões C, Castro EA, Duarte JLMB, Vieira VV, Hirata Jr R, Santos KRN, Mattos-Guaraldi AL, Pereira JAA.

Revista: *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2014; 78: 85–92.

Resumo

Staphylococcus haemolyticus é um importante patógeno oportunista em infecções adquiridas no hospital em todo o mundo, frequentemente isolados de hemoculturas, causando bacteremia principalmente em pacientes da unidade de terapia intensiva neonatal (UTIN). *Staphylococcus haemolyticus* resistente à oxacilina (ORSH) foi encontrado como a espécie mais predominante (77,5%) de Estafilococos coagulase-negativas associados com bacteremia em neonatos fazendo uso de catéteres intravenoso em uma unidade de terapia intensiva de um hospital de ensino brasileiro. Trinta e um isolados de sangue foram confirmados como *S. haemolyticus* por sequenciamento do 16S e agrupado em 6 tipos de PFGE (com 58% das cepas pertencentes a 2 tipos predominantes B e D). *S. haemolyticus* são principalmente resistentes à oxacilina (90,3%), apresentando perfis de multiresistência (70,4%). No entanto, o gene *mec*A não foi detectado em 22,6% das cepas. ORSH apresentaram produção de *slime* no ágar Vermelho do Congo (67,7%), aderência ao poliestireno (96,7%), e superfícies de vidro (87%).

Interessantemente, o operon *ica* foi detectado em 58% das cepas, pertencendo principalmente aos tipos clonais B, D, e F, que é uma porcentagem significativamente maior quando comparado a outros estudos realizados em diferentes partes do mundo. Os dados indicaram que o operon *ica* e a formação de biofilme por ORSH são endêmicas no ambiente hospitalar brasileiro. Estudos adicionais da presença e expressão de gene *ica* podem esclarecer os diferentes mecanismos de adesão na patogênese das infecções causadas por *S. haemolyticus*, incluindo os casos associados a dispositivos médicos.

Author's personal copy

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 78 (2014) 85–92

Contents lists available at ScienceDirect

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/diagmicrobi o

Staphylococcus haemolyticus disseminated among neonates with bacteremia in a neonatal intensive care unit in Rio de Janeiro, Brazil☆

Paula Marcele Afonso Pereira [a], Vanessa Batista Binatti [a], Bruna Pinto Ribeiro Sued [a], Juliana Nunes Ramos [a,c], Renata Stavracakis Peixoto [a,b], Cláudio Simões [b], Eduardo Almeida de Castro [a], José Luís Muniz Bandeira Duarte [a], Verônica Viana Vieira [c], Raphael Hirata Jr. [a], Kátia Regina Netto Santos [b], Ana Luíza Mattos-Guaraldi [a,*], José Augusto Adler Pereira [a]

[a] *Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro*
[b] *Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro*
[c] *Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS -Departamento de Microbiologia, Rio de Janeiro, RJ, Brazil*

a r t i c l e i n f o

Article history:
Received 11 March 2013
Received in revised form 26 May 2013
Accepted 4 June 2013
Available online 28 October 2013

Keywords:
Staphylococcus haemolyticus
Multiresistance
PFGE
Biofilm
Neonates
Bacteremia

a b s t r a c t

Oxacillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* (ORSH) was found as the most prevalent (77.5%) species of coagulase-negative staphylococci associated with bacteremia in neonates making use of intravenous catheters in an intensive care unit of a Brazilian teaching hospital. Thirty-one blood isolates were confirmed as *S. haemolyticus* by sequencing of the 16S and clustered in 6 pulsed-field gel electrophoresis types (with 58% of the strains belonging to 2 predominant types B and D). *S. haemolyticus* was mostly oxacillin-resistant (90.3%) displaying multiresistance profiles (70.4%). However, the *mecA* gene was undetected in 22.6% strains. ORSH exhibited slime production on Congo-Red agar (67.7%), adherence to polystyrene (96.7%), and glass (87%) surfaces. Interestingly, *ica*-operon was detected in 58% strains, mostly belonging to the B, D, and F genotypes, which is a significantly higher percentage when compared to other studies conducted at different parts of the globe. Data indicated that *ica* operon and biofilm-forming ORSH are endemic in Brazilian nosocomial environment.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Among the coagulase-negative staphylococci (CoNS), *Staphylococcus haemolyticus* plays an important role in hospital-acquired opportunistic infections worldwide (Barros et al., 2012; Botelho et al., 2012; Jain et al., 2004; Monsen et al., 2005; Nystrom et al., 1992; Tuo et al., 1995; Voronina et al., 2011). *S. haemolyticus* is second only to *Staphylococcus epidermidis* in its frequency of isolation from human blood cultures (Falcone et al., 2006; Ing et al., 1997). The pathogen may also cause peritonitis, otitis, urinary tract infections, and septicemia (Kumari et al., 2001). Oxacillin-resistant *S. haemolyticus* (ORSH) strains have been also associated with foreign body infections (Falcone et al., 2006).

S. haemolyticus is also among the CoNS that colonize and cause bacteremia in neonatal intensive care units (NICUs) in many countries (Bjorkqvist et al., 2002; Bradford et al., 2006; Foka et al., 2006; Klingenberg et al., 2007; Neumeister et al., 1995; Tuo et al., 1995; Voronina et al., 2011). In Greece, the analysis of clonality of slime-producing methicillin-resistant CoNS (MR-CoNS) disseminated among pre-term neonates revealed that all MR-CoNS strains were multiresistant, and 89% produced slime. Ten of 16 *S. haemolyticus* isolates belonged to a single clone (Foka et al., 2006). In Norway, a study of persistent strains of CoNS in a single neonatal unit over a 12-year period showed that only 1 *S. haemolyticus* cluster appeared to selectively colonize and infect the most extreme pre-term infants (Klingenberg et al., 2007). In India, *S. haemolyticus* (36%) and *S. epidermidis* (35%) were indicated as the most frequent CoNS species encountered in a NICU (Jain et al., 2004; Mehta et al., 1991) and as the only pathogens from infants that developed septicemia due to CoNS. Forty-five percent of these CoNS strains were slime producers (Mehta et al., 1991).

2. Objectives

Multiple selective factors, including antibiotic resistance, biofilm formation, and surface proteins with adhesive properties, increase the ability of CoNS to persist in a hospital environment (Klingenberg et al., 2007). Hence, in the present study, *S. haemolyticus* strains were isolated from blood cultures of infants making use of intravenous catheters in the NICU, over a 3-year period. Microorganisms were analyzed to determine their clonal distribution by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), antibiotic resistance patterns, biofilm pro- duction, and the prevalence of *mec*A and *ica*A genes associated with oxacillin resistance and biofilm formation, respectively.

☆ Disclosure Statement: No competing financial interests exist.

♦ Corresponding author. Fax: +55-21-2868-8376.
E-mail address: guaraldi@uerj.br (A.L. Mattos-Guaraldi).

0732-8893/$ – see front matter © 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.06.026

1. Materials and methods

1.1. Patients and origin of CoNS strains

A total of 47 blood culture isolates of CoNS were obtained from 40 neonates admitted to NICU of a teaching hospital, Rio de Janeiro, Brazil, over the period from 2008 to 2010. Thirty-seven of them (92.5%) were diagnosed as bacteremia isolates and 03 (7.5%) as contaminants. Invasive strains were collected from the following clinical groups: a) patients making use of indwelling catheter ($n = 40$); b) patients with clinical evidence of infection and submitted to empiric antibiotic therapy with vancomycin or gentamycin ($n = 37$); c) patients without clinical evidence of infection ($n = 03$); d) patients with fever ($n = 25$); d) patients without fever ($n = 13$); and e) premature patients ($n = 2$).

The assessment of clinical aspects was performed through a review of the medical records. The regional committee for medical research ethics approved the collection and analysis of patient data. Patients with 1 ($n = 33$) or 2 ($n = 07$) positive blood cultures were interpreted as infected when a CoNS was isolated from blood cultures in which there was a suspicion of infection and the physician considered it clinically significant to immediately start an empiric antimicrobial therapy. The diagnosis of infection was staged according to the classification of the Centers for Disease Control and Prevention (CDC, 1992). The isolates categorized as contaminants were not included in this study.

The control isolates used for the phenotypic characterization, antimicrobial susceptibility tests, PCRs, and the biofilm assays were *S. haemolyticus* ATCC 29970, *S. epidermidis* ATCC 35984, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. epidermidis* ATCC 14990, *Staphylococcus hominis* ATCC 27844, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305, *Staphylococcus warneri* ATCC 10209, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 33591 and *S. aureus* ATCC 25923.

1.2. Phenotypic procedures

1.2.1. Phenotypic characterization

A simplified method using 9 tests was carried out as described by Iorio et al. (2007): 2 susceptibility tests using 5 μg novobiocin and 100 μg desferrioxamine disks; tests that detect the production of clumping factor, PYR, urease, and alkaline phosphatase as well as acid production from D-mannose, D-trehalose and D-xylose.

1.2.2. Antibiotic susceptibility testing

1.2.2.1. Disk diffusion test. Antibiotic susceptibility testing by the disk diffusion method was performed according the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2010), except for mupirocin (Fuchs et al., 1990). Sixteen antibiotics (purchased from CECON; São Paulo, Brazil, and Oxoid, Basingstoke, England) were tested: oxacillin (Oxa), cefoxitin (Cfx), penicillin (P), ceftazidime (Caz), gentamycin (Gen), neomycin (Neo), tobramycin (Tob), ertapenem (Etp), meropenem (Mer), ciprofloxacin (Cip), erythromycin (Ery), clindamycin (Clin), chloramphenicol (Clo), mupirocin (Mup), tetracycline (Tet), and vancomycin (Van).

1.2.2.2. MIC of oxacillin and vancomycin. The MICs of oxacillin (Sigma, St. Louis, MO, USA) and vancomycin (Oxoid, Basingstoke, England) were evaluated by the broth microdilution method (CLSI, 2010, 2012). The concentrations ranged from 0.25 to 512 μg/mL for oxacillin and from 0.25 to 256 μg/mL for vancomycin. The plates were incubated at 35 °C for 24 h.

1.3. Biofilm testing

1.3.1. Slime production assays for

Qualitative detection of slime production was studied by culturing the strains on Congo Red Agar plates (CRA; Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA) as described previously (Chaieb et al., 2005; Freeman et al., 1989). Inoculated CRA plates (0.8 g Congo red mixed with 36 g sucrose in 1 L of brain heart infusion agar) were incubated for 24 h at 37 °C under aerobic conditions and followed overnight at room temperature. Slime-positive variants appeared as reddish-black colonies with a rough, dry, and crystalline consistency on CRA, whereas slime-negative strains developed pinkish-red, smooth colonies with a darkening at the center. *S. epidermidis* strains ATCC 35984 and ATCC 12228 were used as positive and negative controls, respectively.

1.3.2. Glass surface adherence assay

Briefly, microorganisms were inoculated in glass tubes (13 by 100 mm) containing 4 mL of Trypticase Soy Broth (TSB) and incubated for 48 h at 37 °C without shaking. The tubes were gently shaken for 5 s, and the supernatants containing bacterial cells that were non-adherent to the surfaces of the glass tubes were discarded. TSB (4 mL) was then added, and the tubes were re-incubated for 48 h. This procedure was repeated twice. The glass-adherent bacteria created a confluent coat of cells on sides of the tube (Moreira et al., 2003).

1.3.3. Plastic surface adherence assay

Semi-quantitative adherence assay in polystyrene microtiter plates was performed as previously described by Stepanovic et al. (2000). Briefly, CoNS strains were cultivated overnight in TSB medium, and 200 μL of each bacterial suspension was used to inoculate sterile, 96-well polystyrene microtiter plates (Greiner, Frickenhausen, Germany). After incubation for 24 h at 37 °C, the wells were gently washed twice with 200 μL of sterile phosphate-buffered saline. The plates were air dried, and the remaining surface-adsorbed cells of the individual wells were stained with 0.1% crystal violet for 30 s. Absorbance was measured with a Micro-ELISA Autoreader (Titertek Multiscan) at $\lambda = 490$ nm. The well, to which sterile TSB lacking bacterial cells was added, served as control; the value for this well was subtracted from the experimental readings. Each assay was performed in triplicate. The cut-off OD (OD_C) for the microtiter plate test was defined as 3 SDs above the mean OD of the negative control. Based upon the ODs of bacterial films, microorganisms were classified as non-adherent (OD ≤ OD_C) and adherent (OD_C b OD).

1.4. Genotyping procedures

1.4.1. Multiplex PCR assay (mPCR) to identify methicillin-resistant *S. haemolyticus*

An mPCR to simultaneously identify *S. aureus*, *S. haemolyticus*, and *S. epidermidis* species and to determine methicillin resistance by the presence of gene *mec*A was performed in accordance to previously described methods (Iorio et al., 2011; Potter et al., 2009; Santos et al., 1999; Schuenck et al., 2008). The primers and amplicons used in this study are listed in Table 1.

3.5. Gene amplification and sequencing

S. haemolyticus identification was reconfirmed by sequencing of the 16S rRNA gene of representative strains (SH6, SH8, SH9, SH10, SH12). DNA extraction, primer design, the PCR parameters employed to amplified 16S rRNA gene, and sequencing of amplified PCR products following their purifications were also performed as previously described by Baio et al. (2013). The sequencing reactions were performed with Big Dye Terminator v 3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) on an ABI-3730 Automated DNA Sequencer (Applied Biosystems) by standard protocols. The 16S rRNA gene sequences were compared to those available in the National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) using the BLAST algorithm and the Ribosomal Database Project (RDP-II) (http://rdp.cme.msu.edu/html).

Table 1
Primers used in this study.

Primers	Sequence of forward and reverse primers 5′→ 3′	Product size (bp)	References
SH1	GGTCGCTTAGTCGGAACAAT	285	Schuenck et al., 2008
SH2	CACGAGCAATCTCATCACCT		
SE1	CAGTTAATCGGTATGAGAGC	218	Iorio et al., 2011
SE2	CTGTAGAGTGACAGTTTCGGT		
MRS1	TAGAAATGACTGAACGTCCG	154	Santos et al., 1999
MRS2	TTGCGATCAATGTTACCTAG		
*ica*AF	CGATGGGCTCAAGGTGG	287	Potter et al., 2009
*ica*AR	TTCTTTTCGTAGCGACTGTC		

3.5.1. DNA fingerprinting by PFGE

Chromosomal DNA preparation and PFGE analysis were performed as described previously (Nunes et al., 2005; Vivoni et al., 2006). PFGE banding patterns were analyzed using visual comparison among the strains and with the aid of automated analysis using the Bionumerics program, version 6.0. The Dice similarity coefficients were calculated with a band position tolerance of 1.5%, and the UPGMA method was applied for clusters analysis. Isolates were first assigned to PFGE types, using 80% band-based similarity coefficients as cut-off values. Banding patterns were classified according to the criteria described by Van Belkum et al. (2007). PFGE types were identified by letters, and subtypes were identified by letters followed by a numeric subscript.

3.6. Statistical analysis

The chi-square tests and Fisher exact tests were used to assess the statistical significance for a confidence level of 95%; *P*-value b .05 was considered statistically significant.

1. Results

1.1. Identification of S. haemolyticus strains

Phenotypic tests identified CoNS strains as *S. haemolyticus* (77.5%), *S. epidermidis* (15% strains), *S. captis* (5% strains), and *S. warneri* (2.5% strain). The 31 *S. haemolyticus* blood isolates identified by the phenotypic assays were confirmed by mPCR and 16S rRNA sequencing. Genbank accession numbers for 16S rRNA genes sequences of *S. haemolyticus* strains were deposited under the bank with submitting numbers 1632716, 1632721, 1632727, 1632729, and 1632731 on GenBank database.

1.2. Determination of clonal distribution by PFGE

PFGE analysis showed the presence of 12 restriction profiles clustered in 6 pulse types: A ($n = 4$; 12.9%), B ($n = 10$; 32.2%), C ($n = 5$; 16.1%), D ($n = 8$; 25.8%), E ($n = 1$; 3.2%), and F ($n = 3$; 9.6%) (Fig. 1 and Table 2). Isolates showing a similarity coefficient ≥80% were considered genetically PFGE related. Several clinical isolates were classified as belonging to the same clonal subtype A'1 ($n = 01$), A'2 ($n = 02$), A'3 ($n = 01$), B'1 ($n = 05$), B'2 ($n = 05$), C'1 ($n = 02$), C'2 ($n = 03$), D'1 ($n = 05$), D'2 ($n = 03$), F'1 ($n = 01$), and F'2 ($n = 02$) (Tables 2 and 3). The 16S rRNA sequences from 5 representative PFGE type strains exhibited highest similarity values to the type strain of *S. haemolyticus*, ranges of 99.15% to 99.54%.

1.3. Antimicrobial susceptibility profiles

Results of the disk diffusion tests shown in Fig. 2, Tables 2, and 3 shown multiresistance to varied antimicrobial agents in 87% of *S. haemolyticus* strains isolated from blood of neonates making use of intravenous catheters. Antimicrobial susceptibility profiles were independent of PFGE types and subtypes; 28 out of 31 tested strains (90.3%) were phenotypically resistant to oxacillin (ORSH). Oxacillin-resistant isolates were also resistant to representative drugs from 4 to 6 non–beta-lactam drug classes. The resulting MICs for oxacillin (range: 0.25–512 μg/mL; oxacillin-resistant mean values: 356.07 ± 211.9 μg/mL) were compared to disk diffusion zone diameters and to *mecA* gene detection by PCR ($P = .028$). MICs for oxacillin ranging from N4 to b128 μg/mL were not observed for *S. haemolyticus* strains included in this study. Interestingly, most of the *S. haemolyticus* strains ($n = 27$; 70.4%) showed high resistance levels to oxacillin (MIC values ≥ 128 μg/mL). With the used pair of primers, we could not observe an agreement between high MICs values and *mecA* detection, since the *mec*A gene was not detected for 2 (6.4%) ORSH isolates (SH-27, SH-28 strain) with MICs reported as ≥128 μg/mL. The presence of *mec*A gene was observed in 77.4% ($n = 24$) of *S. haemolyticus* strains belonging to PFGE types A ($n =$

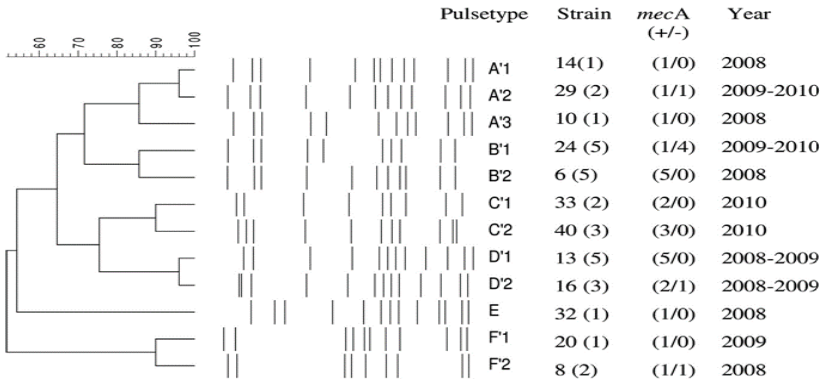


Fig. 1. Dendogram of the PFGE profile of *Sma*I—digested genomic DNA of 31 *Staphylococcus haemolyticus* strains isolated from blood of neonates making use of intravenous catheters. Similarities percentage are identified on the dendogram derived from the unweighted pair group method using arithmetic averages and based on Dice coefficients. Isolates showing a similarity coefficient ≥80% were considered genetically PFGE related. Pulse types (strain number): A′1 (SH-14), A′2 (SH-21, SH-29), A′3 (SH-10); B′1 (1, 24, 26, 27, 28), B′2(2, 3, 4, 5, 6); C′1 (33, 38), C′2 (16,35, 39); D′1 (7, 12, 13, 18, 11), D′2 (19, 36, 40); E (32); F′1 (20), F′2 (8, 9). PCR reaction: +, positive; −, negative; year, period of isolation of microorganisms.

Table 2
Microbiological and genetic properties of *Staphylococcus haemolyticus* strains isolated from blood of neonates making use of intravenous catheters.

Strain number	Year of isolation	Biofilm formation CRA/G/P	*ica*A Gene	Vancomycin MIC (μg/mL)	Oxacillin MIC (μg/mL)	Oxacillin susceptibility	*mec*A gene	PFGE type
SH-14	2008	+/+/+	−	4	512	R	+	A1
SH-21	2009	−/+/−	−	4	512	R	+	A2
SH-29	2010	−/+/+	−	4	4	R	−	A2
SH-10	2008	+/+/+	+	4	512	R	+	A3
SH-1	2009	+/+/+	+	8	512	R	+	B1
SH-24	2009	−/−/+	+	4	0.25	R	−	B1
SH-26	2010	+/+/+	+	2	0.25	S	−	B1
SH-27	2010	+/+/+	+	4	128	R	−	B1
SH-28	2010	+/+/+	+	4	128	R	−	B1
SH-2	2008	+/+/+	+	2	512	R	+	B2
SH-3	2008	+/+/+	+	2	512	R	+	B2
SH-4	2008	+/+/+	+	2	512	R	+	B2
SH-5	2008	+/+/+	+	4	512	R	+	B2
SH-6	2008	+/+/+	+	2	128	R	+	B2
SH-33	2010	+/+/+	−	2	0.25	S	+	C1
SH-38	2010	+/+/+	−	2	256	R	+	C1
SH-16	2009	+/+/+	+	4	512	R	+	C2
SH-35	2010	+/+/+	−	4	1	R	+	C2
SH-39	2010	+/+/+	−	2	4	R	+	C2
SH-7	2008	−/+/+	+	4	4	R	+	D1
SH-12	2008	+/+/+	+	4	512	R	+	D1
SH-13	2008	+/+/+	−	4	512	R	+	D1
SH-18	2009	−/−/+	+	2	512	R	+	D1
SH-11	2008	+/+/+	+	2	512	R	+	D1
SH-19	2009	+/−/+	−	4	512	R	+	D2
SH-36	2010	−/−/+	−	4	0.25	S	−	D2
SH-40	2010	−/+/+	−	4	256	R	+	D2
SH-32	2010	−/+/+	−	2	1	R	−	E
SH-20	2009	−/+/+	−	2	512	R	+	F1
SH-8	2008	+/+/+	+	4	512	R	+	F2
SH-9	2008	−/+/+	+	4	512	R	+	F2

G = Adherence to glass; P = Adherence polystyrene; + = Positive; − = Negative. Experiments were performed in triplicate.

3; 12.5%), B ($n = 6$; 25%), C ($n = 5$; 20.8%), D ($n = 7$; 29.1%), F ($n = 3$; 12.5%), but not E ($n = 0$). Data showed that most of the strains of PFGE types A, B, and D gave positive results for the *mec*A gene. The presence of *mec*A gene was observed in all strains tested of PFGE types C and F. Moreover, results of the disk diffusion test demonstrated 61.2% resistance to gentamicin and 100% susceptibility to vancomycin of all ORSH and oxacillin-sensitive *Staphylococcus haemolyticus* strains. Eighteen *S. haemolyticus* strains (58%) showed MIC to vancomycin of 4 μg/mL, and only the SH-1 strain showed MIC of 8 μg/mL (medium of 3.355 ± 1.284 μg/mL).

1.1. Slime production and adherence to abiotic surfaces

Microbiological and genetic properties of *S. haemolyticus* strains isolated from blood samples of neonates making use of intravenous catheters are displayed in Tables 2 and 3. Slime production, adherence to hydrophilic (glass), and/or hydrophobic (polystyrene) abiotic surfaces were observed for *S. haemolyticus*, but with different profiles. Twenty-one strains gave (67.7%) simultaneous positive results for these 3 tests. However, we did not observe strains that gave simultaneous negative results for these 3 tests. Slime production evaluated by the CRA method was observed for 67.7% strains; 32.3% *S. haemolyticus* blood isolates were non-slime producers. Most of the strains tested (87%) were adherent to glass surfaces. All *S. haemolyticus* isolates, except the SH-21 strain, adhered to polystyrene surfaces commonly formed biofilms. No correlation among the results of CRA, polystyrene, and glass adherence tests was partially observed ($P = .534$). The SH-21 strain was glass positive but polystyrene negative. Interestingly, we observed only 1 CRA-positive and glass-negative isolate (SH-19 strain), while 7 (SH-

Table 3
PFGE clusters in terms of antibiotic resistance and virulence factors of *Staphylococcus haemolyticus* ($n = 31$) strains isolated from blood of neonates making use of intravenous catheters.

Bacterial characteristics PFGE clusters	Total number of strains (%)	Number of strains in Type A Total = 4	Type B Total = 10	Type C Total = 5	Type D Total = 8	Type E Total = 1	Type F Total= 3
Genes							
*mec*A-positive	24 (77.4)	3	6	5	7	0	3
*ica*A	18 (58)	1	10	1	4	0	2
Oxacillin resistance	28 (90.3)	4	9	4	7	1	3
MICs							
Oxacillin (BMD test) ≥512 μg/mL	17 (54.8)	3	5	1	5	0	3
Vancomycin (BMD test) ≥4 μg/mL	18 (58)	3	5	2	6	0	2
Biofilm formation							
CRA	21 (67.7)	2	9	5	4	0	1
Glass	27 (87)	4	9	5	5	1	3
Polystyrene	30 (96.7)	3[a]	10	5	8	1	3
Year of isolation	2008, 2009, 2010	2008, 2009, 2010	2008,				
2009, 2010	2009, 2010						
	2008, 2009, 2010	2010					
	2008, 2009						

BMD = Broth microdilution test.
[a] SH-21 strain (subtype A2) was polystyrene negative.

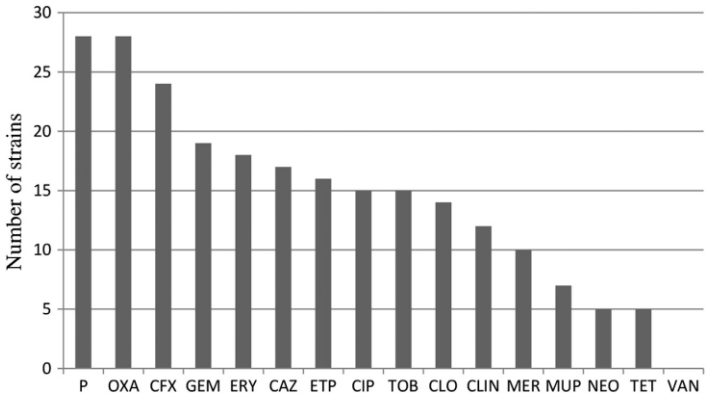


Fig. 2. Antimicrobial susceptibility profiles evaluated by the disk diffusion method of *Staphylococcus haemolyticus* blood isolates (n = 31) of neonates making use of intravenous catheters: 90.3% strains were resistant to penicillin (P) and oxacillin (Oxa), 77.4% strains to cefoxitin (Cfx), 61.2% strains to gentamycin (Gen), 58% strains to erythromycin (Ery); 54.8% strains to ceftazidime (Caz), 51.6% strains to ertapenem (Etp), 48.3% strains to ciprofloxacin (Cip), and tobramycin (Tob); 45.1% strains to chloramphenicol (Clo), while 38.7% strains were resistant to clindamycin (Clin); 32.2% strains to meropenem (Mer), 16.1% strains to tetracycline (Tet) and neomycin (Neo); 22.6% strains were resistant to mupirocin (Mup) and 100% strains were susceptible to vancomycin (Van).

21, SH-29, SH-07, SH-09, SH-32, SH-40, SH-20 strains) isolates were CRA negative and glass positive.

Microorganisms from PFGE types B and C showed the highest proportion of strains with simultaneous ability to produce slime and/ or biofilm in all 3 abiotic surfaces tested (CRA, glass, and polystyrene). The presence of *ica*A gene positive was observed in 58% of
S. haemolyticus blood isolates. No correlation was observed among biofilm formation on abiotic surfaces, oxacillin phenotypic resistance (glass $P = .422$; polystyrene $P = .822$), and the presence of *mec*A gene (glass $P = .120$; polystyrene $P = .754$) and *ica*A gene (glass $P = .195$; polystyrene $P = .654$).

1. Discussion

In many countries, *S. haemolyticus* is second to *S. epidermidis* in its frequency of isolation from newborns (Bjorkqvist et al., 2002). The number of infections caused by CoNS has dramatically increased as the management of patients in the NICUS has become more dependent on invasive procedures and indwelling devices (Brodie et al., 2000). Some studies of the clonality of ORSH responsible of epidemic infections in NICU suggested that ORSH neonatal infections are caused by a limited number of clones (Kazembe et al., 1993; Low et al., 1992).

PFGE typing showed that the *S. epidermidis* isolates regarded as inducers of sepsis were more homogeneous than isolates considered contaminants (Bjorkqvist et al., 2002). The occurrence of a dominat- ing genotypic group among the sepsis isolates of *S. epidermidis* may represent strains with higher invasive capacity (Chu et al., 2011). Recently, cluster and phylogenetic analysis of CoNS strains isolated in hospitals emphasized the high adaptive ability of some nosocomial strains of *S. haemolyticus* that circulate in hospitals in the Russian Federation and threaten both neonates and hospitalized adult patients (Voronina et al., 2011).

In the present study, *S. haemolyticus* was the most prevalent species (77.5%) isolated from infants with bacteremia and subjected to therapy with vancomycin and/or gentamicin in a Brazilian NICU, as previously observed in India (Jain et al., 2004; Mehta et al., 1991). PFGE results revealed 6 pulse types (A, B, C, D, E, and F) indicating a genetic diversity among these *S. haemolyticus* strains during the period of 2008–2010. Pulse types A, B, D, and E were observed during the 3 years of the study. Most of the types were mainly observed in 2008, while type C was observed mainly in 2010 (P b .358). Among the
S. haemolyticus isolates, 18 (58%) strains belonged to the 2 predominant pulse types, B (n = 10) and D (n = 08). Similar to data described in the Russian Federation (Voronina et al., 2011), the presence of 2 predominant PFGE types (B and D) indicated the adaptive ability of some nosocomial strains of *S. haemolyticus* to circulate in this hospital located in Rio de Janeiro and to infect neonates hospitalized patients making use of intravenous catheters.

Antibiotic resistance in CoNS has increased over the years and is driven by the acquisition of the *mecA* gene. The *mecA* gene is present in more than 80% of the CoNS late-onset sepsis isolates. Given the large number of methicillin-resistant CoNS, inclusion of vancomycin in empiric therapy for neonates with late-onset septicemia may be justified (Jain et al., 2004). *S. haemolyticus* has the highest level of antimicrobial resistance among all CoNS species, and heteroresistance to glycopeptides is common (Brodie et al., 2000; Chiew et al., 2007; Froggatt et al., 1989; Sieradzki et al., 1998; Tabe et al., 2001).

In the present study, the disk diffusion tests revealed 90.3% of the clinical isolates as ORSH. However, the presence of *mecA* gene was detected only in 77.4% of *S. haemolyticus* strains independently of oxacillin susceptibility and pulse types. Similar to data described in the literature (Marshall et al, 1998; Zafar Hussain et al., 2000), a categorical agreement between high MICs values and *mecA* detection was not verified. OSSH strains presenting *mecA* gene as well as ORSH isolates without *mec*A gene were observed, among these Brazilian *S. haemolyticus* nosocomial isolates.

A high proportion (87%) *S. haemolyticus* strains isolated from neonates showed multiresistance to antimicrobial agents, including gentamicin used as initial empiric therapy. Microorganisms exhibited different multiresistance profiles independent of pulse types and subtypes; 22.6% were also resistant to mupirocin. The diversity of high-level mupirocin resistance plasmids [Mup(R)] was also demon- strated in *S. haemolyticus* strains belonging to different PFGE types or subtypes. (do Carmo Ferreira et al., 2011).

The mechanism of reduced vancomycin susceptibility in CoNS is unclear but may be related to the selection of resistant subpopulations under pressure of antimicrobial exposure (Dunne et al., 2001). In a study made in Japan, the results indicated that methicillin resistance may not be related to reduced susceptibility to glycopeptide in *S. haemolyticus* and that a multiresistance profile is more associated with a decreasing susceptibility to glycopeptides than with resistance to oxacillin. These facts limit the therapeutic options available and make an ORSH infection a serious threat (Tabe et al., 2001). A reduction in the efficacy of vancomycin has been described in studies of methicillin-resistant *S. aureus* infections treated with this antibiotic, and it has been suggested that slight increases in vancomycin MICs of between 1 and

2 μg/mL, which are within the susceptible range, may be related to suboptimal clinical outcomes. Some of these studies have used the broth microdilution method for determining vancomycin MICs. Despite the fact that *S. haemolyticus* are usually more resistant to glycopeptides (Ashtiani et al., 2008; Bannerman and Peacock, 2007), the results of our study showed most MICs to vancomycin ⩽4 μg/mL (18 strains). Only 1 strain showed intermediate resistance with MIC = 8 μg/mL.

Takeuchi et al. (2005) observed that the highly glycopeptide-resistant *S. haemolyticus* JCSC1435strain frequently generated mutants that lost antibiotic resistance during passage in drug-free medium. JCSC1435 strain may provide an ideal tool for elucidating the genetic mechanisms for acquisition of glycopeptide and β-lactam antibiotic resistance that poses such a difficult medical problem in modern hospitals. Comparative analysis of the genomes of *S. haemolyticus* JCSC 1435 strain, *S. epidermidis*, and *S. aureus* detected an average sequence identity of 78% in genes found as orthologues. In that opportunity, complete genome sequencing of *S. haemolyticus* JCSC1435 uncovered a wide range of open reading frames encoding putative virulence factors. The virulence genes in *S. haemolyticus* and *S. epidermidis* were rather "benign" in nature, as indicated by surface adhesins, secretory antigens, serine proteases, and exonucleases (Takeuchi et al.,2005).

Slime production and biofilm formation are important virulence factors of CoNS, allowing them to attach to smooth surfaces of biomaterials; it has been associated with infections of implanted medical devices (Bernardi et al., 2005; Flahaut et al., 2008). Some materials such as glass, hair, and nylon tend to give up electrons and become positively charged. Other materials such as polypropylene, polystyrene, vinyl (PVC), silicon, Teflon, and silicone tend to collect electrons and become negatively charged. Sialic acid may be a constituent molecule of slime and involved in bacterial adherence to inert surfaces, as demonstrated for *Corynebacterium diphtheriae* (Mattos-Guaraldi et al., 1999) and CoNS (Sakarya et al., 2004). Krepsky et al. (2003) investigated cell surface hydrophobicity and slime production of *S. epidermidis*. Data suggested involvement of protein components in adherence to polystyrene, but not in auto-aggregation properties and adherence to glass surfaces. Previous studies also gave an insight into the mechanism of slime production and adherence of slime-forming CoNS to polystyrene plates and polypropylene tubes (Sakarya et al., 2004). Biofilm formation and adherence to acrylic by *S. haemolyticus* were found significantly reduced compared to those of *S. epidermidis* (Cerca et al., 2004, 2005). Nowadays, biofilm formation is also a common phenotype in clinical *S. haemolyticus* isolates (Fredheim et al., 2009). In contrast to *S. epidermidis*, the molecular basis of the virulence of *S. haemolyticus* in general and in the context of foreign material-associated infections is largely unknown. Confocal laser scanning microscopy indicated that the biofilm structure of *S. haemolyticus* clearly differed from that of *S. epidermidis* (Fredheim et al., 2009).

Several genes have been identified to play roles in the biofilm formation. The *ica* gene locus (*ica*ADBC) encodes the biosynthesis of polysaccharide intercellular adhesion (PIA), involved in the accumulation process (Heilmann et al., 1996). Fredheim et al. (2009) demonstrated the presence of the *ica* gene in 3 of 72 *S. haemolyticus* strains. Hence, a low prevalence compared with the prevalence in *S. epidermidis*. In concurrence with previously reported sequences, a high degree of similarity between the *ica* operons was found in different staphylococcal species. Phylogenetic analyses showed that the *ica* operon of *S. haemolyticus* is closely related to that of *S. epidermidis*. However, it has become clear that PIA is neither an essential nor necessarily the major component of CoNS biofilms (Fitzpatrick et al., 2005; Kogan et al., 2006; Oliveira and Cunha, 2010). The presence of an *ica* operon in *S. haemolyticus* has been reported, but to date, its contribution to biofilm formation is unclear. The biofilm-associated *ica* locus, present in *S. epidermidis* and *S. aureus*, may be absent from clinical isolates of *S. haemolyticus* (Cerca et al., 2005; De Silva et al., 2002; Fredheim et al., 2009). One of the most novel parts of this present study is the description of a high prevalence (58%) of the *ica*-operon in the collection. This separates from other studies where a max prevalence of 1–2% has been reported. Comparative genome analyses and the possibility to detect genes with higher variation are limited by the fact that there is currently still only 1 fully sequenced genome published (Takeuchi et al., 2005).

Other cell wall structures, such teichoic acid and protein, have been shown to mediate staphylococcal biofilm formation in strains lacking or not expressing the *ica* locus. A capsular polysaccharide was proposed to be an important virulence factor in *S. haemolyticus*. However, there was no correlation among the clinical *S. haemolyticus* isolates between capsular polysaccharide production and biofilm production (Flahaut et al., 2008). Although capsules produced by staphylococci have been detected by changes in colonial appearance, this approach has not been found suitable for determining slime production. The production of slime by CoNS is routinely detected using the Christensen method, although this method may not always be successful for detecting weak slime production. An alternative method for detecting slime that uses a specially prepared solid medium was described by Freeman et al. (1989). CRA was chosen because it has been used as a stain for showing the presence of the exopolysaccharide of bacteria. The exact mechanism of the Congo red phenomenon is as yet unknown.

In the present study, the subtype B2 of *S haemolyticus* seemed to exhibit a more expressive virulence potential than the other pulse types since it comprised 5 strains with identical phenotypical and genotypical profiles with involvement of all the virulence factors considered in this study. Therefore, all B2 samples were ORSH and exhibited a reduced sensitivity to vancomycin in addition to being carriers of methicillin resistance, adhesion, and biofilm production (*mecA* and *icaA*) genes besides producing biofilm on CRA, polystyrene, and glass. Among the other pulse types, only 2 strains of subtypes B1 and F2 exhibited identical profiles of B2 subtype. Qualitative and quantitative diversity in the ability of biofilm production indicated the involvement of other bacterial and environmental features that need further investigation.

In conclusion, we were able to describe the clonality of ORSH within the NICU in Brazilian hospital and that some clones are endemic in the hospital environment. Measures have to be taken to reduce the risk of hospital-acquired *S. haemolyticus* infections.

The data further suggested that intraspecies differences in virulence occur for *S. haemolyticus*, as previously described for *S. epidermidis* (Gunn, 1989). The occurrence of prevalent genotypic groups among the bacteremia isolates of *S. haemolyticus* may represent strains with higher invasive capacity. The ability to produce biofilm and the notoriously multi-resistance to antimicrobial agents, including glycopeptides, favor *S. haemolyticus* as an emerging cause of nosocomial infections (Cavanagh et al., 2012). Although *S. haemolyticus* biofilm formation *in vitro* has been reported, the molecular mechanisms involved remain partially elucidated. Additional studies of the presence and expression of *ica* genes may clarify the different adhesion mechanisms in the pathogenesis of *S. haemolyticus* infections, including those cases associated with medical devices.

Acknowledgments

This work was supported by grant from CNPq, CAPES, FAPERJ, SR-2/UERJ, and Programa de Núcleo de Excelência (PRONEX) of the Brazilian Ministry of Science and Technology. We are grateful to Drº Adenilson de Souza da Fonseca from Departº of Biophysics and Biometry of the IBRAG/UERJ, RJ, for assistance in statistical analysis.

References

Ashtiani MTH, Kamal S, Aboutorabi SK, Mahjoub F, Mamishi S, Asgari F. Comparison of disk diffusion and E test methods for antimicrobial susceptibility testing of

vancomycin in coagulase negative *Staphylococcus* isolated from blood culture. Iranian J Pathol 2008;3:61–6.

Baio PV, Mota HF, Freitas AD, Gomes DL, Ramos JN, Sant'Anna LO, et al. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2013;108:23–9.

Bannerman TL, Peacock SJ. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Landry ML, editors. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. Washington, DC: ASM Press; 2007. p. 390–411.

Barros EM, Ceotto H, Bastos MC, Santos KR, Giambiagi-Demarval M. *Staphylococcus haemolyticus* as an important hospital pathogen and carrier of methicillin resistance genes. J Clin Microbiol 2012;50:166–8.

Bernardi ACA, Pizzolitto EL, Pizzolitto AC. Detection of slime production by coagulase- negative staphylococci isolated from central venous catheter. J Basic Appl Pharm Sci 2005;22:223–38.

Bjorkqvist M, Soderquist B, Tornqvist E, Sjöberg L, Kühn I, Colque-Navarro P, et al. Phenotypic and genotypic characterization of blood isolates of coagulase-negative staphylococci in the newborn. APMIS 2002;110:332–9.

Botelho AM, Nunes ZG, Asensi MD, Gomes MZ, Fracalanzza SE, Figueiredo AM. Characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from hospital indoor air and a comparative analysis between airborne and inpatient isolates of *Staphylococcus epidermidis*. J Med Microbiol 2012;61(8):1136–45.

Bradford R, Abdul MR, Daley AJ. Coagulase-negative staphylococci in very-low-birth- weight infants: inability of genetic markers to distinguish invasive strains from blood culture contaminants. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2006;25:283–90.

Brodie SB, Sands KE, Gray JE, Parker RA, Goldmann DA, Davis RB. Occurrence of nosocomial bloodstream infections in six neonatal intensive care units. Pediatr Infect Dis J 2000;19:56–65.

Cavanagh JP, Klingenberg C, Hanssen A-M, Fredheim EA, Francois P, Schrenzel J, et al. Core genome conservation of *Staphylococcus haemolyticus* limits sequence based population structure analysis. J Microbiol Methods 2012;89:159–66.

Center for Disease Control and Prevention (CDC). 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. Morb Mortal Wkly Rep Recomm Rep 1992;41:1–19.

Cerca N, Pier GB, Oliveira R, Azeredo J. Comparative evaluation of coagulase-negative staphylococci (CoNS) adherence to acrylic by a static method and a parallel-plate flow dynamic method. Res Microbiol 2004;155:755–60.

Cerca N, Martins S, Sillankorva S, Jefferson KK, Pier GB, Oliveira R, et al. Effects of growth in the presence of subinhibitory concentrations of dicloxacillin on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* biofilms. Appl Environ Microbiol 2005;71:8677–82.

Chaieb K, Mahdouani K, Bakhrouf A. Detection of *ica*A and *ica*D *loci* by polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needless in a dialysis unit. J Hosp Infect 2005;61:225–30.

Chiew YF, Charles M, Johnstone MC, Thompson KM, Parnell KD, Penno EC. Detection of vancomycin heteroresistant *Staphylococcus haemolyticus* and vancomycin intermediate resistant *Staphylococcus epidermidis* by means of vancomycin screening agar. Pathology 2007;39:375–7.

Chu C, Wallace D, Ofoegbu BN, Hassan I. A case of neonatal Eustachian valve endocarditis. J Clin Pathol 2011;64:647–8.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing – tenth edition supplement (M02-A10). Wayne, PA: CLSI; 2010.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing – eleventh edition supplement (M02-A11). Wayne, PA: CLSI; 2012.

De Silva GD, Kantzanou M, Justice A, Massey RC, Wilkinson AR, Day NP, et al. The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. J Clin Microbiol 2002;40:382–8.

Do Carmo Ferreira N, Schuenck RP, Santos KR, de Freire Bastos MC, Giambiagi-de Marval M. Diversity of plasmids and transmission of high-level mupirocin mupA resistance gene in *Staphylococcus haemolyticus*. FEMS Immunol Med Microbiol 2011;61:147–52.

Dunne Jr WM, Qureshi H, Pervez H, Nafziger DA. *Staphylococcus epidermidis* with intermediate resistance to vancomycin: elusive phenotype or laboratory artifact? Clin Infect Dis 2001;33:135–7.

Falcone M, Giannella M, Raponi G, Mancini C, Venditti M. Teicoplanin use and emergence of *Staphylococcus haemolyticus*: is there a link? Clin Microbiol Infect 2006;12:96–7.

Fitzpatrick F, Humphreys H, O'Gara JP. Evidence for *icaADBC*-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. J Clin Microbiol 2005;43:1973–6.

Flahaut S, Vinogradov E, Kelley KA, Brennan S, Hiramatsu K, Lee JC. Structural and biological characterization of a capsular polysaccharide produced by *Staphylococcus haemolyticus*. J Bacteriol 2008;190:1649–57.

Foka A, Chini V, Petinaki E, Kolonitsiou F, Anastassiou ED, Dimitracopoulos G, et al. Clonality of slime-producing methicillin-resistant coagulase-negative staphylococ- ci disseminated in the neonatal intensive care unit of a university hospital. Clin Microbiol Infect 2006;12:1230–3.

Fredheim EG, Klingenberg C, Rohde H, Frankenberger S, Gaustad P, Flaegstad T, et al. Biofilm formation by *Staphylococcus haemolyticus*. J Clin Microbiol 2009;47: 1172–80.

Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase-negative *Staphylococci*. J Clin Pathol 1989;42:872–4.

Froggatt JW, Johnston JL, Galetto DW, Archer GL. Antimicrobial resistance in nosocomial isolates of *Staphylococcus haemolyticus*. Antimicrob Agents Chemother 1989;33: 460–6.

Fuchs PC, Jones RN, Barry AL. Interpretive criteria for disk diffusion susceptibility testing of mupirocin, a topical antibiotic. J Clin Microbiol 1990;28:608–9.

Gunn BA. Comparative virulence of human isolates of coagulase-negative staphylococci tested in an infant mouse weight retardation model. J Clin Microbiol 1989;27: 507–11.

Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, Vanittanakom N, Mack D, Gotz F. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. Mol Microbiol 1996;20:1083–91.

Ing MB, Baddour LM, Bayer AS. Bacteremia and infective endocarditis: pathogenesis, diagnosis, and complications. In: Crossley KB, Archer GL, editors. The staphylococci in human disease. New York, NY: Churchill Livingstone; 1997. p. 331–54.

Iorio NLP, Ferreira RBR, Schuenck RP, Malvar KL, Pereira AB, Nunes APF, et al. Simplified and reliable scheme for species-level identification of clinical isolates of *Staphylococcus*. J Clin Microbiol 2007;45:2564–9.

Iorio NL, Azevedo MB, Frazão VH, Barcellos AG, Barros EM, Pereira EM, et al. Methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis carrying biofilm formation genes: detection of clinical isolates by multiplex PCR. Int Microbiol 2011;14(1):13–7.

Jain A, Agarwal J, Bansal S. Prevalence of methicillin-resistant, coagulase-negative staphylococci in neonatal intensive care units: findings from a tertiary care hospital in India. J Med Microbiol 2004;53:941–4.

Kazembe P, Simor AE, Swarney AE. A study of the epidemiology of an endemic strain of *Staphylococcus haemolyticus* (TOR-35) in a neonatal intensive care unit. Scand J Infect Dis 1993;25:507–13.

Klingenberg C, Rønnestad A, Anderson AS, Abrahamsen TG, Zorman J, Villaruz A, et al. Persistent strains of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: virulence factors and invasiveness. Clin Microbiol Infect 2007;13:1100–11.

Kogan G, Sadovskaya I, Chaignon P, Chokr A, Jabbouri S. Biofilms of clinical strains of *Staphylococcus* that do not contain polysaccharide intercellular adhesin. FEMS Microbiol Lett 2006;255:11–6.

Krepsky N, Ferreira RBR, Nunes APF, Lins UGC, Filho FCS, Mattos-Guaraldi AL, et al. Cell surface hydrophobicity and slime production of *Staphylococcus epidermidis* Brazilian isolates. Curr Microbiol 2003;46:280–6.

Kumari N, Rai A, Jaiswal CP, Xess A, Shahi SK. Coagulase negative staphylococci as causative agents of urinary tract infections-prevalence and resistance status in IGIMS, Patna. Indian J Pathol Microbiol 2001;44:415–9.

Low DE, Schmidt BK, Kirpalani HM, Moodie R, Kreiswirth B, Matlow A, et al. An endemic strain of *Staphylococcus haemolyticus* colonizing and causing bacteremia in neonatal intensive care unit patients. Pediatrics 1992;89:696–700.

Marshall SA, Wilke WW, Pfaller MA, Jones RN. *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from blood stream infections: frequency of occurrence, antimicrobial susceptibility, and molecular (*mecA*) characterization of oxacillin resistance in the SCOPE program. Diagn Microbiol Infect Dis 1998;30:205–14.

Mattos-Guaraldi AL, Cappelli EA, Previato JO, Formiga LCD, Andrade AFB. Characterization of surface saccharides in two *Corynebacterium diphtheriae* strains. FEMS Microbiol Lett 1999;170:159–66.

Mehta G, Singh S, Kumari S. Observations on coagulase-negative staphylococci in a neonatal unit in India. J Hosp Infect 1991;19:273–81.

Monsen T, Karlsson C, Wistrom J. Spread of clones of multidrug-resistant, coagulase-negative staphylococci within a university hospital. Infect Control Hosp Epidemiol 2005;26:76–80.

Moreira LO, Andrade AFB, Vale MD, Souza SMS, Hirata Jr R, Asad LMB, et al. Effects of iron limitation on adherence and cell surface carbohydrates of *Corynebacterium diphtheriae* strains. Appl Environ Microbiol 2003;69:5907–13.

Neumeister B, Kastner S, Conrad S, Klotz G, Bartmann P. Characterization of coagulase-negative staphylococci] causing nosocomial infections in preterm infants. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1995;14:856–63.

Nunes APF, Teixeira LM, Bastos CCR, Silva MG, Ferreira RBR, Fonseca LS, et al. Genomic characterization of oxacillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* isolated from Brazilian medical centres. J Hosp Infect 2005;59:19–26.

Nystrom B, Ransjo U, Ringertz S, Faxelius G, Tunell R, Ohman G, et al. Colonization with coagulase-negative staphylococci in two neonatal units. J Hosp Infect 1992;22: 287–98.

Oliveira A, Cunha ML. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. BMC Res Notes 2010;3:260–6.

Potter A, Ceotto H, Giambiagi-deMarval M, Santos KRN, Nes IF, Bastos MCF. The gene *bap*, involved in biofilm production, is present in *Staphylococcus* spp. strains from nosocomial infections. J Microbiol 2009;47:319–26.

Sakarya S, Oncu S, Ozturk B, Tuncer G, Sari C. Neuraminidase produces dose-dependent decrease of slime production and adherence of slime-forming, coagulase-negative staphylococci. Arch Med Res 2004;35:275–8.

Santos KRN, Teixeira LM, Leal GS, Fonseca LS, Gontijo-Filho PP. DNA typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: isolates and factors associated with nosocomial acquisition in two Brazilian university hospitals. J Med Microbiol 1999;48:17–23.

Schuenck RP, Pereira EM, Iorio NL, Santos KR. Multiplex PCR assay to identify methicillin resistance of *Staphylococcus haemolyticus*. FEMS Immunol Med Microbiol 2008;52:431–5.

Sieradzki K, Villari P, Tomasz A. Decreased susceptibilities to teicoplanin and vancomycin among coagulase-negative methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 1998;42:100–7.

Stepanovic S, Vukovic D, Davic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of *Staphylococcal* biofilm formation. J Microbiol Methods 2000;40:175–9.

Tabe Y, Nakamura A, Igari J. Glycopeptide susceptibility profiles of nosocomial multiresistant *Staphylococcus haemolyticus* isolates. J Infect Chemother 2001;7: 142–

Takeuchi F, Watanabe S, Baba T, Yuzawa H, Ito T, Morimoto Y, et al. Whole genome sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* uncovers the extreme plasticity of its genome and the evolution of human-colonizing staphylococcal species. J Bacteriol 2005;187:7292–308.
Tuo P, Montobbio G, Vallarino R, Tumolo M, Calevo MG, Massone ML, et al. Nosocomial infection caused by multiresistant staphylococci in a neonatal and pediatric intensive care unit. Pediatr Med Chir 1995;17:117–22.
Van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, European Society Of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Escmid) Study Group On Epidemiological Markers (Esgem). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. Clin Microbiol Infect 2007;13(Suppl 3):1–46.
Vivoni AM, Diep BA, De-Gouveia-Magalhães AC, Santos KRN, Riley LW, SensabaughGF, et al. Clonal composition of *Staphylococcus aureus* isolates at a Brazilian University Hospital: identification of international circulation lineages. J Clin Microbiol 2006;44:1686–91.
Voronina OL, Kunda MS, Dmitrenko OA, Lunin VG, Gintsburg AL. Development of *Staphylococcus haemolyticus* multilocus sequencing scheme and its use for molecular-epidemiologic analysis of strains isolated in hospitals in Russian federation in 2009-2010. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol 2011;5: 62–7.
Zafar Hussain Z, Stoakes L, Massey V, Diagre D, Fitzgerald V, El Sayed S, et al. Correlation of oxacillin MIC with *mecA* gene carriage in coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol 2000;38:752–4.

3.2 **Artigo 2: Sphygmomanometers and thermometers as potential fomites of *Staphylococcus haemolyticus*: biofilm formation in the presence of antibiotics (Artigo Cientifico 2)**

Autores: Sued BPR, **Pereira PMA**, Faria YV, Ramos JN, Binatti VB, Santos KRN, Seabra SH, Hirata Jr R, Vieira VV, Mattos-Guaraldi AL, Pereira JAA.

Revista: Mem Inst Oswaldo Cruz 2017; 1-8.

Resumo

A associação entre *Staphylococcus haemolyticus* e infecções nosocomiais severas está aumentando. Contudo, a extensão em que os fômites contribuem para a disseminação deste patógeno através dos pacientes e das enfermarias permanece desconhecida. No presente estudo, os esfigmomanômetros e os termômetros foram avaliados como potenciais fômites de *S. haemolyticus* resistentes à oxacilina (ORSH). A influência da oxacilina e vancomicina na formação de biofilmes por cepas de ORSH isoladas de fômites também foram investigados. A presença de ORSH em swabs retirados das superfícies de fômites em um hospital brasileiro foi avaliada com procedimentos microbiológicos. Os perfis de susceptibilidade aos antibióticos foram determinados pelo método de disco-difusão. A distribuição clonal foi avaliada em ensaios de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). Concentrações inibitórias mínimas (CIM) de oxacilina e vancomicina foram avaliadas através do método de microdiluição em caldo. Os ensaios de reação em cadeia da polimerase (PCR) foram realizados para detectar os genes *mec*A e *ica*AD. ORSH cultivadas em meio contendo 1/4 CIM de vancomicina ou

oxacilina, foram estudados para produção de *slime* e formação de biofilmes em superfícies de vidro, poliestireno e catéter de poliuretano. As cepas de ORSH compreendendo cinco tipos de PFGE distintos foram isoladas de esfigmomanômetros (n = 5) e termômetro (n = 1) utilizado em unidades de terapia intensiva e salas cirúrgicas. As cepas de ORSH isoladas de fômites mostraram susceptibilidade apenas a linezolida e a vancomicina, e foram caracterizados como multi-resistentes (MDR). Produção de *slime* e biofilme, e sobrevivência de bactérias sésseis diferiram e eram independentes da presença dos genes *ica*AD e *mec*A, PFGE. Vancomicina e oxacilina não inibiram a formação de biofilme por cepas de ORSH suscetíveis a vancomicina em superfícies abióticas, inclusive na superfície do catéter. A formação avançada de biofilme foi observada em algumas situações. Além disso, uma dose sub-letal de vancomicina induziu a formação de biofilme em uma cepa ORSH em poliestireno. Os esfigmomanômetros e termômetros são fômites para a transmissão de ORSH. Uma dose sub-letal de vancomicina pode favorecer a formação de biofilmes por ORSH em fômites e superfícies de catéter.

Mem Inst Oswaldo Cruz, **Rio de Janeiro: I-8, 2017** 1

Sphygmomanometers and thermometers as potential fomites of *Staphylococcus haemolyticus*: biofilm formation in the presence of antibiotics

Bruna Pinto Ribeiro Sued[1], Paula Marcele Afonso Pereira[1], Yuri Vieira Faria[1], Juliana Nunes Ramos[1,3], Vanessa Batista Binatti[1], Kátia Regina Netto dos Santos[5], Sérgio Henrique Seabra[4], Raphael Hirata Júnior[1], Verônica Viana Vieira[2,3], Ana Luíza Mattos-Guaraldi[1]/+, José Augusto Adler Pereira[1]

[1]Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
[2]Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
[3]Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
[4]Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Laboratório de Tecnologia em Bioquímica e Microscopia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
[5]Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

BACKGROUND The association between *Staphylococcus haemolyticus* and severe nosocomial infections is increasing. However, the extent to which fomites contribute to the dissemination of this pathogen through patients and hospital wards remains unknown.

OBJECTIVES In the present study, sphygmomanometers and thermometers were evaluated as potential fomites of oxacillin-resistant *S. haemolyticus* (ORSH). The influence of oxacillin and vancomycin on biofilm formation by ORSH strains isolated from fomites was also investigated.

METHODS The presence of ORSH on swabs taken from fomite surfaces in a Brazilian hospital was assessed using standard microbiological procedures. Antibiotic susceptibility profiles were determined by the disk diffusion method, and clonal distribution was assessed in pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) assays. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of oxacillin and vancomycin were evaluated via the broth microdilution method. Polymerase chain reaction (PCR) assays were performed to detect the *mecA* and *icaAD* genes. ORSH strains grown in media containing 1/4 MIC of vancomycin or oxacillin were investigated for slime production and biofilm formation on glass, polystyrene and polyurethane catheter surfaces.

FINDINGS ORSH strains comprising five distinct PFGE types were isolated from sphygmomanometers (n = 5) and a thermometer (n = 1) used in intensive care units and surgical wards. ORSH strains isolated from fomites showed susceptibility to only linezolid and vancomycin and were characterised as multi-drug resistant (MDR). Slime production, biofilm formation and the survival of sessile bacteria differed and were independent of the presence of the *icaAD* and *mecA* genes, PFGE type and subtype. Vancomycin and oxacillin did not inhibit biofilm formation by vancomycin-susceptible ORSH strains on abiotic surfaces, including on the catheter surface. Enhanced biofilm formation was observed in some situations. Moreover, a sub-lethal dose of vancomycin induced biofilm formation by an ORSH strain on polystyrene.

MAIN CONCLUSIONS Sphygmomanometers and thermometers are fomites for the transmission of ORSH. A sub-lethal dose of vancomycin may favor biofilm formation by ORSH on fomites and catheter surfaces.

Key words: *Staphylococcus haemolyticus* - fomites - oxacillin - vancomycin - biofilm - pulsed-field gel electrophoresis

The transmission of potentially pathogenic bacteria may occur via patient contact with a contaminated inanimate object or the hands of clinicians who have touched contaminated objects. Fomites include medical and non-medical devices, including sphygmomanometers, thermometers and stethoscopes (Cohen et al. 1997, Zarga- ran et al. 2015). Surface bio-contamination contributes to outbreaks of community-acquired and nosocomial infections through episodic fomite-mediated disease transmission and the persistence of fomite reservoirs. The extent to which fomites contribute to overall rates of nosocomial infection remains unknown. However, fomites play a notable role in the transmission of Gram-positive and Gram-negative bacterial pathogens, including staphylococcal species (Nascimento et al. 2015).

Fomite surfaces that are transported between hospital rooms are of particular concern and have been implicated in nosocomial outbreaks caused by different genera and species, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Cohen et al. 1997, Nascimento et al. 2015, Zargaran et al. 2015). Since the 1970s, only a few studies have investigated the contamination of fomites by coagulase-negative staphylococci (CoNS), predominantly *Staphylococcus epidermidis* (Lowbury et al. 1971, Saito et al. 2014, Zargaran et al. 2015). Contaminated

doi: 10.1590/0074-02760160381
Financial support: CAPES, FAPERJ, CNPq, SR-2/UERJ.
+ Corresponding author: guaraldi@uerj.br
Received 22 August 2016
Accepted 22 November 2016

X-ray cassettes may serve as fomites for methicillin-resistant staphylococci (MRS) of varied pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) types in hospital environ- ments, including *Staphylococcus haemolyticus* (Kim et al. 2012). *S. haemolyticus* possesses multiple strategies for antimicrobial resistance, and thus options are limited among available antimicrobial agents (Kim et al. 2012). Patients with MRS infections are commonly treated with vancomycin (VA), which is potentially toxic and is administered only intravenously (Giormezis et al. 2014).

Among CoNS species, *S. haemolyticus* plays an important role in hospital-acquired opportunistic infections worldwide, including peritonitis, otitis, urinary tract infections, septicemia and prosthetic-device-asso- ciated infections (Giormezis et al. 2014). *S. haemolyticus* is also among the CoNS that colonise and cause bacte- remia in neonatal intensive care units (ICUs) in many industrialised and developing countries, including Brazil (Mehta et al. 1991, Foka et al. 2006, Giormezis et al. 2014, Pereira et al. 2014). An analysis of the clonality of slime-producing methicillin-resistant CoNS (MR-CoNS) disseminated among neonates in Brazil (Pereira et al. 2014), India (Mehta et al. 1991) and Greece (Foka et al. 2006) revealed that most *S. haemolyticus* strains demonstrated multiresistance and produced slime.

Biofilm formation is recognised as an important form of growth that contributes to bacterial colonisa- tion of and persistence on abiotic and biotic surfaces by many CoNS pathogens, including *S. haemolyticus* (Fredheim et al. 2009, Iorio et al. 2011, Giormezis et al. 2014, Pereira et al. 2014).

Therefore, it is essential to further investigate the environmental dissemination, virulence properties and molecular mechanisms of biofilm formation by *S. haemolyticus*. No studies conducted in Brazil have examined whether medical devices carry a risk of transmitting *S. haemolyticus* infection between subjects. Moreover, to the best of our knowledge, little information is available concerning the effects of antibiotics on the adherence/ surface properties of *S. haemolyticus*.

Objectives - This study aimed to investigate the environmental survival of *S. haemolyticus* on abiotic sphygmomanometer, thermometer and stethoscope surfaces, which are common fomites in direct contact with clinicians, staff and patients (adults and neonates), in Pedro Ernesto University Hospital (HUPE teaching hospital), Rio de Janeiro, Brazil. Biofilm formation on catheter surfaces, antimicrobial susceptibility profiles and *mecA* and *icaAD* gene prevalence, which are associated with oxacillin (OXA) resistance and biofilm formation, respectively, were examined. In addition, the effects of minimal inhibitory concentrations (MICs) of VA and OXA on slime production and adherence properties on polystyrene and glass surfaces were investigated. Microorganisms were also analysed by performing PFGE assays to assess their clonal distribution.

MATERIALS AND METHODS

Origin and isolation procedures for CoNS strains - The presence of *S. haemolyticus* on swabs taken from the surfaces of 37 medical devices (sphygmomanometers, thermometers and stethoscopes) from five hospital wards in a Brazilian urban hospital in August 2006 were assessed using standard microbiological techniques, as previously described (Cohen et al. 1997, Kim et al. 2012). Pedro Ernesto Hospital-University of the State of Rio de Janeiro (HUPE/UERJ) is a 600-bed tertiary teach- ing hospital with 5 ICUs, a renal transplant program and ambulatories that serve the metropolitan area of Rio de Janeiro, which has more than 6.32 million inhabitants.

Fomite samples demonstrated 100% bacterial contamination with CoNS. A total of 60 CoNS strains were isolated from the surfaces of 24 sphygmomanometers, 18 thermometers and 18 stethoscopes. Furthermore, 62.17% (n = 23) of the tested medical devices were colonised by two or three types of CoNS isolates. CoNS strains were stored in Trypticase Soy Broth (TSB; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) with 10% v/v glycerol at -20ºC in our laboratory.

Briefly, sphygmomanometers, thermometers and stethoscopes were previously wiped with a cotton swab moistened with sterile normal saline. The screen- ing swabs were inoculated onto Mueller Hinton Agar (MHA) plates for 40 min, followed by post-collection and incubation at 35ºC for 48 h. Staphylococcus-like colonies were subcultured from each MHA plate onto 5% sheep's blood agar media plates.

Phenotypic identification and antibiotic susceptibility testing of S. haemolyticus strains - Gram staining was performed on pure cultures of the isolates. All Gram-positive cocci were tested for catalase, DNase, coagulase activity, and growth on mannitol salt agar. CoNS were phenotypically characterised via a simplified method involving the following nine tests, as previously described (Iorio et al. 2007): two susceptibility tests using disks impregnated with 5 µg of novobiocin and 100 µg of desferrioxamine and tests to detect the production of clumping factor, pyrrolidonyl arylamidase (PYR), urease, and alkaline phosphatase, in addition to acid production from D-mannose, D-trehalose and D-xylose. The characteristics of the *S. haemolyticus* strains selected for analysis in this study are shown in Table II.

Antimicrobial susceptibility profiles were determined by the disk diffusion method according to the guide- lines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2012, Pereira et al. 2014), employing the following drugs: cefoxitin (FOX, 30 µg), gentamicin (GEN, 10 µg), sulfamethoxazole-trimethoprim (SXT, 25 µg), imipenem (IPM, 10 µg), ceftazidime (CAZ, 30 µg), ciprofloxacin (CIP, 5 µg), clindamycin (CLI, 2 µg), erythromycin (E, 15 µg), moxifloxacin (MXF, 5 µg) and linezolid (LNZ, 30 µg) (purchased from CECON, São Paulo, Brazil and Ox- oid, Basingstoke, England). Any *S. haemolyticus* strains exhibiting a resistance phenotype to at least three different classes of antimicrobials were considered multi-drug resistant (MDR) strains (Giormezis et al. 2014).

MICs of OXA (Sigma, St. Louis, MO, USA) and VA (Oxoid, Basingstoke, England) were evaluated using the broth microdilution method (CLSI 2012). The concentrations ranged from 0.25 to 512 µg/mL for OXA and from 0.25 to 256 µg/mL for VA. The plates were incubated at

Bacterial stock cultures were maintained at -70ºC in 10% skim milk solution supplemented with 20% glycerol. The following microorganisms were used as controls for the phenotypic or antimicrobial susceptibility tests, biofilm formation or genotypic assays: *S. haemolyticus* ATCC 29970, *S. epidermidis* ATCC 35984, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. epidermidis* ATCC 14990, *Staphylococcus hominis* ATCC 27844, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305, *Staphylococcus warneri* ATCC 10209, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 33591 and *S. aureus* ATCC 25923.

Genotyping analysis - Multiplex PCR assay (mPCR) for the identification of methicillin-resistant S. haemolyticus - mPCR to simultaneously identify *S. aureus*, *S. haemolyticus* and *S. epidermidis* species and to determine methicillin resistance based on the presence of the *mecA* gene was performed in accordance with previously described methods (Santos et al. 1999, Schuenck et al. 2008, Iorio et al. 2011). The primers and amplicons used in this study are listed in Table I.

PCR assay to determine the presence of the icaAD gene - Experiments were performed in accordance with methods previously described (Jong-Hyun et al. 2008). The primers and amplicons are listed in Table I.

Determination of clonal distribution by PFGE - Genomic DNA was prepared using a method described previously (Pereira et al. 2014). DNA was cleaved with *Sma*I (New England BioLabs) according to the manufacturer's instructions. PFGE was carried out in 0.5X TRIS-borate-EDTA-1.2% agarose gels at 13ºC in a CHEF DRII system (Bio-Rad). The pulse times ranged from 1 s to 35 s and were administered over the course of 23 h. Lambda DNA concatemers (New England BioLabs) were used as molecular size markers. Dice similarity coefficients were calculated with a band position tolerance of 1.5%, and the UPGMA method was applied for cluster analysis. Isolates were first assigned to PFGE types using 80% band-based similarity coefficients as cut-off values. Banding patterns were classified according to the criteria described by Van Belkum et al. (2007). Isolates exhibiting a similarity coefficient ≥ 80% were considered genetically PFGE-related. PFGE types were identified by letters, and subtypes were identified by letters followed by a numeric subscript.

Slime production and abiotic surface adherence assays - Slime production on Congo Red Agar (CRA) medium - Slime production was qualitatively detected by culturing the strains on CRA plates (CRA; Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA) as described previously (Chaieb et al. 2005, Pereira et al. 2014). Briefly, inoculated CRA plates were incubated under aerobic conditions for 24 h at 37ºC, followed by overnight incubation at room temperature. Slime-positive variants appeared as reddish-black colonies with a rough, dry, and crystalline consistency on CRA, whereas slime-negative strains appeared as pinkish-red smooth colonies with a darkening at the center. *S. epidermidis* strains ATCC 35984 and ATCC 12228 were used as positive and negative controls, respectively.

Biofilm formation on a hydrophilic glass surface - Microorganisms were inoculated in glass tubes (15x100 mm) containing 5 mL of TSB medium and incubated at 37ºC for 48 h. The supernatants containing non-adherent bacterial cells were discarded. Fresh sterile TSB (5 mL) was added to the test tubes and re-incubated for 48 h. This procedure was repeated twice. Glass-adherent bacteria created a confluent coat of cells on the sides of the tube. Microorganisms were classified as non-adherent (-: absence of adherence), weakly adherent (+: adherent bacteria appeared as a ring at the interface between the medium and the air), moderately adherent (++: bacteria attached on the side of the glass tubes), or strongly adherent (+++: bacteria attached on the side of the glass tubes and at the interface between the medium and the air). *S. epidermidis* strain ATCC 35984 was used as a positive control (Mattos-Guaraldi & Formiga 1991, Pereira et al. 2014).

Biofilm formation on a hydrophobic polystyrene surface - Semi-quantitative adherence assays were performed in sterile 96-well flat-bottomed plastic tissue

TABLE I

Polymerase chain reaction (PCR) primers used in this study to identify *Staphylococcus haemolyticus* (SH), *S. epidermidis* (SE) and *S. aureus* (SA) species and to determine methicillin resistance based on the presence of the *mec*A (MRS) and *icaAD* genes, which play significant roles in slime production and biofilm formation

Primers	Sequence of forward and reverse primers 5'→ 3'	Product size (bp)	References
SH1	GGTCGCTTAGTCGGAACAAT	285	Schuenck et al. (2008)
SH2	CACGAGCAATCTCATCACCT		
SE1	CAGTTAATCGGTATGAGAGC	218	Iorio et al. (2011)
SE2	CTGTAGAGTGACAGTTTCGGT		
SA1	AATCCTTGTCGGTACACGATATTCTTCAGC	108	Pereira et al. (2010)
SA2	CGTAATGAGATTTCAGTAGATAATACAACA		
MRS1	TAGAAATGACTGAACGTCCG	154	Santos et al. (1999)
MRS2	TTGCGATCAATGTTACCTAG		
icaAD 1	GACAAGAACTACTGCTGCGT	546	Jong-Hyun et al. (2008)
icaAD 2	TACCGTCATACCCCTTCTCTG		

culture plates (JET BIOFIL®) as previously described (Stepanovic et al. 2000, Pereira et al. 2014). Briefly, the strains were cultivated in TSB at 37ºC for 48 h, washed and re-suspended in fresh TSB with an optical density (OD) of 0.2 at 570 nm. Then, 200 µL of these suspensions were applied to microplate wells. After incubation at 37ºC for 24 h, the content of each well was aspirated and washed three times with 200 µL of phosphate buffered saline (PBS) at pH 7.2. The remaining attached bacteria were fixed with 200 µL of 99% methanol and stained with 2% crystal violet. The bound dye was then solubilised with 160 µL of 33% glacial acetic acid, and the solution OD was measured at 570 nm using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) plate reader (Bio-Rad, model 550). The cut-off OD (ODc) was defined as the mean OD of the negative control (TSB only). Based on the ODs of the bacterial films, all strains were classified into the following categories: non-adherent (0: $OD \leq OD_c$), weakly adherent (+: $OD_c < OD \leq 2x\ OD_c$), moderately adherent (++: $2x\ OD_c < OD \leq 4x\ OD_c$), or strongly adherent (+++: $4x\ OD_c \leq OD$). Each assay was performed in triplicate and repeated three times. *S. epidermidis* strain ATCC 35984 was used as a positive control, and TSB medium was a negative control.

Biofilm formation on catheter surfaces - Semi-quantitative biofilm formation on catheter surfaces - Polyurethane 16-gauge percutaneous nephrostomy catheters (Intracath; Deseret Pharmaceutical Co., Sandy, Utah) were used to evaluate bacterial viability and biofilm formation on catheter surfaces. Sterile 4-cm segments of polyurethane catheters were immersed in TSB medium containing 10^6 CFU/mL and incubated at 37ºC for 24 h (Gomes et al. 2009). The semi-quantitative roll plate technique (Maki et al. 1977) was performed on Columbia agar plates supplemented with 5% sheep's blood (Oxoid, Germany) for 24 h at 37ºC.

Scanning electron microscopy (SEM) - Segments (1 cm) of polyurethane catheters infected in vitro with the *S. haemolyticus* 11SF/9E3/06 (PFGE type G_2) strain were fixed with 2.5% glutaraldehyde and post-fixed with 1% OsO_4, 5 mM $CaCl_2$ and 0.8% $K4[Fe(CN_6)]$ in cacodylate buffer for 1 h at room temperature. Subsequently, the catheter segments were dehydrated in a graded series of ethanol, subjected to critical point drying with carbon dioxide, covered with a 10-nm layer of gold-palladium and examined with a JEOL JSM 5310 scanning electron microscope. Sterile unused polyurethane catheters were also processed by SEM immediately after removal from commercial packaging (negative control). Catheter segments infected in vitro with *Corynebacterium diphtheriae* CAT5003/BR were used as positive controls (Gomes et al. 2009).

Influence of antibiotics on slime production and biofilm formation on abiotic surfaces - Effects of subMICs of OXA and VA - The slime production and biofilm formation tests described above were performed using their respective media without antibiotics or with the addition of subMICs of OXA or VA equivalent to ¼ MIC, as previously described (Gomes et al. 2013).

RESULTS

Phenotypic and genotypic identification and epidemiological characteristics of S. haemolyticus strains - As shown in Table II, six (1%) CoNS strains were identified as *S. haemolyticus* based on phenotypic tests and mPCR assays. Five *S. haemolyticus* strains were isolated from sphygmomanometers and one strain from a thermometer used in different ICUs and surgical wards of HUPE/UERJ.

S. haemolyticus clonal distribution - The results of the PFGE assays are displayed in Fig. 1 and Table II. Five distinct PFGE types indicated genetic diversity among the *S. haemolyticus* isolates (n = 6) collected from the sphygmomanometers (n = 5) and thermometer (n = 1) used in different hospital wards. An identical PFGE type (J) was observed in two *S. haemolyticus* strains (1SF/1BCGIII/06 and 28SF/2E2/06) collected from sphygmomanometers used in a general surgery and a general ICU, respectively. *S. haemolyticus* (33SF/4E5/06 and 11SF/9E3/06) strains isolated from sphygmomanometers used in the coronary and neonatal ICUs, respectively, demonstrated a similarity coefficient ≥ 80% and were considered genetically related and consequently classified as belonging to PFGE subtypes G_1 and G_2.

Antimicrobial susceptibility patterns and presence of the mecA *gene* - As shown in Table II and Fig. 1, all six *S. haemolyticus* strains isolated from fomites were MDR to at least seven antimicrobial agents tested, re- gardless of their PFGE types and subtypes. All MDR *S. haemolyticus* strains were phenotypically resistant to OXA (ORSH) and showed susceptibility to only linezolid and VA. The OXA and VA MIC values were 1.0 µg/mL to 256 µg/mL and 1.0 µg/mL, respectively. The highest resistance level (profile I) was observed for *mecA*-positive ORSH strains (33.34%; n = 2) with OXA MICs ≥ 32 µg/mL belonging to PFGE types G_1 and I. There was no evidence of the *mecA* gene in the majority (n = 4) of the ORSH isolates.

Slime production and adherence to abiotic surfaces - As shown in Table II, MDR ORSH strains (n = 6) isolated from fomites showed different levels of slime production and adherence properties to hydrophilic (glass) or hydrophobic (polystyrene) abiotic surfaces. The presence of the *icaAD* gene was detected in all *mecA*-negative ORSH (PFGE types G_2, H, I and J) strains (n = 4). The *icaAD* gene was not detected in *mecA*-positive ORSH strains (n = 2).

Slime production on CRA medium was not observed for two *icaAD*-positive ORSH strains and two *icaAD*-negative strains. Different levels of slime production and adherence to glass or polystyrene surfaces were detected for ORSH strains. Biofilm formation on glass surfaces was detected for all (n = 6) ORSH strains, regardless of their PFGE type and slime production properties. The majority of these ORSH strains (n = 5) were classified as strongly (+++) adherent to glass surfaces. Biofilm formation on polystyrene surfaces was also observed for the major- ity (n = 5; 83.4%) ORSH strains but at lower levels than that observed for glass-binding assays. Positive results for all three tests were observed for only two ORSH strains.

TABLE II

Microbiological and genetic properties of six *Staphylococcus haemolyticus* strains isolated from fomites, specifically sphygmomanometers (SF) and a thermometer (T), in the nosocomial environment of Pedro Ernesto University Hospital-University of the State of Rio de Janeiro (HUPE-UERJ), Rio de Janeiro, Brazil

Strains number and fomite	Hospital wards	PFGE types	*mec*A/*ica*AD genes	Antimicrobial multiresistance profiles*	MIC [µg/mL] (susceptibility)		Slime production on Congo Red Agar (CRA)		Adherence# levels to abiotic surfaces: Glass binding assays		Adherence# levels to abiotic surfaces: Polystyrene binding assays	
					OXA	VA	C	OXA/VA	C	OXA/VA	C	OXA/VA
11SF/9E3/06	Neonatal ICU	G_2	- / +	I OXA,FOX,CIP,CLI,E,GEN,STX and CAZ, IPM, MXF	32 (R)	1 (S)	+	+ / +	+++	+++ / +++	++	++ / ++
SF/4BCGII/06	General surgery	I	- / +	I OXA,FOX,CIP,CLI,E,GEN,STX and CAZ, IPM, MXF	1 (R)	1 (S)	-	- / -	+++	+++ / +++	+++	+++ / +++
1SF/1BCG III/06	General surgery	J	- / +	II OXA,FOX,CIP,CLI,E,GEN,STX and CAZ, IPM	32 (R)	1 (S)	+	+ / +	+++	+++ / +++	-	+ / ++
28SF/2E2/06	General ICU	J	+ / -	III OXA,FOX,CIP,CLI,E,GEN,STX and CAZ	256 (R)	1 (S)	-	- / -	+++	+++ / +++	+	+ / +
33SF/4E5/06	Coronary ICU	G_1	+ / -	III OXA,FOX,CIP,CLI,E,GEN,STX and CAZ	32 (R)	1 (S)	-	- / -	+	+++ / +	+	++ / +
27T/2BCG II/06	General ICU	H	- / +	IV OXA,FOX,CIP,CLI,E,GEN,STX	8 (R)	1 (S)	-	-/ -	+++	+++ / +++	++	++ / ++

C: assays performed without antibiotics oxacillin (OXA), vancomycin (VA); CAZ: ceftazidime; CIP: ciprofloxacin; CLI: clindamycin; E: erythromycin; FOX: cefoxitin; GEN: gentamycin; ICU: intensive care unit; IPM: imipenem; MIC: minimun inhibitory concentration; MXF: moxifloxacin; OXA: oxacillin; R: resistant; S: sensitive; SXT: sulfamethoxazole-trimethoprim; *: Susceptibility to vancomycin (VA) and linezolid (LNZ) was observed for all strains tested; #: weakly (+), moderately (++), strongly (+++) adherent and (-) non-adherent to abiotic surfaces in absence (C) or presence of the antimicrobial agents - vancomycin (VA).

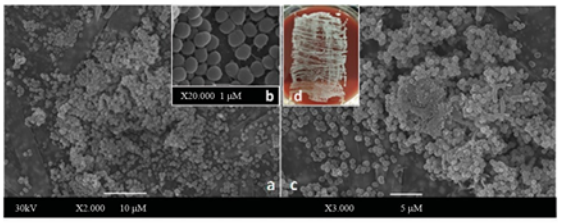


Fig. 1: biofilm formation on polyurethane catheter surfaces by oxacillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* (ORSH) isolated from fomites, verified by (A-C) scanning electron microscopy (SEM) assays and the roll plate Maki technique (D). After 24 h of incubation, the ORSH 11SF/9E3/06 [pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) type G_2 *icaAD*-positive] strain isolated from a sphygmomanometer used in the neonatal intensive care unit-Pedro Ernesto University Hospital-University of the State of Rio de Janeiro (ICU-HUPE-UERJ) (A) and grown in the absence of antibiotics produced a large amount of mature biofilm characterised by hollow voids on the luminal surface of the indwelling medical device; (B) detailed bacterial microcolonies indicative of a biofilm-producing pathogen; (C) biofilm production on catheter surfaces in the presence of ¼ minimal inhibitory concentration (MIC) of vancomycin (VA); (D) the roll plate assay indicated viable ORSH cells were extensively adherent (> 10^6 CFU) to and able to multiply on polyurethane catheter surfaces.

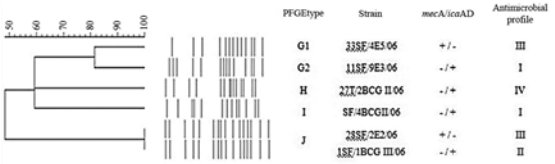


Fig. 2: pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) profile dendrogram of the *SmaI*-digested genomic DNA of six oxacillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* (ORSH) strains isolated from two fomites, specifically sphygmomanometers (SF) and thermometers (T), in the nosocomial environment of Pedro Ernesto University Hospital-University of the State of Rio de Janeiro (HUPE-UERJ), Rio de Janeiro, Brazil. Similarity percentages are identified on the dendrogram derived from the unweighted pair group method using arithmetic averages and based on Dice coefficients. Microorganisms showing a similarity coefficient ≥ 80% were considered genetically PFGE-related. Multi-drug resistant ORSH (MDR ORSH) strains isolated from fomites utilised in different hospital wards demonstrated the following PFGE types: G_1 [coronary intensive care unit (ICU)], G_2 (neonatal ICU), H (general ICU), I (general surgery), and J (general surgery and general ICU). Polymerase chain reaction (PCR) reactions for the *mecA* and *icaAD* genes: +, positive; -, negative; antimicrobial multiresistance profiles: I to IV.

None of the strains were simultaneously negative for CRA, glass and polystyrene assays. The lowest adhesive properties were observed for the *icaAD*-negative ORSH strain (33SF/4E5/06 - PFGE type G_1), which was slime-negative and weakly adherent (+) to both types of glass.

The presence of the *icaAD* gene was not correlated with slime production on CRA medium or adhesion to glass or polystyrene surfaces for MDR ORSH strains isolated from fomites.

Biofilm formation on polyurethane catheter surfaces - Biofilm formation on catheter surfaces by ORSH strains isolated from fomites was verified by SEM assays and the roll plate technique (Maki test), as illustrated in Fig. 2.

The influence of OXA and VA on slime production and biofilm formation on abiotic surfaces - As shown in Table II, MDR ORSH strains isolated from fomites produced biofilms on abiotic surfaces in the presence of both OXA and VA. Biofilm formation levels of ORSH strains on glass and polystyrene surfaces in the presence of OXA and VA were not related to slime production or the presence of the *icaAD* and *mecA* genes. OXA and VA had no effects on slime production on CRA media by ORSH strains. Additionally, OXA and VA did not inhibit biofilm formation on glass and polystyrene surfaces by the ORSH strains of varied PFGE types evaluated in this study. In contrast, enhanced biofilm formation was observed in some situations. OXA enhanced biofilm formation on both glass and polystyrene surfaces by the ORSH 33SF/4E5/06 - PFGE type G_1 strain. VA and OXA induced biofilm formation on polystyrene surfaces by the ORSH 1SF/1BCGIII/06 - PFGE type J strain. As shown in Fig. 2C, the production of mature biofilms with hollow voids on polyurethane catheter surfaces by ORSH grown in the presence of ¼ MIC VA was observed by SEM.

DISCUSSION

Nosocomial pathogens may remain viable or persist on abiotic and biotic surfaces for months and thus are continuous sources of transmission in healthcare environments. Elimination of the sources and transmission of nosocomial pathogens remains a challenge, particularly in ICUs and surgical wards in developing countries. Incomplete cleaning procedures for equipment and patient rooms facilitate the transmission of MDR bacteria from one patient to another (Cohen et al. 1997, Kim et al. 2012, Zargaran et al. 2015). CoNS, particularly *S. epidermidis* and *S. haemolyticus*, cause bloodstream infections in approximately 37% of ICU patients, including those with indwelling medical devices (Giormezis et al. 2014). *S. haemolyticus* (90.3% ORSH; 70.4% MDR strains) of varied PFGE types was recently identified as the prevalent (77.5%) CoNS species associated with bacteremia in neonates making use of intravenous catheters in the neonatal ICU of HUPE/UERJ (Pereira et al. 2014).

In HUPE/UERJ, contaminated sphygmomanometers and thermometers, which are commonly in direct contact with patients or are transported between hospitals rooms, are fomites for ORSH of varied PFGE types that differed from the 6 PFGE types isolated from neonates. According to previous studies, MDR profiles may not be directly associated with resistance to OXA (Tabe et al. 2001, Pereira et al. 2014), but all ORSH strains isolated from fomites, independent of their PFGE types and subtypes, were characterised as MDR. The data indicated the adaptive ability of *S. haemolyticus*, including MDR ORSH strains, to circulate among different wards in this Brazilian tertiary-care hospital. In contrast to our findings, the majority of Korean ORSH strains isolated from X-ray cassettes were identical or closely related to each other according to PFGE analysis, suggesting a common source of contamination (Kim et al. 2012).

Similar to data previously described in the literature (Hussain et al. 2000), ORSH strains deprived of the *mecA* gene were observed in both neonates and fomites in the Brazilian nosocomial environment. The *mecA* gene was de-

tected in 87.4% and 33.3% of *S. haemolyticus* strains isolated from neonates (Pereira et al. 2014) and fomites, respectively, independent of OXA susceptibility and PFGE type.

Biofilm formation was previously found to enhance the fomite survival of human pathogens. The medical importance of biofilms is attributable to their increased resistance to antimicrobial agents compared to that of free-living (planktonic) counterparts; consequently, diseases in which biofilms have a dominant role tend to be chronic and difficult to eradicate (Marks et al. 2014). Infections resulting from CoNS, including *S. haemolyticus*, most frequently occur after the implantation of medical devices and are associated with biofilm-forming potential (Lynch et al. 2007; Fredheim et al. 2009). Biofilm formation was also found to be a common phenotype among *S. haemolyticus* fomite isolates. Biofilm-forming ORSH strains are endemic in the Brazilian nosocomial environment (Pereira et al. 2014). Additionally, biofilm formation may enhance the fomite survival of ORSH. Because we demonstrated that a ORSH strain isolated from a fomite was able to produce a mature biofilm on the surface of a polyurethane catheter, we expect certain ORSH fomite isolates to be associated with the infection of implanted medical devices.

Biofilm development by CoNS is a multifactorial process (Fredheim et al. 2009). In *S. epidermidis*, bacterial adherence to a surface is mediated by a capsular antigen, specifically capsular polysaccharide/adhesin (PS/A), and bacteria multiply to form a multilayered biofilm associated with the production of polysaccharide intercellular adhesin (PIA), which is synthesized by *ica*-encoded proteins and mediates cell-to-cell adhesion and slime production. The presence of an *ica* operon in *S. haemolyticus* has been reported, but to date its contribution to biofilm formation remains unclear. Fredheim et al. (2009) demonstrated a clear difference in the biofilm structures of *S. haemolyticus* and *S. epidermidis*. In contrast to *S. epidermidis*, proteins and extracellular DNA are functionally relevant for biofilm accumulation, whereas PIA plays only a minor role. Therefore, the induction of biofilm formation and the determination of biofilm mass still must be optimised for *S. haemolyticus*. The ORSH *S. haemolyticus* strain isolated from fomites produced biofilm on both hydrophilic (glass) and hydrophobic (polystyrene) surfaces.

Although *ica*-positive strains showed high levels of biofilm production on glass surfaces, high levels of biofilm production on a glass surface independent of the *ica* gene were also observed in one situation. In addi- tion, one *ica*-positive strain did not produce biofilm on polystyrene. Slime production on CRA medium was not observed for two *ica*-positive strains demonstrating high levels of biofilm production on glass and polystyrene surfaces. An *icaAD*-positive ORSH *S. haemolyticus* (11SF/9E3/06) strain isolated from a fomite that exhibited slime production on CRA medium and high levels of biofilm on glass and polystyrene surfaces was also able to produce mature biofilm with a thick and com- plex three-dimensional structure on the polyurethane catheter surface but only with small amounts of an ex- tracellular matrix component. Although *icaA* and *icaD* play significant roles in biofilm formation, the presence of the *icaAD* gene does not always correlate with in vitro biofilm formation (Pereira et al. 2014). According to the present study, the biofilm formation process by ORSH fomite isolates is complex and may be unrelated to *ica* gene carriage. The biofilm-forming abilities of some isolates in the absence of the i*caAD* gene highlight the importance of further genetic investigations into *ica*-independent biofilm formation mechanisms. Moreover, some authors have suggested that the expression of biofilm phenotypes by ORSH may be regulated by several other factors, including environmental conditions (Fredheim et al. 2009, Pereira et al. 2014).

Little information is available regarding the effects of antibiotics on biofilm formation by *S. haemolyticus*. VA is an important anti-staphylococcal antibiotic. Al- though all ORSH strains isolated from fomites were highly sensitive to VA, biofilm formation, slime produc- tion, and adherence to hydrophobic plastic (polystyrene) and hydrophilic (glass) surfaces in the absence of antibi- otics and in the presence the presence of ¼ MICs of VA or OXA were similar in most cases. Slime production on CRA by *icaAD*-positive and *icaAD*-negative strains was not altered by the presence of OXA or VA. More- over, OXA and VA did not exert any inhibitory effects on biofilm formation on either glass or plastic surfaces by *icaAD*-positive and *icaAD*-negative ORSH strains. Interestingly, a sub-lethal dose of VA induced biofilm formation by an ORSH fomite strain (1SF/1BCG III/06 - PFGE type J) only on polystyrene, whereas OXA facilitated biofilm formation by two ORSH strains on both glass (n = 1) or polystyrene (n = 2) surfaces, regardless of the presence of the *icaAD* gene. As the majority of the strains (n = 4; 66.7%) demonstrated higher levels of adherence to hydrophilic glass than to hydrophobic polystyrene surfaces, both antibiotics and the type of abiotic material appear to influence biofilm formation. These findings with VA-susceptible ORSH strains were similar to those previously observed in studies examin- ing the effects of sub-lethal doses of VA and OXA on biofilm formation by VA-resistant *S. aureus* (VRSA) (Zulfiqar et al. 2011). In contrast to VRSA, VA and OXA did not appear to exert any regulatory impact on *icaAD*, which is responsible for biofilm formation by OSRH strains isolated from fomites (Zulfiqar et al. 2011).

In conclusion, sphygmomanometers and thermometers are fomites for the transmission of various PFGE types of ORSH. A sub-lethal dose of VA favored biofilm formation by VA-susceptible ORSH on fomites. Therefore, VA susceptibility testing of planktonic bacterial cells based only on MIC values is ineffective for accurately determining the susceptibility of sessile bacterial cells. ORSH strains isolated from fomites were also able to produce biofilm on catheter surfaces in the presence of VA and are, therefore, potentially associated with invasive infections in patients with indwelling medical devices. Due to their ability to form biofilms on both hydrophilic and hydrophobic surfaces, ORSH strains of different PFGE types may potentially survive on vari- ous abiotic surfaces within a nosocomial environment. These data highlight the importance of *S. haemolyticus* as an emerging worldwide MDR nosocomial pathogen and the fact that different clones contaminating fomi- tes may be responsible for nosocomial outbreaks, par- ticularly in ICUs and surgical wards, including neonatal

ICUs. Contamination barriers or decontamination procedures should be widely applied in developing countries. Further studies are necessary to define the roles of different components of *S. haemolyticus* biofilms and how they are regulated, particularly in the presence of therapeutic antimicrobial agents.

AUTHORS' CONTRIBUTION

BPRS and PMAP contributed equally with all experiments; VBB helped in phenotypic identification and antibiotic susceptibility testing; Prof VVV and JNR helped in determination of clonal distribution by Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE); Prof KRNS helped in a multiplex PCR; Prof SHS and YVF helped in scanning electron microscopy (SEM); Prof RH Jr, Prof ALMG and Prof JAAP helped with all experiments and orientation.

REFERENCES

Chaieb K, Mahdouani K, Bakhrouf A. Detection of *ica*A and *ica*D *loci* by polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needless in a dialysis unit. J Hosp Infect. 2005; 61(3): 225-30.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing - eleventh edition supplement (M02-A11). Wayne: CLSI; 2012.

Cohen HA, Amir J, Matalon A, Mayan R, Beni S, Barzilai A. Stethoscopes and otoscopes - a potential vector of infection? Family Pract. 1997; 14(6): 446-9.

Foka A, Chini V, Petinaki E, Kolonitsiou F, Anastassiou ED, Dimitracopoulos G, et al. Clonality of slime-producing methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci disseminated in the neonatal intensive care unit of a university hospital. Clin Microbiol Infect. 2006; 12(12): 1230-3.

Fredheim EG, Klingenberg C, Rohde H, Frankenberger S, Gaustad P, Flaegstad T, et al. Biofilm formation by *Staphylococcus haemolyticus*. J Clin Microbiol. 2009; 47(4): 1172-80.

Giormezis N, Kolonitsiou F, Foka A, Drougka E, Liakopoulos A, Makri A, et al. Coagulase-negative staphylococcal bloodstream and prosthetic-device-associated infections: the role of biofilm formation and distribution of adhesin and toxin genes. J Med Microbiol. 2014; 63(Pt 11): 1500-8.

Gomes DLR, Martins CAS, Faria LMD, Santos LS, Santos CS, Sabbadini PS, et al. *Corynebacterium diphtheriae* as an emerging pathogen in nephrostomy catheter-related infection: evaluation of traits associated with bacterial virulence. J Med Microbiol. 2009; 58(Pt 11): 1419-27.

Gomes DLR, Peixoto RS, Barbosa EAB, Napoleão F, Sabbadini PS, Santos KRN, et al. SubMIC of penicillin and erythromycin enhance biofilm formation and hydrophobicity of *Corynebacterium diphtheriae* strains. J Med Microbiol. 2013; 62(Pt 5): 754-60.

Hussain Z, Stoakes L, Massey V, Diagre D, Fitzgerald V, El Sayed S, et al. Correlation of oxacillin MIC with *mecA* gene carriage in coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol. 2000; 38(2): 752-4.

Iorio NL, Azevedo MB, Frazão VH, Barcellos AG, Barros EM, Pereira EM, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus epider- midis* carrying biofilm formation genes: detection of clinical iso- lates by multiplex PCR. Int Microbiol. 2011; 14(1): 13-7.

Iorio NL, Ferreira RBR, Schuenck RP, Malvar KL, Brilhante AP, Nunes APF, et al. Simplified and reliable scheme for species-level identification of clinical isolates of *Staphylococcus*. J Clin Microbiol. 2007; 45(8): 2564-9.

Jong-Hyun K, Cheorl-Ho K, Hacker J, Ziebuhr W, Lee BK, Cho SH. Molecular characterization of regulatory genes associated with biofilm variation in a *Staphylococcus aureus* strain. J Microbiol Biotechnol. 2008; 18(1): 28-34.

Kim JS, Kim HS, Park JY, Koo HS, Choi CS, Song W, et al. Contamination of X-ray cassettes with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyti- cus* in a radiology department. Ann Lab Med. 2012; 32(3): 206-9.

Lowbury EJ, Babb JR, Ford PM. Protective isolation in a burns unit: the use of plastic isolators and air curtains. J Hyg (London). 1971; 69(4): 529-46.

Lynch SV, Dixon L, Benoit MR, Brodie EL, Keyhan M, Hu P, et al. Role of the *rapA* gene in controlling antibiotic resistance of *Escherichia coli* biofilms. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51(10): 3650-8.

Maki DG, Weise CE, Sarafin HW. A semi-quantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. N Engl J Med. 1977; 296(23): 1305-9.

Marks LR, Reddinger RM, Hakansson AP. Biofilm formation enhances fomite survival of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. Infect Immun. 2014; 82(3): 1141-6.

Mattos-Guaraldi AL, Formiga LC. Relationship of biotype and source to the hemagglutination and adhesive properties of *Corynebacterium diphtheriae*. Braz J Med Biol Res. 1991; 24(4): 399-406.

Mehta G, Singh S, Kumari S. Observations on coagulase-negative staphylococci in a neonatal unit in India. J Hosp Infect. 1991; 19(4): 273-81.

Nascimento TC, Silva VL, Ferreira-Machado AB, Diniz CG. Potential spread of multidrug-resistant coagulase-negative staphylococci through healthcare waste. J Infect Dev Ctries. 2015; 9(1): 29-34.

Pereira PMA, Binatti VB, Sued BPR, Ramos JN, Peixoto RS, Simões C, et al. *Staphylococcus haemolyticus* disseminated among neonates with bacteremia in a neonatal intensive care unit in Rio de Janeiro, Brazil. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014; 78(1): 85-92.

Saito Y, Kobayashi H, Uetera Y, Yasuhara H, Kajiura T, Okubo T. Microbial contamination of surgical instruments used for laparotomy. Am J Infect Control. 2014; 42(1): 43-7.

Santos KRN, Teixeira LM, Leal GS, Fonseca LS, Gontijo-Filho PP. DNA typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: isolates and factors associated with nosocomial acquisition in two Brazilian university hospitals. J Med Microbiol. 1999; 48(1): 17-23.

Schuenck RP, Pereira EM, Iorio NL, Santos KRN. Multiplex PCR assay to identify methicillin resistance of *Staphylococcus haemo- lyticus*. FEMS Immunol Med Microbiol. 2008; 52(3): 431-5.

Stepanovic S, Vukovic D, Davic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococ- cal biofilm formation. J Microbiol Methods. 2000; 40(2): 175-9.

Tabe Y, Nakamura A, Igari J. Glycopeptide susceptibility profiles of nosocomial multiresistant *Staphylococcus haemolyticus* isolates. J Infect Chemother. 2001; 7(3): 142-7.

Van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK. European Society of clinical microbiology and infec- tious diseases (Escmid) study group on epidemiological markers (Esgem). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. Clin Microbiol Infect. 2007; 13(Suppl. 3): 1-46.

Zargaran D, Hardwick S, Adel R, Hill G, Stubbins D, Salmasi AM. Sphygmomanometer cuffs: a potential source of infection! Angiology. 2015; 66(2): 118-21.

Zulfiqar A, Mirani ZA, Jamil N. Effect of sub-lethal doses of vancomycin and oxacillin on biofilm formation by vancomycin intermediate resistant *Staphylococcus aureus*. J Basic Microbiol. 2011; 51(2): 191-5.

3.3 Artigo 3: Influence of antibiotics on biofilm formation by different clones of nosocomial multidrug-resistant *Staphylococcus haemolyticus* from catheter-related infections (Artigo Cientifico 3)

Autores: Pereira PMA, Sued-Karam BR, Faria YV, Nogueira BA, Colodette SS, Duarte JLMB, Castro EA, Hirata Jr R, Pereira JAA; Mattos-Guaraldi AL.

Revista: Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. (Submetido)

Resumo

Entre os SCN, *Staphylococcus haemolyticus* é um dos mais importantes agentes causadores de infecções nosocomiais e, hoje, o micro-organismo mais comum entre os isolados clínicos de estafilococos resistentes à meticilina. Além disso, *S. haemolyticus* tem uma grande capacidade de formar biofilme e é freqüentemente resistente a múltiplos antibióticos, e único entre as espécies estafilocócicas, propenso a desenvolver resistência aos glicopeptídeos. A disseminação das cepas pode ser de grande preocupação no ambiente hospitalar. O objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades da superfície, a capacidade de produzir biofilme com presença de antimicrobianos de cepas *S. haemolyticus* isoladas de infecções em neonatos e adultos. Foram estudadas cepas de neonatos e adultos isolados de hemocultura. A distribuição clonal foi avaliada por ensaio de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de antibióticos foram avaliadas através do método de microdiluição em caldo. Os ensaios de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada para detectar os genes *mec*A, *ica*A, *aap*, *atl*E, *atl* e *fbp*. As cepas de *S. haemolyticus* cultivadas em meios de cultura adicionados de ¼ MIC dos antibióticos foram investigadas para formação de biofilme em superfícies de vidro, poliestireno e catéter de poliuretano e silicone. *S. haemolyticus* isoladas de neonatos e adultos compreendem 6 e 12 tipos de PFGE distintos, respectivamente. A formação de biofilme e a sobrevivência das bactérias sésseis diferiram e foram independentes da presença dos genes *ica*A e *mec*A, PFGE. Vancomicina e oxacilina não inibiram a formação de biofilme por cepas de *S.haemolyticus* suscetíveis a vancomicina em

superfícies abióticas, incluindo a superfície do catéter. Com relação aos outros grupos de antibióticos testados, nem todas as cepas inibiram a formação de biofilme. O aumento da formação de biofilme foi observada em algumas situações. Além disso, uma dose sub-letal de antibiótico induziu a formação de biofilme por cepas de *S. haemolyticus* em poliestireno e vidro. Os mecanismos moleculares de formação de biofilme nesta espécie ainda não foram elucidados, particularmente na presença de agentes antimicrobianos terapêuticos.

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

Title Page

Influence of antibiotics on biofilm formation by different clones of nosocomial multidrug-resistant *Staphylococcus haemolyticus* from catheter-related infections

Paula Marcele Afonso Pereira[a], Bruna Ribeiro Sued-Karam[a], Yuri Vieira Faria[a], Barbara Araújo Nogueira[a], Sabrina Santos Colodette[a], José Luís Muniz Bandeira Duarte[a], Eduardo Almeida de Castro[a], Raphael Hirata Júnior[a], José Augusto Adler Pereira[a], Ana Luíza Mattos-Guaraldi[a]*.

[a] Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (FCM/UERJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Running title: Antibiotics on *S. haemolyticus* biofilm formation

[#] PMA Pereira and BR Sued-Karam contributed equally for the first authorship in this manuscript.

***Corresponding author**. Prof. Dr. Ana Luíza de Mattos Guaraldi.Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Av. 28 de Setembro, 87 - Fundos, 3° andar. Vila Isabel, RJ, Brazil, CEP 20 551-030. Fax number: +55 21 2868-8376; E-mail: guaraldi@uerj.br.

Abstract

Staphylococcus haemolyticus is the most common organism among clinical isolates of methicillin-resistant staphylococci. The aim of this study was to evaluate the ability to produce biofilm with presence of the antibiotics of *S.haemolyticus* strains isolated from infections in neonates and adults. Clonal distribution was assessed in pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibiotics were evaluated via the broth microdilution method. Polymerase chain reaction (PCR) assays were performed to detect *mecA, icaA, aap, atlE, atl* and *fbp* genes. *S.haemolyticus* strains grown in the presence of the antibiotics were investigated for biofilm formation on glass, polystyrene and catheter surfaces. Biofilm formation were independent of the presence of the *icaA* and *mecA* genes, PFGE type. Vancomycin, oxacillin and the others antibiotics tested did not inhibit biofilm formation on abiotic surfaces. The molecular mechanisms of biofilm formation in this specie have not been elucidated, particularly in the presence of antimicrobial agents.

Keywords: *Staphylococcus haemolyticus*; bacteremia; PFGE; resistance; biofilm; antibiotics.

1. Introduction

Coagulase-negative staphylococci (CoNS) are currently the most prevalent microorganisms responsible for nosocomial infections in both industrialized and developed countries (Potter et al., 2009). Moreover, there is increasing evidence of infections caused by CoNS in neonatal intensive care units (NICUs), including *Staphylococcus haemolyticus* as an important cause of infections related to indwelling medical devices (Zhiling et al., 2013; Kornienko et al., 2016). *S. haemolyticus* is second only to *epidermidis* in its frequency of isolation from human hematogenic infections. *S. haemolyticus* also plays an important role in cases of septicemia, pneumonia, peritonitis, otitis and urinary tract infections. *S. haemolyticus* infections primarily comprise immunocompromised patients, e.g. patients with hematological disease and immature infants (Cavanagh et al., 2012; Zhiling et al., 2013; Kornienko et al., 2016).

S. haemolyticus has the highest tendency for developing resistance to multiple antibiotics (MDR) and also plays an important role in the dissemination of resistance genes, contributing to the emergence of more virulent and epidemic clones (Kornienko et al., 2016; Sader et al., 2016). Whole-genome sequence determination of *S. haemolyticus* strain JCSC1435 revealed not only the presence of many antibiotic resistance genes but also a surprising number of insertion sequences (ISs), many of which were highly homologous (Takeuchi et al., 2005; Cavanagh et al., 2014). Virulence factors differ depending on the species of the most frequent etiological agents of staphylococcal infections - *S. aureus*, *S. epidermidis* and *S. haemolyticus* (Cavanagh et al., 2014; Czekaj et al., 2015; Takeuchi et al., 2005). Until the present time, one of the most important virulence factors of these potentially pathogenic species is the ability of biofilm formation, an important mechanism involved in CVC-related infections and in other medical devices-associated diseases (Grzebyk et al., 2013). Biofilm development is a major concern in nosocomial infections, because it protects microorganisms from opsonophagocytosis and against antibiotics (Potter et al., 2009). However, the biofilms formed by *S. haemolyticus* have not yet been subjected to more detailed studies (Silva et al., 2013). However, little is known about emergence of hospital-adapted clones and factors contributing to dissemination and persistence of *S. haemolyticus* in nosocomial environment. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the influence of antimicrobial agents on the ability of biofilm formation by different clones of *S. haemolyticus* isolated from infections in neonates and adults.

2. Materials and methods

2.1. Origin and identification of *S. haemolyticus* strains. A total of 48 *S. haemolyticus* strains previously isolated from blood samples of neonates (n=31) and adults (n=17) patients with catheter-related bloodstream infection that were attended during the period of 2008-2010 at various sectors of Pedro Ernesto University Hospital/UERJ, located at the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil. *S. haemolyticus* strains evaluated in this study were obtained from the culture collection of our laboratory.

S. haemolyticus blood isolates previously identified by conventional phenotypic tests were confirmed by mPCR, MALDI-TOF and 16S rRNA sequencing assays (Pereira et al., 2014). MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight) method (Kornienko et al., 2016) and a multiplex PCR assay (mPCR) were performed to identify *S. haemolyticus* and methicillin-resistance (*mec*A gene) in accordance to methods previously described (Iorio et al., 2011; Pereira et al., 2014). *S. haemolyticus* ATCC 29970, *S. epidermidis* ATCC 35984, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. aureus* ATCC 29213, and *S. aureus* ATCC 25923 strains were used as control of phenotyping, antimicrobial susceptibility tests, PCR and biofilm assays.

2.2. DNA fingerprinting by PFGE. Chromosomal DNA preparation and PFGE assays were performed as previously described (Nunes et al., 2005; Vivoni et al., 2006). PFGE banding patterns were analyzed by visual comparison among strains and the Bionumerics program, version 6.0. Dice similarity coefficients were calculated with a band position tolerance of 1.5%and the UPGMA method for clusters analysis (Van Belkum et al., 2007).

2.3. Antimicrobial susceptibility testing. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of oxacillin (OXA), vancomycin (VAN), moxifloxacin (MXF), rifampicin (RIF), teicoplanin (TEC), tigecycline (TGC) and linezolid (LZD) (Sigma, St. Louis, MO, USA) were evaluated by the broth microdilution method (Pereira et al., 2014; CLSI 2015).

2.4. Influence of the presence of antibiotics on biofilm formation on abiotic surfaces. Biofilm formation on surfaces of glass tubes and 96-well polystyrene microtiter plates were performed with or without antibiotics based on previously described methods (Stepanovic et al., 2000; Gomes et al., 2013; Pereira et al., 2014). The biofilm formation assays were

performed using their respective media added of subMICs of oxacillin, vancomycin, rifampicin, moxifloxacin, linezolid, tigecyclin and teicoplanin equivalent to ¼ MIC. ATCC 35984 *S. epidermidis* strain was used as positive control.

2.5. Evaluation of bacterial adherence and biofilm formation on catheter surfaces.

2.5.1. *Semi-quantitative roll plate and quantitative techniques.* Polyurethane 16-gauge percutaneous nephrostomy and silicone intravenous catheters were used in the *in vitro* model system for evaluation of bacterial adherence and biofilm formation on catheter surfaces. Sterile 4 cm segments of catheters were immersed for 24 h in 10^6 c.f.u. bacteria ml^{-1} suspended in TSB medium (Tryptics soy broth) (Franson et al., 1984). Catheter segments infected in vitro with strain BR-CAT5003748 were cultured by using a quantitative (Dooley et al., 1996) and a semi-quantitative (Maki et al., 1977) method on Columbia agar medium supplemented with 5% sheep blood for 24 h at 37ºC.

2.5.2. Scanning electron microscopy (SEM). Sections of 1 cm polyurethane and catheters infected with *S. haemolyticus* were aspirated and washed twice with 1 ml of sterile saline. The material was fixed with 2.5% glutaraldehyde and post-fixed with 1% OsO4, 5 mM CaCl2 and 0.8% K4[Fe(CN6)] in cacodylate buffer for 1h at room temperature, dehydrated through a series of graded ethanol solutions. Then the material was subjected to critical point with CO_2 and examined by MEV JEOL JSM 5310 (Franson et al., 1984). The strain CAT5003/BR of *Corynebacterium diphtheriae* isolated from the catheter nephrostomy was used as positive control (Stepanovic, 2000; Gomes et al., 2009).

2.6. Detection of genes by PCR. For detection of the presence *icaA, aap, atlE, atl and fbp* genes involved in staphylococci adherence and/or biofilm formation was performed respectively in accordance to methods previously described (Araujo et al., 2006; Potter et al., 2009; Pereira et al., 2014; Barros et al., 2015). The primers and amplicons used in this study were listed in **Table 1**.

3. Results

3.1. Clonal distribution by PFGE of *S. haemolyticus* strains. In the present study, heterogeneity with regard to *S. haemolyticus* strains was observed in the time period studied

(**Figure 1a and 1b**). PFGE analysis showed the presence of 12 restriction profiles clustered in 6 pulse types (A, B, C, D, E and F) indicating a genetic diversity among the neonates isolates of the NICU, and 17 restriction profiles clustered in 12 pulse types (G, H, I, J, L, M, N, O, P, Q, R and S) in adults isolates.

3.2. Antimicrobial susceptibility profiles. Results displayed in **Table 2** demonstrated oxacillin-resistance and presence of *mecA* gene in 70.9% of *S. haemolyticus* isolates from neonates and 70.5% from adults, independent of PFGE-types. MIC > 512 µg/µl was observed for 87% and 100% oxacillin-resistant *S. haemolyticus* strains isolated from neonates and adults, respectively. Vancomycin-intermediate (MIC=8 µg/µl) strains were isolated from three patients, including one neonate (SH-1 strain). A high percentage of strains isolated both from neonates (74.2%) and adults (76.4%) were resistant to linezolid.

3.3. Influence of antibiotics in biofilm formation on abiotic surfaces by *S. haemolyticus* strains isolated from neonates and adults. Data displayed in **Table 2** showed that *S. Haemolyticus* strains isolated from blood of both neonates (n=31) and adults (n=17) showed different levels of adherence to hydrophobic (polystyrene) or hydrophilic (glass) abiotic surfaces and biofilm formation. Six blood isolates from adults and one from neonates were found non-adherent and unable of biofilm formation on polystyrene surfaces. Regardless of PFGE-types, biofilm formation on polystyrene surfaces was respectively detected in 90.3% and 64.7% strains isolated from neonates and adults while biofilm formation on glass surfaces was detected in 90.3% neonates and 100% adults strains. On glass surfaces assays, the majority of strains isolated from neonates were classified as weakly (+) adherent (61.2%) and from adults as strongly (+++) adherent (70.5%).

Analysis of influence of antibiotics on pathogenicity of *S. haemolyticus* (**Table 2 and Figure 2**) showed that multidrug-resistant MRSH strains grown in the presence of OXA, VAN, TEC, MXF, RIF, LZD and TGC were able to produce biofilm on glass and polystyrene surfaces. OXA and/or VAN, TEC, TGC were unable to inhibit biofilm formation on abiotic surfaces by MRSH strains. Unexpectedly, the presence of OXA and/or VAN, TEC, MXF, RIF, LZD enhanced biofilm formation on glass and polystyrene surfaces in most opportunities.

The ability of biofilm formation on surfaces of polyurethane and silicone catheters by MRSH strains was verified by the roll plate technique (Maki test) and SEM assays are illustrated in **Figure 3**. Evaluation of viability and adherence of microorganisms on catheter

segments revealed >5.0 x 10^4 CFU viable cells of *S.haemolyticus* strains exhibiting bacterial aggregation and microcolony formation. Production of mature biofilm with hollow voids on polyurethane and silicone catheter surfaces by *S.haemolyticus* grown in the presence of ¼ MIC of vancomycin was also demonstrated by SEM.

3.4. Genotypic analysis. The presence of five biofilm-associated genes in *S.haemolyticus* blood isolates of neonates and adults was respectively demonstrated by PCR: 58.0% and 52.9% *ica*A, 38.7% *aap* and *atl*E, 96.7 % and 100% *atl*, 90.3% and 100% *fbp* genes. In this opportunity, seven strains isolated from adults were positive while only one neonate and three adult blood isolates gave negative results for all biofilm-associated genes tested by PCR (**Table 2**).

4. Discussion

CoNS are currently the most prevalent potentially pathogenic microorganisms responsible for nosocomial infections related to indwelling medical devices of both neonates and adults. MDR properties including heteroresistance to glycopeptides are frequently observed among some CoNS species (Oliveira et al., 2016; Bakthavatchalam et al., 2017). In different studies, resistance to one or more antimicrobial agents amongst penicillins, cephalosporins, macrolides, tetracyclines, quinolones, aminoglycosides, glycopeptides and fosfomycines have been reported for *S. haemolyticus* clinical isolates (Czekaj et al., 2015; Hosseinkhani et al., 2016).

Occurrence of bloodstream infections of pediatric patients and circulation of endemic clones of MDR *S. haemolyticus* in neonatal hospital units have been described in different industrialized and developing countries, including Brazil (Pereira et al., 2014; Kornienko et al., 2016). Prevalence and mortality rates of sepsis among long-term hospitalized children may be as high as 30% and 50%, respectively. Although survivors also experience serious sequelae (Dong et al., 2017), pathogenicity and epidemiological data of MDR *S. haemolyticus* need further investigation, especially in NICUs. Ability of biofilm formation has been related to increasement of antimicrobial resistance expressed by some clinical isolates (Martini et al., 2016).

During this study, *S. haemolyticus* strains from catheter-related infections expressed multidrug-resistance independent of PFGE-types. Influence of antibiotics on biofilm formation by MDR *S. haemolyticus* isolated from neonates and adults nosocomial infections was currently

demonstrated. Heterogeneity with regard of PFGE-types was observed among *S. haemolyticus* strains isolated from blood of neonates, similarly to data demonstrated in previous reports (Cavanagh et al., 2012; Pereira et al., 2014; Panda et al., 2016). Interestingly, PFGE-types currently related to hematogenic infections in adults were distinct from those isolated from neonates attended in HUPE/UERJ.

Recently, MICs of vancomycin have increased progressively with levels higher than 2 mg/ml being observed in a large number of *S. haemolyticus* isolates (Barros et al., 2012; Becker et al., 2014; Hosseinkhani., et al 2016; Pinheiro et al., 2016). Presently, vancomycin-intermediate strains, independent of PFGE types, were isolated from three patients, including one neonate.

Excellent oral bioavailability and tissue penetration make linezolid a better alternative to vancomycin for treating complicated skin and soft-tissue infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus*. However, resistance to this synthetic drug has been increasingly reported. Resistance to linezolid was higher in *S. haemolyticus* strains isolated from adults than mentioned in previous studies performed in USA, European countries, China and India (Hosseinkhani et al., 2016; Pinheiro et al., 2016; Szczuka et al., 2016). In our study, a high percentage of methicillin-resistant *S. haemolyticus* strains isolated both from neonates and adults resistant to linezolid was observed a Brazilian hospital.

Although methicillin resistance mediated by *mecA* gene which encodes the modified penicillin binding protein PBP2a was detected in most *S. haemolyticus* strains tested, correlation between presence of *mecA* gene, PFGE-types and drug resistance patterns was not observed, as previously described by others (Cavanagh et al., 2012; Pereira et al., 2014; Panda et al., 2016). The ability of biofilm production and MDR expression may favor *S. haemolyticus* as an emerging cause of nosocomial infections. Possible explanation may be the presence of a novel *mec*A allotype, beta-lactamase hyperproduction or alteration in genes encoding other penicillin binding proteins (Barros et al., 2012; Dziri et al., 2016; Hosseinkhani et al., 2016).

Biofilm formation is considered one of the major virulence factors of CoNS since it is enables the persistence of these pathogens in biomaterials, including invasive medical devices (Pedroso et al., 2016). Influence of antibiotics in biofilm formation on abiotic surfaces by MDR *S. haemolyticus* strains isolated from neonates and adults presenting catheter-related infection was currently demonstrated. Blood isolates of both neonates and adults showed different levels of adherence and biofilm formation on hydrophobic (polystyrene) or hydrophilic (glass) abiotic surfaces, including polyurethane and silicone catheters surfaces. Interestingly, some blood

isolates from adults and/or neonates were found non-adherent and unable of biofilm formation on polystyrene surface. Regardless of PFGE-types, biofilm formation on polystyrene and glass surfaces was predominantly detected among *S. haemolyticus* strains isolated from adults. On glass surfaces assays, the majority of strains isolated from neonates and adults were classified as weakly (+) and strongly (+++) adherent, respectively.

MSSH and MRSH strains grown in the presence of OXA, VAN, TEC, MXF, RIF, LZD and TGC were able to produce biofilm on glass and polystyrene surfaces. OXA and VAN were unable to inhibit biofilm formation on abiotic surfaces by MSSH and MRSH strains. Unexpectedly, the presence of OXA, VAN and LZD enhanced biofilm formation on glass and polystyrene surfaces in most opportunities. Production of mature biofilm with hollow voids on polyurethane and silicone catheter surfaces by a MRSH strain grown in the presence of ¼ MIC of vancomycin was also demonstrated.

A deeper understanding of biofilm formation mechanisms could provide improvement for control strategies of nosocomial infections and medical costs (Hong et al., 2016). Previous studies indicated that polysaccharide intercellular adhesin (PIA) coded by *ica* gene may contribute to cell–cell adhesion and biofilm formation by different CoNS species (Grinholc et al., 2007). However, *S. haemolyticus* may also produce biofilm via *ica*-independent pathways (Grinholc et al., 2007; Fredheim et al., 2009; Barros et al., 2012; Pereira et al., 2014; Barros et al., 2015; Martínez et al., 2016; Sued et al., 2017). Similarly, in the present study, only 42% and 47% of the MDR *S. haemolyticus* isolates from neonates and adults, respectively, harbored *icaA* gene. Data emphasized that biofilm formation by some *S. haemolyticus* strains may be independent of the presence of *ica* gene.

Intercellular adhesion mediated by the Aap and Bap proteins is well described some *Staphylococcus* species. Additional components such as proteins, DNA, RNA, and polysaccharides other than PIA may also be involved in mechanisms of biofilm formation by CoNS (Hong et al., 2016; Martínez et al., 2016). In the present study, the *aap* gene was detected only in a few number of tested strains. Therefore, the *aap* gene was not found as a predominant factor related biofilm formation by some PFGE-types of *S. haemolyticus* isolated from neonates and adults presenting catheter-related infections. *Atl* and *fbp* genes may also previously found to be involved in biofilm formation *in vivo* by *S. haemolyticus* (Barros et al., 2015). Here in, *Atl* and *fbp* genes were found in most clinical isolates from both neonates and adult patients.

Some studies have reported that several genes are directly or indirectly involved in the molecular mechanisms of biofilm formation by *S. epidermidis* and, the most outstanding are

the *atl*E gene which encodes the AtlE autolysin that is responsible for the ability to directly connect to the polymeric surface (Martini et al., 2016; Pedroso et al., 2016). In this study we detected the presence of the *atle* gene in *S. haemolyticus* strains isolated of neonates (39.0%) and adults (59.0%). Interestingly, all the investigated genes (*icaA, atl, atlE, fbp, aap*) were not detected in one of the biofilm producers *S. haemolyticus* strains evaluated in our study. Data confirmed that additional microbial components may influence biofilm production by *S. haemolyticus*.

OXA and VA did not exert any inhibitory effects on biofilm formation on either glass or plastic surfaces by *ica*A-positive and *ica*A-negative *S.haemolyticus* strains, including the biofilm-producer strain that did not present any of the genes (*icaA, atl, atlE, fbp, aap*) related to biofilm production investigated in this study. Findings with VA-susceptible strains were similar to those previously observed in studies examining the effects of sub-lethal doses of VA and OXA on biofilm formation by VA-resistant S. aureus (VRSA) (Zulfiqar et al., 2011; Sued et al., 2017). The majority of strains continued to produce biofilm on polystyrene and glass surfaces in the presence of all antibiotics tested, including linezolid.

In conclusion, this study demonstrated a high frequency of MDR-MRSH blood isolates in neonates and adults, potentially associated with invasive infections in patients with indwelling medical devices. MRSH strains of different PFGE-types were able to produce biofilm on catheter surfaces in the presence of VA, as a result of their ability to form biofilms on both hydrophilic and hydrophobic surfaces. This study demonstrated that biofilm formation process is complex and may not be related with *ica* gene carriage. The molecular mechanisms of biofilm formation in *S. haemolyticus* have not been elucidated, however, in this study the biofilm formation increased in the presence of antimicrobial agents.

Acknowledgements

This work was supported by grant from CNPq, CAPES, FAPERJ, SR-2/UERJ and Programa de Núcleo de Excelência (PRONEX) of the Brazilian Ministry of Science and Technology.

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

Araujo G L, Coelho L R, Carvalho C B, Maciel R M, Coronado A Z, Rozenbaum R, Ferreira-Carvalho B T, Figueiredo A M S, Teixeira L A. Commensal isolates of methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis are also well equipped to produce biofilm on polystyrene surfaces. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2006; 57: 855–864.

Bakthavatchalam YD, Sudarsanam TD, Babu P, Munuswamy E, Sethuvel DPM, Ragupathi NKD, et al. Methicillin susceptible teicoplanin resistant *Staphylococcus haemolyticus* from bloodstream infection: Novel mutation in teicoplanin resistant operon (*tcaRAB*). Japanese Journal of Infectious Diseases, 2017.

Barros EM, Ceotto H, Bastos MC, Santos KR, Giambiagi-Demarval M. *Staphylococcus haemolyticus* as an important hospital pathogen and carrier of methicillin resistance genes. J Clin Microbiol 2012; 50:166-168.

Barros EM, Lemos M, Souto-Padro´n T, Giambiagi-deMarval M. Phenotypic and Genotypic Characterization of Biofilm Formation in *Staphylococcus haemolyticus*. Springer Science Business Media New York 2015.

Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-Negative Staphylococci. Clin Microbiol 2014; Rev. 27 (4): 870.

Cavanagh JP, Klingenberg C, Hanseen AM, Fredheim EA, Francois P, Schrenzel J, et al. Core genome conservation of *Staphylococcus haemolyticus* limits sequence based population strictireanalysis. Journal of Microbiological Methods 2012; 89:159-166, 2012.

Cavanagh JP, Hjerde E, Matthew TG, Kahlke HT, Klingenberg C, Flægstad T, et al. Whole-genome sequencing reveals clonal expansion of multiresistant *Staphylococcus haemolyticus* in European hospitals. J Antimicrob Chemother 2014.

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 24 informational supplement, M100-S24.Wayne, PA, 2015.

Czekaj T, Ciszewski M, Szewczyk EM. *Staphylococcus haemolyticus* – an emerging threat in the twilight of the antibiotics age . Microbiology 2015; 161: 2061–2068 .

Dong H, Cao H, Zheng H. Pathogenic bacteria distributions and drug resistance analysis in 96 cases of neonatal sepsis. BMC Pediatrics 2017; 17:44.

Dooley DP, Garcia A, Kelly JW, Longfield RN, Harrison L. Validation of catheter semiquantitative culture technique for non-staphylococcal organisms. J Clin Microbiol 1996; 34, 409–412.

Dziri R, Klibi N, Lozano C, Ben Said L, Bellaaj R, Tenorio C, et al. High prevalence of *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus saprophyticus* in environmental samples of a Tunisian hospital. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2016; 85: 136–140.

Franson TR, Sheth NK, Rose HD, Sohnle PG. Scanning electron microscopy of bacteria adherent to intravascular catheters. J Clin Microbiol 1984; 20, 500–505.

Fredheim EG, Klingenberg C, Rohde H, Frankenberger S, Gaustad P, Flaegstad T, et al. Biofilm formation by *Staphylococcus haemolyticus*. J Clin Microbiol 2009; 47:1172-1180.

Gomes DLR, Martins CAS, Faria LMD, Santos LS, Santos CS, Sabbadini PS, et al. *Corynebacterium diphtheriae* as an emerging pathogen in nephrostomy catheter-related infection: evaluation of traits associated with bacterial virulence. J Med Microbiol 2009; 58(Pt 11): 1419-27.

Gomes DLR, Peixoto RS, Barbosa EAB, Napoleão F, Sabbadini PS, Santos KRN, et al. SubMIC of penicillin and erythromycin enhance biofilm formation and hydrophobicity of *Corynebacterium diphtheriae* strains. J Med Microbiol 2013; 62(Pt 5): 754-60.

Grinholc M, Wegrzyn G, Kurlenda J. Evaluation of biofilm production and prevalence of the *ica*D gene in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with nosocomial infections and carries. FEMS Imunnol microbiol medical 2007; 50(3):375-9.

Grzeby KM, Buzychazy WM, Piotrowska A, Krzsuak P, Houzsuak P, Bulanda M. Phenotypic evaluation of hydrophobicity and the ability to produce biofilm in coagulase-negative Staphylococci isolated from infected very-low-birth weight newborns. Med Dosw Miksobiol 2013; 65(3): 149-59.

Hong J, Kim J, Kim B-Y, Park J-W, Ryu J-G, Roh E. Complete genome sequence of biofilm-forming strain *Staphylococcus haemolyticus* S167. Genome Announc 2016; 4(3):00567-16.

Hosseinkhani F, Jabalameli F.; Farahani NN, Taherikalani M, Van Leeuwen WB.; Emaneini M. Variable number of tandem repeat profiles and antimicrobial resistance patterns of *Staphylococcus haemolyticus* strains isolated from blood cultures in children. Infection, Genetics and Evolution 2016; 38 :19–21.

Iorio NL, Azevedo MB, Frazão VH, Barcellos AG, Barros EM, Pereira EM, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* carrying biofilm formation genes: detection of clinical isolates by multiplex PCR. Int Microbiol 2011b; 14(1):13-7.

Kornienko M, Ilina E, Lubasovskaya L, Priputnevich T, Falova O, Sukhikh G, et al. Analysis of nosocomial *Staphylococcus haemolyticus* by MLST and MALDI-TOF mass spectrometry. Infection, Genetics and Evolution 2016; 39: 99–105.

Maki DG, Weise CE, Sarafin HW. A semi-quantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. N Engl J Med 1977; 296(23): 1305-9.

Martini R, Hörner R, Rampelotto RF, Garzon LR, Nunes MS, Teixeira MD, et al. Investigation of biofilm formation in coagulase-negative staphylococci isolated from platelet concentrate bags. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2016; 58:1.

Martínez-Meléndez A, Morfín-Otero R, Villarreal-Trevi L, Camacho-Ortíz A, González-González G, Llaca-Díaz J, et al. Molecular epidemiology of coagulase-negative bloodstream isolates: detection of Staphylococcus epidermidis ST2, ST7 and linezolid-resistant ST23. Braz j infect dis 2016; 20(5):419–428.

Nunes APF, Teixeira LM, Bastos CCR, Silva MG, Ferreira RBR, Fonseca LS, et al. Genomic characterization of oxacillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* isolated from Brazilian medical centers. J Hosp Infect 2005*;* 59:19-26.

Oliveira CF, Cavanagh JP, Elizabeth G, Fredheim A, Reiter KC, Rieger A, et al. Coagulase-negative staphylococci in Southern Brazil: looking toward its high diversity. Rev Soc Bras Med Trop 2016; 49(3):292-299.

Panda S, Kar S, Sharma S, Sing DV. Multidrug-resistant *Staphylococcus haemolyticus* isolates from infected eyes and healthy conjunctivae in India. Journal of Global Antimicrobial Resistance 2016; 6: 154–159.

Pedroso SHP, Sandes SHC, Luiz KCM, Dias RS, Filho RAT, Serufo JC, et al. Biofilm and toxin profile: A phenotypic and genotypic characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from human bloodstream infections. Microbial Pathogenesis 2016; 100: 312-318.

Pereira PMA, Binatti VB, Sued BPR, Ramos JN, Peixoto RS, Simões C, et al. *Staphylococcus haemolyticus* disseminated among neonates with bacteremia in a neonatal intensive care unit in Rio de Janeiro, Brazil. Diagn Microbiol Infect Dis 2014; 78(1): 85-92.

Pinheiro L, Brito C I, Cataneli V, Pereira, Oliveira A, Bartolomeu AR, et al. The susceptibility Profile of Staphylococcus epidermidis and *Staphylococcus haemolyticus* Isolated from Blood Cultures to Vancomycin and Novel Antimicrobial Drugs over a Period of 12 Years. Microbial Drug Resistance 2016; 22: 4.

Potter A, Ceotto H, Giambiagi-deMarval M, Santos KRN, Nes IF, Bastos MCF. The gene *bap*, involved in biofilm production, is present in *Staphylococcus* spp. Strains from nosocomial infections. J Microbiol 2009; 47:319-326.

Sader HS, David JF, Flamm RK, Streit JM, Mendes RE, Jones RN. Antimicrobial activity of ceftaroline and comparator agents when tested against numerous species of coagulase-negative Staphylococcus causing infection in US hospitals. Diag Microbiol and Infect Dis 2016.

Santos KRN, Teixeira LM, Leal GS, Fonseca LS, Gontijo-Filho PP. DNA typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus: isolates and factors associated with nosocomial acquisition in two Brazilian university hospitals. J Med Microbiol 1999;48:17–23.

Schuenck RP, Pereira EM, Iorio NL, Santos KR. Multiplex PCR assay to identify methicillin resistance of Staphylococcus haemolyticus. FEMS Immunol Med Microbiol 2008;52:431–5.

Silva PV, Cruz RS, Keim LS, de Paula GR, Carvalho BTF, Coelho LR, et al. The antimicrobial susceptibility, biofilm formation and genotypic profiles of *Staphylococcus haemolyticus* from bloodstream infections. Mem Inst Oswaldo Cruz 2013; 108(6): 812-816.

Stepanovic S, Vukovic D, Davic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of *Staphylococcal* biofilm formation. J Microbiol Methods 2000; 40:175-179.

Sued BPR, Pereira PMA, Faria YV, Ramos JN, Binatti VB, Santos KRN, et al. Sphygmomanometers and thermometers as potential fomites of *Staphylococcus haemolyticus*: biofilm formation in the presence of antibiotics. Mem Inst Oswaldo Cruz 2017; 1-8.

Szczuka E, Krajewska M, Lijewska D, Bosacka K, Kaznowski A. Diversity of staphylococcal cassette chromosome mec elements in nosocomial multiresistant *Staphylococcus haemolyticus* isolates. J Appl Genetics 2016; 57:543–547.

Takeuchi F, Watanabe S, Baba T, Yuzawa H, Ito T, Morimoto Y, et al. Whole genome sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* uncovers the extreme plasticity of its genome and the evolution of human colonizing staphylococcal species. J Bacteriol 2005; 187:7292–308.

Van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK. European Society Of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Escmid) Study Group On Epidemiological Markers (Esgem). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. Clin Microbiol Infect 2007; 13 (Suppl 3):1-46.

Vivoni AM, Diep BA, De-Gouveia-Magalhães AC, Santos KRN, Riley LW, Sensabaugh GF, et al. Clonal composition of *Staphylococcus aureus* isolates at a Brazilian University Hospital: identification of international circulation lineages. J Clin Microbiol 2006; 44:1686-1691.

Zhiling LI, Xiao Z, Li Z, Zheng Q, Zhang Y, Xu F. 116 cases of neonatal early-onset or late-onset sepsis: A sigle center retroséctive analysis on pathogenic bacteria species distribuition an antimicrobial susceptibility. Int J Clin Exp Med 2013; 6(8):693-9.

Zulfiqar A, Mirani ZA, Jamil N. Effect of sub-lethal doses of vancomycin and oxacillin on biofilm formation by vancomycin intermediate resistant *Staphylococcus aureus*. J Basic Microbiol. 2011; 51(2): 191-5.

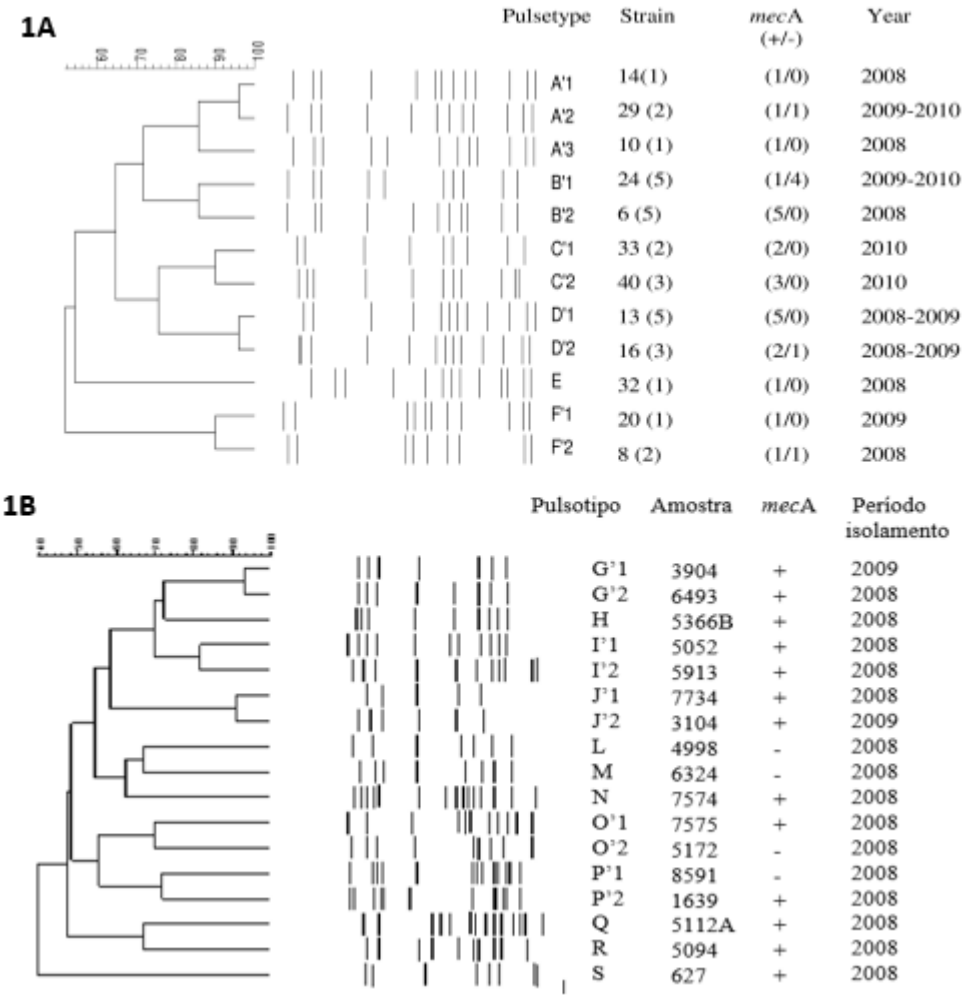


Figure 1. Dendogram of the PFGE profile of *Sma*I - digested genomic DNA of 31 Staphylococcus haemolyticus strains isolated from blood of neonates. Similarities percentage are identified on the dendogram derived from the unweighted pair group method using arithmetic averages and based on Dice coefficients. Isolates showing a similarity coefficient ≥80% were considered genetically PFGE related. Pulse types (strain number): A'1 (SH-14), A'2 (SH-21, SH-29), A'3 (SH-10); B'1 (1, 24, 26, 27, 28), B'2(2, 3, 4, 5, 6); C'1 (33, 38), C'2 (16,35, 39); D'1 (7, 12, 13, 18, 11), D'2 (19, 36, 40); E (32); F'1 (20), F'2 (8, 9) (A). Dendogram of the PFGE profile of SmaI-digested genomic DNA of 17 Staphylococcus haemolyticus strains isolated from blood of adults (B). PCR reaction: +, positive; −, negative; year, period of isolation of microorganisms.

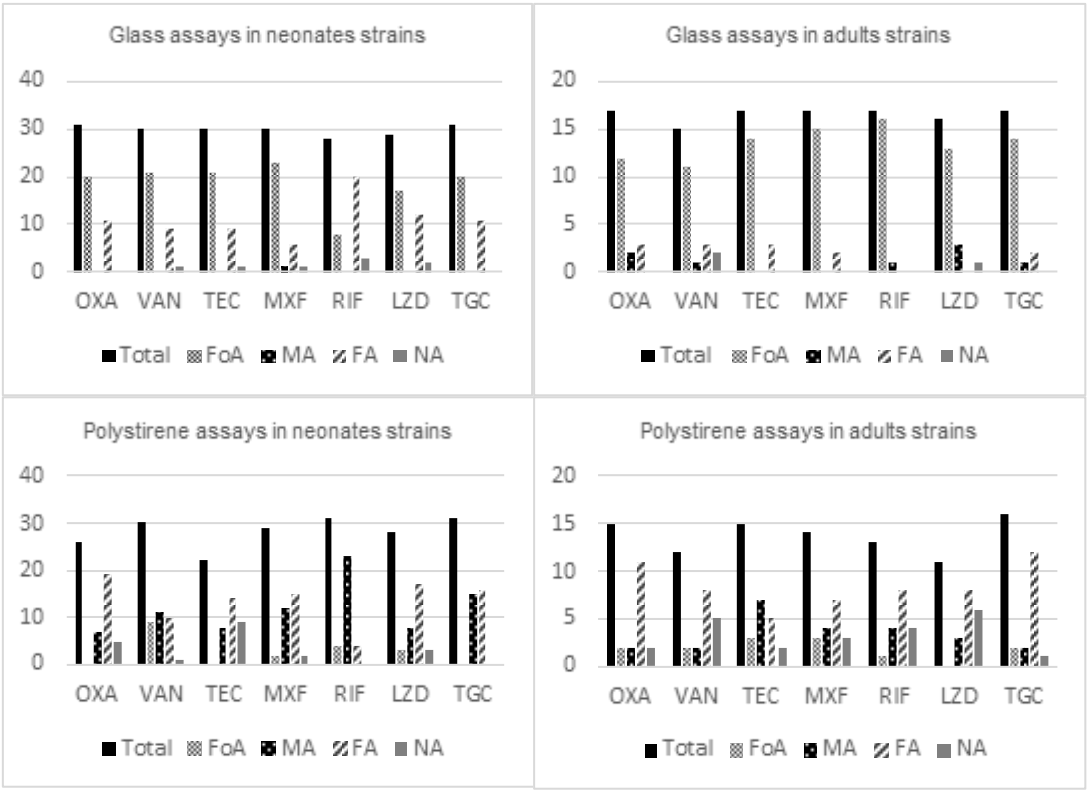


Figure 2. Influence of antibiotics in biofilm formation on abiotic surfaces (polystyrene and glass) by multidrug-resistant ORSH strains isolated from neonates and adults showing different levels of adherence and biofilm formation. OXA- oxacillin, VAN- vancomycin, MXF- moxifloxacin, RIF- rifampicin, TEC- teicoplanin, TGC- tigecycline, LZD- linezolid; FoA- strongly adherent; MA- moderately adherent; FA- weakly adherent; NA- Non-adherent.

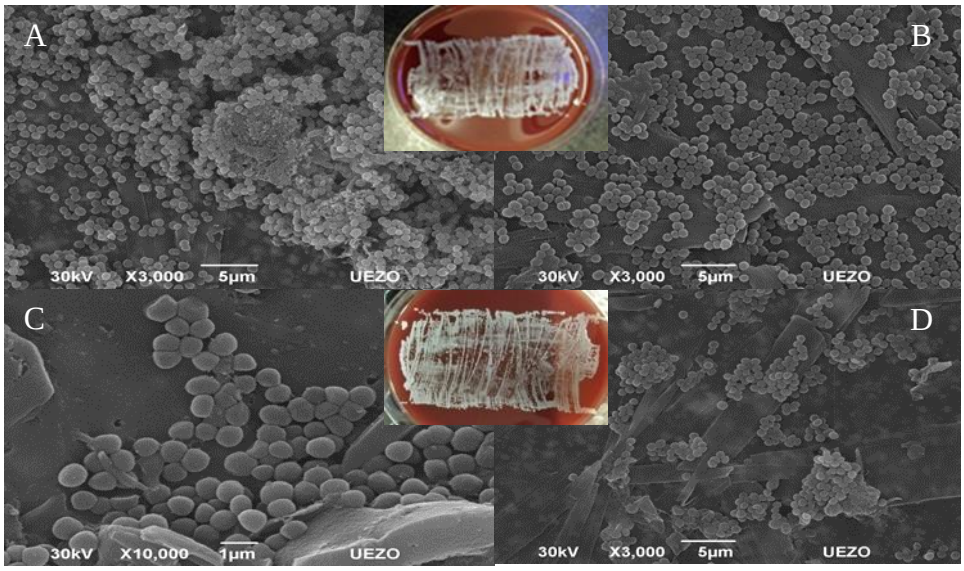


Figure 3: Scanning electron micrographs (SEM) showed biofilm formation on the external surface of the catheter of polyurethane (A), biofilm production on polyurethane catheter surfaces in the presence of ¼ minimal inhibitory concentration (MIC) of vancomycin (VA) (B). SEM showed biofilm formation on the external surface of the catheter of silicone (C), and biofilm production on silicone catheter surfaces in the presence of ¼ minimal inhibitory concentration (MIC) of vancomycin (VA) (D). The Maki's roll plate method indicated bacterial confluent growth on the surfaces of polyurethane and silicone catheter.

Table 1. Primers used in this study

Primers	Sequence of forward and reverse primers 5'→ 3'	Product size (bp)	References
SH1	GGTCGCTTAGTCGGAACAAT	285 pb	Schuenck *et al*,2008
SH2	CACGAGCAATCTCATCACCT		
MRS1	TAGAAATGACTGAACGTCCG	154 pb	Santos *et al*,1999
MRS2	TTGCGATCAATGTTACCTAG		
*ica*A -F	CGATGGGCTCAAGGTGG	287 pb	Potter *et al*, 2009
*ica*A –R	TTCTTTTCGTAGCGACTGTC		
atlE-F	GCTAAGGCACCAGTAAAAAGT	480 pb	Araujo *et al*, 2006
atlE-R	GACCTCATCTTGTTTTACCCA		
aap-F	CAACGAAGGCAGAAGAAGGA	719 pb	Araujo *et al*, 2006
aap-R	CATCCCCATCTTTCTTGCTG		
atl-F	TAACTCAACAATCGATGGCG	446 pb	Barros et al, 2015
atl-R	GTACCCCAAGGTGCTACTTG		
fbp-F	GGTGATACCATTTACCGCAC	512 pb	Barros et al, 2015
fbp-R	CGTGCATCGTAGTAGCGATC		

Table 2. Influence of antibiotics on biofilm formation by different clones of *Staphylococcus haemolyticus* isolated from catheter-related bloodstream infections

Strains	PFGE types	Polystyrene/Glass assays (Susceptibility profiles*)				Biofilm-related genes
		Control	Oxacillin	Vancomycin	Linezolid	
Neonates						
SH-14	A1	++ / +++	- / + (R)	- / +++ (S)	- / +++ (R)	*atl*E, *atl*, *fbp*
SH-21		- / +++	+ / + (R)	+ / +++ (S)	+ / +++ (S)	*atl*
SH-29/A2	A2	++ / +++	+ / + (R)	++ / +++ (S)	+ / +++ (I)	*aap*, *atl*, *fbp*
SH-10/A3	A3	++ / +++	+ / +++ (R)	+++ / +++ (S)	++ / +++ (S)	*Ica*A, *atl*
SH-24/B1	B1	++ / +++	+ / +++ (S)	+ / +++ (S)	+++ / ++ (I)	*Ica*A, *aap*, *atl*, *fbp*
SH-1/B1		++ / +	+ / +++ (R)	++ / - (I)	++ / - (S)	*Ica*A, *aap*, *atl*E, *atl*, *fbp*
SH-26 /B1		++ / +	++ / +++ (S)	+++ / +++ (S)	++ / +++ (S)	*Ica*A, *atl*, *fbp*
SH-27 /B1		++ / +	+ / +++ (R)	+++ / +++ (S)	+ / +++ (S)	*Ica*A, *atl*, *fbp*
SH-28 /B1		++ / +	+ / + (R)	+++ / +++ (S)	+ / + (S)	*Ica*A, *atl*, *fbp*
SH-2/B2	B2	++ / +	+ / +++ (R)	++ / + (S)	+ / + (I)	*Ica*A, *aap*, *atl*E, *atl*, *fbp*
SH-3 /B2		++ / +	+ / +++ (R)	+++ / +++ (S)	+ / +++ (S)	*Ica*A, *aap*, *atl*E, *atl*, *fbp*
SH-4 /B2		++ / +	++ / +++ (R)	+++ / +++ (S)	+ / +++ (S)	*Ica*A, *aap*, *atl*E, *atl*, *fbp*
SH-5 /B2		++ / +	- / +++ (R)	++ / +++ (S)	++ / +++ (S)	*Ica*A, *aap*, *atl*E, *atl*, *fbp*
SH-6 /B2		++ / +	+ / + (R)	++ / +++ (S)	++ / +++ (S)	*Ica*A, *aap*, *atl*E, *atl*, *fbp*
SH-33 /C1	C1	++ / +	++ / + (S)	+ / + (S)	+ / + (S)	-
SH-38 /C1		++ / +	+ / +++ (R)	++ / + (S)	+ / + (I)	*atl*, *fbp*
SH-35 /C2	C2	++ /+++	+ / +++ (R)	+ / +++ (S)	- / +++ (S)	*aap*, *atl*E, *atl*, *fbp*
SH-39 /C2		++ / +	+ / + (R)	++ / +++ (S)	+ / +++ (S)	*atl*, *fbp*
SH-16 /C2		++ / +	+ / + (R)	+ / +++ (S)	+++ / + (S)	*Ica*A, *atl*, *fbp*
SH-7 /D1	D1	++ / +	+ / +++ (R)	++ / +++ (S)	+ / +++ (S)	*Ica*A, *aap*, *atl*E, *atl*, *fbp*
SH-12 /D1		++ / +	++ / +++ (R)	++ / +++ (S)	+ / + (S)	*Ica*A, *atl*E, *atl*, *fbp*
SH-13/D1		++ / +	+ / +++ (R)	+ / + (S)	+ / + (S)	*atl*, *fbp*
SH-18 /D1		++ / -	+ / + (R)	+ / +++ (S)	+ / +++ (S)	*Ica*A, *atl*, *fbp*
SH-19 /D1		++ / -	- / + (R)	++ / +++ (S)	- / +++ (S)	*atl*, *fbp*
SH-40/D2	D2	++ / +++	+ / +++ (R)	+ / +++ (S)	+ / +++ (S)	*Ica*A, *atl*, *fbp*
SH-11 /D2		++ / +	- / +++ (R)	+++ / + (S)	++ / + (S)	*atl*, *fbp*
SH-36 /D2		++ / -	++ / +++ (S)	+++ / +++ (S)	++ / - (S)	*atl*, *fbp*
SH-32/E	E	++ / +++	++ / + (R)	+ / + (S)	++ / + (I)	*aap*, *atl*E, *atl*, *fbp*
SH-20/F1	F1	++ / +++	+ / +++ (R)	+ / + (S)	+ / + (S)	*atl*, *fbp*
SH-8/F2	F2	++ / +	- / +++ (R)	+++ / + (S)	+++ / + (S)	*Ica*A, *aap*, *atl*E, *atl*, *fbp*
SH-9 /F2	F2	++ / +	++ / +++ (R)	++ / + (S)	+ / + (S)	*Ica*A, *atl*, *fbp*
Adults						
3904/G1	G1	+ / +++	- / + (R)	- / +++ (S)	- / +++ (R)	*Ica*A, *aap*, *atl*, *fbp*
6493/G2	G2	+/ +++	+ / + (R)	++ / +++ (S)	+ / +++ (S)	*Ica*A, *atl*, *fbp*
5366B/H	H	++ / +++	+ / +++ (R)	+ / + (S)	++ / +++ (R)	*Aap*, *atl*E, *atl*, *fbp*
5052/I1	I1	++ / +++	++ / +++ (R)	+ / +++ (S)	+ / +++ (R)	*Atl*E, *atl*, *fbp*
5913/I2	I2	- / +++	+ / ++ (R)	+ / +++ (I)	+ / +++ (I)	*Ica*A, *aap*, *atl*E, *atl*, *fbp*
7734/J1	J1	++ / +++	++ / +++ (R)	++ / +++ (S)	- / +++ (R)	*Atl*, *fbp*
3104/J2	J2	+ / ++	+ / +++ (R)	- / +++ (S)	- / +++ (R)	*Ica*A, *atl*, *fbp*
4998/L	L	- / +++	+ / +++ (R)	- / +++(S)	- / +++ (R)	*atl*E, *atl*, *fbp*
6324/M	M	- / +++	+ / + (R)	+ / + (S)	+ / +++ (R)	*atl*E, *atl*, *fbp*
7574/N	N	- / +++	+ / +++ (R)	- / + (S)	- / +++ (I)	*Ica*A, *aap*, *atl*, *fbp*
7575/O1	O1	++ / ++	+ / +++ (R)	+++ / +++ (S)	- / ++ (R)	*Ica*A, *aap*, *atl*, *fbp*
5172/O2	O2	++ / ++	++ / +++ (R)	++ / +++ (S)	- / ++ (S)	*atl*E, *atl*, *fbp*
8591/P1	P1	+ / ++	++ / +++ (S)	++ / + (S)	- / ++ (R)	*aap*, *atl*E, *atl*, *fbp*
1639/P2	P2	-/ +++	+ / +++ (S)	+ / - (S)	+ / +++ (R)	*Ica*A, *aap*, *atl*E, *atl*, *fbp*
5112A/Q	Q	+ / +++	- / +++ (R)	+ / + (S)	+ / +++ (S)	*Ica*A, *atl*, *fbp*
5094/R	R	- / +++	+ / +++ (R)	- / +++ (S)	+ / +++ (R)	*Ica*A, *aap*, *atl*E, *atl*, *fbp*
627/S	S	+ /++	+ / +++ (R)	+ / +++ (S)	+ / ++ (R)	*atl*E, *atl*, *fbp*

Biofilm formation levels on polystyrene surface: absent (-), weakly (+), moderately (++), strongly (+++); Biofilm formation on surface of glass tubes: (-) absence of adherence, (+)weakly adherent bacteria appeared as a ring at the interface between the medium and the air, moderately (++) bacteria attached on the side walls of tubes, strongly (+++) bacteria attached on the side walls of the glass tubes and on the interface between the medium and the air) (Pereira *et al*, 2014); *Minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial agents of planktonic forms; R, resistant; I, intermediate; S, susceptible.

4 **DISCUSSÃO**

Staphylococcus spp. é considerado o agente etiológico mais frequente em casos de IRAS no Brasil e no mundo. A sua versatilidade em adquirir genes de virulência e de resistência lhes confere notória habilidade para desenvolver infecções de gravidades variáveis (ANVISA, 2016).

No presente estudo foi documentada a presença de *S. haemolyticus* frequentemente relacionadas às IRAS em neonatos internados na UTIN e de pacientes adultos internados em diversos setores de um hospital universitário localizado na região metropolitana do Rio de Janeiro. *S. haemolyticus* foram associados com quadros de infecções nosocomiais em pacientes que faziam uso de catéter.

A sepse neonatal é uma grave doença infecciosa que ocorre no período neonatal e está associado principalmente a funções imunes neonatais imaturas. Sepsis de início precoce ocorre dentro de 3 dias após o nascimento. A maioria dos agentes patogênicos derivam do canal parturiente da mãe e trato gastrointestinal, bactérias Gram-negativas são os agentes patogênicos mais freqüentemente detectados e os sintomas são normalmente graves. Em contraste, a sepse de início tardio ocorre 3 dias após o nascimento, com *Staphylococcus spp*. sendo os agentes patogênicos mais freqüentemente observados, representando 70,1% dos casos (DONG et al., 2017). Segundo a ANVISA (2016), o micro-organismo mais frequente com 34,6% foi SCN, seguido por 16,2% de *K. Pneumoniae* e 11,0% de *Candida* spp.

S. haemolyticus é o principal patógeno em países estrangeiros, que podem estar relacionados a diferenças geográficas. Atualmente, a aplicação extensiva de antibióticos poderia controlar rapidamente infecções ou prevenir sepse neonatal de forma limitada e abrangente, e induzir facilmente cepas altamente resistentes. *S. haemolyticus* exibem altas taxas de resistência a penicilina e eritromicina. Vancomicina é o antibiótico mais eficaz contra as bactérias gram positivas (DONG et al., 2017).

Segundo diversos autores, *S. haemolyticus* tem sido responsáveis por 5-38% dos casos de infecções causadas por SCN (TABE et al., 1998; RODRIGEZ et al., 2009; BARROS et al., 2015). Em estudo realizado em diversos departamentos de Hospital Universitário em Budapeste, Hungria (KRISTOF et al., 2011), cepas de *S. haemolyticus* de pulsotipos variados foram responsáveis por 6% do total dos casos de ICS e mostraram-se prevalentes em UTIs, principalmente na UTIN.

Patógenos nosocomiais podem permanecer viáveis ou persistirem em superfícies abióticas e bióticas por meses e, portanto, são fontes contínuas de transmissão em ambientes de atenção à saúde. Eliminação das fontes e transmissão dos patógenos nosocomiais continua sendo um desafio, particularmente em UTI e salas cirúrgicas em países em desenvolvimento. Procedimentos de limpeza incompletos para equipamentos e quartos facilitam a transmissão de bactérias MDR de um paciente para outro (COHEN et al., 1997; KIM et al., 2012; ZARGARAN et al., 2015).

O PFGE, método considerado padrão-ouro para caracterização de *Staphylococcus*, foi utilizado nesse estudo para a realização da investigação do perfil molecular dos isolados clínicos identificados como *S. haemolyticus*, objetivando verificar a clonalidade. Utilizamos o critério de interpretação estabelecido por VAN BELKUM e colaboradores (2007), o que revelou uma considerável diversidade genética dentro da população estudada, onde foram encontrados seis perfis clonais diferentes de *S. haemolyticus*, entre as 31 cepas investigadas de neonatos e 12 diferentes perfis clonais para as amostras de adultos, entras as 17 cepas estudadas. No HUPE/ UERJ, esfigmomanômetros contaminados e termômetros, que geralmente estão em contato direto com pacientes, mostraram em nossos resultados que os 6 tipos de PFGE das cepas de ORSH de fômites foram diferentes dos tipos de PFGE isolados de neonatos e adultos. De acordo com estudos anteriores, os perfis MDR podem não ser diretamente associada à resistência a oxacilina (TABE et al., 2001; PEREIRA et al., 2014), mas todas as cepas ORSH isoladas de fômites, independentemente dos seus tipos e subtipos de PFGE, foram caracterizadas como MDR, indicando disseminação da espécie nesta unidade hospitalar e a endemicidade em nossa comunidade.

Os dados indicam a capacidade de adaptação de *S. haemolyticus*, incluindo cepas MDR de ORSH, para circular entre diferentes setores neste hospital brasileiro de cuidados terciários. Em contraste com nossos achados, a maioria das cepas ORSH coreanas isoladas de cassetes de raios-X eram idênticas ou estreitamente relacionadas, de acordo com a análise de PFGE, sugerindo uma fonte comum de contaminação (KIM et al., 2012).

A maioria dos relatos na literatura sobre diversidade genômica de SCN descreve clones relacionados a surtos hospitalares (NUNES et al., 2005; SORLOZANO et al., 2009) ou relatam alta diversidade genômica das diferentes espécies (MIRAGAIA et al., 2008; BOUCHAMI et al., 2011).

Segundo BOUCHAMI et al. (2011), a caracterização molecular de *S. haemolyticus* tem demonstrado que as infecções em hospitais são causadas por um número limitado de tipos de

clones que têm a capacidade para persistir por vários anos em alas específicas, dado este confirmado em nosso estudo pelo tempo de coleta. Além disso, a disseminação geográfica de clones de *S. haemolyticus* multiresistentes foi observada. No entanto, apesar das altas frequências do *S. haemolyticus* multiresistentes, não se sabe se o mecanismo preferencial de disseminação de resistência a meticilina nesta espécie é através da transferência horizontal de SCC*mec* ou a disseminação de clones de *S. haemolyticus*, pois o papel desta espécie na evolução do SCC*mec* é desconhecida.

Até pouco tempo atrás, muitos laboratórios clínicos não realizavam a identificação dos SCN até o nível de espécie, porém, devido ao crescente envolvimento com bacteremias, especialmente em neonatos, indivíduos imunocomprometidos e pacientes com a utilização de catéteres e próteses, alterou essa conduta (CAIERÃO et al., 2006).

Sabe-se que, dentro de um único hospital, geralmente há um número limitado de cepas circulantes causando infecções hospitalares. Nos últimos anos, o MALDI-TOF se tornou um método importante para identificação de bactérias. Esta abordagem baseia-se na comparação do espectro de massa de um micro-organismo desconhecido com os espectros conhecidos de micro-organismos armazenados em base de dados. Isso resultou em uma acumulação de um grande número de espectros de diferentes micro-organismos (KORNIENKO et al., 2016).

Em nosso estudo, observamos a eficácia do método MALDI-TOFMS para identificação de *S. haemolyticus*. Segundo Lo CI (2015), *S. haemolyticus* estão entre as 10 bactérias mais comumente identificadas no laboratório do hospital principal de Dakar, representando 94,2% de todas as bactérias rotineiramente identificadas pelo MALDI-TOFMS.

A resistência múltipla aos antibióticos tem aumentado em SCN. Estes micro-organismos resistentes a meticilina (MRSCN) são encontrados em todo o mundo, e estão associados ao aumento da morbidade e mortalidade. Muitos componentes genéticos são responsáveis por essa resistência. A resistência de estafilococos à meticilina está associada à presença do gene *mec*A, responsável pela síntese de uma proteína de ligação à penicilina com afinidade menor às drogas beta-lactâmicas, a detecção do gene *mec*A por PCR é considerada o padrão-ouro para a detecção da resistência a oxacilina em *Staphylococcus* (STAPLETON; TAYLOR, 2002; BERGLUND; SÖDERQUIST, 2008; MARTÍNEZ-MELÉNDEZ et al., 2016). Foi possível constatar em uma amostra isolada de *S. haemolyticus* de neonato e uma de adulto que, apesar de as bactérias possuirem o gene *mec*A, provavelmente não houve expressão do mesmo, ou seja, a PBP2a não foi produzida. Tem sido observado que embora o gene *mec*A esteja presente nos estafilococos, alguns fatores podem interferir na expressão do gene, não sendo possível a detecção fenotípica

da resistência à oxacilina mediada pela PBP2a. Uma possível explicação pode ser a presença de um novo alotipo *mec*A, hiperprodução de beta-lactamase ou alteração em genes que codificam outras proteínas de ligação à penicilina. Além disso, a taxa de resistência aos antibióticos de macrólideos, lincosamida e estreptogramina entre os isolados clínicos de estafilococos aumentaram e podem conferir resistência cruzada a outros antimicrobianos (STAPLETON; TAYLOR, 2002; TEERAPUTON, S et al., 2017).

Em um estudo realizado na Tailândia, TEERAPUTON (2017), determinou a prevalência de espécies de SCN e suas resistências aos antimicrobianos isolados de pacientes hospitalares, onde foram 14 espécies de importância clínica. *S. haemolyticus* foi predominantemente encontrado especialmente nas infecções de corrente sanguínea, podendo ser ressaltada a alta prevalência e a importância deste micro-organismo no ambiente hospitalar. Além disso, as cepas de SCN também monstraram alta resistência a drogas antimicrobianas, como observado em *S. aureus*. A alta incidência de resistência à meticilina através da expressão do gene *mec*A foi detectada em 80,3% de *S. haemolyticus*. Em paralelo ao nosso estudo detectamos o gene *mec*A em 77,4% dos neonatos, 76,4% adultos e 33,3% das amostras isoladas de fômites. Segundo ZMANTER (2013), 65,5% das cepas de *Staphylococcus* estudadas que contem o gene *mec*A não apresentaram concordância com o método de disco-difusão para oxacilina. Acredita-se que a resistência a uma grande variedade de antimicrobianos esteja associada à presença de muitas sequências de inserção, que acumulam genes de resistência, no genoma de *S. haemolyticus*. Essa resistência também demonstra a importância desta espécie como um reservatório para o gene *mec*A (SZCZUKA, 2016). Neste estudo, apenas 10,0% das amostras de neonatos, 2,8% de adultos e 66,6% das amostras isoladas de fômites não apresentaram esta concordância. Segundo dados da ANVISA (2016), em UTIs de adulto, a resistência à oxacilina foi observada em 74,9% das amostras de SCN e 78,3% das amostras de SCN em UTIN, nossos dados também demonstram esta alta taxa de resistência a oxacilina com cepas de *S.haemolyticus*.

Alguns autores resssaltaram a importância do Laboratório Clínico distinguir entre as cepas de SCN oxacilina-sensíveis e oxacilina-resistentes para evitar o uso desnecessário da vancomicina nos hospitais. Conforme enfatizado em nossos estudos, o tratamento de escolha para as infecções causadas pelos SCN com frequência é a vancomicina. Devido à emergência de enterococos (BRADLEY et al., 1999) e estafilococos vancomicina-resistentes (HIRAMATSU, 1998; SIEVERT et al., 2002), a recomendação é reduzir o uso desta droga na terapia antimicrobiana (FERREIRA et al., 2003). O surgimento de cepas de SCN com

sensibilidade diminuída à vancomicina e teicoplanina tem sido relatado em instituições de saúde, podendo contribuir para o aumento da resistência a vários outros antimicrobianos. KRISTOF e colaboradores (2011) observaram uma incidência de 32% de sensibilidade reduzida a teicoplanina em cepas de *S. haemolyticus* desprovidas de genes *van*A ou *van*B. Embora todos os isolados de *S. haemolyicus* estudados fossem sensíveis à vancomicina, ressaltando a resistência intermediária de duas amostras isoladas, sendo uma de adulto e uma de neonato, é importante mencionar que o nível de CIM era alto (CIM: 4 mg - 8 mg), esses resultados são confirmados por outros autores em diferentes partes do mundo (BARROS et al., 2012; BECKER et al., 2014; HOSSEINKHANI et al., 2016).

Os glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina) estão sendo cada vez mais usados para tratar SCN multirresistente, mais comumente ocorrendo para *S. epidermidis* e *S. haemolyticus,* levando ao surgimento de cepas com susceptibilidade reduzida a essa classe de antimicrobianos. Em particular, a resistência a teicoplanina tem se tornardo mais comum do que a resistência a vancomicina em espécies de SCN. A heteroresistência à vancomicina em MRSH está aumentando no ambiente (BAKTHAVATCHALAM et al., 2017).

A heteroresistência aos glicopeptídeos é um fenômeno comum em *S. haemolyticus* meticilina resistente e raramente relatada em cepas meticilina sensíveis. BAKTHAVATCHALAM (2017) relatou o primeiro caso de *S. haemolyticus* sensível a meticilina e resistente a teicoplanina associada com sensibilidade reduzida a vancomicina, na Índia. Em nosso estudo, encontramos quatro amostras isoladas de neonatos (SH-24, SH-26, SH-33, SH-36) sensiveis a meticilina e resistentes a teicoplanina. A susceptibilidade reduzida à teicoplanina pode ocorrer sem uma redução na susceptibilidade à vancomicina como foi relatada em *S. aureus.* Além de *tca*RAB que expressa resistência a teicoplanina, superprodução de PBP2 ou redução na expressão de PBP4 resultam na resistência a teicoplanina.

Esta propensidade de *S. haemolyticus* multirresistente e seu potencial patogênico em pacientes imunocomprometidos enfatiza a importância da identificação a nível de espécie dos SCN e testes de rotina para vancomicina e teicoplanina.

Excelente bioviabilidade oral e penetração de tecidos fazem da linezolida uma melhor alternativa à vancomicina para tratar infecções complicadas da pele e tecido mole causadas pelo *Staphylococcus* resistente à meticilina. No entanto, a resistência a esta droga sintética tem sido cada vez mais relatada. A resistência a linezolida foi maior em cepas de *S. haemolyticus* isoladas de adultos do que as mencionadas em estudos anteriores realizados nos EUA, países europeus, China e Índia (HOSSEINKHANI et al., 2016; PINHEIRO et al., 2016; SZCZUKA et al., 2016).

Em nosso estudo, uma amostra de *S.haemolyticus* isolada de neonato e 12 amostras isoladas de adultos apresentaram resistência a linezolida.

Nos últimos anos, *S. haemolyticus* emergiu como um importante patógeno nosocomial, especialmente em pacientes imunocomprometidos, devido à facilidade na incorporação de diferentes genes de resistência aos antimicrobianos, favorecidos pelo meio de biofilme na troca de material genético. Este fator de virulência tem sido considerado um dos riscos mais significativos para os pacientes. A dificuldade de um tratamento clínico para infecções associadas a biofilmes tem conseqüências diretas e indiretas (hospitalização mais longa, custo de antibióticos e medicamentos complementares e procedimentos de diagnóstico) sobre o desfecho e qualidade de vida do paciente (MARTINI et al., 2016)

A propensão de *S. haemolyticus* adquirir resistência aos agentes antimicrobianos diversos e o potencial patogênico para indivíduos imunocomprometidos são aspectos que enfatizam a importância de criteriosa vigilância epidemiológica, identificação em nível de espécies e determinação de CIMs para SCN (KRISTOF et al., 2011). Em contraste com *S. epidermidis*, a base molecular da virulência de *S. haemolyticus*, em geral, inclusive no contexto de infecções associadas a dispositivos médicos invasivos, é em grande parte desconhecido. A formação de biofilme por *S. haemolyticus in vitro* tem sido relatada, mas os mecanismos moleculares envolvidos não foram elucidados. Microscopia confocal a laser indicou que a estrutura de biofilmes de *S. haemolyticus* claramente se difere daquela encontada em *S. epidermidis* (FREDHEIM et al., 2009).

A maioria das amostras de *S. haemolyticus* mostrou associação entre a produção de *slime*, multiresistência e resistência aos antimicrobianos indicando o potencial patogênico das mesmas no ambiente hospitalar. Nossos dados confirmam que o ambiente do biofilme parece ser favorável às transferências gênicas, uma vez que a população formada por cepas capazes de aderir à superfície do poliestireno apresentava maior índice de multiresistência.

FREEMAN et al. (1989) propuseram o ágar Vermelho do Congo, como método alternativo para detectar a produção de *slime* em SCN. No presente estudo, os ensaios usando o ágar Vermelho Congo demonstraram a produção de *slime* em 77,8% das cepas de SCN isoladas de neonatos e 33,3% de fômites. A maioria das cepas de SCN foram oxacilina resistentes e produtoras de polissacarídeos extracelulares (*slime*) em ágar vermelho Congo, correspondendo a 64,5% de cepas de *S. haemolyticus* de neonatos e 33,3% de fômites.

SERRAY (2016) usou para detectar a formação de biofilme o método da placa de poliestireno. O processo de desenvolvimento do biofilme requer a adesina polissacarídica

intercelular, que é sintetizada pela enzima codificada pelo grupo de adesão intercelular (*ica*). A expressão do *ica* é regulada por múltiplos genes, como *sigB*, *sar*, e o gene regulador acessório. Estes podem interagir uns aos outros e regular a formação de biofilmes. A presença do gene de adesão *ica* pode explicar o papel dos vários mecanismos de adesão na patogênese da infecção. No entanto, alguns estudos não encontraram associação entre a detecção do gene *ica* e a formação de biofilmes; A presença de genes *ica*A nem sempre foi associada à formação de biofilme *in vitro*. Nosso estudo mostrou que 32,2% das amostras de neonatos e 62,8% de adultos não mostram associação entre a presença do gene *ica* e a formação de biofilme *in vitro*. RUZICKA et al. demonstraram que 20% das cepas com genes *ica* não expressavam fenótipo. A ausência de biofilme, apesar da presença de *ica*, pode ser devido a várias razões, como a inativação do operon *ica* pela ação do repressor *ica*R, ou por regulação pós-transcrição. Além do que, uma cepa *ica*-positiva isolada de fômite não produziu biofilme em poliestireno. A produção de *slime* no meio ágar vermelho do Congo não foi observado para duas cepas *ica*-positivas demonstrando alto níveis de produção de biofilme em superfície de vidro e poliestireno. Nossos dados mostram que embora *ica*A e *ica*D desempenhem papéis significativos na formação de biofilmes, a presença do gene *ica*AD nem sempre se correlaciona com a formação de biofilme *in vitro*.

A análise do genoma para presença do fator de virulência mostrou que não havia o operon *ica*, que é crucial para a produção de biofilmes em espécies estafilocócicas. Vários fatores de virulência associados ao biofilme de *ica*-independentes, como a proteína de ligação ao fibrinogênio (fbe), a enzima de síntese de polissacarídeos capsulares (cap8D), virulência associada a parede celular ancorada a proteína (*sas*H), regulador acessório estafilocócico (*sar*A), dois componentes genéticos do sistema *arlRS* e o maior gene de autolisina *atl* foram encontrados na sequência de *S.haemolyticus* (BAKTHAVATCHALAM et al., 2017).

Em um estudo realizado por HONG J et al. (2016), o genoma completo contém 2.456 sequências codificadoras de proteínas, 19 genes rRNA e 59 genes de tRNA. A análise do genoma revelou que não havia operon *ica*, que tem sido relatado para desempenhar um papel importante na formação de biofilmes em espécies de *Staphylococcus*. Vários mecanismos *ica*-independentes para a formação de biofilmes, bem como genes relacionados, como *bap*, *sar*A, *agr*, *fnbp*s, *aap*, *dlt*, *arlRS*, e *atl*, tem sido relatados. Os reguladores globais agr e sarA, sistema de genes de dois componentes arlRS e a principal autolisina, o gene *atl*, foram encontrados na sequência de *S. haemolyticus* S167. Em nosso estudo, *atl* gene foram encontrados na maioria dos isolados clínicos de neonatos e adultos. Estes resultados de análise do genoma fornecem

uma base para estudos de mecanismos de biofilme de *ica*-independentes. No presente estudo, apenas 42%, 47% e 33% dos isolados MDR *S. haemolyticus* de neonatos, adultos e fômites, respectivamente, abrigaram o gene *ica*A. Os dados enfatizaram que a formação de biofilmes por algumas cepas de *S. haemolyticus* pode ser independente da presença do gene *ica*, então uma compreensão mais profunda dos mecanismos de formação de biofilmes poderia melhorar as estratégias de controle de biofilme e levar a menores custos médicos.

Uma ampla gama de proteínas de superfície com propriedades adesivas melhora a capacidade dos *Staphylococcus* sp. aderirem a diferentes superfícies. A proteína Bhp (proteína homóloga de Bap) e a autolisina / adesina AtlE (autolisina de *S. epidermidis*) medeiam a adesão inicial através de interações hidrofóbicas. Em nossos resultados, detectamos a presença do gene *atlE* em 39,0% das cepas de *S. haemolyticus* isolados de neonatos e 59,0% de adultos. Muitos isolados de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* carreiam o operon *ica*ADBC que codifica as proteínas envolvidas na síntese do exopolissacarídeo PIA, que conecta as células das bactérias no biofilme. O PIA juntamente com Embp, Bhp e Aap (proteínas associadas ao acúmulo) são responsáveis pela adesão e acumulação intercelular, permitindo a formação do biofilme. Neste estudo, a presença do gene *aap* foi associada com isolados produtores de biofilmes e esta associação pode ser explicada considerando as importantes funções da proteína Aap na adesão e agregação intercelular, permitindo a formação do biofilme. No estudo de SALGUEIRO (2017), isolados envolvendo a deficiência do operon *ica* em *S. epidermidis* identificaram a proteína Aap como a principal adesina responsável pelo biofilme composto principalmente por fatores proteináceos, o que podemos demonstrar em nosso estudo com os isolados de *S. haemolyticus*, explicando assim, que mesmo com a ausência do gene *ica* e com a presença do gene *aap* ocorre a produção de biofilme, apoiando o importante papel desse gene na formação de biofilmes *ica*-independentes.

A fibronectina é uma glicoproteína de alto peso molecular, e um componente da matriz extracelular que se liga às proteínas da membrana celular denominadas integrinas, mas também pode se ligar à fibrina e ao colágeno. Fibrinogênio é uma glicoproteína encontrada no plasma sanguíneo. O fibrinogênio desempenha um papel importante no processo de coagulação sanguínia, em que o fibrinogênio é transformado em sua forma insolúvel, fibrina. A proteína ligadora de fibrinogênio é um importante fator de virulência em infecções causadas por *Staphylococcus aureus*, pois não se liga apenas ao fibrinogênio, mas também pode interferir com a agregação de plaquetas e a cascata do complemento dentro do hospedeiro. SERRAY

(2016) detectou em seu estudo uma taxa de 5,66% do gene *fbp*, em nosso estudo este gene foi detectado em 87,0% das amostras neonatais e 97,1% das amostras de adultos.

A interação de bactérias com biomateriais tem sido sugerida como tendo um papel crucial no condicionamento do progresso dessas infecções nosocomiais severas. Para as espécies de estafilococos, duas explicações possíveis sobre a capacidade de colonizar materiais artificiais são a produção bacteriana de *slime* polissacarídico e a presença de adesinas para as proteínas da matriz do hospedeiro que, *in vivo*, são adsorvidas na superfície do biomaterial. A adesão bacteriana tem sido considerada como um fator de virulência que contribui para infecções associadas a catéteres e outros dispositivos médicos invasivos. Em nosso estudo, as cepas de neonatos e adultos foram coletadas de pacientes que faziam uso de catéteres, o que nos permitiu detectar a formação de um biofilme forte ou moderado, comparando com o estudo de SERRAY (2016) no qual 9,43% das cepas eram provenientes de catéteres, mostrando uma formação de biofilme forte ou moderada. Por outro lado, uma amostra ORSH *ica*AD-positiva (11SF / 9E3 / 06) isolada a partir de um fômite e que exibiu produção de *slime* em níveis médios e altos de biofilme em superfícies de vidro e poliestireno também foi capaz de produzir biofilme maduro com uma espessura e estrutura tridimensional complexa na superfície do catéter de poliuretano, mas apenas com pequenas quantidades de uma matrix extracelular.

Os isolados de sangue de neonatos e de adultos, e as amostras isoladas de fômites mostraram níveis diferentes de aderência e formação de biofilmes em superfícies abióticas hidrofóbicas (poliestireno) ou hidrofílicas (vidro), incluindo superfícies de catéter de poliuretano e silicone. Alguns isolados de sangue de adultos e / ou de neonatos não foram aderentes e não formaram biofilme na superfície de poliestireno. Independentemente dos tipos de PFGE, a formação de biofilmes em poliestireno e superfícies de vidro foi predominantemente detectada em cepas de *S. haemolyticus* isoladas de adultos. Nos ensaios de superfícies ao vidro, a maioria das cepas isoladas de neonatos e adultos foram classificadas como sendo fracamente (+) e fortemente (+++) aderentes, respectivamente.

Pouca informação está disponível na literatura sobre os efeitos de antibióticos na formação de biofilmes por *S. haemolyticus*. Vancomicina é um importante antibiótico anti-estafilocócico. As cepas OSSH e ORSH isoladas de neonatos e adultos cultivadas na presença de OXA, VAN, TEC, MXF, RIF, LZD e TGC foram capazes de produzir biofilme em superfícies de vidro e poliestireno. OXA e VAN foram incapazes de inibir a formação de biofilmes em superfícies abióticas por cepas de OSSH e ORSH *ica*A-positivas e *ica*A-negativas, incluindo uma cepa produtora de biofilme que não apresentou nenhum dos genes

(*ica*A, *atl*, *atl*E, *fbp*, *aap*) relacionado à produção de biofilme investigada neste estudo. Inesperadamente, a presença de OXA, VAN e LZD aumentaram a formação de biofilme nas superfícies de vidro e poliestireno na maioria das oportunidades.

Todas as cepas ORSH isoladas de fômites foram altamente sensível a vancomicina, a formação de biofilmes, produção de *slime*, e aderência ao plástico hidrofóbico (poliestireno) e superfícies hidrofílicas (vidro) foram analisadas na ausência de antibióticos e na presença de ¼ CIMs de vancomicina. Curiosamente, a formação de biofilme induzida por uma dose sub-letal de vancomicina por uma cepa de ORSH (1SF / 1BCG III / - PFGE tipo J) apenas em poliestireno, enquanto oxacilina facilitou a formação de biofilme em duas cepas ORSH, em ambas superfícies, de vidro (n = 1) ou de poliestireno (n = 2), independentemente da presença do gene *ica*AD. Vancomicina ou oxacilina foram semelhantes na maioria dos casos. Essas descobertas com cepas de ORSH suscetíveis a vancomicina foi semelhante ao observado anteriormente em estudos que examinam os efeitos das doses sub-letal de vancomicina e oxacilina em formação de biofilme por *S. aureus* resistente a vancomicina (VRSA) (ZULFIQAR et al., 2011).

O MEV tem como objetivo principal a vantagem da informação qualitativa sobre a estrutura do biofilme produzida, a observação de bactérias aderentes e a organização tridimensional do biofilme. Nossos dados de MEV mostraram *S. haemolyticus* (SH-9) com a produção de biofilmes maduros com espaços vazios em superfícies de catéter de poliuretano cultivadas na presença de ¼ CIM de VAN. A estrutura do biofilme foi característica de isolados fortemente aderentes que produziram uma camada espessa de matriz extracelular, como mostrado em outros estudos (BAILLIF et al., 2013; BARROS et al., 2015). Demonstramos que uma cepa de ORSH isolada de um fômite foi capaz de produzir um biofilme maduro na superfície de um catéter de poliuretano, desta forma consideramos que certos isolados ORSH sejam associados com a infecção de dispositivos médicos implantados.

As diferenças na formação de biofilmes, relacionadas com a presença de genes associados e mesmo entre métodos fenotípicos, podem ser devidas à influência de diferentes meios de cultura, pH, temperatura e pressão osmótica. As possíveis diferenças entre a formação de biofilmes *in vitro* e *in vivo* podem estar relacionadas a fatores como o estresse e as moléculas liberadas pelo sistema imune do hospedeiro (PINHEIRO et al., 2016).

Deste modo, estudos adicionais permanecem necessários para avaliar os processos multifatoriais de virulência que contribuem para a patogênese da sepse por *S. haemolyticus*. Avançar no conhecimento sobre a virulência, assim como a epidemiologia das infecções por essas bactérias no ambiente hospitalar e a evolução clínica dos pacientes são fatores

fundamentais, para que sejam elaborados diagnósticos mais acurados e se melhore a indicação de antimicrobianos específicos, subsidiando favoravelmente a decisão de tratamento das infecções. A capacidade desses micro-organismos ultrapassarem as barreiras hematológicas ainda é motivo de investigação, pois os mecanismos envolvidos neste processo de invasão ainda não foram esclarecidos.

CONCLUSÕES

A identificação e discriminação de *S. haemolyticus* são essenciais para a efetiva terapia antimicrobiana e são, também, fundamentais na vigilância, controle e prevenção de surtos de estafilococos resistentes aos antimicrobianos.

As cepas *de S. haemolyticus* apresentaram heterogeneidade na técnica de PFGE nas amostras isoladas de neonatos, adultos e fômites, onde foram detectadas a presença de seis diferentes tipos clonais de S. *haemolyticus* em neonatos e 12 tipos clonais nas amostras de adultos relacionados com quadros de bacteriemia, em pacientes que faziam uso de catéter, e 5 tipos clonais nas amostras isoladas de fômites, indicando assim a disseminação da espécie nesta unidade hospitalar e a endemicidade em nossa comunidade. Neste estudo, o subtipo B2 (neonatos) pareceu exibir um potencial de virulência mais expressivo que os demais pulsotipos de *S. haemolyticus*, uma vez que compreendeu cinco amostras de perfis fenotípicos e genotípicos homogêneos que incluíam todos os fatores de virulência avaliados.

Nas cepas estudadas podemos observar amostras ORSH que não carream o gene *mec*A, não sendo possível a detecção fenotípica da resistência à oxacilina, uma possível explicação seria a hiperprodução de beta-lactamase ou alteração em genes que codificam outras proteínas de ligação à penicilina.

Foram observadas amostras isoladas de neonatos e adultos apresentando perfil de resistência intermediária a vancomicina, ressaltando as altas taxas de resistência a linezolida que consequentemente aumentaram a produção de biofilme nas superfícies de vidro e poliestireno na maioria das oportunidades.

Os dados indicam diversidade na capacidade de produção de biofilme de *S. haemolyticus* e o envolvimento de outros fatores bacterianos e/ou ambientais que participam na expressão de *slime* e de produção de biofilme por esses patógenos, independentes dos perfis de resistência aos antimicrobianos.

A capacidade de produzir biofilme e a notória multirresistência aos agentes antimicrobianos, incluíndo glicopeptídeos, favorece *S. haemolyticus* como causador de infecções nosocomiais. As cepas estudadas mostraram diferentes níveis de aderência e formação de biofilme nas superfícies abióticas hidrofóbicas (poliestireno) ou hidrofílicas (vidro), não havendo correlação com o teste do ágar vermelho do Congo.

S. haemolyticus causa infecções relacionadas ao uso de catéter, particularmente em pacientes imunocomprometidos, incluindo neonatos. Todas as amostras estudadas foram capazes de aderir ao catéter de poliuretano e silicone nas condições experimentais utilizadas neste estudo.

Vancomicina e oxacilina não inibiram a formação de biofilme por cepas de ORSH suscetíveis a vancomicina em superfícies abióticas, inclusive na superfície do catéter, ressaltando que algumas amostras tiveram aumentado o nível de produção de bioflme na presença destes antimicrobianos. O aumento da formação de biofilme foi observada entra as amostras de *S. haemolyticus* estudadas, uma dose sub-letal de antibiótico induziu a formação de biofilme nas superficies de poliestireno e vidro, inclusive em uma cepa ORSH isolada de fômite em poliestireno. São necessários mais estudos para definir os papéis de diferentes componentes dos biofilmes de *S. haemolyticus* e como eles são regulados, particularmente na presença de agentes antimicrobianos.

Demonstramos em nosso estudo que os isolados de *S. haemolyticus* podem formar biofilme por via *ica*-independente, não havendo associação entre a detecção do gene *ica* e a formação de biofilme, envolvendo, então, outros genes neste processo, revelando que a formação de biofilme por *S. haemolyticus* é complexo e os mecanismos moleculares da formação de biofilme ainda não foram elucidados.

S. haemolyticus foi encontrado em fômites, ratificando que estes fômites estão servindo como fontes de transmissão e disseminação destes micro-organismos. Vale enfatizar a importância de mais estudos a respeito da contaminação dos fômites, e o alerta de ser dado uma maior atenção a estes dentro do hospital, já que os micro-organismos aderidos aos mesmos, possuem perfis de multirresistência semelhantes aos dos isolados a partir de hemoculturas, podendo indicar uma participação destas cepas em infecções nosocomiais.

Neste estudo não foi possível correlacionar a resistência e a aderência com as cepas testadas e os setores hospitalares, pois *S. haemolyticus* é um patógeno nosocomial MDR mundial emergente e o fato de que diferentes clones resistentes à oxacilina contaminam fômites pode ser responsáveis por surtos nosocomiais, particularmente em UTIs e salas cirúrgicas.

REFERÊNCIAS

ABADI, M.I.M. et al. Molecular Characteristics of Nasal Carriage Methicillin Resistant Coagulase Negative Staphylococci in School Students. *Jundishapur J Microbiol*, v. 8, n.6, p. 185-191, 2015.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA (Brasil). Portaria nº 2.616, de 12 de maio de 1998. Estabelece as diretrizes e normas para a prevenção e controle das infecções hospitalares. Diário Oficial da União, Brasília-DF, 13 maio, 1998. Disponível em http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1998.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA- ANVISA (Brasil). *Descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos*. Módulo IV, 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 20 out. 2015.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA- ANVISA (Brasil). Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 14: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2016. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 05 ago. 2017.

ANTUNES, A.L.S. et al. High vancomycin resistance among biofilms produced by *Staphylococcus* species isolated from central venous catheters. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, v.106 , n.1, 2011.

BAKTHAVATCHALAM, I.D. et al. Methicillin susceptible teicoplanin resistant *Staphylococcus haemolyticus* from bloodstream infection: Novel mutation in teicoplanin resistant operon (*tcaRAB*). *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 2017.

BARROS, E.M. et al. Species-level identifications of clinical staphylococcal isolates based on polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a partial *gro*EL gene sequence. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v.59, p. 251-257, 2007.

BARROS, E.M. et al. *Staphylococcus haemolyticus* as an Important Hospital Pathogen and Carrier of Methicillin Resistance Genes. J Clin Microbiol, v. 50, n. 1, p. 166-168, 2012.

BARROS, E.M. et al. Phenotypic and Genotypic Characterization of Biofilm Formation in Staphylococcus haemolyticus. *Curr Microbiol* ,v.70, p.829–834, 2015.

BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. Coagulase-Negative Staphylococci. *Clin Microbiol Rev*,v. 27, n.4, p. 870–926, 2014.

BERGLUND, C.; SÖDERQUIST, B. The origin of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate at a neonatal ward in Sweden-possible horizontal transfer of a staphylococcalcassette chromosome *mec* between methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect*, v.14, n.11, p. 1048-1056, 2008.

BERNARDI, A.C.A.; PIZZOLITTO, E.L.; PIZZOLITTO, A.C. Identificação de cocos aeróbios Gram-positivos, catalase positiva com implicação em processos infecciosos. *Rev Ciênc Farm*, v.22, p. 223-238, 2005.

BJÖRKQVIST, M. et al. Phenotypic and genotypic characterization of blood isolates of coagulase-negative staphylococci in the newborn. APMIS, v. 110, p. 332-339, 2002.

BOTELHO, A.M. et al. Characterization of Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from hospital indoor air and a comparative analysis between airborne and inpatient isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *J Med Microbiol*, 2012.

BOUCHAMI, O. et al. Antibiotic resistance and molecular characterization of clinical isolates of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci isolated from bacteremia patients in oncohematology. *Folia Microbiol* , v.56, p.122–130, 2011.

BRADLEY, S.J. et al. The control of hyperendemic glycopeptide-resistant *Enterococcus* spp. on a hematology unit by changing antibiotic usage. *J Antimicrob Chemoter* ,v.43, p.261-266, 1999.

BRENNAN, S.A. et al. Tourniquets and exsanguinators: a potential source of infection in the orthopedic operating theater? *Acta Orthopaedica*, v.80, p.251-255, 2009.

BRITO, D.D. et al. Outbreaks associated to bloodstream infection with Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococcus spp in premature neonates in a University Hospital from Brazil. *J Bras Microbiol* , v.37, p.101-107, 2006.

CAMPOS-PEÑA, E. et al**.** Multiplex PCR Assay for Identification of Six Different *Staphylococcus* spp. and Simultaneous Detection of Methicillin and Mupirocin Resistance. *J Clin Microbiol, v.*52, n.7, p. 2698–2701, 2014.

CARDUCCI, A. et al. Detection and potential indicators of the presence of hepatitis C virus on surfaces in hospital settings. *Lett Appl Microbiol* , v.34, n.3, p. 189-193, 2002.

CASEY, A.L.; LAMBERT, P.A.; ELLIOTT, T.S. *Staphylococci*. *Int J Antimicrob Agents* , v.29, p.23-32, 2007.

CAVANAGH, J.P. et al. Whole-genome sequencing reveals clonal expansion of multiresistant Staphylococcus haemolyticus in European hospitals. *J Antimicrob Chemother*, v. 69, p. 2920–2927, 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC (2016). Disponível em: <www.cdc.gov/ncidod/healthDis.htl>. Acesso em: 14 out. 2016.

CHAMON, R.C. et al. Linezolid-resistant *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus hominis*: single and double mutations at the domain V of 23S rRNA among isolates from a Rio de Janeiro hospital. *Diag Microbiol Infec Dis*, v.80, p. 307–310, 2014.

CIDRAL, T.A. Resistência à linezolida em estafilococos coagulase negativos resistentes à meticilina provenientes de hospitais da cidade de Natal-RN. 2016. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Biologia Parasitária. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI:. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 24 informational supplement 2016, M100-S24.Wayne, PA.

COHEN, H.A. et al. Steth- oscopes and otoscopes – a potential vector of infection? *Family Pract*, v.14, n.6, p. 446-449, 1997.

COUTO, R.C.; PEDROSA, T.M.G. Infecção relacionada à assistência (infecção hospitalar) e outras complicações não infecciosas. 3. ed. MedBook: Rio de Janeiro, 2012.

DONG, H.; CAO, H.; ZHENG, H. Pathogenic bacteria distributions and drug resistance analysis in 96 cases of neonatal sepsis. *BMC Pediatrics, v.*17, p.44, 2017.

FALCONE, M. et al. Teicoplanin use and emergence of *Staphylococcus haemolyticus*: is there a link? *Clin Microbiol Infect*, v. 12, p.96-97, 2006.

FELIX JUNIOR, L.F. Infecção por *Staphylococcus aureus* resistência a oxacilina: revisão da literatura. *Especialização em Pediatria*, Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, Brasília, 2007.

FERREIRA, R.B.R. et al. Coagulase-negative staphylococci: comparison of phenotypic and genotypic oxacillin susceptibility tests and evaluation of the agar screening test by using different concentrations of oxacillin. *J Clin Microbiol*, v.41, p. 3609-3614, 2003.

FERREIRA, J.J. et al. Notificação de Infecções em Unidade Neonatal com Critérios Nacionais - Notification of Infections in a Neonatal Unity Based on National Criteria. *Rev Epidemiol Control Infect, v.*3, n.3, p. 75-81, 2013.

FEY, P.D.; OLSON, M.E. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis. Future Microbiol* , v.5, n.6, p. 917–933, 2010.

FITZPATRICK, F.; HUMPHREYS, H.; O'GARA, J.P. Evidence for *icaADBC*-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Clin Microbiol, v.* 43, p.1973-1976, 2005.

FOKA, A. et al. Clonality of slime-producing methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci disseminated in the neonatal intensive care unit of a university hospital. *Clin Microbiol Infect* , v.12, p.1230-1233, 2006.

FREDHEIM, E.G.A. et al. Biofilm Formation by *Staphylococcus haemolyticus. J Clin Microbiol, v.* 47, n.4, p. 1172–1180, 2009.

FREEMAN, J. et al. Birth weight and length of stay as determinants of nosocomial coagulasenegative staphylococcal bacteremia in neonatal intensive care unit populations: potential for confounding. *Am J Epidemiol, v.* 132, n.6, p.1130-1140, 1989.

FREITAS, A.P.C.B. et al. Brinquedos em uma brinquedoteca: um perigo real. *Rev Bras Anal Clin, v.* 39, p. 291-294, 2007.

GALLIMORE, C.I. et al. Asymptomatic and symptomatic excretion of noroviruses during a hospital outbreak of gastroenteritis. *J Clin Microbiol, v.* 42, n.5, p. 2271-2274, 2004.

GHADA EL-SAEED MASHALY AND RASHA HASSAN EL-MAHDY. Vancomycin heteroresistance in coagulase negative *Staphylococcus* blood stream infections from patients of intensive care units in Mansoura University Hospitals, Egypt. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, p.16-63, 2017.

HANSSEN, A.M. et al. Dissemination of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in northern Norway: sequence types 8 and 80 predominate. *J Clin Microbiol*, v. 43, p.2118-2124, 2005.

HERNÀNDEZ, B.D. et al. Production of icaADBC-enconded polysaccharide intercellular adhesion and therapeutic failure in pediatric patients with staphylococcal device-related infections. *BMC Infectious Diseases, v.* 10, n.68, 2010.

HIRAMATSU, K. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother, v.* 40, n.1, p.135-136, 1998.

HIRAMATSU, K. et al. Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol, v.* 292, p. 67-74, 2002.

HONG, J. et al. Complete Genome Sequence of Biofilm-Forming Strain *Staphylococcus haemolyticus* S167. *Genome Announcements, v.* 4, n.3, 2016.

HOSSEINKHANI, F. et al. Variable number of tandem repeat profiles and antimicrobial resistance patterns of Staphylococcus haemolyticus strains isolated from blood cultures in children. *Infection, Genetics and Evolution* , v.38, p. 19–21, 2016.

ING, M.B.; BADDOUR, L.M.; BAYER, A.S. Bacteremia and infective endocarditis: pathogenesis, diagnosis, and complications. *In* Crossley KB and Archer GL (ed.), The staphylococci in human disease, p. 331-354, 1997.

INTERNATIONAL WORKING GROUP OF THE CLASSIFICATION OS STAPHYLOCOCCAL CASSETTE CHROMOSOME ELEMENTS (IWG-SCC). Classification of Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. *Antimicrob Agents Chemother, v.* 53, p.4961-4967, 2009.

INTERNATIONAL WORKING GROUP OF THE CLASSIFICATION OS STAPHYLOCOCCAL CASSETTE CHROMOSOME ELEMENTS (IWG-SCC). Disponível em: <www.sccmec.org>. Acesso em: 05 jun. 2017.

JIANG, S. Whole genome sequence of *Staphylococcus hominis*, an opportunistic pathogen. J BACTERIOL, v.194, n.17, p. 4761-4762, 2012.

KAISER, T.D.L. et al. Avaliação de métodos comumente usados em laboratórios para a determinação de suscetibilidade à oxacilina entre amostras de *Staphylococcus* sp., isoladas de um hospital de Vitória, Estado do Espírito Santo. *Rev Soc Bras Med Trop, v.* 43, n.3, p. 298-303, 2010.

KEIN, L.S. Mapeamento dos estafilococos coagulase negativo no hospital universitário Antônio Pedro da universidade federal fluminense, no período de 1998 a 2002. Dissertação (Mestrado) - Nitéroi, 2005.

KEIM, L.S. et al. Prevalence, etiology and antibiotic resistance profiles of coagulase negative staphylococci isolated in a teaching hospital. *Braz J Microbiol, v.* 42, p. 248-255, 2012.

KIM, J.S. et al. Contamination of X-ray cassettes with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* in a radiology department. *Annals of Laboratory Medicine*, v.32, p. 206-209, 2012.

KOGAN, G. et al. Biofilms of clinical strains of *Staphylococcus* that do not contain polysaccharide intercellular adhesin. *FEMS Microbiol Lett, v.* 255, p.11-16, 2006.

KONEMAN, E.W. et al. Diagnóstico Microbiológico.Texto e Atlas colorido. Editora Guanabara Koogan RJ, 5ºedição, cap: 11, p. 552-567, 2008.

KORNIENKO, M. et al. Analysis of nosocomial Staphylococcus haemolyticus by MLST and MALDI-TOF mass spectrometry. *Infect Genetics and Evolution* , v.39, p. 99–105, 2016.

KLINGENBERG, C. et al. Persistent strains of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: virulence factors and invasiveness. *Clin Microbiol Infect, v.*13, p.100-111, 2007.

KLOOS, W.E. Taxonomy and Systematic of Staphylococci Indigenous to Humans. In: Crossey, K.B, Archer, L.G, editors. The Staphylococci in Human Disease. New York: Churchill Livingstone, p. 113-137, 1997.

KRISTOF, K.; KOCSIS, E.; STABO, D. Significance of methicillin-teicoplanin resistant *Staphylococcus haemolyticus* in bloodstream infections in patients of the Semmelweis University hospitals in Hungary. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis, v.* 30, p. 691-699, 2011.

KRZYMINSKA, S. et al. Virulence and the presence of aminoglycoside resistance genes of Staphylococcus haemolyticus strains isolated from clinical specimens. *Antonie van Leeuwenhoek, v.*107, p.857–868, 2015.

KUMARI, N. et al. Coagulase negative *Staphylococci* as causative agents of urinary tract infections-prevalence and resistance status in IGIMS, Patna. *Indian J Pathol Microbiol, v.* 44, p. 415-419, 2001.

LAVERTY, G.; GORMAN, S.P.; GILMORE, B.F. Biomolecular mechanisms of staphylococcal biofilm formation. *Future Microbiology*, v.8, n.4, p. 509-524, 2014.

LINHARDT, F. et al. Pulsed-field gel electrophoresis of genomic restriction fragments as a tool for the epidemiological analysis of Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci. *FEMS Microbiol Lett,* v.74, p.181-185, 1992.

Lo CI. et al. MALDI-TOF Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Clinical Microbiology at Hôpital Principal de Dakar, Senegal (West Africa). *PLoS ONE,* v.10, n.12, 2015.

LPSN – List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Disponível em: <http://www.bacterio.net/staphylococcus.html>. Acesso em: 20 nov. 2017.

MARQUES, P.B.; FERREIRA, A.P.; CARNEIRO, F.M.C. Perfil bacteriano de cultura de ponta de cateter venoso central. *Rev Pan-Amaz Saúde,* v. 2, n.1, p.53-58, 2011.

MARTINI, R. et al. Investigation of biofilm formation in coagulase-negative staphylococci isolated from platelet concentrate bags. *Ver Inst Med Trop,* v. 58, n.1, 2016.

MARTÍNEZ-MELÉNDEZ, A. et al. Molecular epidemiology of coagulase-negative bloodstream isolates: detection of Staphylococcus epidermidis ST2, ST7 and linezolid-resistant ST23. *Braz j infect dis,* v.20, n.5, p.419–428, 2016.

MASUNARI, A.; TAVARES, L.C. Síntese e determinação de atividade antimicrobiana de derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos frente a *Staphylococcus aureus* multirresistentes. *Rev Bras Cienc Farm, v.* 42, n.3, 2006.

MCDOUGAL, L.K. et al. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J Clin Microbiol,* v. 41, p.5113-5120, 2003.

MERLIN, M.A. et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the stethoscopes of emergency medical services providers. *Prehospital Emergency Care,* v.13, p. 71-74, 2009.

MESQUITA, A.L. et al. Impacto da contaminação bacteriana em fômites e mãos de estudantes de medicina. *RESU, v.* 4, n.1, p. 47, 2016.

MIRAGAIA, M. et al. Molecular characterization of methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis clones: evidence of geographic dissemination. *J Clin Microbiol,* v. 40, p.430-438, 2002.

MIRAGAIA, M. et al. Comparison of molecular typing methods for characterization of *Staphylococcus epidermidis*: proposal for clone definition. *J Clin Microbiol* , v.46, n.1, p.118-129, 2008.

MONSEN, T.; KARLSSON, C.; WISTROM, J. Spread of clones of multidrug-resistant, coagulase-negative staphylococci within a university hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol,* v.26, p.76-80, 2005.

NEUMEISTER, B. et al. Characterization of coagulase-negative *Staphylococci* causing nosocomial infections in preterm infants. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v.14, p.856-863, 1995.

NUNES, A.P.F. et al. Genomic characterization of oxacillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* isolated from Brazilian medical centers. *J Hosp Infect*; v.59, p.19-26, 2005.

NWANKWO, E. Isolation of pathogenic bacteria from fomites in the operating rooms of a specialist hospital in Kano, North-western Nigeria. *The Pan African Medical Journal*, v.12, n. 90, 2012.

NYSTROM, B. et al. Colonization with coagulase-negative staphylococci in two neonatal units. *J Hosp Infect*, v. 22, p.287-298, 1992.

OLIVEIRA, A.; CUNHA, M. L. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. *BMC Res Notes*, v.3, p.260-266, 2010.

OLIVEIRA, A. Biofilme estafilocócico: prevenção, detecção da produção e determinação do perfil de resistência a antimicrobianos. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

OLIVEIRA, A. Antimicrobial Resistance Profile of Planktonic and Biofilm Cells of Staphylococcus aureus and Coagulase-Negative Staphylococci. *Int J Mol Sci*, v.17, p.1423, 2016.

PARK, S. Characterization of the structure and biological functions of a capsular polysaccharide produced by *Staphylococcus saprophyticus*. *J Bacteriol*, v. 192, n.18, p.4618-4626, 2010.

PEREIRA, E.M. A brazilian lineage of *Staphylococcus lugdunensis* presenting rough colony morphology may adhere to and invade lung epitelial cells. *J Med Microbiol*, v.61, p. 463-469, 2012.

PEREIRA, P.M.A. et al. *Staphylococcus haemolyticus* disseminated among neonates with bacteremia in a neonatal intensive care unit in Rio de Janeiro, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v.78, n.1, p. 85-92, 2014.

PHILLIPS, W.R. Letters correspondence - Antimicrobial stewardship by family physicians. *Canadian Family Physician/Le Médecin de famille canadien*, v. 64, 2018.

PINHEIRO, L. et al. Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus haemolyticus: detection of biofilm genes and biofilm formation in blood culture isolates from patients in a Brazilian teaching hospital. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 86, p.11–14, 2016.

PODKOWIK, M. et al. Enterotoxigenic potential of coagulase-negative Staphylococci. *Int J Food Microbiol*, v.163, p.34-40, 2013.

RAJAN, V.; PRAKASH, P.H.; GOPAL, S. Letter to the Editor - Occurrence of linezolid-resistant *Staphylococcus haemolyticus* in two tertiary care hospitals in Mysuru. *J Global Antimicrobiol Res*, v. 8, p.140–141, 2017.

RAMANI, S.R. et al. Investigation of the environment and of mothers in transmission of rotavirus infections in the neonatal nursery. *J Med Virol*, v. 80, n.6, p.1099-1105, 2008.

RODRIGEZ-ARANDA, A. et al. Nosocomial spread of linezolid-resistant *Staphylococcus haemolyticus* infections in na intensive care unit. *Diagn Microbiol Infect Dis, v.* 63**,** p.398-402, 2009.

ROGERS, K.L.; FEY, P.D.; RUPP, M.E. Coagulase negative staphylococcal infections. *Infect Dis Clin North Am*, v. 23, n.1, p.73-98, 2009.

SADER, H.S. et al. Antimicrobial activity of ceftaroline and comparator agents when tested against numerous species of coagulase-negative Staphylococcus causing infection in US hospitals. *Clin Microbiol and Infect, v.* 85, n.1, p.80-84, 2016.

SALGUEIRO, V.C. et al. **S**taphylococcal Cassette Chromosome mec Elements in Methicillin-Resistant Coagulase Negative Staphylococci from a Brazilian Neonatal Care Unit. *Pediatr Infect Dis J*, v. 33, n.10, p.1089-1090, 2014.

SALGUEIRO, V.C. et al. Methicillin resistance and virulence genes in invasive and nasal Staphylococcus epidermidis isolates from neonates. *BMC Microbiology*, v.17, p.15, 2017.

SCHITO, G.C. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol and Infect*, v. 12, n.1, p. 3-8, 2006.

SCHLAG, M. et al. Role of staphylococcal wall teichoic acid in targeting the major autolysin Atl. *Mol Microbiol*, v.75, n.4, p. 864-873. 2010.

SERRAY, B. et al. Genes encoding adhesion factors and biofilm formation in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Morocco. *J Infect Dev Ctries*, v.10, n.8, p.863-886, 2016.

SHITTU, A.O. et al. The discovery of a multi-resistant Staphylococcus haemolyticus clone in the hospital and community environment in south western Nigeria. *Ostomy Wound Manage*, v. 51, p.67-70, 2005.

SIEVERT, D.M. et al. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin-United States 2002. *Morb Mortal Wkly Rep*, p. 565-567, 2002.

SILVEIRA, G.P. et al. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. *Química Nova*, v. 29, n.4, p. 844-855, 2006.

SOARES, L.C. et al. Caracterização fenotípica da resistência a antimicrobianos e detecção do gene *mec*A em *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos isolados de amostras animais e humanas. *Cienc Rur, v.*38, n.5, p.1346-1350, 2008.

SORLOZANO, A. et al. Detection of new mutations conferring resistance to linezolid in glycopeptide-intermediate susceptibility *Staphylococcus hominis* subspecies *hominis* circulating in an intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2009.

STAPLETON, P.D.; TAYLOR, P.W. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. *Sci Prog, v.* 85, n.1, p. 57-72, 2002.

STEWART, P.S.; FRANKLIN, M.J. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbio*l, v. 6, n.3, p. 199–210, 2008.

SZCZUKA, E.; GRABSKA, K.; KAZNOWSKI, A. In Vitro Activity of Rifampicin Combined with Daptomycin or Tigecycline on Staphylococcus haemolyticus Biofilms. *Curr Microbiol,* v. 71, p.184–189, 2015.

SZCZUKA, E. et al. Diversity of staphylococcal cassette chromosome *mec* elements in nosocomial multiresistant Staphylococcus haemolyticus isolates. *J Appl Genetics,* Published online, 2016.

SUED, B.P.R. et al. Sphygmomanometers and thermometers as potential fomites of *Staphylococcus haemolyticus*: biofilm formation in the presence of antibiotics. *Mem Inst Oswaldo Cruz, v.* 112, n.3, p. 188-195, 2017.

TABE, Y. et al. Molecular characterization of epidemic multiresistant *Staphylococcus haemolyticus* isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 32, p.177-183, 1998.

TABE, Y.; NAKAMURA, A.; IGARI, J. Glycopeptide susceptibility profiles of nosocomial multiresistant *Staphylococcus haemolyticus* isolates. *J Infect Chemother, v.*7 n.3, p. 142-147, 2001.

TALEBI, M. et al. Pourshafie. Genotypic Diversity of Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Inpatients and Outpatients. *Microbial Drug Resistance*, 2015**.**

TAVARES, W. Antibióticos e quimioterápicos para o clínico. 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2009.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol, v.* 18, n.6, p.426-439, 1997.

TERASAWA, L.B. Caracterização da resistência à oxacilina em estafilococos coagulase negativa isolados no Hospital das Clínicas de Curitiba – Paraná. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, 2006.

TEERAPUTON, S. et al. Prevalence of methicillin resistance and macrolide–lincosamide–streptogramin B resistance in Staphylococcus haemolyticus among clinical strains at a tertiary-care hospital in Thailand. *New Microbe and New Infect*, v.19, p. 28–33, 2017.

TOLDOS, C.M. et al. Assement of multiple coagulase-negative staphylococci isolated in blood cultures using pulsed-field gel electrophoresis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v.16, n.8, p. 581-586, 1997.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L.O. Microbiologia. 8. ed. São Paulo: Artmed, 2005.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 4ª edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

TUO, P. et al. Nosocomial infection caused by multiresistant *Staphylococci* in a neonatal and pediatric intensive care unit. *Pediatr Med Chir, v.* 17, p. 117-122, 1995.

VAN BELKUM, A.; European Society Of Clinical Microbiology And Infectious Diseases (Escmid) Study Group On Epidemiological Markers (Esgem). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect, v.*13, n.3, p.1-46, 2007.

VORONINA, O.L. et al. Development of *Staphylococcus haemolyticus* multilocus sequencing scheme and its use for molecular-epidemiologic analysis of strains isolated in hospitals in Russian federation in 2009-2010. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, v.5, p. 62-67, 2011.

WEISSER, M. et al. Hypervariability of biofilm formation and oxacilina resistance in a *Staphylococcus epidermidis* strain causing persistent severe infection in a imunocompromised patient. *J Clin Microbiol*, v.48, n.7, p. 2407-2412, 2010.

WOLFE, D.F. et al. Bacterial colonization of respiratory therapists' pens in the intensive care unit. *Respiratory Care*, v. 54, p.500-503, 2009.

ZAIDI, A.K. et al. Pathogens associated with sepsis in newborns and young infants in developingcountries. *Pediatr Infect Dis J*, v.28, n.1, p. S10-18, 2009.

ZARGARAN, D. et al. Sphygmomanometer cuffs: a potential source of infection! *Angi-ology*, v. 66, n.2, p. 118-121, 2015.

ZMANTAR. et al. Molecular investigation of antibiotic resistance genes in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from nasal cavity in pediatric service Tarek**.** *African J Microbiol Research*, v. 7, n.34, p. 4414-4421, 2013.

ZULFIQAR, A.; MIRANI, Z.A.; JAMIL, N. Effect of sub-lethal doses of van- comycin and oxacillin on biofilm formation by vancomycin in- termediate resistant *Staphylococcus aureus*. *J Basic Microbiol*, v. 51, n.2, p. 191-195, 2011.

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética**:**

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESOUISA

Rio de Janeiro, 21 de maio de 2010

Do: Comitê de Ética em Pesquisa
Prof.: Wille Oigman
Para: Aut. Paula Marcele. A. Pereira – Orient. Profa. Ana Luiza M. Guaraldi / PG-FCM

Registro CEP/HUPE: 2673(este número deverá ser citado nas correspondências referentes ao projeto)
CAAE: 0118.0.228.000-10

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto, "ESTUDO DE ASPECTOS FENOTÍPICO E GENOTÍPICO DE STAPHYLOCOCCUS COAGULASE NEGATIVO E SUAS IMPLICAÇÕES EM INFECÇÕES NOSOCOMIAIS" aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde.

O pesquisador deverá informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética solicita a V. Sª., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

Dr. Wille Oigman
Coordenador Clínica Médica
CRM 52-22409-7
(21) 2587-6631

Prof. Wille Oigman
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa

CEP - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
AV. VINTE E OITO DE SETEMBRO, 77 TÉRREO - VILA ISABEL - CEP 20551-030
TEL: 21 2587-6353 – FAX: 21 2264-0853 - E-mail: cep-hupe@uerj.br

ANEXO B - Produção Científica Durante o Período de Realização do Doutorado

1. Pereira PMA, Sued-Karam BR, Faria YV, Nogueira BA, Colpdette SS, Duarte JLMB, Castro EA, Hirata Jr R, Pereira JAA; Mattos-Guaraldi AL. Influence of antibiotics on biofilm formation by different clones of nosocomial multidrug-resistant *Staphylococcus haemolyticus* from catheter-related infections. (Submetido para publicação – Diagnostic Microbiology and Infectious Disease), 2018.

2. Nogueira BA, Olivella JGB, Sued BPR, Pereira PMA, Gonçalves VD, Cataldo M, Meirelles-Pereira F, Andrade AFB, Mattos-Guaraldi AL, Pereira JAA. Dissemination of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-producing Enterobacteriaceae in a lagoon complex. (Submetido para publicação - Marine freshwater research), 2018.

3. Nogueira BA, Olivella JGB, Sued BPR, Pereira PMA, Gonçalves VD, Cataldo M, Meirelles-Pereira F, Ignácio ACR, Pereira JAA, Bello AR, Hirata R Jra, Mattos-Guaraldi AL. Multidrug-resistance and virulence potential of Escherichia coli isolated from a lagoon complex in a metropolitan area of a developing country. (Submetido para publicação -Journal of pathogens), 2018.

4. Sued BPR, Pereira PMA, Faria YV, Ramos JN, Binatti VB, Santos KRN, Seabra SH, Hirata Jr R, Vieira VV, Mattos-Guaraldi AL, Pereira JAA. Sphygmomanometers and thermometers as potential fomites of *Staphylococcus haemolyticus*: biofilm formation in the presence of antibiotics. Mem Inst Oswaldo Cruz 2017; 1-8.

5. Binatti VB, Pereira PMA, Ribeiro BSP, Ribeiro de Castro EA, Pereira AM, Bello A, Leão RS, Marques EA and Pereira JAA. *In vitro* adherence of coagulase-negative *staphylococcus* strains in catheters of different material composition. International Journal of Microbiology Research; 7 (4): 671-675, 2015.

6. Pereira PMA, Binatti VB, Sued BPR, Ramos JN, Peixoto RS, Simões C, Castro EA, Duarte JLMB, Vieira VV, Hirata Jr R, Santos KRN, Mattos-Guaraldi AL, Pereira JAA. *Staphylococcus haemolyticus* disseminated among neonates with bacteremia: phenotypic and molecular characterization of isolates from a neonatal intensive care unit in Rio de Janeiro, Brazil. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2014; 78: 85–92.

7. Ramos JN, dos Santos LS, Vidal LMR, Pereira PMA, Salgado AA, Fortes CQ, Vieira VV, Mattos-Guaraldi AL, Júnior RH, Damasco PV. A case report and literature overviw: Abiotrophia defectiva aortic valve endocarditis indeveloping countries. Infection; 42: 579-584, 2014.