



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Bruna Pinto Ribeiro Sued

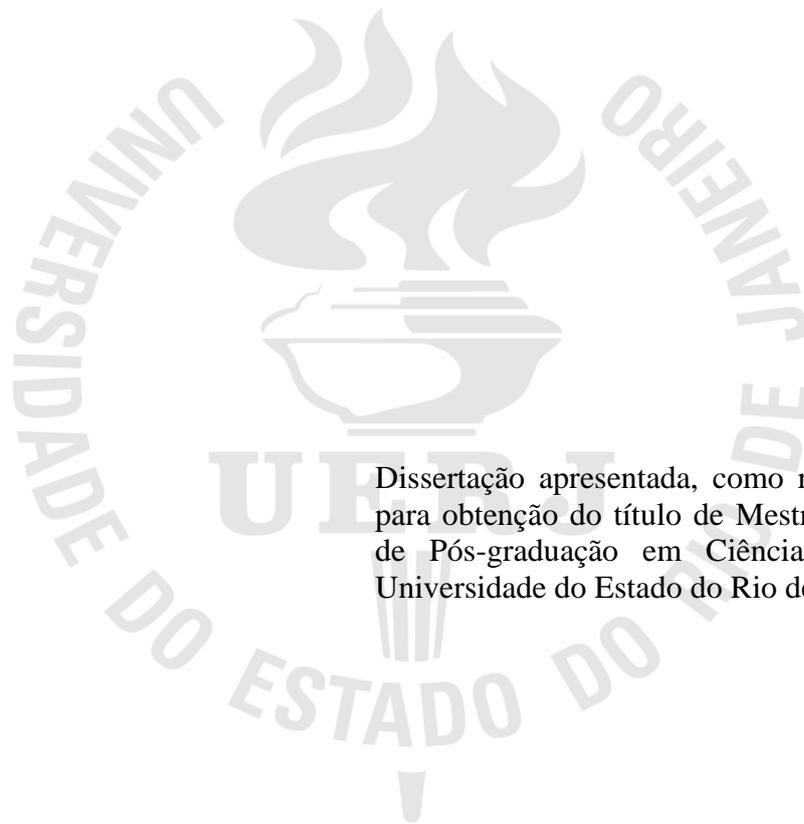
***Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus epidermidis* isolados de
fômites de origem hospitalar: perfis de resistência aos agentes
antimicrobianos e produção de biofilme**

Rio de Janeiro

2014

Bruna Pinto Ribeiro Sued

***Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus epidermidis* isolados de fômites de origem hospitalar: perfis de resistência aos agentes antimicrobianos e produção de biofilme**



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ana Luíza de Mattos Guaraldi

Coorientador: Prof. Dr. José Augusto Adler Pereira

Rio de Janeiro

2014

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

S944 Sued, Bruna Pinto Ribeiro.

Staphylococcus haemolyticus e Staphylococcus epidermidis isolados de fômites de origem hospitalar: perfis de resistência aos agentes antimicrobianos e produção de biofilme / Bruna Pinto Ribeiro Sued. - 2014. 94 f.

Orientadora: Ana Luíza de Mattos Guaraldi.
Coorientador: José Augusto Adler Pereira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Ciências Médicas.

1. Estafilococos - Teses. 2. Biofilme - Teses. 3. Aderência bacteriana - Teses. 4. Infecção hospitalar - Teses. 5. Drogas - Resistência em microorganismos - Teses. 6. Staphylococcus coagulase-negativa. I. Guaraldi, Ana Luíza de Mattos. II. Pereira, José Augusto Adler. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.98:579.862.1

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

Assinatura

Data

Bruna Pinto Ribeiro Sued

***Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus epidermidis* isolados de fômites de origem hospitalar: perfis de resistência aos agentes antimicrobianos e produção de biofilme**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 14 de maio de 2014.

Orientadora:

Prof.^a Dra. Ana Luíza de Mattos Guaraldi
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Coorientador:

Prof. Dr. José Augusto Adler Pereira
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Raphael Hirata Junior
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Cintia Silva dos Santos
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof. Dr. Eliezer Menezes Pereira
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia

Rio de Janeiro

2014

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha família por todo apoio, amor, carinho, por acreditarem em mim e por nunca terem medido esforços para que esse sonho fosse concluído. Obrigada por tudo. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a todos meus protetores espirituais por mais uma etapa concluída, por toda força e por sempre me mostrarem o caminho. Sem fé, não teria lutado e chegado até aqui.

Aos meus pais Christina e Moisés, por todo carinho, amor, dedicação, por terem me incentivado, por serem meus exemplos e terem me transformado na pessoa que sou hoje. Por nunca terem deixado que eu desistisse, e por fazerem o possível e o impossível por mim. À minha avó, Glaucilea, que é o motivo de eu ser uma pessoa melhor. E aos meus avôs, João e Guido, a minha avó Rebeca, e a minha madrinha, Gelania, mesmo em outro plano, obrigada por tudo. Amo muito vocês!

À orientadora e Professora Dr^a Ana Luíza de Mattos Guaraldi, por dividir comigo seu incrível conhecimento, e por ser uma pessoa fantástica, que sempre esteve ao meu lado, nos momentos mais difíceis dessa jornada. Obrigada por me acolher, confiar em mim e por todo incentivo, carinho, paciência e dedicação. Obrigada pelas broncas, puxadas de orelha, cobranças e pelos conselhos. Sem eles, não teria chegado até aqui. Seu apoio incondicional foi essencial nessa jornada.

Ao orientador e Professor Dr José Augusto Adler Pereira, por ser um grande mestre! Por continuar a dividir comigo seus conhecimentos, e por continuar a ser um Pai. Obrigada por todos os conselhos, pela paciência, pelo carinho, pelo apoio e pela dedicação. Obrigada por ter me incentivado, e por sempre estar ao meu lado, nos momentos que achei que não iria conseguir. Obrigada por não ter deixado que eu desistisse desse sonho e por sempre ter acreditado no meu potencial. Sem o senhor, nada disso seria possível.

Ao meu noivo, Thiago, por estar ao meu lado de uma forma incondicional. Por me apoiar, pelas suas palavras, por nunca ter deixado que eu desistisse ou fraquejasse. Por sempre me dizer que eu era capaz, e por entender minhas ausências, crises e desesperos. Obrigada pelo seu amor altruísta, pelas suas atitudes e carinho.

A “co-orientadora”, Anjo da Guarda e grande amiga, Paula Afonso, por estar comigo em mais uma etapa da minha vida profissional. Obrigada pela sua amizade ímpar, pelo dia a dia, pelas viagens, carnavais, loucuras, por horas no telefone, pelas crises de risos, pelos momentos de cumplicidade e também pelos momentos de desespero nos quais você nunca me abandonou, nem deixou que eu desistisse. Obrigada principalmente por todo incentivo, apoio,

carinho, broncas e brincadeiras, pela dedicação, e por sempre estar ao meu lado. Obrigada pela paciência, por me aturar todo dia te perturbando, dizendo que nada dava certo (risos). Obrigada por ser meu exemplo não só no campo profissional, mas também na vida. Espero um dia chegar perto do ser humano que você é ! Você foi essencial nessa “batalha”.

As minhas grandes amigas Vanessa Binatti, Barbara Nogueira, Julianna Olivella e Verônica Dias, pelo convívio diário no Laboratório. Obrigada por dividirem comigo alegrias, preocupações, sorrisos e agonias. Obrigada pelo apoio, companheirismo, incentivo, carinho e toda preocupação. Sem vocês, nada disso teria graça. Aos amigos do Laboratório 3, Cíntia, Louisy, Lincoln, Renata, Monica e Yuri, e também a Emanoela Araújo e Marcia Jones pela ajuda constante e fundamental na realizando desse trabalho.

Ao Professor Dr. Eliezer Menezes Pereira, por me receber de braços abertos em seu laboratório, e pela paciência e bom humor, em me auxiliar em um momento tão complicado. Sua ajuda foi essencial para a realização desse trabalho.

Ao “primo” Leonardo Teixeira pela ajuda na hora mais difícil desse trabalho, onde tudo parou de funcionar, e você calmamente me mostrou que toda jornada é difícil, mas que no final, tudo vale a pena. Obrigada por dividir comigo seu conhecimento e obrigada pela paciência.

Aos professores da PGCM, representados pelo coordenador Professor Dr. Rogério Alves Rufino, por todo carinho e apoio. A equipe da Coordenação da Secretária Acadêmica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, em especial ao Professor Dr. Denizar Vianna, por todo auxílio.

Aos professores da DIMI, representado pela Professora Dra. Lucimar Gonçalves Milagres, bem como seu corpo docente, funcionários e colegas, pelo auxílio e desenvolvimento que contribuíram para a concretização deste projeto.

Agradeço as instituições FAPERJ, CNPq, CAPES, e SR2-UERJ, pelo apoio financeiro oferecido para o desenvolvimento deste trabalho, e a todos que de forma direta ou indireta, colaboraram para realização desse trabalho.

Não sabendo quer era impossível, foi lá e fez.

Jean Cocteau

RESUMO

SUED, Bruna Pinto Ribeiro. *Staphylococcus haemolyticus e Staphylococcus epidermidis isolados de fômites de origem hospitalar*: perfis de resistência aos agentes antimicrobianos e produção de biofilme. 2014. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Os *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN) são encontrados na pele e mucosas de seres humanos e outros animais, já que algumas espécies são parte integrante da microbiota normal destes mesmos sítios, e podem constituir um reservatório para SCN. A espécie *Staphylococcus epidermidis*, é reconhecida como grande oportunista e agente de graves infecções nosocomiais e comunitárias, além de associado com infecções em pacientes submetidos a implantes com dispositivos médicos, e a espécie *Staphylococcus haemolyticus* é a segunda espécie mais isolada de hemoculturas humanas, sendo uma das espécies que apresenta elevada resistência aos antimicrobianos. O presente estudo teve como objetivo principal investigar a presença de SCN em fômites (estetoscópios, termômetros e esfigmomanômetros) no ambiente hospitalar, identificar as espécies *S. haemolyticus* e *S. epidermidis* e correlacionar seus perfis de resistência aos antimicrobianos com a capacidade de produção de biofilme. A técnica de multiplex-mPCR foi empregada na determinação das espécies e a fenotipagem foi realizada pelos testes fenotípicos convencionais. Os perfis de resistência aos antimicrobianos foram verificados através do teste de disco-difusão, determinação da CIM (oxacilina e vancomicina), determinação da CBM e presença do gene *mecA*. A capacidade de produção de biofilme foi investigada pelos testes do Ágar Vermelho do Congo e ensaios de aderência em superfícies abióticas (poliestireno e vidro) na presença e ausência de oxacilina e vancomicina, além da PCR para o gene *icaAD*. Os resultados demonstraram que pelos testes bioquímicos convencionais, a espécie mais encontrada foi *S. epidermidis* (43,5%). Após a confirmação pela técnica de PCR, 29 amostras (82%) foram identificadas como *S. epidermidis*, e 6 amostras (18%) foram identificadas como *S. haemolyticus*. Todas as amostras foram multirresistentes, oxacilina resistentes e vancomicina sensíveis, sendo que apenas 5 amostras *S. epidermidis* (17,2%) foram tolerantes a oxacilina. A presença do gene *mecA* foi detectada em 71,4% das amostras. Apesar da maioria das amostras ter apresentado capacidade de produzir *slime* e/ou biofilme não foi observada total correlação com a presença do gene *icaAD* enfatizando a natureza multifatorial da produção de biofilme. As amostras aderiram melhor ao esfigmomanômetro, e também, neste fômite, foi encontrado a maior porcentagem de amostras positivas para a produção de *slime*. Para aderência ao vidro e aderência ao poliestireno não foi encontrada correlação com os fômites. Foram isoladas amostras *S. epidermidis* de todos os sítios hospitalares estudados e *S. haemolyticus* só não foi encontrado em Enfermaria de Clínica Médica. Em relação aos fômites, *S. epidermidis* foi encontrado em todos os fômites estudados, e *S. haemolyticus*, apenas foi encontrado em esfigmomanômetro e em outros fômites. Os fômites estão servindo como fontes de transmissão e disseminação de micro-organismos, sendo necessário maiores estudos a respeito.

Palavras-chave: Biofilme. Fômites. Infecções nosocomiais. Multirresistência antimicrobiana.

Staphylococcus coagulase-negativa.

ABSTRACT

SUED, Bruna Pinto Ribeiro. *Staphylococcus haemolyticus and Staphylococcus epidermidis isolated from fomites hospital origin*: profiles of antimicrobial resistance and biofilm production. 2014. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Coagulase-negative staphylococci (SCN) are found in the skin and mucous membranes of humans and other animals, since some species are a constituent part of the normal flora of these same sites, which may constitute a reservoir for SCN. *Staphylococcus epidermidis* species, is recognized as a major opportunistic infections and serious nosocomial and community staff, as well as associated with infections in patients undergoing implants with medical devices, and *Staphylococcus haemolyticus* is the second species most frequent species of human blood cultures, one of species that has a high antimicrobial resistance. The present study aimed to investigate the presence of SCN on fomites (stethoscopes, thermometers and sphygmomanometers) in the hospital environment, identify the species *S. haemolyticus* and *S. epidermidis* and correlate their antimicrobial resistance profiles with the ability to produce biofilm. The technique of multiplex mPCR was used in the determination of the species and phenotyping was performed by conventional phenotypic tests. The antimicrobial resistance profiles were checked by the disk diffusion test, MIC determination (oxacillin and vancomycin), determination of MBC and the presence of the *mecA* gene. The capacity of the biofilm was investigated by testing the Congo Red agar and adhesion assays abiotic surfaces (glass and polystyrene) in the presence and absence of oxacillin and vancomycin in addition to the PCR *icaAD* gene. The results demonstrated that the conventional biochemical tests, it was found more species *S. epidermidis* (43,5%). After confirmation by PCR, 29 samples (82%) were identified as *S. epidermidis*, and 6 samples (18%) were identified as *S. haemolyticus*. All samples were multiresistant, oxacillin-resistant and vancomycin-sensitive, and only 5 samples *S. epidermidis* (17,2%) were tolerant to oxacillin. The presence of the *mecA* gene was detected in 71,4% of samples. Although most of the samples have shown the ability to produce *slime* and/or biofilm not fully correlate with the presence of the gene was observed *icaAD* emphasizing the multifactorial nature of biofilm production. Samples adhered better to the sphygmomanometer, and that too, in this fomites, found the highest percentage of samples positive for *slime* production. For adhesion to glass and adherence to polystyrene was found no correlation with fomites. *S. epidermidis* samples of all hospital sites studied, and *S. haemolyticus* were isolated not only found in Infirmary Medical Clinic. Regarding fomites, *S. epidermidis* was found in all studied fomites, and *S. haemolyticus*, have been found only on sphygmomanometer and other fomites. The fomites are serving as sources of transmission and spread of microorganisms, and further study concerning necessary.

Keywords: Antimicrobial multiresistence. Biofilm. Coagulase-negative *Staphylococcus*. Fomites. Nosocomial infections.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------|---|----|
| Figura 1 – | Presença do gene <i>mecA</i> , codificando a PBP2a (PBP modificada), expressando a resistência..... | 27 |
| Figura 2 – | Micrografia de varredura de etapas iniciais da formação do biofilme por <i>S. epidermidis</i> (A), envolto pelo <i>slime</i> (B)..... | 32 |
| Figura 3 – | Etapas da formação do biofilme por <i>Staphylococcus sp.</i> | 33 |
| Figura 4 – | Espécies de SCN (n= 62) isoladas de estetoscópios (n=17), termômetros (n=16), esfigmomanômetros (n=18) e outros fômites (n=11) identificadas por testes bioquímicos convencionais..... | 49 |
| Figura 5 – | Eletroforese em gel de agarose 1% após: (A) PCR multiplex para identificação de espécies <i>Staphylococcus haemolyticus</i> e <i>Staphylococcus epidermidis</i> e detecção de gene <i>mecA</i> | 54 |
| Figura 6 – | Micrografia de ensaio microscopia eletrônica de varredura (MEV) demonstrando a formação de biofilme na superfície de catéter de poliuretano (48 h de incubação) por amostra de <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | 71 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-------------|---|----|
| Tabela 1 – | Testes fenotípicos empregados na identificação de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativo..... | 41 |
| Tabela 2 – | Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nos ensaios de PCR..... | 43 |
| Tabela 3 – | Resultados dos ensaios de PCR realizados para a confirmação das espécies de 35 amostras de SCN previamente avaliadas por métodos fenotípicos..... | 50 |
| Tabela 4 – | Perfis fenotípicos expressos por 06 amostras de <i>Staphylococcus haemolyticus</i> e 29 de <i>Staphylococcus epidermidis</i> identificadas pelo PCR | 52 |
| Tabela 5 – | Resultado dos ensaios de PCR realizados para a detecção dos genes <i>mecA</i> e <i>icaAD</i> de amostras de <i>Staphylococcus haemolyticus</i> e <i>Staphylococcus epidermidis</i> isolados de diferentes tipos de fômites de origem hospitalar.... | 53 |
| Tabela 6 – | Perfis resistência aos agentes antimicrobianos de amostras de <i>Staphylococcus haemolyticus</i> e de <i>Staphylococcus epidermidis</i> isoladas de fômites de origem hospitalar avaliados por método de difusão em disco.... | 57 |
| Tabela 7 – | Concentração Inibitória Mínima (CIM) para oxacilina e para vancomicina de amostras de <i>Staphylococcus haemolyticus</i> e de <i>Staphylococcus epidermidis</i> isoladas de fômites de origem hospitalar..... | 58 |
| Tabela 8 – | Produção de <i>slime</i> no meio Vermelho do Congo por amostras de <i>Staphylococcus haemolyticus</i> e <i>Staphylococcus epidermidis</i> isolados de diferentes tipos de fômites de origem hospitalar..... | 59 |
| Tabela 9 – | Aderência a superfície abiótica do vidro (hidrofílica/carga positiva) de amostras de <i>Staphylococcus haemolyticus</i> e <i>Staphylococcus epidermidis</i> isolados de diferentes tipos de fômites de origem hospitalar..... | 61 |
| Tabela 10 – | Aderência a superfície abiótica do poliestireno (hidrofóbica/carga negativa) de amostras de <i>Staphylococcus haemolyticus</i> e <i>Staphylococcus epidermidis</i> isolados de diferentes tipos de fômites de origem hospitalar ... | 63 |
| Tabela 11 – | <i>Staphylococcus haemolyticus</i> e <i>Staphylococcus epidermidis</i> isolados de diferentes tipos de fômites de origem hospitalar..... | 65 |
| Tabela 12 – | Correlação das espécies de amostras de <i>Staphylococcus haemolyticus</i> e de <i>Staphylococcus epidermidis</i> com os setores hospitalares, tipos de fômites | |

| | | |
|-------------|--|----|
| | e presença de genes <i>mecA</i> e <i>ica</i> | 67 |
| Tabela 13 – | Aderência a diferentes substratos de amostras de <i>Staphylococcus haemolyticus</i> e <i>Staphylococcus epidermidis</i> isolados de diferentes tipos de fômites de origem hospitalar..... | 69 |
| Tabela 14 – | Perfis resistência aos agentes antimicrobianos avaliados por método de difusão em disco e a produção de biofilme nos diferentes substratos, de amostras de <i>Staphylococcus haemolyticus</i> e de <i>Staphylococcus epidermidis</i> isoladas de fômites de origem hospitalar..... | 72 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------------------|---|
| Aap | Proteína associada ao acúmulo |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| Bap | Proteína associada ao biofilme |
| BHI | Brain Heart Infusion |
| C° | Graus Celsius |
| CAZ | Ceftazidima |
| CBM | Concentração bactericida mínima |
| CDC | Centers for Disease Control and Prevention |
| CIM | Concentração inibitória mínima |
| CIP | Ciprofloxacina |
| CN | Gentamicina |
| CRA | Ágar Vermelho do Congo |
| DA | Clindamicina |
| DNase | Prova da Desoxirribonuclease |
| DMIP | Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia |
| E | Eritromicina |
| Embp | Extracellular matrix binding protein |
| EUA | Estados Unidos da América |
| Fbe | Proteína ligadora de fibrinogênio |
| FOX | Cefoxitina |
| GehD | Lipase extracelular de ligação ao colágeno |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrogênio |
| HUPE | Hospital Universitário Pedro Ernesto |
| IPM | Imipenem |
| IRAS | Infecções relacionadas à assistência a saúde |
| MEV | Microscopia eletrônica de varredura |
| MRSA | <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina |
| LZD | Linezolida |
| MHA | Mueller Hinton Ágar |
| MXF | Moxifloxacina |
| PBP2A | Penicillin-binding protein 2A |

| | |
|----------------|--|
| PBS | Tampão salina fosfato |
| PCR | Polimerase chain reaction |
| PIA | Polissacharidae intercelular adhesin |
| PSA | Capsular polysaccharide adhesin |
| PYR | Enzima pirrolidonil arilamidase |
| SCC <i>mec</i> | Staphylococcal Cassette Chromosome <i>mec</i> |
| SCN | <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa |
| SXT | Sulfametaxol-trimetropim |
| TSA | Tryptone Soy Agar |
| TSB | Trypticase soy broth |
| UERJ | Universidade do Estado do Rio de Janeiro |
| UEZO | Centro Universitário Estadual da Zona Oeste |
| UFC | Unidades formadoras de colônia |
| UTI | Unidade de terapia intensiva |
| VISA | Vancomycin intermediate <i>Staphylococcus aureus</i> |
| VRSA | Vancomycin resistant <i>Staphylococcus aureus</i> |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| | INTRODUÇÃO | 16 |
| 1 | DEFINIÇÃO DO GÊNERO <i>STAPHYLOCOCCUS</i> | 17 |
| 1.1 | <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa (SCN) | 18 |
| 1.2 | IRAs e o ambiente hospitalar | 20 |
| 1.3 | Infecções relacionadas com o uso de dispositivos médicos invasivos | 22 |
| 1.4 | Disseminação de infecções nosocomiais por fômites | 23 |
| 1.5 | Resistência a antimicrobianos | 24 |
| 1.6 | Resistência a oxacilina | 25 |
| 1.7 | Resistência a vancomicina | 28 |
| 1.8 | Tolerância bacteriana | 29 |
| 1.9 | Biofilme | 29 |
| 1.10 | Produção de biofilme por <i>Staphylococcus</i> spp. | 34 |
| 1.11 | Justificativa | 35 |
| 2 | OBJETIVOS | 37 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 38 |
| 3.1 | Identificação bacteriana | 38 |
| 3.1.1 | <u>Identificação do gênero <i>Staphylococcus</i></u> | 38 |
| 3.1.2 | <u>Testes fenotípicos convencionais</u> | 38 |
| 3.1.3 | <u>Método molecular para identificação das espécies de <i>Staphylococcus</i> e detecção do gene <i>mecA</i> - PCR multiplex</u> | 42 |
| 3.2 | Método molecular para detecção do gene <i>icaAD</i> (PCR) | 43 |
| 3.3 | Determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos | 44 |
| 3.4 | Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para oxacilina e para vancomicina | 44 |
| 3.5 | Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) para oxacilina e para vancomicina | 45 |
| 3.6 | Avaliação da produção de biofilme na ausência e na presença de oxacilina e/ou vancomicina | 45 |
| 3.6.1 | <u>Método de crescimento em Ágar Vermelho do Congo (CRA)</u> | 46 |
| 3.6.2 | <u>Determinação do padrão de aderência ao vidro</u> | 46 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.6.3 | <u>Avaliação da formação de biofilme em superfície de poliestireno</u> | 47 |
| 3.7 | Análise morfológica e estrutural de biofilme produzido em superfície de catéter pela técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV | 47 |
| 3.8 | Análise estatística | 48 |
| 4 | RESULTADOS | 49 |
| 4.1 | Número e espécies de amostras de SCN isoladas de fômites identificadas por testes bioquímicos convencionais | 49 |
| 4.2 | Confirmação das espécies de amostras de SCN isoladas de fômites identificadas por PCR | 50 |
| 4.3 | Perfis fenotípicos expressos pelas amostras de <i>S. haemolyticus</i> e de <i>S. epidermidis</i> identificadas pelo PCR | 51 |
| 4.4 | Detecção dos genes <i>mecA</i> e <i>ica</i> pela técnica de PCR | 51 |
| 4.5 | Determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos | 55 |
| 4.6 | Determinação da CIM e da CBM para oxacilina e vancomicina | 55 |
| 4.7 | Expressão da produção de <i>slime</i> na ausência e presença de oxacilina e vancomicina | 56 |
| 4.8 | Determinação do padrão de aderência ao vidro na ausência e presença de oxacilina e vancomicina | 60 |
| 4.9 | Avaliação da formação de biofilme em superfície de poliestireno na ausência e presença de oxacilina e vancomicina | 62 |
| 4.10 | Correlação das espécies de amostras de SCN com os tipos de fômites e presença dos genes <i>mecA</i> e <i>ica</i> | 64 |
| 4.11 | Avaliação de associações entre espécies de amostras de SCN com os tipos de fômites e setores hospitalares | 66 |
| 4.12 | Avaliação da produção de biofilme nos diferentes substratos com os tipos de fômites | 68 |
| 4.13 | Avaliação da ocorrência de multirresistência e de produção de biofilme para os tipos de fômites e à produção de biofilme nos diferentes substratos | |
| 4.14 | Microscopia eletrônica de varredura | 71 |
| 5 | DISCUSSÃO | 73 |
| | CONCLUSÕES | 81 |
| | REFERÊNCIAS | 83 |
| | ANEXO - Comitê de Ética em Pesquisa | 94 |

INTRODUÇÃO

Os *Staphylococcus* coagulase-negativa são considerados patógenos potencialmente causadores de infecções no homem, principalmente aquelas relacionadas ao uso de dispositivos médicos. O tratamento destas infecções tem se tornado cada vez mais um desafio para a saúde pública, uma vez que eles têm apresentado resistência a múltiplas drogas antimicrobianas.

Os *Staphylococcus* estão entre os micro-organismos mais frequentemente isolados no laboratório de Microbiologia Clínica. Os *Staphylococcus* coagulase-negativa (SCN) são encontrados na pele e mucosas de seres humanos e outros animais, já que algumas espécies são parte constituinte microbiota normal destes mesmos sítios, o que podem constituir um reservatório para SCN. Atualmente, os SCN, são reconhecidos como agentes etiológicos de uma série de processos infecciosos. A espécie de SCN mais frequentemente isolada é *Staphylococcus epidermidis* seguido de *Staphylococcus haemolyticus*.

A multirresistência dos micro-organismos é um fator crítico no aumento da letalidade por infecções hospitalares. A descoberta dos antibióticos foi um grande avanço na medicina humana, sendo importante na diminuição da mortalidade em infecções. Porém, o uso indiscriminado desses antimicrobianos fez com que surgisse a resistência bacteriana aos mesmos. 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.

O principal fator de virulência dos SCN é a sua capacidade de aderir e formar biofilme em variedade de superfícies inertes e vivas. O biofilme é um dos principais fatores para infecção bacteriana persistente ou crônica, e muitas vezes requer a remoção do dispositivo colonizado para o efetivo controle do processo infeccioso.

1. DEFINIÇÃO DO GÊNERO *STAPHYLOCOCCUS*

Os *Staphylococcus* foram inicialmente observados e cultivados por Pasteur, tendo sido isolados e descritos, pela primeira vez, em 1878, por Robert Koch. O nome é de origem grega e foi adotado por Alexander Ogston, em 1880. Porém, em 1884, foi Anton Julius F. Rosenbach, que ao obter colônias puras em seus estudos, 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*. Rosenbach mostrou que estes micro-organismos eram responsáveis por infecções e furunculoses de feridas e que era um constituinte normal e natural da pele. Na era “pré-antibiótica”, os estafilococos ficaram conhecidos como patógenos de difícil tratamento (KEIM, 2005; FELIX JUNIOR, 2007).

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae*, correspondendo a cocos Gram-positivos, de cerca de 0,5µm a 1,5µm de diâmetro que habitualmente se dispõem semelhantes a cachos de uva. São imóveis, na maioria das vezes aeróbios (estritos), catalase positivos, não formam esporos, fermentam a glicose com produção de ácido e, sob influência de antimicrobianos, sofrem lise (KONEMAN *et al.*, 2008; BROOKS *et al.*, 2009; PODKOWIK *et al.*, 2013). O gênero é composto de 49 espécies, sendo 25 destas isoladas de amostras biológicas humanas (EUZÈBY, 2012; LPSN, 2014). Representantes desse gênero podem ser encontrados, geralmente, na pele e em mucosas de humanos e de outros animais. São capazes de crescer em meios que contenham alta concentração de cloreto de sódio e a temperaturas que variam de 18°C a 40°C, sendo sua temperatura ótima, entre 30°C a 37°C (bactérias mesófilas) (NEVES *et al.*, 2007; BROOKS *et al.*, 2009).

Alguns dos *Staphylococcus sp.* podem produzir uma enzima denominada coagulase (confere aos *Staphylococcus* a habilidade de coagular o plasma de coelho), que permite classificá-los em coagulase-positiva e coagulase-negativa. O *Staphylococcus aureus* é o principal representante dos *Staphylococcus* coagulase-positiva. Dentre os *Staphylococcus* coagulase-negativa, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus saprophyticus* são isolados com maior frequência de infecções humanas (LOONEN, *et al.*, 2011; PODKOWIK *et al.*, 2013).

Staphylococcus aureus pode estar relacionado com quadros de supuração, formação de abscessos, vários tipos de infecções piogênicas, até mesmo, sepsis fatal apesar de também serem capazes de colonizar as superfícies cutâneo-mucosas, sem necessariamente causar infecção. O papel da coagulase na patogênese das doenças estafilocócicas é ainda, de certa

forma, especulativo, mas acredita-se que essa enzima poderia levar à formação de uma camada de fibrina formando um abscesso, localizando assim a infecção e, provavelmente, protegendo o micro-organismo da fagocitose e da ação de drogas antimicrobianas (SANTOS *et al.*, 2009; JIMÉNEZ *et al.*, 2011).

Os *Staphylococcus* estão entre os micro-organismos mais frequentemente isolados no laboratório de Microbiologia Clínica. A identificação comumente realizada é limitada à realização de testes rápidos que visam à identificação de *S. aureus*. Eles podem ser realizados de forma manual ou através de sistemas automatizados (FREDHEIN *et al.*, 2009).

1.1 *Staphylococcus coagulase-negativa* (SCN)

Os *Staphylococcus coagulase-negativa* (SCN) são encontrados na pele e mucosas de seres humanos e outros animais, já que algumas espécies são parte constituinte microbiota normal destes mesmos sítios, o que podem constituir um reservatório para SCN (BROOKS *et al.*, 2009; TEIXEIRA, 2009). Os SCN são responsáveis por doenças como: endocardites, osteomielites, infecções do trato urinário, conjuntivites, entre outras, porém raramente causam doenças em hospedeiros saudáveis, mas são considerados micro-organismos oportunistas, pois são favorecidos em certas situações de comprometimento das defesas do hospedeiro, podendo produzir infecções graves. A imaturidade do sistema imunológico que consiste na deficiência de fagocitose e de opsonização por anticorpos e complemento, contribui para o agravamento das infecções estafilocócicas (D'AZEVEDO *et al.*, 2007; TEIXEIRA, 2009).

No passado, os SCN eram considerados não patogênicos ou somente parte da microbiota normal da pele de seres humanos. Atualmente, são reconhecidos como agentes etiológicos de uma série de processos infecciosos (SOARES *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2006). Após o emprego terapêutico dos primeiros antibióticos, as infecções estafilocócicas alastraram-se pelo mundo, aparecendo como grave problema de saúde pública (MAYHALL, 2004).

A espécie de SCN mais frequentemente isolada é *S. epidermidis* que faz parte da microbiota epitelial e foi a espécie responsável por 37% dos casos de sepse nos Estados Unidos, no ano de 2008, sendo a primeira espécie a ser descrita como produtora de biofilme (ROGERS *et al.*, 2008; HERNÁNDEZ *et al.*, 2010; CONTRETRAS *et al.*, 2013). Os *S.*

epidermidis, constituem a espécie de SCN reconhecidos como grandes oportunistas e agentes de graves infecções nosocomiais e comunitárias, além de associados com infecções, em pacientes submetidos a implantes com dispositivos médico e em crianças imunocomprometidas (CONTRETRAS *et al.*, 2013; SCHERR, *et al.*, 2014). No México, *S. epidermidis* foram isolados em alta frequência, a partir de bacteremias relacionadas a cateteres (CONTRETRAS *et al.*, 2013). Seu principal fator de virulência é a habilidade de formar biofilme em superfície de dispositivos hospitalares, estimando-se que 22% das infecções da corrente sanguínea detectadas em unidades de cuidados intensivos (UTI) nos EUA, são relacionadas à produção de biofilmes formado por *S. epidermidis* na superfície de cateteres venosos centrais ou periféricos (CARVALHAIS *et al.*, 2014; FRANÇA *et al.*, 2014). A sua principal autolisina, a *atlE*, está envolvida na aderência à superfícies de poliestireno (LAZZAROTTO, 2010; SCHLAG *et al.*, 2010).

S. saprophyticus é a segunda espécie isolada de infecções do trato urinário, mas também pode ser encontrada no sistema gastrointestinal. Encontra-se associada a infecções não complicadas do trato urinário, principalmente em mulheres, sendo a taxa de incidência de 52,3% entre as mulheres com idades entre 16 e 25 anos. Os *S. saprophyticus* foram considerados contaminantes urinários até 1960 (PARK *et al.*, 2010).

S. haemolyticus faz parte da microbiota normal da pele e mucosa de humanos. É a segunda espécie mais isolada de hemoculturas humanas (constituem 6% de todos os isolados a partir da corrente sanguínea), sendo uma das espécies que apresenta uma múltipla resistência aos antimicrobianos, limitando assim as opções entre os agentes antimicrobianos disponíveis (FREDHEIM *et al.*, 2009). Sua habilidade de produzir biofilme, sua aderência ao acrílico e sua multirresistência (sendo as duas primeiras, de forma reduzida em relação a *S. epidermidis*), o torna uma espécie emergente em infecções nosocomiais (CAVANAGH *et al.*, 2012).

Outras espécies de SCN também são importantes patógenos humanos, com por exemplo, *Staphylococcus lugdunensis*, que foi associado à endocardite de válvulas naturais e protéticas, celulite da pele, peritonite, osteomielite, infecções do trato urinário, dentre outras infecções. *S. lugdunensis* possui vários fatores de virulência, como por exemplo: adesinas, lipases, DNase e hemolisinas (FRANK *et al.*, 2008; KONEMAN *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2012). *Staphylococcus warneri*, que representa cerca de 1% dos SCN encontrados na pele humana, e na atualidade é uma causa bem reconhecida de bacteremia associada a cateteres (KONEMAN *et al.*, 2008). *Staphylococcus sciuri* que representa 4,3% dos isolados de SCN, e é considerada uma das espécies de *Staphylococcus* mais abundantes no planeta (ZHOU *et al.*, 2008).

Staphylococcus hominis é comumente encontrada nas amostras clínicas, geralmente isoladas da axila, pele dos braços, pernas e tronco dos seres humanos. 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 (JIANG *et al.*, 2012).

1.2 IRAs e o ambiente hospitalar

As infecções relacionadas à assistência a saúde (IRAS) representam um problema de saúde no mundo, constituindo uma das principais causas de sofrimento, mortalidade, morbidade e de custos, uma vez que aumentam as complicações e sequelas, e exigem tratamentos que prolongam a estado do paciente no hospital. Hoje, como prioridade entre os epidemiologistas, está o controle dessas infecções (MASUNARI & TAVARES, 2006; MARQUES *et al.*, 2011).

O termo infecção hospitalar vem sendo substituído pelo termo, IRAS, definido pelo “Center for Disease Control and Prevention” (CDC), como: infecção adquirida pelo paciente no curso de um tratamento específico para outra enfermidade associado aos cuidados médicos (CDC, 2008).

Antes da década de 70, já eram publicados trabalhos relatando infecções por SCN (CUNHA *et al.*, 2006). Hoje se sabe que bactérias do gênero *Staphylococcus*, são frequentes agentes em infecções sistêmicas associadas com as infecções urinárias, infecções associadas a dispositivos permanentes, bacteremias em hospedeiros comprometidos, receptores de transplantes, endocardite, entre outras (D’AZEVEDO *et al.*, 2007; ANTUNES *et al.*, 2007). *S. epidermidis*, foi descrito não só como uma espécie normal da microbiota, mas também como o causador de várias infecções em humanos (JAGLIC, *et al.*, 2009).

As espécies de SCN mais comumente encontradas causando infecções em humanos são: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus hominis* subespécie *hominis*, *Staphylococcus hominis* subespécie *novobiosepticus*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus cohnii* subespécie *cohnii*, *Staphylococcus cohnii* subespécie *urealyticum*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus saccharolyticus* (GILL *et al.*, 2005).

Segundo Mayhall (2004), estudos têm mostrado que infecções hospitalares causadas por SCN são mais prováveis de ocorrer entre pacientes portadores de neoplasias, especialmente aqueles submetidos à quimioterapia, que produz lesões nas superfícies mucosas. Quando o paciente começa a ter seu trato gastrointestinal colonizado por SCN, os micro-organismos podem em seguida penetrar na mucosa lesada e causar sepse ou infecções localizadas. Nos hospitais, as áreas de maior risco de infecções estafilocócicas graves são os berçários, as unidades de tratamento intensivo, o centro cirúrgico e as enfermarias de quimioterapia para tratamento do câncer (BROOKS *et al.*, 2009). O ambiente hospitalar estabelece condições que tornam os pacientes mais susceptíveis aos micro-organismos (VIANA *et al.*, 2011).

A multirresistência dos micro-organismos é um fator crítico no aumento da letalidade por infecções hospitalares. A primeira consequência é o aumento do tempo de permanência, o aumento do sofrimento humano, além de aumentar o custo por episódio, devendo-se ressaltar o aumento do risco de morte. O impacto econômico que vem destas infecções deve estimular o desenvolvimento dos programas de qualidade na assistência hospitalar (FERNANDES, 2004).

1.3 Infecções relacionadas com o uso de dispositivos médicos invasivos

A introdução do uso dos cateteres venosos plásticos, em 1945, permitiu a manutenção do acesso vascular por tempo prolongado e a realização de procedimentos clínicos e cirúrgicos, ao qual representa um grande avanço no diagnóstico e na terapêutica (FERNANDES, 2004; MELO *et al.*, 2007). A decisão do dispositivo a ser utilizado para a obtenção de um acesso vascular, pode ser um desafio. Fatores como, idade, disponibilidade do local para a punção e tipo de medicação, influenciam na tomada de decisão sobre qual dispositivo utilizar. Os cateteres, incluindo cateteres venosos centrais e cateteres arteriais são os dispositivos invasivos mais utilizados no mundo e de fundamental importância para o tratamento de pacientes hospitalizados com internações prolongadas e também para a realização de procedimentos hospitalares (MARQUES *et al.*, 2011; CABRAL, *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2014).

Os cateteres representam uma fonte potencial de complicações já que a maioria das infecções por SCN ocorre em decorrência do implante deste dispositivo hospitalar

(GONZÁLES *et al.*, 2009; MARQUES *et al.*, 2011; MERTENS & GHEBREMEDHIN, 2014). As principais causas das infecções decorrentes ao uso do cateter venoso são a falta de orientação aos funcionários e de conscientização dos funcionários sobre a identificação precoce dos fatores de risco. A detecção precoce e o tratamento adequado, são fundamentais para um resultado favorável e para uma terapia antimicrobiana adequada (MELO *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2014).

Hoje, como cateteres e dispositivos médicos implantados são cada vez mais utilizados na prática hospitalar, as infecções por *S. epidermidis* são consideradas como uma das cinco mais frequentes causas de infecções hospitalares. A formação de biofilme é um importante fator promotor para infecções por *S. epidermidis* após o implante de dispositivos médicos, em especial os cateteres. O biofilme em dispositivos médicos, representa uma importante causa de morbidade e mortalidade em pacientes hospitalizados. Hoje, os instrumentos cirúrgicos permanecem sendo uma dos mais importantes fontes de infecções. Os dispositivos médicos, devem ser descontaminados e esterilizados entre procedimentos cirúrgicos ou internações, para prevenir a transmissão cruzada (GÖKÇEN *et al.*, 2013; MERTENS & GHEBREMEDHIN, 2014; SAITO *et al.*, 2014).

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 (AL GHAMDI *et al.*, 2011; LOPES *et al.*, 2014; NWANKWO, 2012). 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).

O primeiro estudo relacionado a vários dispositivos médicos, onde *Staphylococcus* estava presente, foi o estudo de Lowburg *et al* (1971), e o primeiro estudo relacionado diretamente com fômites foi o estudo de Andrew *et al* (1975).

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. Saito *et al* (2014) identificaram *S. epidermidis* contaminando instrumentos utilizados para laposcopia. 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*.

Vários estudos, relatam que telefones celulares, canetas, moedas e outros objetos, também podem atuar como fômites na transmissão de patógenos. Os telefones celulares tornaram-se acessórios indispensáveis hoje. Por isso, podem atuar como fômites, já que “viajam” com o seu dono a lugares como banheiros, hospitais e cozinhas, que são carregados com micro-organismos. Bhoonderowa *et al* (2014) observaram em seu estudo que a contaminação por SCN prevalece (69%) nos telefones celulares de pessoas da comunidade. Já Walia *et al* (2014) descrevem em seu estudo a contaminação por diversos patógenos, inclusive *S. aureus*, em telefones celulares, de pessoas de dentro de um hospital. Angelakis *et al* (2014), observaram a contaminação por *S. aureus*, de moedas e notas, que podem agir como potenciais vetores de transmissão de patógenos. Wolfe *et al* (2009) descreveram a contaminação por SCN em canetas utilizadas por médicos em uma UTI.

Da década de 70 para cá, poucos estudos foram realizados a respeito da contaminação de fômites, e a maioria desses estudos, está relacionado com contaminação por *S. aureus*. Existem alguns poucos estudos sobre a contaminação de fômites por SCN.

1.5 Resistência a antimicrobianos

O homem sempre usou vários recursos, como vegetais, mel, sal, chumbo, entre outros, no combate a doenças infecciosas. As primeiras descrições sobre o uso de substâncias que agiam como antimicrobianos datam de 3000 anos atrás. Chineses, de maneira empírica, utilizavam bolores para tratar tumores e feridas. Os Suméricos usavam, para o tratamento de feridas, uma mistura de vinho, cerveja e zimbro, e Indianos, para curar disenterias, ingeriam certos “mofos” (PORTAL EDUCAÇÃO, 2013).

A descoberta dos antibióticos foi um grande avanço na medicina humana, sendo importante na diminuição da mortalidade em infecções. Porém, o uso indiscriminado desses antimicrobianos fez com que surgisse a resistência bacteriana aos mesmos (MOTA *et al.*, 2005; SILVEIRA *et al.*, 2006). Outros fatores que favoreceram e continuam favorecendo o aparecimento da resistência foram: indicação inadequada de

antimicrobianos pelos médicos (para melhora rápida do paciente), interrupção do tratamento, venda de antimicrobianos sem prescrição médica e uso de antimicrobianos em rações de animais (TEIXEIRA, 2009).

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). A transferência bacteriana cromossômica ocorre geralmente entre bactérias da mesma espécie. Porém, a resistência bacteriana extracromossomial é a que representa o verdadeiro e o maior problema, já que esta pode ocorrer entre bactérias de diferentes espécies e essas bactérias se tornam resistentes a diversos antimicrobianos, a esse processo damos o nome de resistência adquirida (SANTANA, 2006). Já alguns grupos bacterianos apresentam uma resistência natural a alguns tipos de antimicrobianos, o que chamamos de resistência intrínseca (PORTAL EDUCAÇÃO, 2013).

A presença de *Staphylococcus* resistentes aos antibióticos foi constatada, na década de 1940, logo após a introdução da penicilina, e a primeira cepa de *Staphylococcus* spp. resistente a oxacilina foi da espécie *S. aureus*, detectada na Europa em 1961. No final dos anos 50, os *Staphylococcus* adquiriram resistência a praticamente todos os antibióticos disponíveis para o tratamento de infecções, tais como a eritromicina, estreptomicina e tetraciclina. Para tratar as infecções estafilocócicas, surgiram então, as penicilinas semi-sintéticas antiestafilocócicas: a oxacilina em 1959 e a meticilina em 1960 (TAVARES, 2009).

1.6 Resistência a oxacilina

A resistência à oxacilina (meticilina) é extremamente variável sendo determinada, na grande maioria das vezes, pelo gene *mecA* (que é carregado por um cassete cromossômico de estafilococo – o qual apresenta dois complexos gênicos, no qual um deles, é o complexo *mec*). Este gene é responsável pela síntese da proteína ligadora de penicilina modificada, chamada de PBP2a, essencial na expressão da resistência, já que esta apresenta uma diminuição de sua afinidade com a maioria dos antimicrobianos β -lactâmicos (**Figura 1**). Outros mecanismos de resistência conhecidos são: produção de β -lactamases (que inativam os antimicrobianos β -lactâmicos) e o impedimento da interação entre o antimicrobiano e a PBP-alvo (KAISER *et al.*, 2010; BROOKS *et al.*, 2009; MURRAY, *et al.*, 2009; MIMICA & MENDES, 2007).

O gene *mecA* é um segmento de DNA que está localizado em uma ilha genômica conhecido como elemento *mec* ou cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*: *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*). O mecanismo de transferência e a evolução de SCC*mec* ainda não foram elucidados, porém até o momento, estudos indicam que *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus hominis*, carregam genes que representam formas ancestrais de SCC*mec*. Os tipos de SCC*mec* são classificados de acordo com a combinação de dois elementos: complexo *mec* e o complexo *ccr*, resultando em diferentes tipos de SCC*mec*. As sequências, entre os complexos ou depois deles, foram classificadas como regiões “junkyard” ou região J, elas contêm vários genes que não parecem ser úteis para a célula bacteriana, embora importantes exceções incluam os genes de resistência mediados por transposons ou plasmídeos para resistência aos antibióticos não β -lactâmicos e metais pesados. Onze tipos de SCC*mec* são descritos para *S.aureus* (em numeral romano, classificado segundo a ordem de descrição) classificados de acordo com o tipo do complexo *mec* e do complexo *ccr* (LIVERMORE, 2000; IWG-SCC, 2011; ESPADINHA *et al.*, 2013; FLUIT *et al.*, 2013; SHORE & COLEMAN, 2013).

Os antimicrobianos β -lactâmicos, juntamente com seus derivados, formam a mais importante classe de antimicrobianos, já que os agentes desta classe interferem com a biossíntese da parede celular bacteriana (CROSSLEY *et al.*, 2010). Quando a bactéria é exposta a agente dessa classe de antimicrobianos, este se liga às PBPs específicas na parede celular bacteriana e inibe a montagem das cadeias de peptídeo-glicano, ativando autolisinas que degradam a parede celular, levando a morte da célula bacteriana (MURRAY *et al.*, 2009).

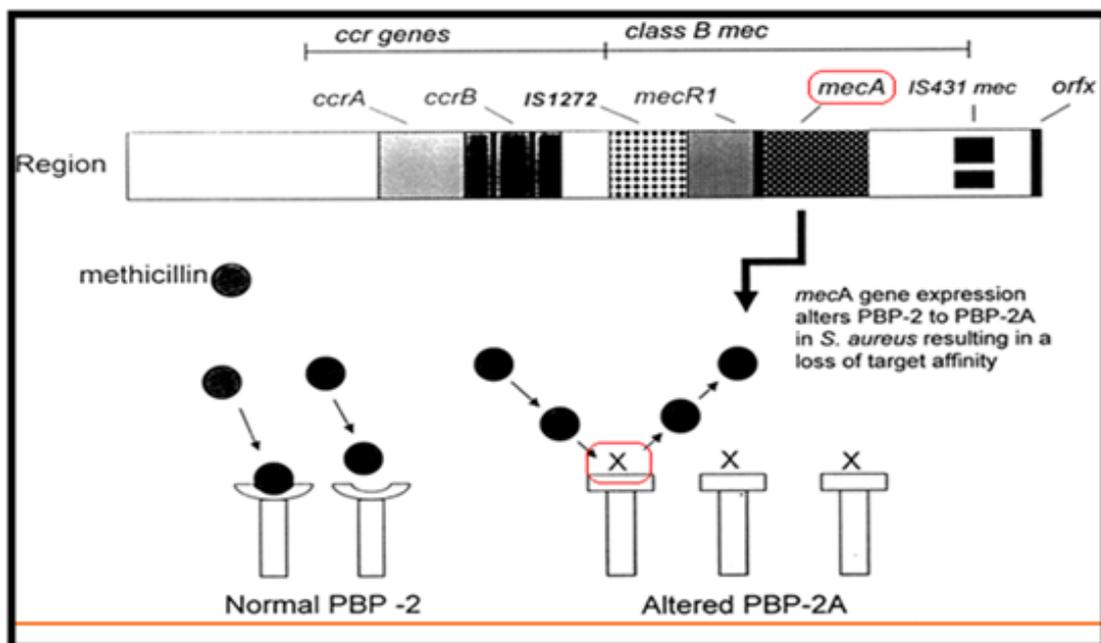
O primeiro antibiótico descoberto pertencente a essa classe, foi a penicilina (orinda do fungo do gênero *Penicillium*), por Alexander Fleming, em 1928, e passou a ser utilizados em humanos, a partir de 1941, onde o primeiro representante utilizado clinicamente foi a penicilina G (benzilpenicilina). Também na década de 1940, foram observadas propriedades antimicrobianas de outro fungo (*Cephalosporium acreminium*), e os antibióticos extraídos deste fungo, foram denominados cefalosporinas, sendo introduzidas na prática clínica na década de 1960. Todos os antimicrobianos β -lactâmicos, interferem na síntese do peptídeo-glicano da parede celular bacteriana. Após sua fixação a sítios de ligação na bactéria, os antimicrobianos inibem a enzima que faz a transpeptidação. Como efeito bactericida adicional, ocorre a inativação de um inibidor de enzimas autolíticas na parede celular, levando a lise bacteriana (PERES *et al.*, 2007).

Há também a presença de sequências de inserção relacionadas com a integração de genes que determinam a resistência a outros antimicrobianos. Essas características genéticas,

explicam a multirresistência a outros antimicrobianos, além da oxacilina, em cepas de SCN (KAISER *et al.*, 2010). Segundo D'Azevedo *et al* (2008), a falha na determinação da resistência à oxacilina poderá acarretar em uma terapêutica ineficaz, levando ao uso desnecessário e indiscriminados de antimicrobianos. Os antimicrobianos atuam como agentes seletivos, ocorrendo um aumento na prevalência de cepas bacterianas resistentes, nas últimas décadas (MOTA *et al.*, 2005).

S. epidermidis é uma das espécies de maior importância entre os SCN resistentes a meticilina. Na atualidade, aproximadamente entre 80% e 90% dos *S. epidermidis* isolados de pacientes com infecções nosocomiais, possuem o gene *mecA*. A alta prevalência do gene, reforça a crescente resistência a diferentes grupos de antimicrobianos (CONTRETRAS, *et al.*, 2013).

Figura 1 - Presença do gene *mecA*, codificando a PBP2a (PBP modificada), expressando a resistência



Fonte: Adaptado de Medscape

1.7 Resistência a vancomicina

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).

A vancomicina é um glicopeptídeo complexo que interrompe a síntese do peptídeoglicano da parede celular em bactérias Gram-positivas, assim como os antimicrobianos penicilínicos (MURRAY *et al.*, 2009). A resistência à vancomicina ocorre através da mutação genética, onde, os micro-organismos passam a sintetizar o dipeptídeo D-Alanina-D-Lactato, ao invés do dipeptídeo D-Alanina-D-Alanina, havendo uma interação eletrostática repulsiva, no lugar da ligação de hidrogênio, impedindo assim, a ação da transglicolase (não ocorrendo à transferência da fração básica para os locais de síntese de parede) e da reação de transpeptidação (onde há o bloqueio da remoção da D-alanina terminal – pela ação da enzima D-alanina-carboxipeptidase – e conseqüentemente, da formação das ligações cruzadas pela enzima transpeptidase). Isto ocorre, pois a molécula é volumosa, e desta forma impede a interação das enzimas com o peptídeoglicano (SILVEIRA *et al.*, 2006; VERMELHO *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2011).

Quando houve o reconhecimento da vancomicina como um poderoso antimicrobiano, ocorreu um período de “tranquilidade” na guerra contra esses micro-organismos. Em 1988, apareceram as primeiras cepas resistentes a vancomicina (enterococos). Com isso, começou a se pensar em como combater o avanço das infecções causadas por essas cepas e, também, de como prevenir o aparecimento das mesmas. O controle das infecções e a educação da população foram algumas medidas tomadas para conter a propagação dos micro-organismos (SILVEIRA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2011). Em 1966, foi identificada no Japão, a primeira cepa de *S. aureus* com resistência intermediária (suscetibilidade reduzida) a vancomicina (VISA – “vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*”). Outros isolados de VISA foram relatados em vários países, inclusive no Brasil. Em junho de 2002, foi identificado no EUA,

em Michigan, o primeiro caso de *S. aureus* resistente a vancomicina (VRSA – “vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*”), que possuía uma concentração inibitória mínima de 1024µg/ml , cerca de 1000 vezes a concentração inibitória mínima habitual da vancomicina para *S. aureus* (MIMICA & BEREZIN, 2006).

1.8 Tolerância bacteriana

No início da década de 70, foi reconhecido um problema adicional de resistência, a tolerância bacteriana a antimicrobianos. A tolerância é considerada quando a concentração bactericida mínima é 32 vezes maior (e às vezes, até mais) que a concentração inibitória mínima. A tolerância pode provocar efeitos semelhantes à resistência em circunstâncias como: sepse em pacientes imunocomprometidos, endocardites ou osteomielites, ocorrendo falência na terapêutica com oxacilina em infecções por *Staphylococcus* tolerantes a esta droga. As bactérias dispõem de plasmídios e transposons que podem permitir a disseminação deste mecanismo de resistência (TAVARES, 2009).

Biofilmes são frequentemente associados com à tolerância bacteriana, que pode ser explicado, em parte, pela presença de uma sub-população de células bacterianas em estado de replicação não reversível, o que, conseqüentemente, pode manter uma infecção persistente. Estas células bacterianas, podem ser definidas como estando num estado “dormente”, geralmente apresentando um metabolismo baixo, permitindo-lhes sobreviver e resistir sob condições estressantes, como a redução da disponibilidade de nutrientes, falta de oxigênio, a variação de temperatura, salinidade, e variações de pH (CARVALHAIS *et al.*, 2014).

1.9 Biofilme

O principal fator de virulência dos SCN é a sua capacidade de aderir e formar biofilme em variedade de superfícies inertes e vivas. Os biofilmes são comunidades bacterianas heterogêneas existentes dentro de uma matriz composta por proteínas e polissacarídeos e sua composição depende, muitas vezes, de fatores ambientais, como a disponibilidade de nutrientes e o estresse mecânico (SCHERR *et al.*, 2014). O biofilme é um dos principais

fatores para infecção bacteriana persistente ou crônica, e muitas vezes requer a remoção do dispositivo colonizado para o efetivo controle do processo infeccioso, já que as bactérias formam macrocolônias, protegendo-se dos anticorpos, de outros mecanismos de defesa do hospedeiro e da ação dos antimicrobianos (GAD *et al.*, 2009; FARINA *et al.*, 2013; SCHERR *et al.*, 2014). A capacidade de aderência é fundamental para a formação de biofilme, sendo responsável pela fixação celular em uma superfície, sendo a adesão intercelular, responsável pela acumulação de bactérias em multicamadas, contribuindo, assim, para o crescimento populacional e para a proteção celular, o que dificulta a atividade imunológica do hospedeiro e da ação dos antimicrobianos (HERNÁNDEZ *et al.*, 2010; LAVERTY *et al.*, 2014).

Segundo, Kouidhi *et al* (2010), a formação do biofilme está sujeita a uma regulação complexa que é influenciada por uma série de fatores ambientais. As espécies formadoras de biofilme produzem uma matriz exopolissacarídica (polissacarídeo extracelular) chamada de *slime* (Figura 2), que se acredita constituir uma fase inicial da formação do biofilme, sendo importante para a colonização (BERNADI *et al.*, 2007; LIDUMA, *et al.*, 2012). Segundo Hernández *et al* (2010), a formação do biofilme é iniciada quando ocorre a adesão da bactéria à superfície livre do substrato, seguida da proliferação de células bacterianas, formando múltiplas camadas (fase de acúmulo) (Figura 3). Após o estabelecimento da camada da *slime*, algumas células são capazes de escapar do biofilme podendo ser levadas a novos sítios, reiniciando o processo de colonização (TERASAWA, 2006). A importância do papel desempenhado pelo *slime* é reforçada pela associação frequente a uma menor susceptibilidade aos antimicrobianos e a dificuldade em erradicar infecções crônicas (ARSLAN & ÖZKARDES, 2007). A habilidade de expressar diferentes fenótipos e produzir *slime* garante aos SCN uma grande competência de colonizar diferentes ambientes (BERNARDI, 2005).

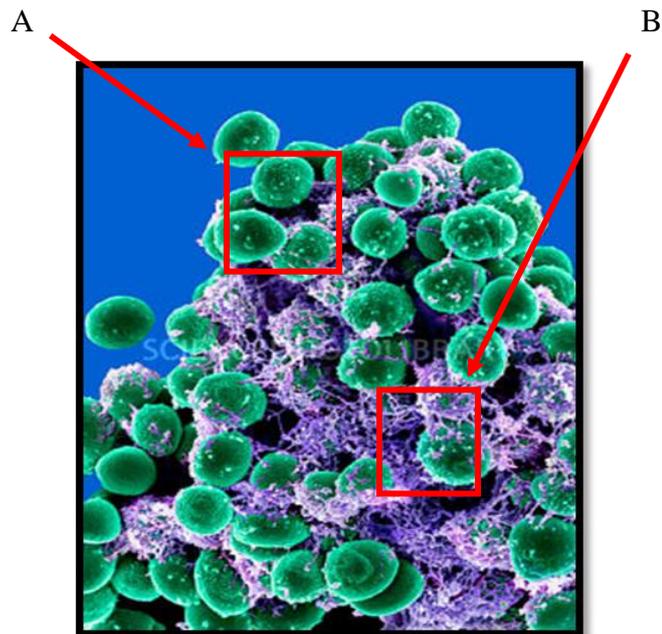
Os genes que codificam as principais proteínas envolvidas na formação do biofilme fazem parte do *operon icaADBC* que codifica a produção de adesina polissacarídica intercelular (“polissaccharide intercellular adhesin”, PIA), que faz a mediação entre a adesão intercelular de bactérias e a acumulação de multicamadas de biofilme e a adesina polissacarídica capsular (“Capsular polysaccharide adhesin”, PSA). Cada gene (*icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC*) é responsável por fatores patogênicos e de virulência relevantes envolvidas na síntese da PIA. A transcrição do *operon icaADBC* é regulada negativamente por um gene regulatório de uma sequência adjacente, o gene *icaR*. A evidência da importância do gene *icaR* foi estabelecida através de deleção do mesmo, havendo então, um aumento da produção de PIA. O gene *icaA* codifica uma proteína transmembranar que trabalha em conjunto com o gene *icaD*. A presença do gene *icaC*, 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 *icaA*, *icaD* e *icaC* é um requisito necessário para a produção de PIA. A presença do gene *icaB*, é importante para catalisar a desacetilação da sequência poli-N-acetilglicosamina, aumentando a virulência e as propriedades adesivas da PIA. O papel do *operon icaADBC* na regulação da formação de biofilme, na aderência e na virulência foi provado pela expressão de biofilme após a introdução da sequência em estirpes de *S. epidermidis*, que eram previamente *icaADBC*-negativo e não formavam biofilme (TRABULSI & ALTERTHUM, 2005; LAVERTY *et al.*, 2014).

Acredita-se que a produção do biofilme mediado pela PIA forneça vantagem seletiva na colonização dos dispositivos associados (WEISSER *et al.*, 2010). A expressão do *operon icaADBC* 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 (HERNÁNDEZ *et al.*, 2010).

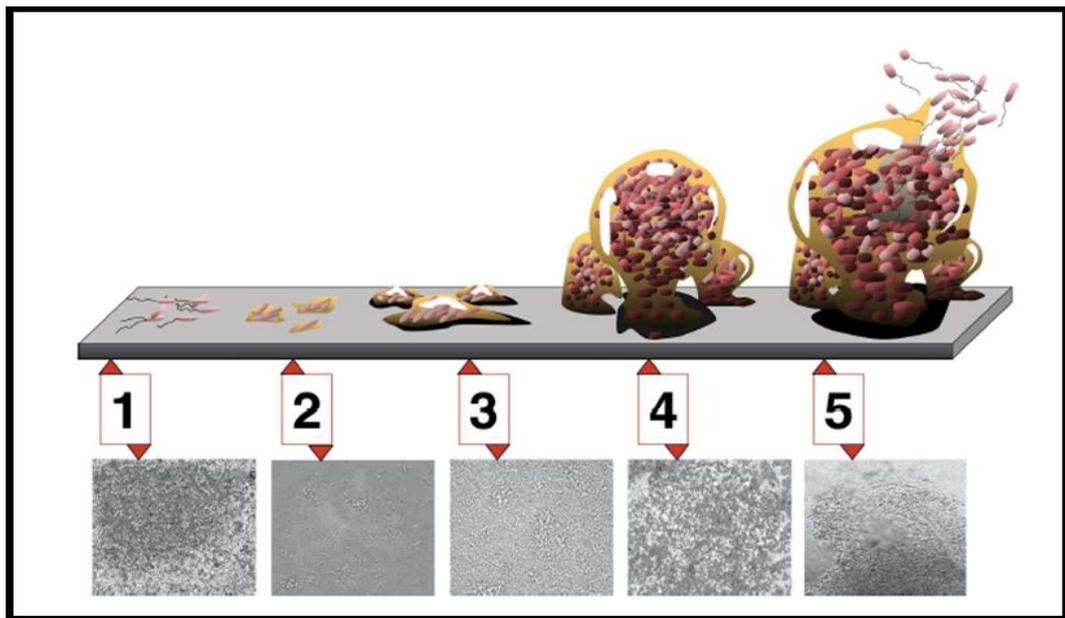
Sequências homólogas aos genes *icaADBC* também foram encontrados em muitas bactérias patogênicas Gram-negativas, sendo a produção de PIA confirmada bioquimicamente e/ou imunologicamente em *Acinetobacter baumannii*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Bordetella* spp, *Burkholderia* spp, *Escherichia coli* e *Yersinia pestis* (GÖKÇEN *et al.*, 2013).

Figura 2. Micrografia de varredura de etapas iniciais da formação do biofilme por *S. epidermidis* (A), envolto pelo *slime* (B).



Fonte: Science Photo Library

Figura 3. Etapas da formação do biofilme por *Staphylococcus sp.* Formação em quatro etapas: (1 e 2) adesão inicial, (3) acúmulo, (4) maturação e (5) desprendimento. Fonte: Lazzarotto, 2010.



Legenda: Formação em quatro etapas: (1 e 2) adesão inicial, (3) acúmulo, (4) maturação e (5) desprendimento. Fonte: Lazzarotto, 2010.

1.10 Produção de biofilme por *Staphylococcus* spp.

A adesão primária ou inespecífica dos *Staphylococcus* é devida, principalmente, à hidrofobicidade de superfície celular. Um composto de polímeros de alto peso molecular (28 kDa), a PSA, oferece proteção contra a resposta imune do hospedeiro, através da formação da cápsula bacteriana que age como uma barreira à fagocitose (LAVERTY *et al.*, 2014). Laverty *et al* (2014) observaram que a PSA é responsável pelo processo de fixação da bactéria à superfície, enquanto o *slime* está ligado ao processo de acumulação e maturação do biofilme na superfície.

O processo de fixação dos SCN é intensificado pela presença da autolisina AtlE, que é codificada pelo gene *atlE*, que se liga às proteínas do plasma, presentes em biomateriais implantados. Existem várias proteínas e autolisinas ligadas à superfície de *S. epidermidis* que são responsáveis pela ligação com o colágeno, a vitronectina, a fibronectina e fibrinogênio e outras proteínas presentes na matriz extracelular. Entre essas proteínas e autolisinas encontramos, a lipase extracelular de ligação ao colágeno (GehD), a autolisina Aae, que possui uma atividade de ligação da vitronectina, a proteína Embp (“Extracellular matrix-binding protein”), codificada pelo gene *ebp*, que está envolvida com ligação da fibronectina, e é necessária para a fixação primária e acúmulo de biofilme em superfícies recobertas com fibronectina. A interação de *S. epidermidis* com o fibrinogênio é facilitada por uma proteína ligadora de fibrinogênio (Fbe/SdrG), codificada pelo gene *fbe*. A proteína associada ao biofilme (Bap) é, também, uma proteína de superfície envolvida no processo de formação do biofilme (LAZZAROTTO, 2010; LAVERTY *et al.*, 2014; LEMBRÉ *et al*, 2014).

Embora a expressão do *operon icaADBC* e sua produção associada a PIA, seja o mecanismo mais estudado de formação de biofilmes em *S. epidermidis*, um número de estirpes de *S. epidermidis* que não apresentam o *operon icaADBC* ainda possuem a capacidade de formar biofilmes por meio de mecanismos alternativos. Estes mecanismos alternativos incluem proteínas, tais como a proteína Embp e a proteína associada ao acúmulo (Aap) codificada pelo gene *aap* que exerce atividade de adesina intercelular responsável pelo acúmulo de biofilme e o DNA extracelular (LINNES *et al.*, 2013).

A descoberta de uma inserção mutante (Tn917) em *S. epidermidis*, confirmou a importância de hidrofobicidade, particularmente em relação aos plásticos. Foi observado que este *S. epidermidis* “mutante” era significativamente menos hidrofóbico do que uma estirpe de

tipo selvagem (S-47) e, portanto, não foi capaz de aderir a uma superfície de poliestireno (LAVERTY *et al.*, 2014).

Ao contrário do que já é sabido para *S. epidermidis*, a virulência de *S. haemolyticus* em geral é, em grande parte, desconhecida. A formação de biofilmes em *S. haemolyticus in vitro* tem sido relatada, porém os mecanismos moleculares envolvidos não foram bem esclarecidos. A presença de um operon *ica* em *S. haemolyticus* tem sido relatada, mas até o momento, sua contribuição para a formação de biofilme não é clara (FREDHEIM *et al.*, 2009).

Mecanismos de sobrevivência de *Staphylococcus* são definidas por dois sistemas de *quorum-sensing*, o *agr* (*agrB*, *agrD*, *agrC* e *agrA*) e o *luxS*. A ativação do sistema *agr* correlaciona a entrada na fase estacionária de crescimento bacteriano, com a regulação negativa da superfície da célula. O sistema de *quorum-sensing luxS*, está presente tanto em bactérias Gram-positivas e quanto em bactérias Gram-negativas (LAVERTY *et al.*, 2014; MERTENS & GHEBREMEDHIN, 2013).

1.11 Justificativa

Nas últimas décadas, os SCN passaram a ser reconhecidos como agentes etiológicos de processos infecciosos diversos, sendo a presença de cateteres o mais importante fator de risco associado, tornando a alta incidência de infecção hospitalar por esses agentes uma das maiores preocupações da área da saúde. As infecções causadas pelos SCN permanecem um grande problema de Saúde Pública devido ao crescente aumento da resistência bacteriana aos diversos agentes antimicrobianos utilizados na prática clínica. Portanto, a análise de aspectos epidemiológicos relacionados à colonização e/ou infecção por SCN ocorridas tanto na comunidade quanto no ambiente hospitalar, além do estudo da evolução clínica dos pacientes, são fatores indispensáveis para a prevenção e controle do aparecimento desses patógenos multirresistentes na comunidade.

Os SCN, em especial cepas de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, que são os mais frequentemente isolados em espécimes de humanos, passaram a apresentar resistência à oxacilina e a outros antimicrobianos. Assim, os antibióticos do grupo dos glicopeptídios (vancomicina) passaram a constituir uma das principais opções terapêuticas nas infecções estafilocócicas em ambiente hospitalar. A vancomicina foi introduzida na clínica, em 1958 e a

utilização desta droga aumentou dramaticamente nos últimos 20 anos, em decorrência do aumento na prevalência de *S. aureus* e SCN resistentes à oxacilina. Neste sentido, é necessário que se estabeleça a vigilância permanente tanto da patogenicidade, quanto da resistência e da tolerância bacteriana dos SCN aos antimicrobianos em questão.

Pouco se sabe a respeito da contaminação de fômites, mesmo se sabendo que eles são uma fonte importante de infecção nosocomial. Os estudos relacionados a contaminação de fômites, são, muitas da vezes, dirigidos para os *S. aureus*. Mesmo sendo reconhecidos como fonte de transmissão, pouco é estudado sobre a contaminação de fômites por SCN.

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo geral investigar a presença de SCN em fômites (estetoscópios, termômetros e esfigmomanômetros) no ambiente hospitalar, identificar as espécies *S. haemolyticus* e *S. epidermidis* e correlacionar seus perfis de resistência aos antimicrobianos com a capacidade de produção de biofilme.

Neste estudo foram desenvolvidos os seguintes objetivos específicos:

- ✓ Identificação em nível de espécie, os SCN através de testes fenotípicos convencionais e pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR);
- ✓ Determinação dos perfis de sensibilidade a diversos agentes antimicrobianos empregados na clínica médica;
- ✓ Determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) e das concentrações bactericidas mínimas (CBM) de oxacilina e vancomicina;
- ✓ Avaliação da produção de biofilme na ausência e na presença de oxacilina e de vancomicina através de metodologias diversas - cultivo em Ágar Vermelho do Congo, aderência ao vidro e ao poliestireno, ensaios de microscopia eletrônica de varredura;
- ✓ Pesquisa da presença dos genes *mecA* e *ica* pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Colheita das amostras bacterianas e considerações éticas. A pesquisa da presença de SCN na superfície de estetoscópios, esfigmomanômetros e termômetros utilizados no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE/UERJ) foi previamente realizada com o auxílio de swabs estéreis embebidos em solução salina estéril e semeados em Mueller Hinton Ágar, em até 40 minutos após a coleta (SUED, 2010). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto – Registro 2678/2010 (Anexo 1).

3.1 Identificação bacteriana

3.1.1 Identificação do gênero *Staphylococcus*

As amostras foram semeadas inicialmente, em Ágar Sangue de carneiro e incubadas a 35°C, por 48h, para análise de pureza, morfologia colonial e verificação da produção de hemólise. Posteriormente, as amostras de SCN foram submetidas a testes preliminares de identificação como: coloração de Gram, catalase, prova da coagulase, prova da desexirribonuclease (DNase) e manitol (KONEMAN *et al.*, 2008).

3.1.2 Testes fenotípicos convencionais

Para identificação dos SCN em nível de espécie, inicialmente as amostras foram crescidas em Ágar Sangue (35°C/48h), e foram submetidas aos seguintes testes bioquímicos: expressão do fator “clumping”, acidificação a partir da maltose, xilose, manose e trealose, produção de ornitina descarboxilase, crescimento em atmosfera de anaerobiose, produção de urease, produção da enzima pirrolidonil arilamidase (PYR), produção da enzima fosfatase e teste de sensibilidade à novobiocina e a desferrioxamina. As leituras de todos os testes foram feitas em

24 horas e 48 horas, sendo que no crescimento em atmosfera de anaerobiose também foram realizadas leituras em 72 horas, 96 horas e 120 horas (LEÃO, 2002; IORIO, 2007) (Tabela 1):

Expressão do fator “clumping” - A produção de “fator clumping” foi verificada utilizando-se o sistema comercial “Slidex Staph Plus” (bioMérieux, Paris, França), segundo recomendação do fabricante. A amostra padrão utilizada como controle positivo foi *S. aureus* ATCC 25923, e como controle negativo *S. epidermidis* ATCC 12228.

Acidificação a partir da maltose, xilose, manose e trealose - Algumas colônias foram inoculadas em meio Purple Broth Base (Difco Labs), contendo 1% de: maltose, xilose e manose. Os tubos foram incubados em banho-maria a 35-37°C por 18-24h. Para o tubo contendo manose, a leitura foi feita com tempo de incubação prolongado (até 48h) devido a resultados positivos tardios que ocorrem para algumas espécies. A reação positiva foi indicada pela mudança na coloração original púrpura do meio, para amarela, como consequência da produção de ácidos a partir dos carboidratos. Para xilose, o controle positivo foi: *S. xylosus* – ATCC 25591 e o controle negativo foi: *S. epidermidis* – ATCC 12228. Para maltose, o controle positivo foi: *S. epidermidis* – ATCC 12228 e o controle negativo foi: *S. cohnii* – BAC 1187. E para manose, o controle positivo foi: *S. xylosus* – ATCC 25591 e o controle negativo foi: *S. saprophyticus* – ATCC 15305. A fermentação do carboidrato trealose foi verificada em caldo vermelho de fenol, com modificações: (1,3% [p/v] de peptona, 0,13% [p/v] de extrato de carne, 0,66% [p/v] de NaCl e 0,0024% [p/v] de vermelho de fenol, pH 7,4). Os carboidratos 1,25 (p/v) de manose e 1,25 (p/v) de trealose (Vetek Química Fina LTDA, Rio de Janeiro, Brasil) foram adicionados após filtração. A leitura foi realizada em 24 e 48h de incubação, a 35°C. A modificação da coloração do meio para amarela foi indicativa de resultado positivo. Como controles das reações, foram utilizadas as amostras *S. aureus* ATCC 12600, como controle positivo, e *S. epidermidis* ATCC 14990 como controle negativo.

Produção de ornitina descarboxilase - Uma alíquota densa foi inoculada em 3mL do meio Moeller Decarboxilase Basal Medium (Difco Labs) acrescido de 1% L-ornitina, pH 6,0. Paralelamente, foi inoculado um meio controle, sem o aminoácido. Ambos foram cobertos com óleo mineral estéril de forma a se obter uma coluna de 4 a 5 mm. Os tubos foram incubados à 35-37°C, em banho-maria, por 24h. O resultado positivo foi caracterizado pela mudança de coloração original do meio contendo aminoácido para violeta, conseqüente à sua

alcalinização. Foi utilizado *Shigella sonnei* – BAC 447 como controle positivo e *S. saprophyticus* – ATCC 15305, como controle negativo.

Crescimento em atmosfera de anaerobiose – Foram preparadas suspensões em solução salina fisiológica estéril (NaCl 0,85%) padronizadas com turbidez equivalente a 0,5 da escala de McFarland. Alíquotas de 0,1 ml da suspensão foram inoculadas em tubos contendo 8 ml do meio tioglicolato (Oxoid – Basingstake, Hampshire, Reino Unido) e incubados a 35-37°C por até 5 dias, com observações diárias. O crescimento em anaerobiose foi caracterizado pelo aparecimento de turvação no terço inferior do tubo. Foi utilizado *S. epidermidis* – ATCC 12228 como controle positivo e *S. hominis* – BAC 115, como controle negativo.

Expressão da enzima urease - A expressão da enzima urease foi verificada em caldo uréia de Rustigian & Stuart, segundo MacFaddin (1977) com modificações, conforme descrito a seguir: 1,2% (p/v) KH_2PO_4 , 2,4% (p/v) de Na_2HPO_4 , 0,14% (p/v) de extrato de levedura e 0,014% (p/v) de vermelho de fenol, pH 7,6. O caldo foi autoclavado, e a seguir, a uréia 2,5% (p/v) (VETEC, Química e Representações LTDA, Rio de Janeiro, Brasil) esterilizada por filtração, foi adicionada. A leitura foi realizada em até 48h de incubação, a 35°C. A ausência de alteração na coloração do meio (amarela) foi considerada como resultado negativo. A amostra *S. epidermidis* ATCC 14990 foi utilizada como controle positivo, e a amostra *S. haemolyticus* ATCC 29970 foi utilizada como controle negativo.

Produção de PYR (enzima pirrolidonil arilamidase) - A expressão da enzima pirrolidonil arilamidase foi verificada em caldo TSB (“Trypticase Soy Broth”, Oxoid), contendo 0,006% (p/v) de L-pirroglutamil- β -naftilamina (Sigma Aldrich). A leitura do teste foi realizada pela adição de 50 μ L da solução reveladora, contendo 1% (p/v) dimetilaminocinamaldeído (Sigma Aldrich), após 24h de incubação, a 35°C. O aparecimento de uma coloração rosa ou púrpura, em até 10 min após a adição do reativo, foi considerado como resultado positivo. Como controle positivo foi utilizada a amostra *S. haemolyticus* ATCC 29970 e como controle negativo, *S. aureus* ATCC 12600.

Produção da enzima fosfatase - Foi verificada em caldo PDP (Difosfato de fenoltaleína), segundo MacFaddin (1977), com modificações [0,37% (p/v) de extrato de carne; pH 7,5], adicionado de 2% (v/v) de solução PDP [0,5% (p/v) de difosfato de fenoltaleína] (Reagen,

Quimibrás Indústrias Químicas S.A., Rio de Janeiro, Brasil). A leitura foi realizada após a adição de 10µL da solução reveladora de NaOH a 40% (v/v), após 24h de incubação, a 35°C, observando-se o aparecimento de coloração rosa para amostras positivas. As amostras controles utilizadas foram *S. aureus* ATCC 12600 (controle positivo) e *S. haemolyticus* ATCC 29970 (controle negativo).

Susceptibilidade à novobiocina e desferrioxamina - Uma suspensão bacteriana, com uma turbidez equivalente a 1,0 da escala McFarland foi preparada em solução salina fisiológica estéril (NaCl 0,85%) e semeada em Mueller Hinton Ágar (Difco Laboratories) utilizando-se um swab estéril. Foram depositados sobre a superfície do meio de cultura: um disco contendo 5µg de novobiocina (CECON) e um disco de papel de filtro impregnado com 10µg de desferrioxamina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). O meio foi incubado a 35°C, por 24h. Um halo menor ou igual a 16mm foi indicativo de resistência à novobiocina (BANNERMAN & PEACOCK, 2007). As amostras que apresentaram qualquer halo de inibição no disco de desferrioxamina foram consideradas susceptíveis (MONSEN *et al.*, 1998). As amostras utilizadas como controles dos testes foram *S. saprophyticus* ATCC 15305 (resistente à novobiocina) e *S. epidermidis* ATCC 14990 (sensível à novobiocina), *S. warneri* ATCC 10209 (resistente à desferrioxamina) e *S. hominis* ATCC 27844 (sensível à desferrioxamina).

Tabela 1 - Testes fenotípicos empregados na identificação de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativo

| Espécies | Catalase | Crescimento Anaerobiose | Coagulase (plasma coelho) | Fator clumping | Maltose | Manose | Xilose | Trealose | Ornitina | Urease | PAL | Novobiocina | Desferrioxamina | PYR |
|------------------------|----------|-------------------------|---------------------------|----------------|---------|--------|--------|----------|----------|--------|-----|-------------|-----------------|-----|
| <i>S. epidermidis</i> | + | + | - | - | + | + | - | - | V | + | V | S | S | - |
| <i>S. haemolyticus</i> | + | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - | S | S | + |
| <i>S. cohnii</i> | + | V | - | - | V | V | - | + | - | - | - | R | S | - |
| <i>S. simulans</i> | + | + | - | - | V | V | - | V | - | + | V | R | S | + |
| <i>S. hominis</i> | + | - | - | - | + | - | - | V | - | + | - | S | S | - |
| <i>S. xylosus</i> | + | V | - | - | + | + | + | + | - | + | V | S | S | V |
| <i>S. lugdunensis</i> | + | + | - | + | + | + | - | + | + | V | - | S | S | + |
| <i>S. warneri</i> | + | + | - | - | + | - | - | + | - | + | - | S | R | - |

Leão 2002; Iorio 2007. PAL, fosfatase alcalina; PYR, pirrolidonil arilamidase; S-sensível; R-resistente; V-variável; +* - reação tardia ou lenta

3.1.3 Método molecular para identificação das espécies de *Staphylococcus* e detecção do gene *mecA* - PCR multiplex (mPCR)

A liberação do DNA bacteriano através de lise térmica foi realizada de acordo com Schuenck *et al* (2008) com modificações. Três a cinco colônias de cada amostra cultivada em Ágar Sangue foram transferidas para 100µL de tampão TE (10mM Tris [Sigma], 1mM EDTA [Sigma], pH 7,8). Esta suspensão foi mantida à temperatura de ebulição, em torno 100°C, por 10 minutos e, em seguida centrifugada por 1 minuto, a 7.000 rpm. Em seguida, foram coletados os sobrenadantes com DNA liberado e usados para a reação de PCR.

A identificação das espécies *S. haemolyticus* e *S. epidermidis* foi realizada pela detecção de segmentos genômicos específicos de cada espécie, com detecção simultânea do gene *mecA*. Foram utilizados os oligonucleotídeos SHF e SHR para *S. haemolyticus* (SCHUENCK *et al.*, 2008); SE1 e SE2 para *S. epidermidis* (PEREIRA, 2007); MRS1 e MRS2 para detecção do gene *mecA* (SANTOS *et al.*, 1999). Os oligonucleotídeos utilizados estão descritos na Tabela 2.

A amplificação foi realizada em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient), utilizando volume total de 50µL para a reação composta de 10µL de DNA liberado, 200µM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) (Life Technologies), 0,25µM de cada um dos oligonucleotídeos SHF e SHR, SE1 e SE2 e MRS1 e MRS2, 1,5U de *Taq* DNA polimerase (Biotools, Madrid, Espanha), 5µL do tampão da enzima 10X (10 mM Tris HCl, 25mM KCl) e 2mM de MgCl₂.

Após realização de uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, foram realizados 30 ciclos de amplificação com desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, seguido de uma etapa final de extensão, realizada a 72°C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em E-gel (agarose a 2% - Invitrogen), no equipamento de *E-gel iBase Power System* (Invitrogen), por 25 minutos. A visualização dos produtos de amplificação foi obtida em transiluminador de luz ultravioleta e, posteriormente, o gel foi fotografado (*Kodak Digital Science Electrophoresis Documentation & Analysis System 120*).

3.2 Método molecular para detecção do gene *icaAD* (PCR)

A liberação do DNA bacteriano através de lise térmica foi realizada de acordo com Schuenck *et al* (2008) com modificações.

Nos ensaios de PCR realizados para detecção da presença do genes *ica* foram utilizados os oligonucleotídeos descritos na Tabela 2 (JONG-HYUN *et al.*, 2008).

Após realização de uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, foram realizados 30 ciclos de amplificação com desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, seguido de uma etapa final de extensão, realizada a 72°C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em E-gel (agarose a 2% - Invitrogen), no equipamento de *E-gel iBase Power System* (Invitrogen), por 25 minutos. A visualização dos produtos de amplificação foram realizada em transiluminador de luz ultravioleta e, posteriormente, o gel foi fotografado (*Kodak Digital Science Electrophoresis Documentation & Analysis System 120*).

Tabela 2 - Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nos ensaios de PCR

| Gene | Sequência do Primer 5' → 3' | Tamanho do Amplicon(bp) | Referência |
|--------------------|-----------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| <i>SH-F</i> | GGTCGCTTAGTCGGAACAAT | 285 pb | Schuenck <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>SH-R</i> | CACGAGCAATCTCATCACCT | | Schuenck <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>SE-1</i> | CAGTTAATCGGTATGAGAGC | 218 pb | Pereira, 2007 |
| <i>SE-2</i> | CTGTAGAGTGACAGTTTCGGT | | Pereira, 2007 |
| <i>MRS1 (mecA)</i> | TAGAAATGACTGAACGTCCG | 154 pb | Santos <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>MRS2 (mecA)</i> | TTGCGATCAATGTTACCTAG | | Santos <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>icaAD 1</i> | GACAAGAACTACTGCTGCGT | 546 pb | Jong-Hyun <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>icaAD 2</i> | TACCGTCATACCCCTTCTCTG | | Jong-Hyun <i>et al.</i> , 2008 |

3.3 Determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos

O perfil de sensibilidade para os seguintes antimicrobianos foi determinado pela técnica de Disco-Difusão, segundo CLSI 2012 e os antimicrobianos testados foram: Cefoxitina (30µg), Gentamicina (10µg), Ciprofloxacina (5µg), Ceftazidima (30µg), Imipenem (10µg), Sulfametazol-Trimetropim (25µg) (SENSIFAR), Eritromicina (15µg) e Clindamicina (2µg) (OXOID, Hants, UK). Para as amostras identificadas com *S. haemolyticus*, foram testados os antimicrobianos já descritos, além de: Moxifloxacina (5µg) e Linezolida (30µg) (OXOID, Hants, UK). Consideramos como multirresistentes as amostras resistentes a três ou mais classes diferentes de antimicrobianos.

3.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para oxacilina e para vancomicina

As determinações de concentração mínima inibitória, tanto para a oxacilina quanto para vancomicina, foram realizadas através da microdiluição em placa segundo CLSI (2012). O inóculo foi preparado com a semeadura das amostras em placa de Muller Hinton Ágar, incubado por 24 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, posteriormente semeado em Caldo Muller Hinton (1,5ml) e, novamente, incubado por 24 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Após a incubação, o inóculo foi padronizado pela escala 0,5 de McFarland e diluído (1:100) em Caldo Muller Hinton (MACFADDIN, 2000). O preparo da técnica foi feita com a produção da solução mãe onde foi pesado 10mg de oxacilina/vancomicina, adicionado os solventes e diluentes específicos para a oxacilina/vancomicina, e em seguida a solução foi filtrada através de uma membrana filtrante. Partindo da solução mãe, foi retirada uma alíquota que foi calculada pela fórmula: $C_i.V_i=C_f.V_f$, onde C_i é a concentração inicial da solução; V_i é o volume inicial que vamos retirar da solução mãe para obter a concentração desejada; C_f é a concentração final da solução; V_f é o volume final do meio. Depois foram colocados na microplaca 50µl do inóculo e 50µl da solução mãe. A microplaca foi incubada por 24 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, e posteriormente foi realizada a leitura. O primeiro poço onde não houve turvação foi à determinação da CIM. O último poço foi a amostra controle, onde foi colocado apenas o inóculo, sem adição de antimicrobianos. Conforme CLSI (2012), as amostras que

apresentarem CIM menor ou igual a 0,5µg/mL são consideradas sensíveis à oxacilina, já as amostras que apresentarem CIM maior que 0,5µg/mL, são consideradas resistentes à oxacilina. São consideradas sensíveis para vancomicina as amostras que apresentarem CIM menor ou igual 4µg/mL e são consideradas resistentes as amostras que apresentarem CIM maior ou igual 32µg/mL.

3.5 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) para oxacilina e para vancomicina

A definição para concentração bactericida mínima é a menor diluição na qual ocorre redução de 99,9% do crescimento bacteriano, neste caso, a detecção de 5 UFC ou menos, representam 99,9% de morte bacteriana (inóculo inicial x alíquota semeada x % viável permitida). Após a leitura da CIM, 10µl de cada poço sem crescimento bacteriano visível (sem turvação) foram transferidos para uma placa de Muller Hinton Ágar e incubada por 24 horas a 35°C ± 2°C. Posteriormente, foi realizada a leitura. O meio contido no poço controle de viabilidade da cepa também foi semeado com a finalidade de averiguar se a cepa se encontrava pura. A concentração foi considerada bactericida (morte bacteriana) quando o crescimento foi inferior a 5 UFC (DA SILVA, 2007).

3.6 Avaliação da produção de biofilme na ausência e na presença de oxacilina e/ou vancomicina

Os SCN foram semeados em Muller Hinton Ágar por 24 horas a 35°C ±2°C, e foram submetidos aos seguintes ensaios:

3.6.1 Método de crescimento em Ágar Vermelho do Congo (CRA)

A expressão da produção de *slime* foi avaliada através do método de crescimento em CRA, de três formas: na ausência de antimicrobianos, na presença de oxacilina, e na presença de vancomicina. Na ausência de antimicrobianos, as amostras foram semeadas em placa, em forma de *spot*, em triplicata, e foram incubados por 18-24 horas á $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e, posteriormente, por 24 horas a temperatura ambiente (aproximadamente 30°C), em aerobiose. Como controle positivo para o teste foi usado a amostra de *S. epidermidis* ATCC 35984. Colônias negras demonstram resultado positivo e colônias vermelhas ou rosa-avermelhadas negativo (CHAIEB *et al.*, 2005). Segundo Kaiser *et al.*, 2010, com modificações, as amostras foram semeadas em placa, em forma de *spot*, e em triplicata, contendo a concentração de oxacilina ou de vancomicina equivalente a $\frac{1}{4}$ da CIM (cada amostra possuía uma CIM, logo, cada tubo continha $\frac{1}{4}$ da CIM equivalente a amostra em questão), e foram incubados por 18-24 horas á $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e, posteriormente, por 24 horas a temperatura ambiente (aproximadamente 30°C), em aerobiose.

3.6.2 Determinação do padrão de aderência ao vidro

A aderência ao vidro foi avaliada de três formas: na ausência de antimicrobianos, na presença de oxacilina, e na presença de vancomicina. Na ausência de antimicrobianos, tubos 13 x 100 mm contendo 5ml de TSB foram utilizados para verificar a capacidade de aderência ao vidro. Para tal, alíquotas das suspensões bacterianas (10^8 bactérias/mL) foram inoculadas nos tubos e incubadas por 48h a 37°C . A cada 48h o meio foi retirado e uma nova partida foi acrescentada. Este procedimento foi repetido mais duas vezes. Por fim, as amostras foram classificadas com base nos seguintes padrões: I (+++) - bactérias aderidas nas laterais do tubo de vidro e na interface entre o meio de cultura e o ar; II (++) - bactérias aderidas nas laterais do tubo de vidro; III (+) – bactérias formando um anel na interface entre o meio de cultura e o ar; e IV (-) ausência de bactérias aderidas. Como controle positivo para o teste foi usado a amostra de *S. epidermidis* ATCC 35984 (MATTOS-GUARALDI & FORMIGA,1991). Na presença de oxacilina/vancomicina, foi realizada a mesma técnica, porém cada tubo continha

5ml de TSB com a concentração equivalente a $\frac{1}{4}$ da CIM (cada amostra possuía uma CIM, logo, cada tubo continha $\frac{1}{4}$ da CIM equivalente a amostra em questão) (GOMES *et al.*, 2013).

3.6.3 Avaliação da formação de biofilme em superfície de poliestireno

A produção de biofilme foi avaliada de três formas: na ausência de antimicrobianos, na presença de oxacilina, e na presença de vancomicina. Na ausência de antimicrobianos, a produção de biofilme foi avaliada qualitativamente através de uma modificação do método descrito previamente por Stepanovic (2000). As amostras foram inicialmente crescidas em meio TSA (“Tryptone Soy Agar”) à 37°C por 48h e suspensas em TSB com turvação equivalente 0,5 McFarland, e cultivadas à 37°C por 24h. Uma alíquota de 200µl de suspensão bacteriana em TSB foi dispensada em poço de uma placa de microtitulação de poliestireno de 96 poços. As placas foram incubadas a 37°C por 24h e, em seguida, lavadas duas vezes com 200µl em tampão salina fosfato (PBS) e, posteriormente 200µl de metanol foram adicionados a cada poço e mantidos por 15 minutos. Em seguida, o metanol foi retirado e a placa deixada em temperatura ambiente para secagem, 200µl de cristal violeta a 0,2% foram colocados em cada poço por 5 minutos e a placa foi lavada exaustivamente com água destilada. Depois de secos, se adicionou aos poços 200µl de ácido acético a 33%, a fim de eluir o corante. A avaliação de formação de biofilme foi realizada através da leitura de cada poço utilizando espectrofotômetro (570nm). Foram utilizados como controle positivo para o teste as amostras de *S. epidermidis* ATCC 12228 e como controle negativo, TSB estéril. As amostras podem ser classificadas em quatro categorias com base na DO: não aderente (-) = DO obtida menos que a DO do controle negativo (DOc); fracamente aderente (+) = $DOc < DO \leq (2 \times DOc)$; moderadamente aderente (++) = $(2 \times) DOc < DO \leq (4 \times DOc)$ e fortemente aderente (+++) = $DO > (4 \times DOc)$ (STEPANOVIC, 2000). Na presença de oxacilina/vancomicina, foi realizada a mesma técnica, porém as amostras foram semeadas em tubos contendo 3ml de TSB com a concentração equivalente a $\frac{1}{4}$ da CIM (cada amostra possuía uma CIM, logo, cada tubo continha $\frac{1}{4}$ da CIM equivalente a amostra em questão) (GOMES *et al.*, 2013).

3.7 Análise morfológica e estrutural de biofilme produzido em superfície de catéter pela técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

Foram avaliadas por MEV, cepas representantes de SCN. Primeiramente foi obtida a produção de biofilme, segundo Stepanovic (2000), acrescentando pequenos segmentos de 1 cm de cateter de poliuretano (Intracath) estéreis. O conteúdo de cada poço foi aspirado e lavado duas vezes com 1 mL de salina estéril. O material foi então fixado em solução de glutaraldeído a 2,5%, pós-fixado com tetróxido de ósmio a 1% e desidratado em diferentes soluções de etanol. Em seguida, o material foi submetido ao ponto crítico com dióxido de carbono, coberto com nanopartículas de ouro e examinados em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 5310 (FRANSON *et al.*, 1984), gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Sérgio Henrique Seabra (Centro Universitário Estadual da Zona Oeste – UEZO/RJ). O controle negativo foi realizado com segmentos de cateter de poliuretano estéreis, os quais também foram processados diretamente após a remoção da embalagem comercial. A cepa BR-CAT5003/BR de *Corynebacterium diphtheriae* isolada de cateter de nefrostomia foi utilizada como controle positivo (GOMES *et al.*, 2009).

3.8 Análise estatística

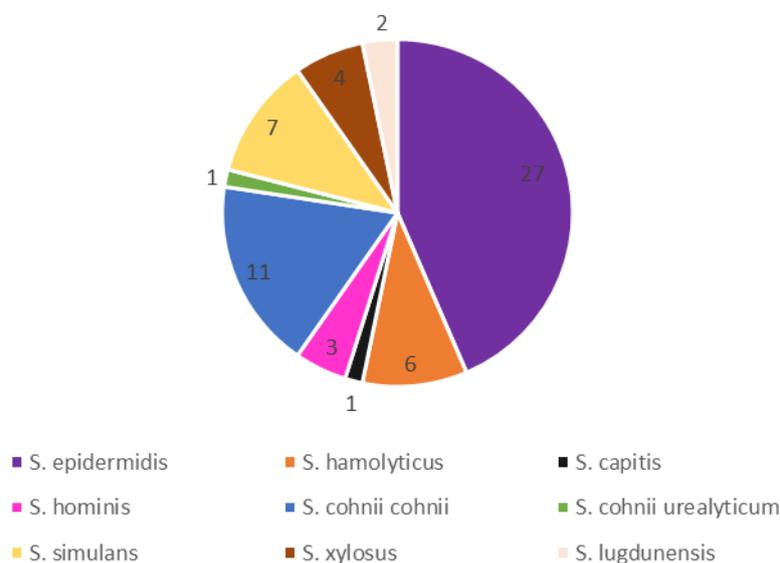
Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos três vezes. A análise da variância (one way ANOVA) pelo teste t de Student foi utilizada para avaliação dos resultados através do Programa Graphpad, sendo significativos os valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Número e espécies de amostras de SCN isoladas de fômites identificadas por testes bioquímicos convencionais

No total foram isoladas 62 amostras de SCN de estetoscópios, termômetros e esfigmomanômetros, além de outros fômites examinados em diferentes setores do HUPE/UERJ. A Figura 4, ilustra os micro-organismos que foram identificados pelos testes bioquímicos convencionais como: *S. epidermidis* (n=27; 43,5%), *Staphylococcus cohnii* subespécie *cohnii* (n=11; 17,7%), *Staphylococcus cohnii* subespécie *urealyticum* (n=01; 1,6%), *Staphylococcus haemolyticus* (n=06; 8,1%), *Staphylococcus simulans* (n=07; 11,3%), *Staphylococcus xylosus* (n=04; 8,1%), *Staphylococcus hominis* (n=03; 4,8%), *Staphylococcus lugdunensis* (n=02; 3,2%) e *Staphylococcus capitis* (n=01; 1,6%).

Figura 4 - Espécies de SCN (n= 62) isoladas de estetoscópios (n=17), termômetros (n=16), esfigmomanômetros (n=18) e outros fômites (n=11) identificadas por testes bioquímicos convencionais



4.2 Confirmação das espécies de amostras de SCN isoladas de fômites identificadas por PCR

A Figura 5A ilustra o ensaio de PCR-Multiplex aplicado na identificação das espécies *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* e a detecção do gene *mecA*. Os resultados dos ensaios de PCR realizados para a confirmação de espécies das seguintes amostras (n=35): *S. epidermidis* (n=22), *S. haemolyticus* (n=06), *S. cohnii cohnii* (n=03), *S. simulans* (n=02), *S. hominis* (n=01) e *S. xylosus* (n=01), estão demonstrados na Tabela 3.

Pelos ensaios de PCR, vinte nove amostras (82%) foram identificadas como *S. epidermidis*, e seis amostras (18%) foram identificadas como *S. haemolyticus*. Sete amostras identificadas fenotipicamente como outras espécies foram identificadas genotipicamente como *S. epidermidis*.

Tabela 3 - Resultados dos ensaios de PCR realizados para a confirmação das espécies de 35 amostras de SCN previamente avaliadas por métodos fenotípicos

| Amostras | Fenotipagem | Genotipagem | Total |
|--|------------------------|------------------------|---------------|
| 1EF/1BCG III, 2EF/4BCG II, 27F/2BCG II, 28F/2E2, 33F/4E5, 11EF/9E3 | <i>S. haemolyticus</i> | <i>S. haemolyticus</i> | 17,20% (n=06) |
| 3EF/4D2, 4EF/4D3, 5EF/5E5, 6EF/7CCT I, 9EF/7D4, 12TF/2CCT I, 13TF/6CCT III, 14TF/8D4, 15TF/8E1, 16TF/8E4, 17TF/10D1, 20EtF/2D4, 21EtF/2E1, 23EtF/5AECM I, 25EtF/8AECM I, 26EtF/12CCT I, 29F/4AECM I, 30F/4AECM III, 31F/4AECM IV, 32F/4D4, 34F/5BCG II, 35F/12E4 | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. epidermidis</i> | 62,80% (n=22) |
| 22EtF/3E2, 24EtF/5AECM III, 7EF/7CCT II, 8EF/7D3, 10EF/9/10CCT I, 18TF/10D3, 19TF/11D3 | Outras espécies* | <i>S. epidermidis</i> | 20,00% (n=07) |

**S. cohnii cohnii* (n=03), *S. simulans* (n=02), *S. hominis* (n=01) e *S. xylosus* (n=01)

4.3 Perfis fenotípicos expressos pelas amostras de *S. haemolyticus* e de *S. epidermidis* identificadas pelo PCR

Os perfis fenotípicos expressos pelas amostras de *S. haemolyticus* e de *S. epidermidis* estão apresentados na Tabela 4. O teste PYR mostrou-se indispensável para diferenciação das espécies *S. haemolyticus* e *S. epidermidis*.

Todas as amostras identificadas como *S. haemolyticus* tiveram comportamento homogêneo frente aos testes fenotípicos utilizados. Por outro lado, para as amostras identificadas como *S. epidermidis*, foi observada uma variação nos resultados dos testes: produção de urease, xilose, trealose, crescimento em anaerobiose e susceptibilidade a novobiocina para as seguintes amostras: 7EF/7CCTII, 8EF/7D3, 18TF/10D3, 19TF/11D3 e 22EtF/3E2.

4.4 Detecção dos genes *mecA* e *icaAD* pela técnica de PCR

A Figura 5B ilustra o ensaio de PCR aplicado na detecção do gene *ica*. Os resultados da detecção dos genes *mecA* e *ica* das amostras de *S. haemolyticus* e de *S. epidermidis* estão apresentados na Tabela 5.

Das seis amostras identificadas como *S. haemolyticus*, apenas uma (16,6%) foi positiva tanto para o gene *mecA* quanto para o gene *ica*; duas amostras (33,4%) foram positivas apenas para o gene *mecA*; e três amostras (50%) foram positivas apenas para o gene *ica*.

Das vinte e nove amostras identificadas como *S. epidermidis*, treze amostras (44,8%) foram positivas tanto para o gene *mecA* quanto para o gene *ica*; nove amostras (31%) foram positivas apenas para o gene *mecA*; uma amostra (3,4%) foi positiva apenas para o gene *ica*; e seis amostras (20,8%) foram negativas tanto para o gene *mecA* quanto para o gene *ica*.

Não houve associação estatística entre presença de gene *ica* e *mecA* ($p > 0,05$).

Tabela 4 - Perfis fenotípicos expressos por 06 amostras de *Staphylococcus haemolyticus* e 29 de *Staphylococcus epidermidis* identificadas pelo PCR

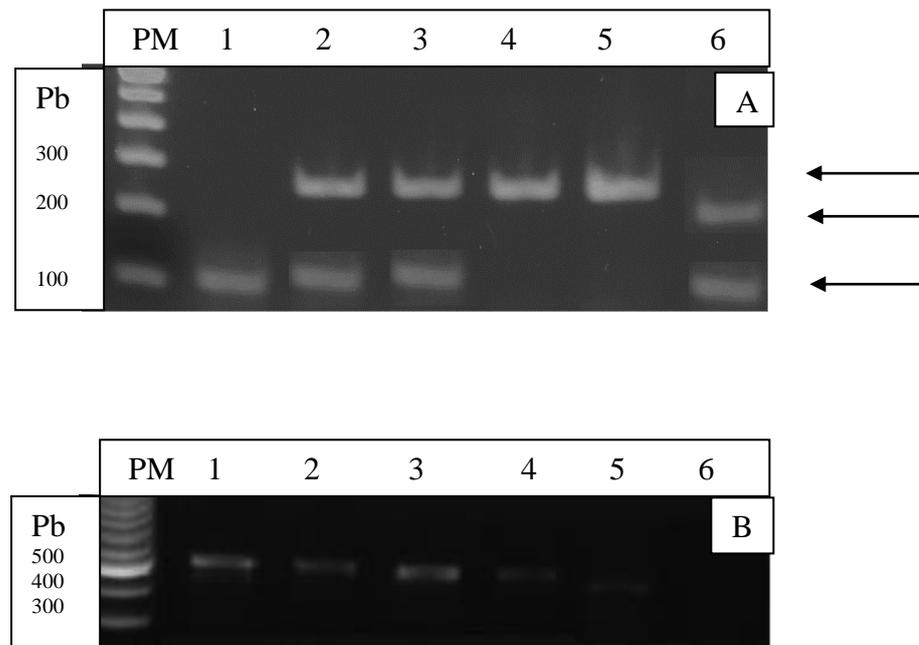
| Amostras* | Espécies definidas por | | Crescimento Anaerobiose | Fator clumping | Maltose | Xilose | Manose | Trealose | Urease | Ornitina | Fosfatase | Novobiocina | Desferrioxamina | PYR |
|-----------------|---------------------------|------------------------|----------------------------|----------------|---------|--------|--------|----------|--------|----------|-----------|-------------|-----------------|-----|
| | Genotipagem | Fenotipagem | | | | | | | | | | | | |
| 1EF/1BCG III | <i>S. haemolyticus</i> | <i>S. haemolyticus</i> | + | - | + | - | - | + | - | - | - | S | S | + |
| 2EF/4BCG II | <i>S. haemolyticus</i> | <i>S. haemolyticus</i> | + | - | + | - | - | + | - | - | - | S | S | + |
| 11EF/9E3 | <i>S. haemolyticus</i> | <i>S. haemolyticus</i> | + | - | + | - | - | + | - | - | - | S | S | + |
| 27F/2BCG II | <i>S. haemolyticus</i> | <i>S. haemolyticus</i> | + | - | + | - | - | + | - | - | - | S | S | + |
| 28F/2E2 | <i>S. haemolyticus</i> | <i>S. haemolyticus</i> | + | - | + | - | - | + | - | - | - | S | S | + |
| 33F/4E5 | <i>S. haemolyticus</i> | <i>S. haemolyticus</i> | + | - | + | - | - | + | - | - | - | S | S | + |
| 3EF/4D2 | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. epidermidis</i> | + | - | + | - | - | - | + | - | - | S | S | - |
| 4EF/4D3 | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. epidermidis</i> | + | - | + | - | - | - | + | - | - | S | S | - |
| 5EF/5E5 | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. epidermidis</i> | + | - | + | - | - | - | + | + | + | S | S | - |
| 6EF/7CCT I | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. epidermidis</i> | + | - | + | - | + | - | + | + | - | S | S | - |
| 7EF/7CCT II | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. cohnii</i> | + | - | + | - | + | + | - | - | - | S | S | - |
| 8EF/7D3 | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. xylosus</i> | + | - | + | + | + | + | + | - | - | S | S | - |
| 9EF/7D4 | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. epidermidis</i> | + | - | + | - | + | - | + | - | - | S | S | - |
| 10EF/9/10CCT I | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. simulans</i> | + | - | + | - | + | - | + | - | + | S | S | - |
| 12TF/2CCT I | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. epidermidis</i> | + | - | + | - | - | - | + | - | - | S | S | - |
| 13TF/6CCT III | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. epidermidis</i> | + | - | + | - | - | - | + | + | + | S | S | - |
| 14TF/8D4 | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. epidermidis</i> | + | - | + | - | - | - | + | + | + | S | S | - |
| 15TF/8E1 | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. epidermidis</i> | + | - | + | - | + | - | + | + | + | S | S | - |
| 16TF/8E4 | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. epidermidis</i> | + | - | + | - | + | - | + | + | + | S | S | - |
| 17TF/10D1 | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. epidermidis</i> | + | - | + | - | + | - | + | - | + | S | S | - |
| 18TF/10D3 | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. cohnii</i> | + | - | + | - | + | + | - | - | - | R | S | - |
| 19TF/11D3 | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. cohnii</i> | + | - | + | - | + | + | - | - | - | S | S | - |
| 20EtF/2D4 | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. epidermidis</i> | + | - | + | - | + | - | + | - | + | S | S | - |
| 21EtF/2E1 | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. epidermidis</i> | + | - | + | - | + | - | + | - | + | S | S | - |
| 22EtF/3E2 | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. hominis</i> | - | - | + | - | - | - | + | - | - | S | S | - |
| 23EtF/5AECM I | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. epidermidis</i> | + | - | + | - | + | - | + | + | + | S | S | - |
| 24EtF/5AECM III | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. simulans</i> | + | - | + | - | + | - | + | - | + | S | S | - |
| 25EtF//8AECM I | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. epidermidis</i> | + | - | + | - | - | - | + | - | - | S | S | - |
| 26EtF/12CCT I | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. epidermidis</i> | + | - | + | - | - | - | + | - | + | S | S | - |
| 29F/4AECM I | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. epidermidis</i> | + | - | + | - | - | - | + | + | + | S | S | - |
| 30F/4AECM III | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. epidermidis</i> | + | - | + | - | + | - | + | + | + | S | S | - |
| 31F/4AECM IV | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. epidermidis</i> | + | - | + | - | + | - | + | - | - | S | S | - |
| 32F/4D4 | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. epidermidis</i> | + | - | + | - | - | - | + | + | + | S | S | - |
| 34F/5BCG II | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. epidermidis</i> | + | - | + | - | - | - | + | + | - | S | S | - |
| 35F/12E4 | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. epidermidis</i> | + | - | + | - | - | - | + | - | - | S | S | - |

Todas amostras foram catalase-positivas e coagulase-negativas; PAL, fosfatase alcalina; PYR, pirrolidoniil arilamidase; S-sensível; R-resistente.

Tabela 5 - Resultado dos ensaios de PCR realizados para a detecção dos genes *mecA* e *icaAD* de amostras de *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus epidermidis* isolados de diferentes tipos de fômites de origem hospitalar

| Amostras | Gene <i>mecA</i> | Gene <i>ica</i> | Total |
|--|------------------|-----------------|-------|
| <i>S. haemolyticus</i> (n=06) | | | |
| 1EF/9E3 | + | + | 16,6% |
| 28F/2E2, 33F/4E5 | + | - | 33,4% |
| 1EF/1BCG III, 27F/2BCG II 2EF/4BCG II | - | + | 50% |
| <i>S. epidermidis</i> (n=29) | | | |
| 3EF/4D2, 23EtF/5AECM I, 24EtF/5AECM III, 34F/5BCG II, 5EF/5E5, 8EF/7D3, 9EF/7D4, 25EtF/8AECM I, 14TF/8D4, 10EF/9/10CCT I, 18TF/10D3, 19TF/11D3, 35F/12E4 | + | + | 44,8% |
| 12TF/2CCT I, 21EtF/2E1, 29F/4AECM I, 30F/4AECM III, 31F/4AECM IV, 4EF/4D3, 32F/4D4, 6EF/7CCT I, 15TF/8E1 | + | - | 31% |
| 17TF/10D1 | - | + | 3,4% |
| 20EtF/2D4, 22EtF/3E2, 13TF/6CCT III, 7EF/7CCT II, 16TF/8E4, 26EtF/12CCT I | - | - | 20,8% |

Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose 1% após: (A) PCR multiplex para identificação de espécies *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus epidermidis* e detecção de gene *mecA*.



Legenda: Linha 1, Padrão de peso molecular (pb); 2, Amostra *S. aureus* ATCC 25923; 3, Amostra 2E2; 4, Amostra 4E5; 5, Amostra 1BCG III; 6, Amostra 2BCG II. (B) PCR para a detecção de gene *icaAD*. Linha 1, Padrão de peso molecular (pb); 2, Amostra 1BCG III; 3, Amostra 2BCG II; 4, Amostra 4BCG II; 5, Amostra 4AECM I; 6 controle negativo (H_2O).

4.5 Determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos

Os perfis de sensibilidade expressos pelas amostras de *S. haemolyticus* e de *S. epidermidis* estão apresentados na Tabela 6.

As seis amostras identificadas como *S. haemolyticus* (100%) foram sensíveis a linezolida e resistentes aos seguintes antimicrobianos: cefoxitina, ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, gentamicina e sulfametazol-trimetropim. Cinco amostras identificadas como *S. haemolyticus* (84%) também foram resistentes a ceftazidima, três amostras (50%) também foram resistentes a imipenem, e duas amostras também foram resistentes a moxifloxacina (33%).

As vinte e nove amostras identificadas como *S. epidermidis* (100%) foram resistentes a cefoxitina, ciprofloxacina (6 amostras com resistência intermediária), clindamicina (duas amostras com resistência intermediária) e eritromicina (uma amostra com resistência intermediária). Vinte e três amostras identificadas como *S. epidermidis* (79,3%) também foram resistentes a gentamicina, vinte e duas amostras (75,8%) também foram resistentes a sulfametazol-trimetropim, vinte amostras (68,9%) também foram resistentes a ceftazidima e três amostras (10,3%) também foram resistentes a imipenem.

Todas as amostras identificadas como *S. haemolyticus* e *S. epidermidis* foram categorizadas como multirresistentes.

4.6 Determinação da CIM e da CBM para oxacilina e vancomicina

O CLSI (2012) determina que, para uma cepa ser classificada como resistente a oxacilina, deva ter CIM maior que 0,5 µg/mL, e para ser classificada como sensível a oxacilina, deve ter CIM menor ou igual que 0,5 µg/mL, e para uma cepa ser classificada como resistente a vancomicina, deve ter CIM maior que 32µg/mL e como sensível CIM menor ou igual que 4µg/mL. A CBM é a menor diluição na qual ocorre redução de 99,9% do crescimento bacteriano.

Os resultados apresentados na Tabela 7 indicaram que, 100% das amostras de *S. haemolyticus* e de *S. epidermidis* foram oxacilina-resistentes, e que 100% das amostras de *S. haemolyticus* e de *S. epidermidis* foram vancomicina-sensíveis.

Três amostras (50%) identificadas como *S. haemolyticus*, apresentaram CIM de 32µg/mL para oxacilina e seis amostras (100%) identificadas como *S. haemolyticus*, apresentaram CIM de 1µg/mL para vancomicina. Duas amostras (33,4%) identificadas como *S. haemolyticus*, apresentaram CBM de 32µg/mL para oxacilina e três amostras (50%) identificadas como *S. haemolyticus*, apresentaram CBM de 2µg/mL para vancomicina.

Cinco amostras (17,2%) identificadas como *S. epidermidis*, apresentaram CIM de 32µg/mL para oxacilina e vinte e uma amostras (72,4%) identificadas como *S. epidermidis*, apresentaram CIM de 1µg/mL para vancomicina. Seis amostras (20,6%) identificadas como *S. epidermidis*, apresentaram CBM de 32µg/mL para oxacilina e dezenove amostras (65,5%) identificadas como *S. epidermidis*, apresentaram CBM de 2µg/mL para vancomicina.

4.7 Expressão da produção de *slime* na ausência e presença de oxacilina e vancomicina

Os resultados da expressão de produção de *slime* pelo método do CRA das amostras (n=35), estão demonstrados na Tabela 8.

Das amostras identificadas como *S. haemolyticus*, foram positivas para produção de *slime*, duas amostras (33,3%) na ausência de antimicrobianos, duas amostras (33,3%) na presença de oxacilina e duas amostras (33,3%) na presença de vancomicina. E foram negativas para produção de *slime*, quatro amostras (66,7%) na ausência de antimicrobianos, três amostras (50%) na presença de oxacilina e quatro amostras (66,7%) na presença de vancomicina. Uma amostra (16,7%) não cresceu em meio com oxacilina.

Das amostras identificadas como *S. epidermidis*, foram positivas para produção de *slime*, nove amostras (31%) na ausência de antimicrobianos, três amostras (10,3%) na presença de oxacilina e três amostras (10,3%) na presença de vancomicina. E foram negativas para produção de *slime*, vinte amostras (69%) na ausência de antimicrobianos, vinte e três amostras (79,4%) na presença de oxacilina e vinte e duas amostras (75,8%) na presença de vancomicina. Três amostras (10,3%) não cresceram em meio com oxacilina, e quatro amostras (13,9%) não cresceram em meio com vancomicina.

Tabela 6 - Perfis resistência aos agentes antimicrobianos de amostras de *Staphylococcus haemolyticus* e de *Staphylococcus epidermidis* isoladas de fômites de origem hospitalar avaliados por método de difusão em disco

| Amostras | Perfis de Resistência | | | | | | | | | | Gen <i>mecA</i> |
|------------------------|-----------------------|------------------|-----------------|----------------|-----------------|-----|------------------|-----|-----|-----|--------------------|
| | FOX | CIP | DA | E | CN | STX | CAZ | IPM | MXF | LNZ | |
| <i>S. haemolyticus</i> | | | | | | | | | | | |
| 11EF/9E3 | FOX | CIP | DA | E | CN | STX | CAZ | IPM | MXF | | + |
| 2EF/4BCG II | FOX | CIP ^I | DA | E ^I | CN | STX | CAZ | IPM | MXF | | - |
| 1EF/1BCG III | FOX | CIP | DA | E | CN | STX | CAZ | IPM | | | + |
| 28F/2E2 | FOX | CIP | DA | E | CN | STX | CAZ | | | | + |
| 33F/4E5 | FOX | CIP | DA | E | CN | STX | CAZ | | | | + |
| 27F/2BCG II | FOX | CIP | DA | E | CN | STX | | | | | - |
| <i>S. epidermidis</i> | | | | | | | | | | | |
| 26EtF/12CCT I | FOX | CIP | DA | E | CN | STX | CAZ | IPM | | | - |
| 32F/4D4 | FOX | CIP | DA | E | CN | STX | CAZ | IPM | | | + |
| 8EF/7D3 | FOX | CIP | DA | E | CN | STX | CAZ | | | | + |
| 10EF/9/10CCT | FOX | CIP | DA | E | CN | STX | CAZ | | | | + |
| 12TF/2CCTI | FOX | CIP | DA | E | CN | STX | CAZ | | | | + |
| 13TF/6CCT III | FOX | CIP | DA | E | CN | STX | CAZ | | | | - |
| 20EtF/2D4 | FOX | CIP | DA | E | CN | STX | CAZ | | | | - |
| 21EtF/2E1 | FOX | CIP | DA | E | CN | STX | CAZ | | | | + |
| 22EtF/3E2 | FOX | CIP ^I | DA | E ^I | CN | STX | CAZ | | | | - |
| 24EtF/5AECM III | FOX | CIP | DA | E | CN | STX | CAZ | | | | + |
| 34F/5BCG II | FOX | CIP ^I | DA | E | CN | STX | CAZ | | | | + |
| 35F/12E4 | FOX | CIP | DA | E | CN | STX | CAZ | | | | + |
| 5EF/5E5 | FOX | CIP | DA | E | CN | STX | | | | | + |
| 6EF/7CCT I | FOX | CIP | DA | E | CN | STX | | | | | + |
| 7EF/7CCT II | FOX | CIP | DA | E | CN | STX | | | | | - |
| 9EF/7D4 | FOX | CIP | DA | E | CN | STX | | | | | + |
| 14TF/8D4 | FOX | CIP | DA | E | CN | STX | | | | | + |
| 31F/4AECM IV | FOX | CIP ^I | DA | E | CN | STX | | | | | + |
| 29F/4AECM I | FOX | CIP | DA | E | CN | | CAZ | | | | + |
| 25EtF/8AECM I | FOX | CIP ^I | DA | E | CN | STX | CAZ | | | | + |
| 18TF/10D3 | FOX | CIP | DA | E | | | CAZ | | | | + |
| 19TF/11D3 | FOX | CIP | DA | E | | | CAZ | | | | + |
| 16TF/8E4 | FOX | CIP ^I | DA | E | | STX | | | | | - |
| 30F/4AECM III | FOX | CIP | DA | E | | | CAZ | | | | + |
| 4EF/4D3 | FOX | CIP | DA ^I | E | CN | | CAZ | | | | + |
| 17TF/10D1 | FOX | CIP | DA | E | CN ^I | | CAZ ^I | IPM | | | - |
| 23EtF/5AECM I | FOX | CIP | DA ^I | E | | STX | | | | | + |
| 15TF/8E1 | FOX | CIP ^I | DA | E | | STX | | | | | + |
| 3EF/4D2 | FOX | CIP | DA | E | CN | STX | CAZ | | | | + |

Agentes antimicrobianos testados: FOX-cefoxitina; CN-gentamicina; SXT- sulfametazol-trimetropim; IPM-imipenem; CAZ-ceftazidima; CIP-ciprofloxacina; DA-clindamicina; E-eritromicina; MXF- moxifloxacina e LZD- linezolida testados apenas com *S. haemolyticus*. Todas as amostras foram sensíveis a vancomicina e linezolida, e resistentes a oxacilina; I, resistência intermediária.

Tabela 7 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) para oxacilina e para vancomicina de amostras de *Staphylococcus haemolyticus* e de *Staphylococcus epidermidis* isoladas de fomites de origem hospitalar

| Amostras | Oxacilina | | Vancomicina | | Oxacilina/ Vancomicina | Gen <i>mecA</i> |
|------------------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|---------------------------|--------------------|
| | CIM (µg/ml) | CBM* (µg/ml) | CIM (µg/ml) | CBM (µg/ml) | | |
| <i>S. haemolyticus</i> | | | | | | |
| 2EF/4BCG II | 1 | 4 | 1 | 4 | R/S | - |
| 27F/2BCG II | 8 | 32 | 1 | 2 | R/S | - |
| 11EF/9E3 | 32 | 32 | 1 | 2 | R/S | + |
| 1EF/1BCG III | 32 | 256 | 1 | 4 | R/S | - |
| 33F/4E5 | 32 | 512 | 1 | 2 | R/S | + |
| 28F/2E2 | 256 | >512 | 1 | 8 | R/S | + |
| <i>S. epidermidis</i> | | | | | | |
| 14TF/8D4 | 2 | 32 | 2 | 8 | R/S | + |
| 10EF/9/10CCT I | 4 | 4 | 1 | 2 | R/S | + |
| 21EtF/2E1 | 4 | 4 | 1 | 2 | R/S | + |
| 20EtF/2D4 | 4 | 4 | 1 | 2 | R/S | - |
| 16TF/8E4 | 4 | 32 | 0,5 | 4 | R/S | - |
| 3EF/4D2 | 4 | 64 | 1 | 2 | R/S | + |
| 23EtF/5AECM I | 4 | 128 | 1 | 4 | R/S | + |
| 13TF/6CCT III | 4 | 256 | 2 | 2 | R/S | - |
| 17TF/10D1 | 4 | 512 | 1 | 2 | R/S | - |
| 4EF/4D3 | 8 | 32 | 1 | 2 | R/S | + |
| 6EF/7CCT I | 8 | 128 | 1 | 2 | R/S | + |
| 25EtF/8AECM I | 16 | 32 | 0,5 | 4 | R/S | + |
| 15TF/8E1 | 32 | 32 | 1 | 2 | R/S | + |
| 24EtF/5AECM III | 32 | 32 | 4 | 8 | R/S | + |
| 8EF/7D3 | 32 | 256 | 1 | 2 | R/S | + |
| 22EtF/3E2 | 32 | >512 | 1 | 2 | R/S | - |
| 19TF/11D3 | 32 | >512 | 1 | 2 | R/S | + |
| 26EtF/12CCT I | 64 | 64 | 1 | 2 | R/S | - |
| 7EF/7CCT II | 64 | 128 | 1 | 4 | R/S | - |
| 9EF/7D4 | 64 | 256 | 0,5 | 2 | R/S | + |
| 31F/4AECM IV | 64 | 512 | 1 | 2 | R/S | + |
| 30F/4AECM III | 64 | 512 | 4 | 8 | R/S | + |
| 29F/4AECM I | 128 | >512 | 1 | 8 | R/S | + |
| 18TF/10D3 | 512 | 512 | 1 | 2 | R/S | + |
| 12TF/2CCT I | 512 | >512 | 2 | 8 | R/S | + |
| 32F/4D4 | 512 | >512 | 1 | 2 | R/S | + |
| 35F/12E4 | 512 | >512 | 1 | 2 | R/S | + |
| 34F/5BCG II | 512 | >512 | 1 | 4 | R/S | + |
| 5EF/5E5 | 512 | >512 | 1 | 2 | R/S | + |

E, Esfigmomanômetro; T, Termômetro; Et, Estetoscópio; F, Fômites; CIM, concentração inibitória mínima; CBM, concentração bactericida mínima (i.e. a menor diluição na qual ocorre redução de 99,9% do crescimento bacteriano)

Tabela 8 - Produção de *slime* no meio Vermelho do Congo por amostras de *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus epidermidis* isolados de diferentes tipos de fômites de origem hospitalar

| Amostras* | Fômite | Genes | | Produção de <i>slime</i> no meio Vermelho do Congo | | |
|------------------------|------------------|-------------|------------|--|----------------------------|------------------------------|
| | | <i>mecA</i> | <i>ica</i> | s/ Antibiótico | + ¼ da CIM Oxacilina | + ¼ da CIM Vancomicina |
| <i>S. haemolyticus</i> | | | | | | |
| 1EF/1BCG III | Esfigmomanômetro | - | + | + | + | + |
| 11EF/9E3 | Esfigmomanômetro | + | + | + | + | + |
| 2EF/4BCG II | Esfigmomanômetro | - | + | - | - | - |
| 28F/2E2 | Outros fômites | + | - | - | - | - |
| 33F/4E5 | Outros fômites | + | - | - | - | - |
| 27F/2BCG II | Outros fômites | - | + | - | NC | - |
| <i>S. epidermidis</i> | | | | | | |
| 3EF/4D2 | Esfigmomanômetro | + | + | + | + | + |
| 14TF/8D4 | Termômetro | + | + | + | + | + |
| 17TF/10D1 | Termômetro | - | + | + | - | - |
| 19TF/11D3 | Termômetro | + | + | + | - | - |
| 8EF/7D3 | Esfigmomanômetro | + | + | + | - | - |
| 9EF/7D4 | Esfigmomanômetro | + | + | + | - | NC |
| 26EtF/12CCT I | Estetoscópio | - | - | + | - | NC |
| 31F/4AECM IV | Outros fômites | + | - | + | - | NC |
| 7EF/7CCT II | Esfigmomanômetro | - | - | + | NC | NC |
| 20EtF/2D4 | Estetoscópio | - | - | - | + | + |
| 12TF/2CCT I | Termômetro | + | - | - | - | - |
| 13TF/6CCT III | Termômetro | - | - | - | - | - |
| 4EF/4D3 | Esfigmomanômetro | + | - | - | - | - |
| 15TF/8E1 | Termômetro | + | - | - | - | - |
| 16TF/8E4 | Termômetro | - | - | - | - | - |
| 10EF/9/10CCT I | Esfigmomanômetro | + | + | - | - | - |
| 18TF/10D3 | Termômetro | + | + | - | - | - |
| 21EtF/2E1 | Estetoscópio | + | - | - | - | - |
| 22EtF/3E2 | Estetoscópio | - | - | - | - | - |
| 23EtF/5AECM I | Estetoscópio | + | + | - | - | - |
| 24EtF/5AECM III | Estetoscópio | + | + | - | - | - |
| 25EtF//8AECM I | Estetoscópio | + | + | - | - | - |
| 29F/4AECM I | Outros fômites | + | - | - | - | - |
| 30F/4AECM III | Outros fômites | + | - | - | - | - |
| 32F/4D4 | Outros fômites | + | - | - | - | - |
| 34F/5BCG II | Outros fômites | + | + | - | - | - |
| 35F/12E4 | Outros fômites | + | + | - | - | - |
| 5EF/5E5 | Esfigmomanômetro | + | + | - | NC | - |
| 6EF/7CCT I | Esfigmomanômetro | + | - | - | NC | - |

Todas amostras oxacilina-resistentes e vancomicina-sensíveis; (+), positivo; (-), negativo; NC, ausência de crescimento.

4.8 Determinação do padrão de aderência ao vidro na ausência e presença de oxacilina e vancomicina

Os resultados do padrão de aderência ao vidro das amostras (n=35), estão mostrados na Tabela 9.

Das amostras identificadas como *S. haemolyticus*, na ausência de antimicrobianos, quatro amostras (66,6%) foram classificadas como I (+++) e duas amostras (33,4%) foram classificadas como III (+). Na presença de oxacilina, as seis amostras (100%) foram classificadas como I (+++). E na presença de vancomicina, cinco amostras (83,3%) foram classificadas como I (+++) e uma amostra (16,7%) foi classificadas como III (+).

Das amostras identificadas como *S. epidermidis*, na ausência de antimicrobianos, vinte e três amostras (79,5%) foram classificadas como I (+++) e seis amostra (20,5%) foram classificadas como III (+). Na presença de oxacilina, vinte e seis amostras (89,6%) foram classificadas como I (+++) e três amostras (10,4%) foram classificadas como III (+). Na presença de vancomicina, vinte e três amostras (79,3%) foram classificadas como I (+++) e seis amostras (20,7%) foram classificadas como III (+).

Nenhuma amostra *S. haemolyticus* ou *S. epidermidis* foi classificada como II (++) ou IV (-), em nenhuma circunstância.

Tabela 9 - Aderência a superfície abiótica do vidro (hidrofílica/carga positiva) de amostras de *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus epidermidis* isolados de diferentes tipos de fômites de origem hospitalar

| Amostras* | Fômite | Genes <i>ica</i> / <i>mecA</i> | Slime em meio Vermelho do Congo | Aderência ao Vidro | | |
|------------------------|------------------|--------------------------------------|--|--------------------|----------------------------|------------------------------|
| | | | | s/ Antibiótico | + ¼ da CIM Oxacilina | + ¼ da CIM Vancomicina |
| <i>S. haemolyticus</i> | | | | | | |
| 1EF/1BCG III | Esfigmomanômetro | +/- | + | +++ | +++ | +++ |
| 2EF/4BCG II | Esfigmomanômetro | +/- | - | +++ | +++ | +++ |
| 11EF/9E3 | Esfigmomanômetro | +/+ | + | +++ | +++ | +++ |
| 27F/2BCG II | Outros fômites | +/- | - | +++ | +++ | +++ |
| 28F/2E2 | Outros fômites | -/+ | - | +++ | +++ | +++ |
| 33F/4E5 | Outros fômites | -/+ | - | + | +++ | + |
| <i>S. epidermidis</i> | | | | | | |
| 3EF/4D2 | Esfigmomanômetro | +/+ | + | +++ | +++ | +++ |
| 4EF/4D3 | Esfigmomanômetro | -/+ | - | +++ | +++ | +++ |
| 5EF/5E5 | Esfigmomanômetro | +/+ | - | +++ | +++ | +++ |
| 6EF/7CCT I | Esfigmomanômetro | -/+ | - | +++ | +++ | +++ |
| 7EF/7CCT II | Esfigmomanômetro | -/- | + | +++ | +++ | +++ |
| 8EF/7D3 | Esfigmomanômetro | +/+ | + | +++ | +++ | +++ |
| 9EF/7D4 | Esfigmomanômetro | +/+ | + | +++ | +++ | +++ |
| 12TF/2CCT I | Termômetro | -/+ | - | +++ | +++ | +++ |
| 13TF/6CCT III | Termômetro | -/- | - | +++ | +++ | +++ |
| 17TF/10D1 | Termômetro | +/- | + | +++ | +++ | +++ |
| 18TF/10D3 | Termômetro | +/+ | - | +++ | +++ | +++ |
| 19TF/11D3 | Termômetro | +/+ | + | +++ | +++ | +++ |
| 20EtF/2D4 | Estetoscópio | -/- | - | +++ | +++ | +++ |
| 21EtF/2E1 | Estetoscópio | -/+ | - | +++ | +++ | +++ |
| 22EtF/3E2 | Estetoscópio | -/- | - | +++ | +++ | +++ |
| 23EtF/5AECM I | Estetoscópio | +/+ | - | +++ | +++ | +++ |
| 26EtF/12CCT I | Estetoscópio | -/- | + | +++ | +++ | +++ |
| 29F/4AECM I | Outros fômites | -/+ | - | +++ | +++ | +++ |
| 30F/4AECM III | Outros fômites | -/+ | - | +++ | +++ | +++ |
| 31F/4AECM IV | Outros fômites | -/+ | + | +++ | +++ | +++ |
| 32F/4D4 | Outros fômites | -/+ | - | +++ | +++ | +++ |
| 34F/5BCG II | Outros fômites | +/+ | - | +++ | +++ | +++ |
| 35F/12E4 | Outros fômites | +/+ | - | +++ | +++ | +++ |
| 24EtF/5AECM III | Estetoscópio | +/+ | - | + | +++ | + |
| 25EtF//8AECM I | Estetoscópio | +/+ | - | + | +++ | + |
| 15TF/8E1 | Termômetro | -/+ | - | + | +++ | + |
| 14TF/8D4 | Termômetro | +/+ | + | + | + | + |
| 16TF/8E4 | Termômetro | -/- | - | + | + | + |
| 10EF/9/10CCT I | Esfigmomanômetro | +/+ | - | + | + | + |

Todas amostras Oxacilina-resistentes e Vancomicina-sensíveis; (-), negativo; (+), positivo; (++) moderadamente aderente; (+++) fortemente aderente.

4.9 Avaliação da formação de biofilme em superfície de poliestireno na ausência e presença de oxacilina e vancomicina

Os resultados da avaliação da formação de biofilme em superfície de poliestireno das amostras (n=35) estão mostrados na Tabela 10.

Das amostras identificadas como *S. haemolyticus*, na ausência de antimicrobianos, uma amostra (16,7%) foi classificada como fortemente aderente (+++), duas amostras (33,3%) foram classificadas como moderadamente aderentes (++), duas amostras (33,3%) foram classificadas como fracamente aderente (+) e uma amostra (16,7%) foi classificada como não aderente (-). Na presença de oxacilina, uma amostra (16,7%) foi classificada como fortemente aderente (+++), três amostras (50%) foram classificadas como moderadamente aderentes (++) e duas amostras (33,3%) foram classificadas como fracamente aderente (+). Na presença de oxacilina, nenhuma amostra foi classificada como não aderente (-). Na presença de vancomicina, uma amostra (16,7%) foi classificada como fortemente aderente (+++), três amostras (50%) foram classificadas como moderadamente aderentes (++) e duas amostras (33,3%) foram classificadas como fracamente aderente (+). Na presença de vancomicina, nenhuma amostra foi classificada como não aderente (-).

Das amostras identificadas como *S. epidermidis*, na ausência de antimicrobianos, uma amostra (3,5%) foi classificadas como fortemente aderente (+++); vinte amostras (72,4%) foram classificadas como moderadamente aderentes (++) e seis amostras (24,1%) foram classificadas como fracamente aderente (+). Nenhuma das amostras foi classificada como não aderente (-). Na presença de oxacilina, dezenove amostras (65,5%) foram classificadas como moderadamente aderentes (++) e dez amostras *S. epidermidis* (34,5%) foram classificadas como fracamente aderente (+). Nenhuma das amostras foi classificada como fortemente aderente (+++) ou não aderente (-). Na presença de vancomicina, uma amostra (3,5%) foi classificada como fortemente aderente (+++); dezoito amostras (62%) foram classificadas como moderadamente aderentes (++) e dez amostras (34,5%) foram classificadas como fracamente aderente (+). Na presença de vancomicina, nenhuma amostra foi classificada como não aderente (-).

Tabela 10 - Aderência a superfície abiótica do poliestireno (hidrofóbica/carga negativa) de amostras de *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus epidermidis* isolados de diferentes tipos de fômites de origem hospitalar

| Amostras* | Fômite | Genes <i>ica</i> / <i>mecA</i> | <i>Slime</i> em meio Vermelho do Congo | Aderência ao Vidro | Aderência ao Poliestireno | | |
|------------------------|------------------|--------------------------------------|---|--------------------------|---------------------------|----------------------------|------------------------------|
| | | | | | s/ Antibiótico | + ¼ da CIM Oxacilina | + ¼ da CIM Vancomicina |
| <i>S. haemolyticus</i> | | | | | | | |
| 2EF/4BCG II | Esfigmomanômetro | +/- | - | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 11EF/9E3 | Esfigmomanômetro | +/+ | + | +++ | ++ | ++ | ++ |
| 27F/2BCG II | Outros fômites | +/- | - | +++ | ++ | ++ | ++ |
| 33F/4E5 | Outros fômites | -/+ | - | + | + | ++ | + |
| 28F/2E2 | Outros fômites | -/+ | - | +++ | + | + | + |
| 1EF/1BCG III | Esfigmomanômetro | +/- | + | +++ | - | + | ++ |
| <i>S. epidermidis</i> | | | | | | | |
| 34F/5BCG II | Outros fômites | +/+ | - | +++ | +++ | ++ | +++ |
| 3EF/4D2 | Esfigmomanômetro | +/+ | + | +++ | ++ | ++ | ++ |
| 4EF/4D3 | Esfigmomanômetro | -/+ | - | +++ | ++ | ++ | ++ |
| 6EF/7CCT I | Esfigmomanômetro | -/+ | - | +++ | ++ | ++ | ++ |
| 10EF/9/10CCT I | Esfigmomanômetro | +/+ | - | + | ++ | ++ | ++ |
| 12TF/2CCT I | Termômetro | -/+ | - | +++ | ++ | ++ | ++ |
| 13TF/6CCT III | Termômetro | -/- | - | +++ | ++ | ++ | ++ |
| 14TF/8D4 | Termômetro | +/+ | + | + | ++ | ++ | ++ |
| 17TF/10D1 | Termômetro | +/- | + | +++ | ++ | ++ | ++ |
| 18TF/10D3 | Termômetro | +/+ | - | +++ | ++ | ++ | ++ |
| 21EtF/2E1 | Estetoscópio | -/+ | - | +++ | ++ | ++ | ++ |
| 22EtF/3E2 | Estetoscópio | -/- | - | +++ | ++ | ++ | ++ |
| 23EtF/5AECM I | Estetoscópio | +/+ | - | +++ | ++ | ++ | ++ |
| 29F/4AECM I | Outros fômites | -/+ | - | +++ | ++ | ++ | ++ |
| 35F/12E4 | Outros fômites | +/+ | - | +++ | ++ | ++ | ++ |
| 30F/4AECM III | Outros fômites | -/+ | - | +++ | ++ | ++ | + |
| 5EF/5E5 | Esfigmomanômetro | +/+ | - | +++ | ++ | + | ++ |
| 19TF/11D3 | Termômetro | +/+ | + | +++ | ++ | + | ++ |
| 24EtF/5AECM III | Estetoscópio | +/+ | - | + | ++ | + | ++ |
| 26EtF/12CCT I | Estetoscópio | -/- | + | +++ | ++ | + | ++ |
| 8EF/7D3 | Esfigmomanômetro | +/+ | + | +++ | + | ++ | + |
| 9EF/7D4 | Esfigmomanômetro | +/+ | + | +++ | + | ++ | + |
| 32F/4D4 | Outros fômites | -/+ | - | +++ | + | ++ | + |
| 7EF/7CCT II | Esfigmomanômetro | -/- | + | +++ | + | + | + |
| 15TF/8E1 | Termômetro | -/+ | - | + | + | + | + |
| 16TF/8E4 | Termômetro | -/- | - | + | + | + | + |
| 20EtF/2D4 | Estetoscópio | -/- | - | +++ | + | + | + |
| 25EtF//8AECM I | Estetoscópio | +/+ | - | + | + | + | + |
| 31F/4AECM IV | Outros fômites | -/+ | + | +++ | + | + | + |

Todas amostras oxacilina-resistentes e vancomicina-sensíveis; (-), negativo; (+), positivo; (++) moderadamente aderente; (+++) fortemente aderente.

4.10 Correlação das espécies de amostras de SCN com os tipos de fômites e presença dos genes *mecA* e *ica*

A correlação das espécies com os tipos de fômites e presença dos genes *mecA* e *ica* estão apresentados na Tabela 11.

Das seis amostras identificadas como *S. haemolyticus*, três foram isoladas de esfigmomanômetro, e três foram isoladas de outros fômites. Das três amostras isoladas de esfigmomanômetro, uma amostra (33,4%) foi positiva para presença dos genes *mecA* e *ica* e duas amostras (66,6%) foram positivas apenas para o gene *ica*. Das três amostras isoladas de outros fômites, duas amostras (66,6%) foram positivas apenas para presença do gene *mecA* e uma amostra (33,4%) foi positiva para a presença do gene *ica*.

Das vinte e nove amostras identificadas como *S. epidermidis*, oito foram isoladas de esfigmomanômetro, oito foram isoladas de termômetro, sete foram isoladas de estetoscópio e seis foram isoladas de fômites desconhecidos. Das oito amostras isoladas de esfigmomanômetro, cinco amostras (62,5%) foram positiva para presença dos genes *mecA* e *ica*, duas amostras (25%) foram positivas apenas para o gene *mecA*, e uma amostra (12,5%) foi negativa para a presença de ambos os genes. Das oito amostras isoladas de termômetro, três amostras (37,5%) foram positiva para presença dos genes *mecA* e *ica*, duas amostras (25%) foram positivas apenas para o gene *mecA*, uma amostra (12,5%) foi positivas apenas para o gene *ica*, e duas amostras (25%) foram negativa para a presença de ambos os genes. Das sete amostras isoladas de estetoscópio, três amostras (42,8%) foram positiva para presença dos genes *mecA* e *ica*, uma amostra (14,4%) foi positivas apenas para o gene *mecA* e três amostras (42,8%) foram negativa para a presença de ambos os genes. E das seis amostras isoladas de outros fômites, duas amostras (33,4%) foram positiva para presença dos genes *mecA* e *ica* e quatro amostras (66,6%) foram positivas apenas para o gene *mecA*. Não houve associação estatística entre presença de gene *ica* e *mecA* ($p > 0,05$).

A presença ou ausência tanto do gene *mecA* quanto do gene *ica*, não mostraram associação ao tipo de fômites, nem às espécies das amostras.

Tabela 11 - *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus epidermidis* isolados de diferentes tipos de fômites de origem hospitalar

| Amostras | Espécie | Fômite | Gen <i>mecA</i> | Gen <i>ica</i> | Oxa/ Vanco |
|-----------------|------------------------|------------------|--------------------|-------------------|---------------|
| 11EF/9E3 | <i>S. haemolyticus</i> | Esfigmomanômetro | + | + | R/S |
| 1EF/1BCG III | <i>S. haemolyticus</i> | Esfigmomanômetro | - | + | R/S |
| 2EF/4BCG II | <i>S. haemolyticus</i> | Esfigmomanômetro | - | + | R/S |
| 3EF/4D2 | <i>S. epidermidis</i> | Esfigmomanômetro | + | + | R/S |
| 5EF/5E5 | <i>S. epidermidis</i> | Esfigmomanômetro | + | + | R/S |
| 8EF/7D3 | <i>S. epidermidis</i> | Esfigmomanômetro | + | + | R/S |
| 9EF/7D4 | <i>S. epidermidis</i> | Esfigmomanômetro | + | + | R/S |
| 10EF/9/10CCT I | <i>S. epidermidis</i> | Esfigmomanômetro | + | + | R/S |
| 4EF/4D3 | <i>S. epidermidis</i> | Esfigmomanômetro | + | - | R/S |
| 6EF/7CCT I | <i>S. epidermidis</i> | Esfigmomanômetro | + | - | R/S |
| 7EF/7CCT II | <i>S. epidermidis</i> | Esfigmomanômetro | - | - | R/S |
| Subtotal | 31,43% (n=11) | | | | |
| 14TF/8D4 | <i>S. epidermidis</i> | Termômetro | + | + | R/S |
| 18TF/10D3 | <i>S. epidermidis</i> | Termômetro | + | + | R/S |
| 19TF/11D3 | <i>S. epidermidis</i> | Termômetro | + | + | R/S |
| 15TF/8E1 | <i>S. epidermidis</i> | Termômetro | + | - | R/S |
| 12TF/2CCT I | <i>S. epidermidis</i> | Termômetro | + | - | R/S |
| 17TF/10D1 | <i>S. epidermidis</i> | Termômetro | - | + | R/S |
| 13TF/6CCT III | <i>S. epidermidis</i> | Termômetro | - | - | R/S |
| 16TF/8E4 | <i>S. epidermidis</i> | Termômetro | - | - | R/S |
| Subtotal | 22,87% (n=08) | | | | |
| 23EtF/5AECM I | <i>S. epidermidis</i> | Estetoscópio | + | + | R/S |
| 24EtF/5AECM III | <i>S. epidermidis</i> | Estetoscópio | + | + | R/S |
| 25EtF//8AECM I | <i>S. epidermidis</i> | Estetoscópio | + | + | R/S |
| 21EtF/2E1 | <i>S. epidermidis</i> | Estetoscópio | + | - | R/S |
| 20EtF/2D4 | <i>S. epidermidis</i> | Estetoscópio | - | - | R/S |
| 22EtF/3E2 | <i>S. epidermidis</i> | Estetoscópio | - | - | R/S |
| 26EtF/12CCT I | <i>S. epidermidis</i> | Estetoscópio | - | - | R/S |
| Subtotal | 20% (n=07) | | | | |
| 28F/2E2 | <i>S. haemolyticus</i> | Outros fômites | + | - | R/S |
| 33F/4E5 | <i>S. haemolyticus</i> | Outros fômites | + | - | R/S |
| 27F/2BCG II | <i>S. haemolyticus</i> | Outros fômites | - | + | R/S |
| 34F/5BCG II | <i>S. epidermidis</i> | Outros fômites | + | + | R/S |
| 35F/12E4 | <i>S. epidermidis</i> | Outros fômites | + | + | R/S |
| 29F/4AECM I | <i>S. epidermidis</i> | Outros fômites | + | - | R/S |
| 30F/4AECM III | <i>S. epidermidis</i> | Outros fômites | + | - | R/S |
| 31F/4AECM IV | <i>S. epidermidis</i> | Outros fômites | + | - | R/S |
| 32F/4D4 | <i>S. epidermidis</i> | Outros fômites | + | - | R/S |
| Subtotal | 25,71% (n=09) | | | | |

E, Esfigmomanômetro; T, Termômetro; Et, Estetoscópio; F, Fômites,

4.11 Avaliação de associações entre espécies de amostras de SCN com os tipos de fômites e setores hospitalares

Amostras de *S. epidermidis* e/ou *S. haemolyticus*, foram encontradas na superfície de fômites de todos os setores hospitalares investigados: CTI geral (34,29%), CTI coronariana (31,43%), UTI neonatal (17,14%), Enfermarias (17,14%). *S. haemolyticus* só não foi isolado de fômites da Enfermaria de Clínica Médica.

A correlação das espécies com os tipos de fômites e setores hospitalares (Tabela 12), indicaram que, as seis amostras identificadas como *S. haemolyticus* foram isoladas de esfigmomanômetro (n=03) (01 de UTI neonatal e 02 de enfermaria de cirurgia geral) e de outros fômites (n=03) (02 do CTI geral e 01 CTI coronariana).

E as vinte e nove amostras identificadas como *S. epidermidis* foram isoladas de esfigmomanômetro (n=08) (03 de CTI geral, 04 de CTI coronariana e 01 de UTI neonatal), termômetro (n=08) (02 de CTI geral, 04 de CTI coronariana e 02 de UTI neonatal) e estetoscópio (n=07) (01 de CTI geral, 01 de CTI coronariana, 02 de UTI neonatal e 03 de enfermaria de clínica médica), além de outros fômites (n=06) (04 de CTI geral, 01 de CTI coronariano e 01 de enfermaria de cirurgia geral).

A presença do gene *mecA* foi observada na maioria das amostras (71,43%) de todos os setores hospitalares investigados. Enquanto a presença do gene *ica* (51,43%) foi detectada em maior número de amostras nas Enfermarias (n=6/6) e no CTI coronariano (n=7/11). Poucas amostras isoladas no CTI geral (n=3/12) e na UTI neonatal (n=2/6) apresentaram o gene *ica*.

A presença ou ausência tanto do gene *mecA* quanto do gene *ica*, não apresentaram correlação com os tipos de fômites, nem com os diferentes setores hospitalares.

Tabela 12 - Correlação das espécies de amostras de *Staphylococcus haemolyticus* e de *Staphylococcus epidermidis* com os setores hospitalares, tipos de fômites e presença de genes *mecA* e *ica*

| Amostras | Setor hospitalar | Fômite | Espécie | Gen <i>mecA</i> | Gen <i>ica</i> |
|-----------------|-------------------------------|------------------|------------------------|-----------------|----------------|
| 28F/2E2 | CTI Geral | Outros fômites | <i>S. haemolyticus</i> | + | - |
| 27F/2BCG II | CTI Geral | Outros fômites | <i>S. haemolyticus</i> | - | + |
| 10EF/9/10CCT I | CTI Geral | Esfigmomanômetro | <i>S. epidermidis</i> | + | + |
| 35F/12E4 | CTI Geral | Outros fômites | <i>S. epidermidis</i> | + | + |
| 6EF/7CCT I | CTI Geral | Esfigmomanômetro | <i>S. epidermidis</i> | + | - |
| 12TF/2CCT I | CTI Geral | Termômetro | <i>S. epidermidis</i> | + | - |
| 29F/4AECM I | CTI Geral | Outros fômites | <i>S. epidermidis</i> | + | - |
| 30F/4AECM III | CTI Geral | Outros fômites | <i>S. epidermidis</i> | + | - |
| 31F/4AECM IV | CTI Geral | Outros fômites | <i>S. epidermidis</i> | + | - |
| 13TF/6CCT III | CTI Geral | Termômetro | <i>S. epidermidis</i> | - | - |
| 26EtF/12CCT I | CTI Geral | Estetoscópio | <i>S. epidermidis</i> | - | - |
| 7EF/7CCT II | CTI Geral | Esfigmomanômetro | <i>S. epidermidis</i> | - | - |
| Subtotal | 34,29% (n=12) | | | | |
| 33F/4E5 | CTI Coronariana | Desconhecido | <i>S. haemolyticus</i> | + | - |
| 3EF/4D2 | CTI Coronariana | Esfigmomanômetro | <i>S. epidermidis</i> | + | + |
| 8EF/7D3 | CTI Coronariana | Esfigmomanômetro | <i>S. epidermidis</i> | + | + |
| 9EF/7D4 | CTI Coronariana | Esfigmomanômetro | <i>S. epidermidis</i> | + | + |
| 14TF/8D4 | CTI Coronariana | Termômetro | <i>S. epidermidis</i> | + | + |
| 18TF/10D3 | CTI Coronariana | Termômetro | <i>S. epidermidis</i> | + | + |
| 19TF/11D3 | CTI Coronariana | Termômetro | <i>S. epidermidis</i> | + | + |
| 4EF/4D3 | CTI Coronariana | Esfigmomanômetro | <i>S. epidermidis</i> | + | - |
| 32F/4D4 | CTI Coronariana | Outros fômites | <i>S. epidermidis</i> | + | - |
| 17TF/10D1 | CTI Coronariana | Termômetro | <i>S. epidermidis</i> | - | + |
| 20EtF/2D4 | CTI Coronariana | Estetoscópio | <i>S. epidermidis</i> | - | - |
| Subtotal | 31,43% (n=11) | | | | |
| 11EF/9E3 | UTI Neonatal | Esfigmomanômetro | <i>S. haemolyticus</i> | + | + |
| 5EF/5E5 | UTI Neonatal | Esfigmomanômetro | <i>S. epidermidis</i> | + | + |
| 15TF/8E1 | UTI Neonatal | Termômetro | <i>S. epidermidis</i> | + | - |
| 21EtF/2E1 | UTI Neonatal | Estetoscópio | <i>S. epidermidis</i> | + | - |
| 16TF/8E4 | UTI Neonatal | Termômetro | <i>S. epidermidis</i> | - | - |
| 22EtF/3E2 | UTI Neonatal | Estetoscópio | <i>S. epidermidis</i> | - | - |
| Subtotal | 17,14% (n=06) | | | | |
| 1EF/1BCG III | Enf. Cir. Geral ^{*1} | Esfigmomanômetro | <i>S. haemolyticus</i> | - | + |
| 2EF/4BCG II | Enf. Cir. Geral | Esfigmomanômetro | <i>S. haemolyticus</i> | - | + |
| 34F/5BCG II | Enf. Cir. Geral | Outros fômites | <i>S. epidermidis</i> | + | + |
| 23EtF/5AECM I | Enf. Clín. Méd. ^{*2} | Estetoscópio | <i>S. epidermidis</i> | + | + |
| 24EtF/5AECM III | Enf. Clín. Méd. | Estetoscópio | <i>S. epidermidis</i> | + | + |
| 25EtF//8AECM I | Enf. Clín. Méd | Estetoscópio | <i>S. epidermidis</i> | + | + |
| Subtotal | 17,14% (n=06) | | | | |

CTI, Centro de tratamento intensivo; E, Esfigmomanômetro; T, Termômetro; Et, Estetoscópio; F, Fômites; UTI, Unidade de terapia intensiva;^{*1}, Enfermaria de Cirurgia Geral;^{*2}, Enfermaria de Clínica Médica; *, todas as amostras foram oxacilina-resistentes e vancomicina-sensíveis.

4.12 Avaliação da produção de biofilme nos diferentes substratos com os tipos de fômites

A produção de biofilme nos diferentes substratos nos tipos de fômites, está mostrado na Tabela 13. Das seis amostras identificadas como *S. haemolyticus*, três foram isoladas de esfigmomanômetro, das quais, duas amostras (66,6%) foram positivas para produção de *slime*, três amostras (100%) foram classificadas como I (+++) para aderência ao vidro, e uma amostra (33,3%) foi classificada como fortemente aderente (+++) para aderência ao poliestireno. As outras três amostras foram isoladas de outros fômites das quais três amostras (100%) foram negativas para produção de *slime*, duas amostras (66,6%) foram classificadas como I (+++) para aderência ao vidro e uma amostra (33,3%) foi classificada como fracamente aderente (+) para a aderência ao poliestireno.

Das vinte e nove amostras identificadas como *S. epidermidis*, oito amostras foram isoladas de esfigmomanômetro das quais, quatro amostras (50%) foram positivas para produção de *slime*, sete amostras (87,5%) foram classificadas como I (+++) para aderência ao vidro e cinco amostras (71,4%) foram classificadas como moderadamente aderente (++) para a aderência ao poliestireno. Foram isoladas oito amostras de termômetro, das quais, três amostras (37,5%) foram positivas para produção de *slime*, cinco amostras (62,5%) foram classificadas como I (+++) para aderência ao vidro e seis amostras (75%) foram classificadas como moderadamente aderente (++) para a aderência ao poliestireno. Foram isoladas sete amostras de estetoscópio, das quais, apenas uma amostra (14,2%) foi positiva para produção de *slime*, cinco amostras (71,4%) foram classificadas como I (+++) para aderência ao vidro e cinco amostras (71,4%) foram classificadas como moderadamente aderente (++) para a aderência ao poliestireno. Foram isoladas seis amostras de outros fômites, das quais, apenas uma amostra (16,6%) foi positiva para produção de *slime*, seis amostras (100%) foram classificadas como I (+++) para aderência ao vidro e apenas uma amostra (16,6%) foi classificada como fortemente aderente (+++) para a aderência ao poliestireno.

Observamos que as amostras identificadas como *S. haemolyticus* e *S. epidermidis*, aderiram melhor ao esfigmomanômetro (tanto para aderência ao vidro, quanto para a aderência ao poliestireno) seguido por, estetoscópio, termômetro e outros fômites. Para a produção de *slime*, as amostras identificadas como *S. haemolyticus* foram positivas apenas no esfigmomanômetro. Já as amostras *S. epidermidis*, todos os fômites apresentaram amostras positivas, sendo o esfigmomanômetro com a maior porcentagem de amostras positivas.

Tabela 13 - Aderência a diferentes substratos de amostras de *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus epidermidis* isolados de diferentes tipos de fômites de origem hospitalar

| Amostras* | Fômite | Biofilme | | |
|------------------------|------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|
| | | Vermelho do congo | Aderência ao vidro | Aderência ao poliestireno |
| <i>S. haemolyticus</i> | | | | |
| 1EF/1BCG III | Esfigmomanômetro | + | +++ | - |
| 11EF/9E3 | Esfigmomanômetro | + | +++ | ++ |
| 2EF/4BCG II | Esfigmomanômetro | - | +++ | +++ |
| 28F/2E2 | Outros fômites | - | +++ | + |
| 33F/4E5 | Outros fômites | - | + | + |
| 27F/2BCG II | Outros fômites | - | +++ | ++ |
| <i>S. epidermidis</i> | | | | |
| 3EF/4D2 | Esfigmomanômetro | + | +++ | ++ |
| 4EF/4D3 | Esfigmomanômetro | - | +++ | ++ |
| 5EF/5E5 | Esfigmomanômetro | - | +++ | ++ |
| 6EF/7CCT I | Esfigmomanômetro | - | +++ | ++ |
| 7EF/7CCT II | Esfigmomanômetro | + | +++ | + |
| 8EF/7D3 | Esfigmomanômetro | + | +++ | + |
| 9EF/7D4 | Esfigmomanômetro | + | +++ | + |
| 10EF/9/10CCT I | Esfigmomanômetro | - | + | ++ |
| 12TF/2CCT I | Termômetro | - | +++ | ++ |
| 13TF/6CCT III | Termômetro | - | +++ | ++ |
| 14TF/8D4 | Termômetro | + | + | ++ |
| 15TF/8E1 | Termômetro | - | + | + |
| 16TF/8E4 | Termômetro | - | + | + |
| 17TF/10D1 | Termômetro | + | +++ | ++ |
| 18TF/10D3 | Termômetro | - | +++ | ++ |
| 19TF/11D3 | Termômetro | + | +++ | ++ |
| 20EtF/2D4 | Estetoscópio | - | +++ | + |
| 21EtF/2E1 | Estetoscópio | - | +++ | ++ |
| 22EtF/3E2 | Estetoscópio | - | +++ | ++ |
| 23EtF/5AECM I | Estetoscópio | - | +++ | ++ |
| 24EtF/5AECM III | Estetoscópio | - | + | ++ |
| 25EtF//8AECM I | Estetoscópio | - | + | + |
| 26EtF/12CCT I | Estetoscópio | + | +++ | ++ |
| 29F/4AECM I | Outros fômites | - | +++ | ++ |
| 30F/4AECM III | Outros fômites | - | +++ | ++ |
| 31F/4AECM IV | Outros fômites | + | +++ | + |
| 32F/4D4 | Outros fômites | - | +++ | + |
| 34F/5BCG II | Outros fômites | - | +++ | +++ |
| 35F/12E4 | Outros fômites | - | +++ | ++ |

Todas amostras oxacilina-resistentes e vancomicina-sensíveis; (+), positivo; (-), negativo.

4.13 Avaliação da ocorrência de multirresistência e de produção de biofilme para os tipos de fômites e à produção de biofilme nos diferentes substratos

A multirresistência com a produção de biofilme nos diferentes substratos está mostrada na Tabela 14. Das três amostras *S. haemolyticus* isoladas de esfigmomanômetro, todas (100%) foram multirresistente, todas (100%) foram *mecA* negativo e foram *ica* positivo, duas amostras (66,6%) foram *slime* positivo, todas (100%) foram classificadas como I (+++) para aderência ao vidro e apenas uma amostra (33,3%) foi classificadas como fortemente aderente (+++). Das três amostras *S. haemolyticus* isoladas de outros fômites, todas (100%) foram multirresistente, duas amostras (66,6%) foram *mecA* positivo, uma amostra (%) foi *ica* positivo, todas (100%) foram *slime* negativo, duas amostras (66,6%) foram classificadas como I (+++) para aderência ao vidro e duas amostras (66,6%) foram classificadas como moderadamente aderente (++)

Das oito amostras *S. epidermidis* isoladas de esfigmomanômetros, todas (100%) foram multirresistentes, sete amostras (87,5%) foram *mecA* positivo, cinco amostras (62,5%) foram *ica* positivo, quatro amostras (50%) foram *slime* positivo, sete amostras (75%) foram classificadas como I (+++) para aderência ao vidro e cinco amostra (62,5%) foram classificadas como moderadamente aderente (++)

Das oito amostras *S. epidermidis* isoladas de termômetro, todas (100%) foram multirresistentes, cinco amostras (62,5%) foram *mecA* positivo, cinco amostras (62,5%) foram *ica* positivo, três amostras (37,5%) foram *slime* positivo, seis amostras (75%) foram classificadas como I (+++) para aderência ao vidro e sete amostras (87,5%) foram classificadas como moderadamente aderente (++)

Das sete amostras *S. epidermidis* isoladas de estetoscópios, todas (100%) foram multirresistentes, quatro amostras (57,1%) foram *mecA* positivo, três amostras (42,8%) foram *ica* positivo, uma amostra (14,2%) foi *slime* positivo, cinco amostras (71,4%) foram classificadas como I (+++) para aderência ao vidro e cinco amostras (71,4%) foram classificadas como moderadamente aderentes (++)

Das seis amostras *S. epidermidis* isoladas de outros fômites, todas (100%) foram multirresistentes, todas (100%) foram *mecA* positivo, duas amostras (33,3%) foram *ica* positivo, uma amostra (16,6%) foi *slime* positivo, todas (100%) classificadas como I (+++) para aderência ao vidro e uma amostra (16,6%) foi classificada como fortemente aderente (+++)

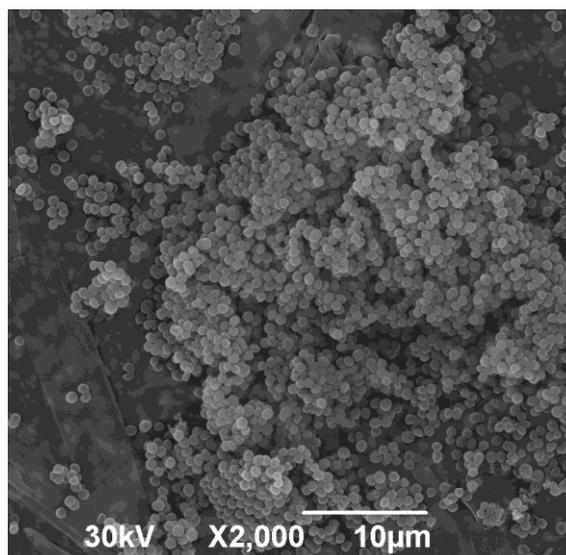
Tanto as amostras *S. haemolyticus*, quanto as amostras *S. epidermidis*, foram multirresistentes, aderiram melhor ao esfingomanômetro (tanto para aderência ao vidro, quanto para a aderência ao poliestireno), e a presença ou ausência do gene *mecA* e do gene *ica*, não apresentaram correlação com os tipo de fômites.

Não houve associação estatística entre presença de gene *ica* e produção de *slime* (vermelho do Congo) ($p > 0,05$). Adicionalmente, encontramos associação estatística marginal (não conclusiva) entre presença de gene *ica* e produção de *slime* (vermelho do Congo) ($p > 0,05$).

4.14 Microscopia eletrônica de varredura

Um dos maiores problemas referentes aos *Staphylococcus* é o fato de apresentarem um alto poder de adesão a diferentes superfícies, incluindo superfícies lisas de biomateriais. Através da microscopia eletrônica de varredura, foi possível observar a formação do biofilme estafilocócico em cateter de poliestireno e sua superfície, como ilustrado na **figura 6**.

Figura 6 - Micrografia de ensaio microscopia eletrônica de varredura (MEV) ilustrando a formação de biofilme na superfície de catéter de poliuretano (48 h de incubação) por amostra de *Staphylococcus haemolyticus*.



Nota: Células sésseis multiplicadas e autoagregadas mantendo contato com a superfície abiótica.

Tabela 14 - Perfis resistência aos agentes antimicrobianos avaliados por método de difusão em disco e a produção de biofilme nos diferentes substratos, de amostras de *Staphylococcus haemolyticus* e de *Staphylococcus epidermidis* isoladas de fômites de origem hospitalar

| Amostras | Fômites | Perfis de Resistência | Gene <i>mecA</i> | Gene <i>ica</i> | Vermelho do congo | Aderência ao vidro | Aderência ao poliestireno |
|------------------------|------------------|---|------------------|-----------------|-------------------|--------------------|---------------------------|
| <i>S. haemolyticus</i> | | | | | | | |
| 11EF/9E3 | Esfigmomanômetro | FOX, CIP, DA, E, CN, STX, CAZ, IPM, MXF | - | + | + | +++ | ++ |
| 2EF/4BCG II | Esfigmomanômetro | FOX, CIP ^I , DA, E ^I , CN, STX, CAZ, IPM, MXF | - | + | - | +++ | +++ |
| 1EF/1BCG III | Esfigmomanômetro | FOX, CIP, DA, E, CN, STX, CAZ, IPM | - | + | + | +++ | - |
| 28F/2E2 | Outros fômites | FOX, CIP, DA, E, CN, STX, CAZ | + | - | - | +++ | + |
| 33F/4E5 | Outros fômites | FOX, CIP, DA, E, CN, STX, CAZ | + | - | - | + | + |
| 27F/2BCG II | Outros fômites | FOX, CIP, DA, E, CN, STX | - | + | - | +++ | ++ |
| <i>S. epidermidis</i> | | | | | | | |
| 26EtF/12CCT I | Estetoscópio | FOX, CIP, DA, E, CN, STX, CAZ, IPM | - | - | + | +++ | ++ |
| 32F/4D4 | Outros fômites | FOX, CIP, DA, E, CN, STX, CAZ, IPM | + | - | - | +++ | + |
| 8EF/7D3 | Esfigmomanômetro | FOX, CIP, DA, E, CN, STX, CAZ | + | + | + | +++ | + |
| 10EF/9/10CCT I | Esfigmomanômetro | FOX, CIP, DA, E, CN, STX, CAZ | + | + | - | + | ++ |
| 12TF/2CCTI | Termômetro | FOX, CIP, DA, E, CN, STX, CAZ | + | - | - | +++ | ++ |
| 13TF/6CCT III | Termômetro | FOX, CIP, DA, E, CN, STX, CAZ | - | - | - | +++ | ++ |
| 20EtF/2D4 | Estetoscópio | FOX, CIP, DA, E, CN, STX, CAZ | - | - | - | +++ | + |
| 21EtF/2E1 | Estetoscópio | FOX, CIP, DA, E, CN, STX, CAZ | + | - | - | +++ | ++ |
| 22EtF/3E2 | Estetoscópio | FOX, CIP ^I , DA, E ^I , CN, STX, CAZ | - | - | - | +++ | ++ |
| 24EtF/5AECM III | Estetoscópio | FOX, CIP, DA, E, CN, STX, CAZ | + | + | - | + | ++ |
| 34F/5BCG II | Outros fômites | FOX, CIP ^I , DA, E, CN, STX, CAZ | + | + | - | +++ | +++ |
| 35F/12E4 | Outros fômites | FOX, CIP, DA, E, CN, STX, CAZ | + | + | - | +++ | ++ |
| 5EF/5E5 | Esfigmomanômetro | FOX, CIP, DA, E, CN, STX | + | + | - | +++ | ++ |
| 6EF/7CCT I | Esfigmomanômetro | FOX, CIP, DA, E, CN, STX | + | - | - | +++ | ++ |
| 7EF/7CCT II | Esfigmomanômetro | FOX, CIP, DA, E, CN, STX | - | - | + | +++ | + |
| 9EF/7D4 | Esfigmomanômetro | FOX, CIP, DA, E, CN, STX | + | + | + | +++ | + |
| 14TF/8D4 | Termômetro | FOX, CIP, DA, E, CN, STX | + | + | + | + | ++ |
| 31F/4AECM IV | Outros fômites | FOX, CIP ^I , DA, E, CN, STX | + | - | + | +++ | + |
| 29F/4AECM I | Outros fômites | FOX, CIP, DA, E, CN, CAZ | + | - | - | +++ | ++ |
| 25EtF/8AECM I | Estetoscópio | FOX, CIP ^I , DA, E, CN, STX, CAZ | + | + | - | + | + |
| 18TF/10D3 | Termômetro | FOX, CIP, DA, E, CAZ | + | + | - | +++ | ++ |
| 19TF/11D3 | Termômetro | FOX, CIP, DA, E, CAZ | + | + | + | +++ | ++ |
| 16TF/8E4 | Termômetro | FOX, CIP ^I , DA, E, SXT | - | - | - | + | + |
| 30F/4AECM III | Outros fômites | FOX, CIP, DA, E, CAZ | + | - | - | +++ | ++ |
| 4EF/4D3 | Esfigmomanômetro | FOX, CIP, DA ^I , E, CN, CAZ | + | - | - | +++ | ++ |
| 17TF/10D1 | Termômetro | FOX, CIP, DA, E, CN ^I , CAZ ^I , IPM | - | + | + | +++ | ++ |
| 23EtF/5AECM I | Estetoscópio | FOX, CIP, DA ^I , E, SXT | + | + | - | +++ | ++ |
| 15TF/8E1 | Termômetro | FOX, CIP ^I , DA, E, SXT | + | - | - | + | + |
| 3EF/4D2 | Esfigmomanômetro | FOX, CIP, DA, E, CN, SXT, CAZ | + | + | + | +++ | ++ |

Agentes antimicrobianos testados: FOX-cefoxitina; CN-gentamicina; SXT- sulfametazol-trimetropim; IPM-imipenem; CAZ-ceftazidima; CIP-ciprofloxacina; DA-clindamicina; E-eritromicina; MXF- moxifloxacina e LZD- linezolida testados apenas com *S. haemolyticus*. Todas as amostras foram sensíveis a vancomicina e linezolida, e resistentes a oxacilina; I, resistência intermediária; (+), positivo; (-), negativo.

5. DISCUSSÃO

Os SCN foram, por muito tempo, considerados micro-organismos saprófitos e raramente patogênicos. Nas últimas décadas, observou-se o aumento de IRAS relacionadas a SCN, que hoje estão entre os principais agentes de sepse em pacientes com dispositivos hospitalares de longa permanência como cateteres venosos centrais e periféricos, próteses valvulares, válvulas cardíacas artificiais e de outras infecções que envolvem a formação de biofilme em biomateriais implantados.

S. epidermidis coloniza naturalmente a pele e mucosa de humanos e animais, e durante as duas últimas décadas tem sido o causador de infecções nosocomiais. Seu isolamento a partir de espécimes clínicos para ser considerado significativo requer a diferenciação entre agente de infecção clínica e contaminante. Esta diferenciação é importante para o diagnóstico definitivo de infecções relacionadas ao cateter, já que pode levar a uma decisão importante: mudar o tratamento ou até mesmo remover um dispositivo cirúrgico (KAISER *et al.*, 2013).

S. haemolyticus são bactérias saprófitas, que assim como *S. epidermidis*, têm a capacidade de colonizar a pele e as mucosas de humanos. No entanto, *S. haemolyticus* surgiu recentemente como patógeno associado a IRAS em pacientes imunocomprometidos. Estudos recentes identificaram *S. haemolyticus* como uma importante causa de infecções da corrente sanguínea associadas com o uso de cateteres venosos centrais (SILVA *et al.*, 2013).

No presente estudo foi documentada, através dos testes fenotípicos, a presença de nove espécies de SCN, dentre elas, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *Staphylococcus cohnii cohnii* e *Staphylococcus simulans*.

Realizada a confirmação das espécies pelo PCR, observou-se que das 35 amostras utilizadas isoladas de fômites hospitalares (termômetros, esfigmomanômetros e estetoscópio), 90,62% (29/35) foram identificadas como *S. epidermidis*. Tal resultado pode ser justificado pelo fato de *S. epidermidis* ser a espécie de SCN mais frequentemente isolada, e que faz parte da microbiota epitelial, além do que, tais fômites são objetos que estão em constante contato com a pele (CONTRETRAS *et al.*, 2013; XAVIER & UENO, 2009). Apenas 17,14% (6/35) das amostras isoladas de fômites foram identificadas como *S. haemolyticus*, não concordando com Kim *et al* (2012), que descreveram em seu estudo, que 51,4% dos cassetes de raio-x pesquisados, estavam contaminados por *S. haemolyticus*, e que

provavelmente, esses micro-organismos podem ser disseminados no ambiente hospitalar através de dispositivos médicos.

O fenômeno da resistência a antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos é conhecido a mais de 50 anos. Cerca de um ano após a introdução de compostos semi-sintéticos da penicilina, foi relatada, no Reino Unido, a primeira cepa de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA). Essa resistência é devido principalmente a PBP2a (uma transpeptidase com baixa afinidade por β -lactâmicos), codificada pelo gene *mecA*, que é altamente conservado em cepas de *Staphylococcus*, e portanto, é útil como marcador de resistência a oxacilina (MONECKE *et al.*, 2012). Na literatura vem sendo sugerido que tanto o biofilme, quanto a presença do gene *ica* são marcadores de significado clínico, com base nos resultados que os isolados de infecções são mais capazes de produzir biofilme do que os isolados comensais. Além disso, a presença de dispositivos médicos de longa permanência, como cateteres, pode favorecer a formação de biofilme, resultando na persistência da infecção (IORIO *et al.*, 2011).

Neste estudo, das amostras identificadas como *S. haemolyticus*, 50% (3/6) apresentavam o gene *mecA*, 66,66% (4/6) apresentavam o gene *ica* e 16,6% (1/6) apresentaram tanto o gene *mecA* quanto o gene *ica*. Das amostras identificadas como *S. epidermidis*, 75,86% (22/29) apresentavam o gene *mecA*, 48,27% (14/29) apresentavam o gene *ica* e 44,8% (13/29) apresentaram tanto o gene *mecA* quanto o gene *ica*. Outros estudos indicam altas porcentagens da presença do gene *mecA*, como Silva *et al* (2013) que descrevem em seu estudo que 96,2% (26/27) das amostras *S. haemolyticus* carregavam o gene *mecA* e Martins *et al* (2013) que descrevem que 70,7% (80/111) das amostras identificadas como *S. epidermidis* carregavam o gene *mecA*. Também são encontrados na literatura estudos que apontam altas porcentagens para a presença do gene *ica*, como Pereira *et al* (2014) que descrevem em seu estudo, que 58% (18/31) de suas amostras *S. haemolyticus* foram positivas para presença do gene *ica* e Gad *et al* (2009) que observaram que 88,6% (31/35) de suas amostras identificadas como *S. epidermidis* foram positivas para a presença do gene *ica*.

Foi descrito que embora o gene *mecA* possa estar presente, alguns fatores podem interferir na expressão do gene, não sendo possível a detecção fenotípica da resistência à oxacilina mediada pela PBP2a (STAPLETON & TAYLOR, 2002).

O descobrimento dos antibióticos foi um grande avanço para a aplicação terapêutica no cuidado com a saúde humana, e eles são importantes na redução da morbidade e mortalidade. O aparecimento de resistência aos antimicrobianos foi, é, e provavelmente

continuará a ser um dos grandes problemas da medicina, pois é causada pela mutação espontânea e recombinação de genes, que criam variabilidade genética, gerando um sério problema do ponto de vista clínico e de saúde pública. O rápido aparecimento e disseminação da multirresistência entre as bactérias aumentam a necessidade da identificação e controle dos patógenos envolvidos (MOTA *et al.*, 2005).

Todas as amostras foram multirresistentes, tendo perfis similares. Todas as amostras também foram oxacilina-resistentes, sendo 66,6% (4/6) das amostras *S. haemolyticus* e 58,6% (17/29) das amostras *S. epidermidis*, com CIM maiores ou iguais a 32 µg/ml, e vancomicina-sensíveis, sendo que nenhuma (0/6) das amostras *S. haemolyticus* e 6,8% (2/29) das amostras *S. epidermidis* apresentaram CIM maiores ou iguais a 4 µg/ml para vancomicina. Na literatura, encontramos estudos nos quais foram observados dados que corroboram com os do presente estudo. Li *et al* (2013) e Silva *et al* (2013) observaram que 90% e 92,6%, respectivamente, de suas amostras foram multirresistentes. Já Mertens & Ghebremedhin (2013) informaram que apenas 15,5% das amostras foram multirresistentes. Martins *et al* (2013), observaram que 35,1% (39/111) das amostras *S. epidermidis* e que 43,7% (7/16) das amostras *S. haemolyticus* apresentaram CIM para oxacilina com concentrações variando de ≥ 32 µg/ml até ≤ 256 µg/ml e, também, observaram que 3,6% (4/111) das amostras *S. epidermidis* e que 12,5% (7/16) das amostras *S. haemolyticus*, apresentaram CIM para vancomicina com concentrações maiores ou iguais a 4 µg/ml.

Já foi descrito na literatura uma prevalência muito elevada de genes que codificam resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos e aminoglicosídeos, bem como uma proporção significativa de isolados com CIMs de vancomicina próximas do ponto definido para a resistência (FREDHEIM *et al.*, 2009).

O uso de antimicrobianos tem se tornado muito frequente e como consequência, cresce constantemente a resistência aos mesmos. Estamos frente a um grande desafio nos próximos anos, a mais urgente racionalização do uso de medicamentos. A oxacilina é uma opção para o tratamento de infecções por SCN, contudo, a resistência a este antimicrobiano tem se tornado um grande problema nas últimas décadas. Uma redução na eficácia da vancomicina tem sido descrita em estudos de infecções por MRSA tratados com este antimicrobiano (PAIVA *et al.*, 2010).

Um fenômeno relacionado com a resistência é a tolerância. Segundo Bourgeois *et al* (2007) a tolerância à antimicrobianos é um "tipo de resistência" em particular, em bactérias capazes de sobreviver, porém não multiplicar-se, na presença de uma dose normalmente letal

de um dado antimicrobiano, isto é, a bactéria se mostra sensível à concentração inibitória mínima (CIM) do antimicrobiano, porém apresenta maior capacidade de sobreviver na presença do antimicrobiano, ou seja, não sofre a ação da concentração bactericida mínima (CBM) habitual, e ainda pode permanecer viável no sítio da infecção (Lechner *et al.*, 2012). No presente estudo, observamos que para algumas amostras, a CBM é igual a CIM, porém há certas amostras, em que a CBM é bem maior do que a CIM. Como a tolerância é considerada quando a CBM é 32 vezes maior que a CIM, não encontramos nenhuma amostra *S. haemolyticus* tolerante e apenas cinco amostras *S. epidermidis* tolerantes, em nosso estudo.

Bourgeois *et al* (2007) observaram em seu estudo que já existem amostras tolerantes a vancomicina e a teicoplanina e alertam para que seja dado uma atenção maior ao problema da tolerância. É necessário explorar os mecanismos de tolerância que ainda são desconhecidos, mesmo que recentes trabalhos sobre *Streptococcus pneumoniae* e *S. aureus* tenham sugerido o envolvimento de sistemas de regulação ou modificações na composição da parede celular.

Um dos maiores problemas dos SCN está no fato destes micro-organismos apresentarem um alto poder de adesão a diferentes superfícies, incluindo superfícies lisas de biomateriais, e posterior produção de uma camada polissacarídica, chamada de *slime*. O importante papel desempenhado pelo *slime* é aumentado pela sua frequente associação ao aumento dos antimicrobianos ou resistência a antimicrobianos. A dificuldade na erradicação de uma infecção crônica associada com a formação de *slime* tem sido relatada e foi mostrado que bactérias produtoras de *slime* resistem a altas concentrações de antimicrobianos quando comparadas com bactérias não produtoras de *slime*, o que demonstra que a produção de biofilme dificulta a ação dos antimicrobianos (POURMAND *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2013).

O teste do Ágar vermelho do Congo (CRA) é baseado na subcultura das cepas bacterianas em BHI Ágar, acrescentando sacarose e o corante vermelho do Congo. Foi demonstrado que este método tem baixo rigor na detecção da produção de *slime*, porém é mais barato e fácil de realizar, e seu critério de avaliação é baseado na análise visual da cor das colônias, que variam de vermelho para cepas não produtoras de biofilme e preto para cepas produtoras de biofilme (KAISER *et al.*, 2013).

Observamos em nosso estudo que, na ausência de antimicrobianos, foram positivas para a produção de *slime*, 33,4% (2/6) das amostras identificadas como *S. haemolyticus* e 31% (9/29) das amostras identificadas como *S. epidermidis*. Em discordância com nossos dados, Nayak *et al* (2011) informam em seus estudos que 65,6% de suas amostras identificadas como *S. epidermidis* foram produtoras de *slime* detectadas pelo vermelho do

Congo. Porém Contretras *et al* (2013) observaram que 34% de suas amostras *S. epidermidis* foram produtoras de *slime*, o que corrobora com nossos achados.

Não há estudos na literatura a respeito da avaliação da produção de *slime* na presença de oxacilina. Ao realizarmos essa técnica em nosso estudo, encontramos que 33,3% (2/6) das amostras identificadas como *S. haemolyticus* e 10,3% (3/29) das amostras identificadas como *S. epidermidis* foram positivas para a produção de *slime*. Acreditamos então, que a presença de oxacilina no meio, pode agir como um fator de estresse, de duas formas distintas: induzindo o micro-organismo a produzir o *slime* para proteção (gerando uma resistência ao antimicrobiano), ou agindo como um inibidor de *slime*.

Na presença de vancomicina, encontramos na literatura, apenas o estudo de Kaiser *et al* (2013), onde os autores descrevem que 57,1% (4/7) de suas amostras *S. epidermidis* produziram *slime*. No presente estudo, 10,3% (3/29) amostras identificadas como *S. epidermidis* foram positivas para a produção de *slime*. Não há estudos na literatura a respeito da avaliação da produção de *slime* na presença de vancomicina, com amostras de *S. haemolyticus*. Em nosso estudo, 33,3% (2/6) das amostras identificadas como *S. haemolyticus* produziram *slime* na presença de vancomicina.

Segundo Kaiser *et al* (2013), estudos demonstram opiniões controversas a respeito da vancomicina. Alguns acreditam que a vancomicina não tem nenhum efeito inibidor sobre a formação de biofilme, e outros estudos acreditam que a presença de vancomicina com concentrações sub-CIM, ou mesmo em concentrações mais elevadas (8µg/ml), induz a formação de biofilmes em *S. epidermidis*.

Nos ambientes naturais, as bactérias frequentemente aderem a superfícies as mais diversas. Esse modo de crescimento aderente, usualmente associada com a produção da matriz extracelular é conhecido como biofilme. Infecções associadas ao biofilme são notoriamente difíceis de erradicar devido à natureza dos micro-organismos, que são capazes de resistir à ação dos antimicrobianos e do sistema imunológico do hospedeiro. Além disso, há evidência limitada, porém crescente, sugerindo que os biofilmes podem facilitar o aparecimento de resistência aos antimicrobianos. Os *Staphylococcus* podem causar uma variedade de infecções que envolvam biofilme, incluindo osteomielite, endocardite, e as infecções associadas a dispositivos médicos (RYDER *et al.*, 2012).

Verificamos que das amostras identificadas como *S. haemolyticus*, 66,6% (4/6) aderiram ao vidro e 16,7% (1/6) aderiram fortemente ao poliestireno. Para as amostras identificadas como *S. epidermidis*, 79,5% (23/29) aderiram ao vidro e 3,5% (1/29) aderiram fortemente ao poliestireno. Também é possível observar que os perfis de aderência na

ausência de antimicrobianos das amostras identificadas como *S. haemolyticus* e das amostras identificadas como *S. epidermidis* são parecidos com os perfis de aderência na presença de oxacilina e vancomicina, permitindo considerar que os antimicrobianos possam estar agindo como um fator de estresse eventualmente promotor para a aderência. Pereira *et al* (2014) observaram em seu estudo que 87% e 97% de suas amostras aderiram ao vidro e ao poliestireno, respectivamente.

Em nosso estudo, observamos que a presença do gene *mecA*, não apareceu associada à produção ou não de biofilme.

Na atualidade, pouco se sabe a respeito da contaminação de fômites de origem hospitalar por SCN. Na literatura, é possível encontrar estudos, mesmos que poucos, a respeito de contaminação de fômites de diversas origens, principalmente por *S. aureus*. Em 1971, Lowbury *et al*, relataram o primeiro caso de contaminação de dispositivos médicos, e em 1975, Andrew *et al*, descreveram o primeiro caso relacionado diretamente à fômites hospitalares. Não há, na literatura, estudos que relatam correlações entre o tipo de fômites, perfis de resistência e aderência das amostras. Encontramos um perfil de resistência semelhante entre as amostras *S. haemolyticus* e *S. epidermidis* isoladas de esfigmomanômetro (tecido), termômetro (vidro) e estetoscópio (metal) e de outros fômites. Observamos também que, independente da espécie, a adesão foi maior nas amostras isoladas de esfigmomanômetro (tanto para aderência ao vidro, quanto para a aderência ao poliestireno). A aderência ao esfigmomanômetro nos surpreendeu, já que a parte estudada foi o tecido. Isso nos leva a crer, que os micro-organismos podem aderir virtualmente a qualquer material.

Deve-se ressaltar que as três amostras *S. haemolyticus* formadoras de biofilme, isoladas de esfigmomanômetro, foram *mecA* negativas e *ica* positivas, e cinco amostras *S. epidermidis* formadoras de biofilme isoladas de esfigmomanômetro foram *mecA* e *ica* positivas, demonstrando que para este fômite, a presença ou ausência destes genes, não influenciaram na formação de biofilme. Também é possível observar um perfil semelhante para termômetro, estetoscópio e outros fômites

Observamos também, que não há na literatura, estudos que correlacionem fômites com setores hospitalares. No presente trabalho, isolamos amostras de cinco setores hospitalares: CTI Geral, CTI Coronariana, UTI Neonatal, Enfermaria de Cirurgia Geral e Enfermaria de Clínica Médica. Foram isoladas amostras identificadas como *S. epidermidis*, de todos os setores hospitalares, porém *S. haemolyticus*, não foi encontrado em Enfermaria de Clínica Médica. Isso indica que *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* estão disseminados por todos os setores hospitalares, sendo os fômites, importantes vias de transmissão, já que observamos

que podem absorver e abrigar micro-organismos. Devemos dar mais importância e atenção aos fômites, tanto de origem hospitalar, quanto de outras origens (como celulares, canetas, entre outros), pois eles são já reconhecidos como importantes fontes de transmissão e reservatório de micro-organismos, além de selecioná-los. Os fômites hospitalares utilizados no presente estudo (esfigmomanômetro, termômetro e estetoscópio), são amplamente utilizados em hospitais, e deveriam ser melhores esterilizados e/ou cada paciente possuir seu instrumento de uso individual, para que houvesse a tentativa de diminuir o problema da disseminação dos micro-organismos.

Segundo Binatti (2013), um aspecto de grande importância se refere à questão da pressão seletiva no ambiente hospitalar que atua como crivo para essas supostas vantagens microbianas que favoreceriam a persistência e circulação no ambiente hospitalar, sendo que a resistência é a maior garantia de persistência. Podemos reconhecer que, condições iniciais de vantagem competitiva no ambiente deem margem à ocorrência de transferência/aquisição de genes, mais notadamente de resistência (também, de patogenicidade). Na análise da continuidade de um provável processo de circulação que mantenha, e potencialize a persistência, devemos considerar os fômites. Materiais sintéticos que entram em contato com a pele podem ser contaminados, reter e contaminar a pele de outros indivíduos sejam eles profissionais e/ou pacientes. As constituições por vidro, plástico e tecido sintético, além de permitir adesão mais ou menos estável (persistente) poderiam, também, estar determinando um efeito seletivo na forma de favorecimento de cepas mais aderentes aos materiais de cateteres e próteses.

A resistência cruzada entre patógenos no ambiente hospitalar é um grave problema, já que representa uma transferência de micro-organismos presentes nestes ambientes entre pacientes através de instrumentos hospitalares, como fômites. O CDC enfatiza que medidas simples como o uso de antissépticos e a lavagem das mãos devam ser utilizadas, na tentativa de reduzir a disseminação de micro-organismos hospitalares, reduzindo assim, a ocorrência das IRAS (CDC, 2008).

O aumento na incidência de patógenos nosocomiais multirresistentes tem sido relatado nas últimas décadas. Os SCN, têm se mostrado cada vez mais importantes neste cenário, principalmente, devido ao fato de estarem envolvidos em infecções associadas a dispositivos médicos e fômites. Temos como horizonte futuro para esta pesquisa, o contínuo estudo de aspectos multifatoriais da virulência dos SCN, bem como seus fatores de resistência e mais detalhadamente os fatores de virulência, além da produção de biofilme, pois a disseminação e

resistência dessas amostras são aspectos fundamentais no estudo desse importante grupo de agentes de infecções oportunistas.

CONCLUSÕES

- Foram identificadas nove espécies de SCN entre as 62 amostras isoladas de fômites (esfigmomanômetro, termômetro e estetoscópio) utilizados em diversos setores no Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ, utilizando-se testes bioquímicos convencionais, sendo que os *S. epidermidis* (43,5%) foram isolados com maior frequência, seguidos de *Staphylococcus cohnii cohnii* (17,7%), e *S. haemolyticus* (8,1%).
- Após a confirmação das espécies pela técnica de PCR, foram identificadas como *S. epidermidis* (29 amostras) e *S. haemolyticus* (6 amostras) dentre 35 amostras isoladas de fômites.
- Todas as 35 amostras (100%) foram resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos, sendo assim, classificadas como multirresistentes, sendo que, das amostras *S. haemolyticus*, todas foram linezolidas sensíveis e duas amostras foram resistentes a moxifloxacina. Os perfis de resistência foram semelhantes em todas as amostras de *S. epidermidis*.
- Todas as 35 amostras (100%) apresentaram resistência a oxacilina, sendo que a presença do gene *mecA* foi detectada em 71,4% das amostras. As CIMs para oxacilina variaram de $\geq 1 \mu\text{g/mL}$ à $\leq 512 \mu\text{g/mL}$, e as CBMs variaram de $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ à $\geq 512 \mu\text{g/mL}$. As amostras *S. epidermidis* apresentaram CIMs e CBMs maiores do que as amostras *S. haemolyticus*, sendo CIM = $512 \mu\text{g/mL}$ encontrada apenas em amostras *S. epidermidis* (20,6%). Apenas cinco amostras *S. epidermidis*, foram tolerantes a oxacilina. Foi observado sensibilidade a vancomicina em 100% das amostras, com CIMs variando entre $\geq 0,5 \mu\text{g/mL}$ e $\leq 4 \mu\text{g/mL}$, e CBMs variando entre $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ e $\leq 8 \mu\text{g/mL}$, sendo que nenhuma amostra foi tolerante a vancomicina.
- As amostras apresentaram diferenças na capacidade de produzir biofilme. Os ensaios em Ágar Vermelho do Congo, na ausência de antimicrobianos, demonstraram a expressão de *slime* em apenas 25,7% das amostras. Houve uma redução na expressão de *slime*, na presença de oxacilina e/ou vancomicina. Algumas amostras, sequer cresceram na presença dos antimicrobianos. Para aderência ao vidro, encontramos um perfil oposto, já que a presença ou ausência de antimicrobianos não alterou a intensidade na qual as amostras aderiram ao vidro (superfície abiótica hidrofílica).
- A produção de biofilme em superfície abiótica hidrofóbica (poliestireno) foi detectada em 100% das amostras, sendo que apenas duas amostras, sendo uma *S. haemolyticus* isolada de

esfigmomanômetro e uma *S. epidermidis* isolada de outros fômites foram classificadas como fortemente aderentes. Essa metodologia utilizada pode não ter sido um bom indicador para estabelecer uma correlação, pois a maioria das amostras foram moderadamente produtoras de biofilme. A presença do gene *icaAD*, foi observada em mais da metade das 35 amostras (51,4%).

- A espécie *S. epidermidis* foi a mais isolada e deve-se ressaltar que, apresentou altos níveis de resistência a oxacilina, sendo a maioria produtora de *slime* e biofilme.
- Os fômites podem estar determinando um efeito seletivo na forma de favorecimento de cepas mais aderentes aos diversos materiais.
- Foram isoladas amostras *S. epidermidis* de todos os sítios hospitalares estudados e *S. haemolyticus* só não foi encontrado em Enfermaria de Clínica Médica. Em relação aos fômites, *S. epidermidis* foi encontrado em todos os fômites estudados, e *S. haemolyticus* apenas foi encontrado em esfigmomanômetro e em fômites desconhecidos, 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 eles dentro do hospital, já que os micro-organismos aderidos a eles, possuem perfis de multirresistência semelhantes, podendo indicar uma participação destas cepas em infecções nosocomiais.
- Não foi encontrada correlação entre a resistência e a aderência com os tipos de fômites e os setores hospitalares.

REFERÊNCIAS

- AL GHAMDI, A.K.; ABDELMALEK, S.M.; BAMAGA, M.S.; AZHAR, E.I.; WAKID, M.H.; ALSAIED, Z. Bacterial contamination of Saudi "one" Riyal paper notes. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 42, p. 711-716, 2011.
- ANDREW, D.E.; BUMSTEAD, E.; KEMPTON, A.G. The role of fomites in the transmission of vaginitis. **Canadian Medical Association Journal**, v. 112, p. 1181-1183, 1975.
- ANGELAKIS, E.; AZHAR, E.I.; BIBI, F.; YASIR, M.; AL GHAMDIM A.K.; ASHSHI, A.M.; ELSHEMI, A.G.; RAOULT, D. Paper money and coins as potential vectors of transmissible disease. **Future Microbiology**, v. 9, p. 249-261, 2014.
- ANTUNES, A.L.S.; PEREZ, L.R.R.; REITER, K.C.; SECHHI, C.; FREITAS, A.L.P. Detecção da produção de biofilme em *Staphylococcus* spp. por Ágar Congo Red. **Revista de Saúde da UCPEL**, v. 1, nº. 1, 2007.
- ANTUNES, A.L.S.; BONFANTI, J.W.; PEREZ, L.R.R.; PINTO, C.C.F.; FREITAS, A.L.P.; MACEDO, A.J.; BARTH, A.L. High vancomycin resistance among biofilms produced by *Staphylococcus* species isolated from central venous catheters. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, nº. 1, 2011.
- ARSLAN, S.; ÖZKARDES, F. *Slime* production and antibiotic susceptibility is staphylococci isolated from clinical samples. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, nº. 1, p. 29-33, 2007.
- BANNERMAN, T.L & PEACOCK, S.J. *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grown aerobically. **In: Manual of Clinical Microbiology**. 384-404, edited by Murray, P.R, Baron, E.J, Pfaller, M.A, Tenover, F.C & Yoken, R.H. 8ed. ASM Press. Washington, DC, 2007.
- BERNARDI, A.C.A. Estudo de amostras de *Staphylococcus* coagulase-negativa quanto à formação do Biofilme. **Tese de Doutorado**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, 2005.
- BERNARDI, A.C.A.; PIZZOLITTO, E.L.; PIZZOLITTO, A.C. Detecção da produção de *slime* por estafilococos coagulase-negativa isolados de cateter venoso central. **Revista de Ciências Farmacêuticas: Básica e Aplicada**, v. 28, nº. 1, p. 57-66, 2007.
- BHOONDEROWA, A.; GOOKOOL, S.; BIRANJIA-HURDOYAL, S.D. The importance of mobile phones in the possible transmission of bacterial infections in the community. **Journal of Community Health**, 2014.
- BINATTI, V.B. Relação entre a resistência a oxacilina e a produção de biofilme de amostras de origem comunitária e hospitalar pertencentes a diferentes espécies de *Staphylococcus* coagulase negativo. **Tese de Doutorado**. Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2013.

BOURGEOIS, I.; PESTEL-CARON, M.; LEMELAND, J.F.; PONS, J.L.; CARON, F. Tolerance to the glycopeptides vancomycin and teicoplanin in coagulase-negative Staphylococci. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 51, n°. 2, 2007.

BRENNAN, S.A.; WALLS, R.J.; SMYTH, E.; AL MULLA, T.; O'BYRNE, J.M. Tourniquets and exsanguinators: a potential source of infection in the orthopedic operating theater? **Acta Orthopaedica**, v. 80, p. 251-255, 2009.

BROOKS, G.F.; CARROLL, K.C.; BUTEL, J.S.; MORSE, S.A. **Microbiologia Médica**. 24ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2009.

CARVALHAIS, V.; FRANÇA, A.; CERCA, F.; VITORINO, R.; PIER, G. B.; VILANOVA, M.; CERCA, N. Dormancy within *Staphylococcus epidermidis* biofilm: a transcriptomic analysis by RNA-seq. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2014.

CAVANAGH, J.P.; KLINGENBERG, C.; HANSEEN, A.M.; FREDHEIM, E.A.; FRANCOIS, P.; SCHRENZEL, J.; FLAEGSTAD, T.; SOLLID, J.E. Core genome conservation of *Staphylococcus haemolyticus* limits sequence based population strictireanalysis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 89, p. 159-166, 2012.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC, 2008). Disponível em: <www.cdc.gov/ncidod/healthDis.html>. Acesso em: 14/01/2013.

CHAIEB, K.; MAHDOUNAI, K.; BAKHROUF, A. Detection of *icaA* and *icaD* loci by polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needles in a dialysis unit. **Journal of Hospital Infection**, n°. 61, p. 225-230, 2005.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE- CLSI. Zone diameter and MIC interpretive standards for *Staphylococcus* spp. Documentos: M02-A10, M02-A11 e M07-A9. v. 32, n°. 3, 2012.

CONTRETRAS, R.C.; RAMÍREZ, R.M.; CAMACHO, A.N.G; HERRADA, E.M. Antibiotic resistance and biofilm production in *Staphylococcus epidermidis* strains, isolated from a tertiary care hospital in Mexico City. **International Scholarly Research Notices Microbiology**, v. 1, 2013.

CROSSLEY, K.B.; JEFFERSON, K.K.; ARCHER, G.; FOWLER JR, V.G. **Staphylococci in Human Disease**. 2ª edição. Oxford: Wiley Blackwell, 2010.

CUNHA, M.L.R.S.; RUGOLO, L.M.S.S.; LOPES, C.A.M. Study of virulence factors in coagulase-negative staphylococci isolated from newborns. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n°. 6, p. 661-668, 2006.

DA SILVA, C.B. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do ácido acético em diferentes concentrações conta cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multiresistentes. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, 2007.

D'AZEVEDO, P.A.; SOUZA, A.G.; SANTOS, A.F.; SALES, T.; CHAGAS NETO, T.; PIGNATARI, A.C.C. Suscetibilidade à novobiocina na identificação de amostras de *Staphylococcus* coagulase negativos (SCoN) isolados de hemoculturas. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, nº. 4, p. 303-304, 2007.

D'AZEVEDO, P.A.; SECCHI, C.; ANTUNES, A.L.S.; SALES, T.; SILVA, F.M.; TRANCHESI, R.; PIGNATARI, A.C.C. Oxacilin-resistant coagulase-negative Staphylococci (CONS) bacteremia in a general hospital at São Paulo city, Brasil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 631-635, 2008.

ESPADINHA, D.; FARIA N.A.; MIRAGAIA, M.; LITO, L.M.; CRISTIANO, J.M.; LENCASTRE, H. Extensive dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) between the hospital and the community in a country with a high prevalence of nosocomial MRSA. **PLOS ONE**, v. 8, nº. 4, 2013.

EUZEBY, J.P. List of prokaryotic names with standing in nomenclature – **Genus *Staphylococcus***. Disponível em: <www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>. Acesso em: 20/01/2012.

FARINA, N.; CARPINELLI, L.; SAMUDIO, M.; GUILLÉN, R.; LASPINA, F.; SANABRIA, R.; ABENTE, S.; RODAS, L.; GONZÁLEZ, P.; KASPAR, H.M. *Staphylococcus* coagulasa-negativa clinicamente significativos. Especies más frecuentes y factores de virulencia. **Revista Chilena de Infectología**, v. 30, nº. 5, p. 480-488, 2013.

FERNANDES, A.T. **Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2004.

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.

FLUIT, A.C.; CARPAIJ, N.; MAJLOOR, E.A.M.; BONTEM, M.J.M; WILLEMS, R.J.L. Shared reservoir of *ccrB* gene sequences between coagulase-negative staphylococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, p. 1707-1713, 2013.

FRANÇA, A.; CARVALHAIS, V.; LITRÁN, T. M.; VILANOVA, M.; CERCA, N.; PIER, G. Alterations in the *Staphylococcus epidermidis* biofilm transcriptome following interaction with whole human blood. **Pathogens and Diseases**, p. 1-5, 2014.

FRANK, K. L.; DEL POZO, J. L.; PATEL, R. From clinical microbiology to infection pathogenesis: How daring to be different works for *Staphylococcus lugdunensis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, nº. 1, p. 111-133, 2008.

FRANSON, T.R.; SHET, N.K.; ROSE, H.D.; SOHNLE, P.G. Scanning electron microscopy of bacteria adherent to intravascular catheters. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 20, p. 500-505, 1984.

FREDHEIM, E.G.A.; KLINGENBERG, C.; ROHDE, H.; FRANKENBERGER, S.; GAUSTAD, P.; FLAEGSTAD, T.; SOLLID, J.E. Biofilm formation by *Staphylococcus haemolyticus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n° 4, p. 1172-1180, 2009.

GAD, G.F.M.; EL-FEKY, M.; EL-REHEWY, M.S.; HASSAN, M.A.; ABOLELLA, H.; EL-BAKY, R.M.A. Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 3, n° 5, 2009.

GILL, S.R.; FOUTS, D.E.; ARCHER, R.G.L.; MONGODIN, E.F.; DEBOY, R.T.; RAVEL, J. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n° 7, p. 2426-2448, 2005.

GÖKÇEN, A.; VILEINSKAS, A.; WIESNER, J. Methods to identify enzymes that degrade the main extracellular polysaccharide component of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Virulence**, v. 4, n° 3, p. 260-270, 2013.

GONZÁLEZ, G.E.; OTERO, R.M.; DÍAZ, J.M.L.; NORIEGA, E.R. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci. A review and the experience in a tertiary-care setting. **Epidemiology and Infection**, v. 138, p. 645-654, 2009.

GOMES, D.L.R.; MARTINS, C.A.S.; FARIA, L.M.D.; SANTOS, L.S. ; SANTOS, C.S.; SABBADINI, P.S. ; SOUZA, M.C.; ALVES, G.B.; ROSA, A.C.P. ; NAGAO, P.E. ; PEREIRA, G.A.; HIRATA, R.; MATTOS-GUARALDI, A.L. *Corynebacterium diphtheriae* as an emerging pathogen in nephrostomy catheter-related infection: evaluation of traits associated with bacterial virulence. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 1419-1427, 2009.

GOMES, D. L. R.; PEIXOTO, R. S.; BARBOSA, E. A. B.; NAPOLEÃO, F.; SABBADINI, P. S.; DOS SANTOS, K. R. N.; MATTOS-GUARALDI, A. L.; HIRATA JR, R. SubMIC of penicillin and erythromycin enhance biofilm formation and hydrophobicity of *Corynebacterium diphtheriae* strains. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 754-760, 2013.

HERNÁNDEZ, B.D.; SANTOS, F.S.; MIRANDA, B.L.; BEJARANO, L.P.; NOVALES, G.M. Production of icaADBC-encodded polysaccharide intercellular adhesion and therapeutic failure in pediatric patients with staphylococcal device-related infections. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, n° 68, 2010.

INTERNATIONAL WORKING GROUP OF THE CLASSIFICATION OF STAPHYLOCOCCAL CASSETTE CHROMOSOME ELEMENTS (IWG-SCC). Disponível em <www.sccmec.org>. Acesso em: 05/03/2011.

IORIO, N.I.P. Método miniaturizado alternativo para identificação de espécies prevalente de *Staphylococcus* isoladas de espécimes clínicos. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

IORIO, N.L.P.; LOPES, A.P.C.N.; SCHUENCK, R.P.; BARCELLOS, A.G.; OLENDZKI, A.N.; LOPEZ, G.L.; DOS SANTOS, K.R.N. A combination of methods to evaluate biofilm production may help to determine the clinical relevance of *Staphylococcus* in blood cultures. **Microbiology and Immunology**, v. 55, p. 28-33, 2011.

JAGLIC, Z.; MICHU, E.; HOLASOVA, M.; VLKOVA, H.; BABAK, V.; KOLAR, M.; BARDON, J.; SCHLEGLOVA, J. Epidemiology and characterization of *Staphylococcus epidermidis* isolates from humans, raw bovine milk and a dairy plant. **Epidemiology and Infection**, n° 138, 2009.

JIANG, S.; ZHENG, B.; DING, W.; LV, L.; JI, J.; ZHANG, H.; XIAO, Y.; LI, L. Whole genome sequence of *Staphylococcus hominis*, an opportunistic pathogen. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n° 17, p. 4761-4762, 2012.

JIMÉNEZ, J.N.; OCAMPO, A.M. VANEGAS, J.M.; RODRÍGUEZ, E.A.; GARCÉS, C.G.; PATIÑO, L.A.; OSPINA, S.; CORREA, M.M. Characterisation of virulence genes in methicillin susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a paediatric population in a university hospital of Medellín, Colombia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n° 8, p. 980-985, 2011.

JONG-HYUN K.; CHEORL-HO K.; HACKER J.; ZIEBUHR W.; LEE B.K.; CHO S.H. Molecular characterization of regulatory genes associated with biofilm variation in a *Staphylococcus aureus* strain. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n° 1, p.28–34, 2008.

KAISER, T.D.L.; PACHECO, F.C.; LIMA A.A.; PEREIRA, E.M.; DOS SANTOS, K.R.N.; NUNES, A.P.F. 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. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n° 3, p. 298-303, 2010.

KAISER, T.D.L.; PEREIRA, E.M.; DOS SANTOS, K.R.N.; MACIEL, E.L.N.; SCHUENCK, R.P.; NUNES, A.P.F. Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 75, p. 235-239, 2013.

KEIM, L.S. Mapeamento dos estafilococos coagulase negativo no Hospital Universitário Antônio Pedro da Universidade Federal Fluminense no período de 1988 a 2002. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2005.

KIM, J.S.; KIM, H.S.; PARK, J.Y.; KOO, H.S.; CHOI, C.S.; SONG, W.; CHO, H.C.; LEE, K.M. 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.

KONEMAN, E.W.; ALLEN S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECCHENBERGER. P.C.; WIN Jr. W.C. **Diagnóstico Microbiológico**: Texto e atlas colorido. 5ª edição. Rio de Janeiro: Medsi, 2008.

KOUIDHI, B.; ZMANTAR, T.; HENTATI, H.; BAKHROUF, A. Cell surface hydrophobicity, biofilm formation, adhesive properties and molecular detection of adhesins genes in *Staphylococcus aureus* associated to dental caries. **Elsevier – Microbial Pathogenesis**, 2010.

LAZZAROTTO, C. **Formação de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* isolado de cateter venoso central através de métodos fenotípicos e genotípicos**. 2010. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

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

LEÃO, R.S. **Caracterização fenotípica e susceptibilidade a antimicrobianos em *Staphylococcus coagulase negativa***. 2002. Dissertação de Mestrado. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.

LECHNER S.; LEWIS K.; BERTRAM R. *Staphylococcus aureus* persists tolerant to bactericidal antibiotics. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 235-44, 2012

LEMBRÉ, P.; VENDRELY, C.; DI MARTINO, P. Identification of an amyloidogenic peptide from the bap protein of *Staphylococcus epidermidis*. **Protein & Peptide Letters**, v. 21, p. 75-79, 2014.

LI, Z.; XIAO, Z.; LI, Z.; QIAO, Z.; ZHANG, Y.; XU, F. 116 cases of neonatal early-onset or late-onset sepsis: A single center retrospective analysis on pathogenic bacteria species distribution and antimicrobial susceptibility. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 6, n°. 8, p. 693-699, 2013.

LIDUMA, I.; TRACEVSKA, T.; BERS, U.; ZILEVICA, A. Phenotypic and genetic analysis of biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. **Medicina Kaunas**, v. 48, n°. 6, p. 305-309, 2012.

LINNES, J.C.; MA, H.; BRYERS, J.D. Giant extracellular matrix binding protein expression in *Staphylococcus epidermidis* is regulated by biofilm formation and osmotic pressure. **Current Microbiology**, v. 66, p. 627-633, 2013.

LIVERMORE, D.M. Antibiotic resistance in staphylococci. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16 (suppl 1), p. 3-10, 2000.

LOONEN, A.J.M.; JANZS, A.R.; KREEFTENBERG, H.; BRUGGEMAN, C.A.; WOLFFS, P.F.G.; VAN DEN BRULE, A.J.C. Acceleration of the direct identification of *Staphylococcus aureus* versus coagulase-negative staphylococci from blood culture material: a comparison of six bacterial DNA extraction methods. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 30, p. 337-342, 2011.

LPSN – List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/staphylococcus.html>>. Acesso em: 20/03/2014.

LOWBURY, E.J.; BABB, J.R.; FORD, P.M. Protective isolation in a burns unit: the use of plastic isolators and air curtains. **Journal of Hygiene**, v. 69, p. 529-546, 1971.

MACFADDIN, J.F. **Biochemical Tests for Identifications of Medical Bacteria**. e Willuians & Wilkins Company. Baltimore, USA, 1977.

MACFADDIN, J.F. **Biochemical Tests for Identifications of Medical Bacteria**. 3th edition. Washington DC: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

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

MARTINS, A.; RIBOLI, D.F.M.; CAMARGO, C.H.; PEREIRA, V.C.; SAMPAIO, R.A.; DA CUNHA, M.L.R.S. Antimicrobial resistance and persistence of *Staphylococcus epidermidis* clones in a Brazilian university hospital. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 77, p. 164-168, 2013.

MASUNARI, A.; TAVARES, L.C. Síntese e determinação de atividade antimicrobiana de derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos frente a *Staphylococcus aureus* multirresistentes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n° 3, 2006.

MATTOS-GUARALDI, A.L.; FORMIGA, L.C.D. Hemagglutination and adhesive properties of *Corynebacterium diphtheriae* in relation to biotype and source. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 23, n° 1, 1991.

MAYHALL, C.G. **Hospital Epidemiology and Infection Control**. 2th edition. Washington DC: Lippincott Williams & Wilkins, 2004.

MELO, M.A.C.; MONTEIRO, R.C.S.; VIEIRA, A.B.R.; BRAZÃO, M.A.B.; VIEIRA, J.M.S. Bactérias isoladas de ponta de cateter venoso central e suscetibilidade antimicrobiana em um hospital público de Belém-PA. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, n° 2, p. 115-118, 2007.

MERLIN, M.A.; WONG, M.L; PYROR, P.W.; RYNN, K.; MARQUES-BAPTISTA, A.; PERRITT, R.; STANESCU, C.G; FALLON, T. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the stethoscopes of emergency medical services providers. **Prehospital Emergency Care**, v. 13, p. 71-74, 2009.

MERTENS, A. & GHEBREMEDHIN, B. Genetic determinants and biofilm formation of clinical *Staphylococcus epidermidis* isolates from blood cultures and indwelling devises. **European Journal of Microbiology and Immunology**, v. 3, n° 2, p. 111-119, 2013.

MIMICA, M.J.; BEREZIN, E.N. *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina: um problema emergente. **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, v. 51, n° 2, 2006.

MIMICA, M.J.; MENDES, C.M.F. Diagnóstico laboratorial de resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n° 6, p. 399-406, 2007.

- MONECKE, S.; MULLER, E.; SCHWARZ, S.; HOTZEL, H.; EHRICH, R. Rapid microarray-based identification of different *mecA* alleles in Staphylococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n°. 11, p. 5547–5554, 2012.
- MONSEN, T.; RONNMARK, M.; OLOFSSON, C & WISTRON, J. An inexpensive and reliable method for routine identification of staphylococcal species. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 17, p. 327-35, 1998.
- MOTA, R.A.; DE SILVA, K.P.C.; DE FREITAS, M.F.L.; DA SILVA, L.B.G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n°. 6, p. 465-470, 2005.
- MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**. 6ª edição. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2009.
- NAYAK, N.; SATPATHY, G. NAG, H.L.; VENKATESH, P.; RAMAKRISHNAN, S.; NAG, T.C.; PRASAD, S. Slime production is essential for the adherence of *Staphylococcus epidermidis* in implant related infections. **Journal of Hospital Infection**, v. 77, p. 153-156, 2011.
- NEVES, M.C.; ROSSI JÚNIOR, O.D.; ALVES, E.C.C.; LEMOS, M.V.F. Detecção de genes de resistência antimicrobiana em cromossomos e plasmídeos de *Staphylococcus* spp. **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**, v. 74, n°. 3, 2007.
- 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.
- PAIVA, R.M.; MACHADO, A.B.M.P.; ZAVASCKI, A.P.; BARTH, A.L. Vancomycin MIC for methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* isolates: evaluation of the broth microdilution and etest methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n°. 12, p. 4652-4654, 2010.
- PARK, S.; KELLEY, K.A.; VINOGRADOW, E.; SOLINGA, R.; WEIDENMAIER, C.; MISAWA, Y.; LEE, J. C. Characterization of the structure and biological functions of a capsular polysaccharide produced by *Staphylococcus saprophyticus*. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n°. 18, p. 4618-4626, 2010.
- PEREIRA, E.M. Discriminação das espécies de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus* e detecção simultânea da resistência a oxacilina através da técnica de PCR multiplex. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.
- PEREIRA, E.M.; TEIXEIRA, C.A.A.; ALVARENGA, A.L.M.; SHUENCK, R.P.; DE MARVAL M.G.; HOLANDINO, C.; GUARALDI, A.L.M.; DOS SANTOS, K.R.N. A brazilian lineage of *Staphylococcus lugdunensis* presenting rough colony morphology may adhere to and invade lung epithelial cells. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, p. 463-469, 2012.

PEREIRA, P.M.A.; BINATTI, V.B.; SUED, B.P.R.; RAMOS, J.N.; PEIXOTO, R.S.; SIMÕES, C.; DE CASTRO, E.A.; DUARTE, J.L.M.B.; VIERA, V.V.; HIRATA JR, R.; SANTOS, K.R.N.; MATTOS-GUARALDI, A.L.; PEREIRA, J.A.D. *Staphylococcus haemolyticus* disseminated among neonates with bacteremia in a neonatal intensive care unit in Rio de Janeiro, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, p. 85-92, 2014.

PERES, A.; FIEGENBAUM, M.; TASCA, T. **Manual de Consulta Rápida em Microbiologia**. Editora: Sulina / Universitária Metodista, 2007.

PODKOWIK, M.; PARK, J.Y.; SEO, K.S.; BRYSTRÓN, J.; BANIA, J. Enterotoxigenic potential of coagulase-negative *Staphylococci*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 163, p. 34-40, 2013.

PORTAL EDUCAÇÃO. Apostila de Microbiologia Veterinária, p. 43-45, 2013.

POURMAND, M.R.; ABDOSAMADI, Z.; SALARI, M.H.; HOSSEINI, M. *Slime* layer formation and the prevalence of *mecA* and *aap* genes in *Staphylococcus epidermidis* isolates. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 5, n°. 1, p.034-040, 2011.

ROGERS, K.L.; RUPP, M.E.; FEY, P.D. The presence of *icaADBC* is detrimental to the colonization of human skin by *Staphylococcus epidermidis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n°. 19, 2008.

RYDER, V.J.; CHOPRA, I.; O'NEILL, A. Increased mutability of *Staphylococci* in biofilms as a consequence of oxidative stress. **PLOS One**, v. 7, n°. 10, 2012.

SAITO, Y.; KOBAYASHI, H.; UETERA, Y.; YASUHARA, H.; KAJIURA, T.; OKUBO, T. Microbial contamination of surgical instruments used for laparotomy. **American Journal of Infection Control**, v. 42, 2014.

SANTANA, V.C. O papel dos antibióticos na resistência bacteriana. **Revista Cesumar**, v. 11, n°. 1, p. 129-138, 2006.

SANTOS, K.R.N.; TEIXEIRA, L.M.; LEAL, G.S.; FONSECA, L.S & GONTIJO-FILHO, P.P. DNA typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: isolates and factors associated with nosocomial acquisition in two Brazilian university hospitals. **Journal of Medical Microbiology**, v. 48, p. 17-23, 1999.

SANTOS, O.C.S.; LAPORT, M.S.; TEIXEIRA, L.M.; DE MARVAL, M.G.; IORIO, N.L.P.; DOS SANTOS, K.R.N. Reliable identification of clinically prevalent species and subspecies of staphylococci by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis analysis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 64, 2009.

SCHERR, T.F.; HEIM, C.E.; MORRISON, J.M.; KIELIAN, T. Hiding in plain sight: interplay between staphylococcal biofilm and host immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 5, 2014.

SCHITO, G.C. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n°. 1, p. 3-8, 2006.

SCHLAG, M.; BISWAS, R.; KRISMER, B.; KOHLER, T.; ZOLL, S.; YU, W.; SCHWARZ, H.; PESCHEL, A.; GÖTZ, F. Role of staphylococcal wall teichoic acid in targeting the major autolysin Atl. **Molecular Microbiology**, v. 75, n.º. 4, p. 864-873, 2010.

SCHORE, A.C.; COLEMAN, D.C. Staphylococcal cassette chromosome *mec*: recente advances and new insights. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, p. 350-359, 2013.

SCHUENCK, R.P.; PEREIRA, E.M.; IORIO, N.L.; SANTOS, K.R. Multiplex PCR assay to identify methicillin resistance of *staphylococcus haemolyticus*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 52, p. 431-435, 2008.

SILVA, C.H.P.M.; LINS, A.P.; CRUZ, C.S.O. Avaliação do sistema staph-id para identificação de *staphylococcus* isolados a partir de espécimes clínicos humano. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 38, n.º. 1, p. 7-9, 2006.

SILVA, P.V.; CRUZ, R.S.; KEIM, L.S.; DE PAULA, G.R.; CARVALHO, B.T.F.; COELHO, L.R.; CARVALHO, M.C.S.; DA ROSA, J.M.C.; FIGUEIREDO, A.G.S.; TEIXEIRA, L.A. The antimicrobial susceptibility, biofilm formation and genotypic profiles of *Staphylococcus haemolyticus* from bloodstream infections. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n.º. 6, p. 812-816, 2013.

SILVEIRA, G.P.; NOME, F.; GESSER, J.C.; SÁ, M.M. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, n.º. 4, p. 844-855, 2006.

SOARES, L.C.; PEREIRA, I.A.; COELHO, S.M.O.; CUNHA, C.M.M.; OLIVEIRA, D.F.B.; MIRANDA, A.N.; SOUZA, M.M. S. Caracterização fenotípica da resistência a antimicrobianos e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos isolados de amostras animais e humanas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n.º. 5, p. 1346-1350, 2008.

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

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAVIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of *Staphylococcal* biofilm formation. **Journal of Microbiology Methods**, v. 40, 175-179, 2000.

SUED, B.P.R. Fenótipos e perfis de resistência à oxacilina de *Staphylococcus* coagulase-negativa de origens hospitalar e comunitária. **Monografia**. Universidade Gama Filho, 2010.

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

TEIXEIRA, C.F. Estafilococos coagulase-negativa – um risco real para a saúde pública. **Tese de Doutorado**. FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2009.

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

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

VERMELHO, A.B.; BASTOS, M.C.F.; DE SÁ, M.H.B. **Bacteriologia Geral**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2007.

VIANA, A.P.P.; SOARES, R.S.; CASTRO, A.R.L.; KLUCZYNIK, C.E.N.; CATÃO, R.M.R. Incidência bacteriana em hemoculturas de recém-nascidos e perfil de suscetibilidade frente aos antimicrobianos. **International Standard Serial Number**, v. 5, nº. 1, 2011.

XAVIER, M.S. & UENO, M. Contaminação bacteriana de estetoscópios das unidades de pediatria em um hospital universitário. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, nº. 2, p. 217-218, 2009.

WALIA, S.S.; MANCHANDA, A.; NARANG, R.S.; SINGH, B.; KAHN, S.S. Cellular telephone as reservoir of bacterial contamination: myth or fact. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, p. 50-53, 2014.

WEISSER, M.; SCHOENFELDER, S.M.K.; ORASCH, C.; ARBER, C.; GRATWOHL, A.; FREI, R.; ECKART, M.; FLÜCKIGER, U.; ZIEBUHR, W. Hypervariability of biofilm formation and oxacilina resistance in a *Staphylococcus epidermidis* strain causing persistent severe infection in a immunocompromised patient. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, nº. 7, p. 2407-2412, 2010.

WOLFE, D.F.; SINNET, S.; VOSSLER, J.L.; PRZEPIORA, J.; ENGBRETSON, B.G. Bacterial colonization of respiratory therapists' pens in the intensive care unit. **Respiratory Care**, v. 54 p. 500-503, 2009.

ZHANG, L.; GOWARDMAN, J.; MORRISON, M.; KRAUSE, L.; PLAYFORD, E. G.; RICKARD, C. M. Molecular investigation of bacterial communities on intravascular catheters: no longer just *Staphylococcus*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, 2014.

ZHOU, Y.; ANTIGNAC, A.; WU, S. W.; TOMASZ, A. Penicillin-binding proteins and cell wall composition in β -lactam-sensitive and resistant strains of *Staphylococcus sciuri*. **Journal of Bacteriology**, v. 190, nº. 2, p. 508-514, 2008.

ZHOU, S.; CHAO, X.; FEI, M.; DAI, M.; LIU, B. Analysis of *Staphylococcus epidermidis* *icaA* and *icaD* genes by polymerase chain reaction and slime production: a case control study. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, nº. 242, 2013.

ANEXO – Comitê de Ética em Pesquisa



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

HUPE

Rio de Janeiro, 14 de março de 2012

Do: Comitê de Ética em Pesquisa

Prof.: Wille Oigman

Para: Aut. Vanessa Batista Binatti – Orient. Prof. Elizabeth A. Marques e José Augusto A. Pereira
Registro CEP/HUPE: 2678/2010 (este número deverá ser citado nas correspondências referentes ao projeto)
CAAE: 0123.0.228.000-10

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto, "AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE A RESISTÊNCIA A OXACILINA E A PRODUÇÃO DE BIOFILME EM STAPHYLOCOCCUS COAGULASE-NEGATIVA DE ORIGEM COMUNITÁRIA E HOSPITALAR" aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º 196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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

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

Prof. Wille Oigman
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
HUPE/UERJ

CEP - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
AV. VINTE E OITO DE SETEMBRO, 77 TERREO - VILA ISABEL - CEP 20551-030
TEL: 21 2868-8253 – FAX: 21 2264-0853 – Email: cep-hupe@uerj.br