



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Julianna Giordano Botelho Olivella

Avaliação *in vitro* da capacidade da formação de biofilme, investigação dos mecanismos de resistência e virulência utilizando ensaios *in vivo* com larvas de *Galleria mellonella* de amostras de *Staphylococcus capitis* e *Staphylococcus hominis*

Rio de Janeiro

2023

Julianna Giordano Botelho Olivella

Avaliação *in vitro* da capacidade da formação de biofilme, investigação dos mecanismos de resistência e virulência utilizando ensaios *in vivo* com larvas de *Galleria mellonella* com amostras de *Staphylococcus capitis* e *Staphylococcus hominis*

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

Orientadora: Prof.^a Dra. Ana Luiza de Mattos-Guaraldi

Coorientadora: Prof.^a Dra. Paula Marcele Afonso Pereira Ribeiro

Rio de Janeiro

2023

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

O48 Olivella, Julianna Giordano Botelho.

Avaliação *in vitro* da capacidade da formação de biofilme, investigação dos mecanismos de resistência e virulência utilizando ensaios *in vivo* com larvas de *Galleria mellonella* com amostras de *Staphylococcus capitis* e *Staphylococcus hominis* / Julianna Giordano Botelho Olivella. - 2023.

116 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ana Luiza de Mattos-Guaraldi

Coorientadora: Prof.^a Dra. Paula Marcele Afonso Pereira Ribeiro

Doutorado (Tese) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Microbiologia.

1. Biofilmes – Efeitos dos fármacos – Teses. 2. *Staphylococcus capitis* – Patogenicidade – Teses. 3. *Staphylococcus hominis* – Patogenicidade – Teses. 4. Resistência microbiana a medicamentos – Teses. I. Mattos-Guaraldi, Ana Luiza de. II. Ribeiro, Paula Marcele Afonso Pereira. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 579.86

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo CRB7/7341

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

Assinatura

Data

Julianna Giordano Botelho Olivella

Avaliação *in vitro* da capacidade da formação de biofilme, investigação dos mecanismos de resistência e virulência utilizando ensaios *in vivo* com larvas de *Galleria mellonella* com amostras de *Staphylococcus capitis* e *Staphylococcus hominis*

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

Apresentada em 29 de agosto de 2023.

Coorientadora: Prof.^a Dra. Paula Marcele Afonso Pereira Ribeiro
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

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

Prof.^a Dra. Louisy Sanches dos Santos Sant'Anna
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Lincoln de Oliveira Sant'Anna
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Renata Garcia
Fundação Oswaldo Cruz

Prof.^a Dra. Bruna Ribeiro Sued Karam
Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2023

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus amados pais Veronica e Mauro, a minha incrível avó Jacyra e aos meus avôs Alice, Carlos e José (*in memoriam*), que são impulsionadores dos meus sonhos, abrigo e carinho necessário em todos os momentos e companheiros eternos em todas as situações. Obrigada por tudo e sempre. Amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradecer primeiramente a toda fé que tenho em minhas forças espirituais, que não me deixaram desistir mesmo que o caminho fosse tortuoso. Que proveram a luz, me indicaram a direção a seguir, para que o melhor fosse feito para mim e minha família em todos os aspectos.

Aos meus pais Mauro e Veronica, por todo amor, cumplicidade, incentivo, horas de sono mal dormidas, viagens fantásticas, conversas sobre o futuro, broncas e discussões, desespero e alegria nas questões de saúde de todos e principalmente por serem a base sólida para o meu crescimento e o porto seguro sempre quando precisei em toda volta para a casa e decisão tomada. Eu amo muito vocês!

Aos meus avós, tios e primos, em especial a tia Rosana, tio Ricardo, além das minhas primas (quase irmãs) Marina e Leticia, que são peças fundamentais no meu dia a dia, seja numa palavra, num abraço, uma risada ou no conforto ao falar que não posso porque estou fazendo algo em relação ao doutorado.

À minha orientadora, mãe científica e Prof^a Dr^a Ana Luiza de Mattos Guaraldi, querida, incrível, humana, acolhedora, fantástica e me faltam palavras para descrever o número das qualidades que possuí. Minha eterna gratidão por nunca desistir de mim, pela sua presença e por todo o carinho e amor. Além de ser um exemplo de resiliência, obrigada pelos ensinamentos, broncas, almoços, palavras, reuniões com cafés, e por absolutamente todo o apoio e carinho comigo e com minha família em momentos críticos.

À minha co-orientadora Paula Marcele Afonso Pereira Ribeiro, que é uma mulher única e mãe incrível, competente, inteligente, companheira e principalmente, muito engraçada e que esquece dos óculos o tempo todo. Eu também não teria palavras para descrever o que passamos, o que vamos passar e tudo que você fez por mim nesses últimos anos. Obrigada pela sua amizade e carinho, obrigada por cada segundo que estamos juntas e por ser sempre luz na minha caminhada (Obrigada Dudu e Felipe, por dividir!)

Aos meus melhores amigos Diego, Isadora, Caio, Bernardo, João e Ingrid, por serem exatamente o que são em todos os momentos. Sejam nos momentos de alegria e diversão ou em momentos tristes, vocês estão lá, mesmo que não fisicamente. O que eu sou hoje, a minha evolução mental e psicológica, como mulher, eu devo muito a vocês, principalmente por serem exatamente únicos.

A uma melhor amiga muito especial Bruna, que não me abandona em nenhuma situação da minha vida, seja pessoal ou profissional. Aquela que sempre me impulsiona para frente, mesmo quando estou no penhasco em puro desespero. Ela vai lá e fala: - Voa, que eu estou do

seu lado sabendo de que você é capaz. São tantas coisas e agradecimentos, tantas piadas internas e fotos que não fazem nenhum sentido. Acho que agradecer por toda a eternidade seria pequeno perto do meu sentimento.

As minhas eternas amigas de 2008.1: Marcela, Raissa e Grégor. Obrigada por cada trabalho (sempre com muita discussão), cada grito, cada frase de incentivo como “Segurem a Julianna na trilha, ela não pode cair!” e logo em seguida “Ela caiu de novo!”. Obrigada pelas risadas de sempre, conselhos, problemas e soluções, e por serem vocês o grupo seletivo de pessoas que eu não desisti mesmo depois que a faculdade acabou (o ciclo e oficialmente).

Ao Departamento de Microbiologia, minha segunda casa a pelo menos 13 anos, o ambiente que mais me viu chorar, rir, dançar, distribuir abraços e dizer: INSALUBRE! INUMANO! Obrigada por cada um que de alguma forma me acolheu, me auxiliou e que principalmente foi uma companhia para um café na copa em pleno caos.

Ao LDCIC, mais eternamente em meu coração como laboratório 03, que durante todos esses anos de caminhada foi porto seguro, incluindo cada pessoa que convive e conviveu comigo. Muito obrigada por cada pedido atendido ou não, por todo abraço, por todos os bom dias, por todos os salvamentos, por todos os choros, por todas as risadas, simplesmente por tudo! E um agradecimento mais do que especial a Prof^a Louisy Sant’anna e ao Dr. Lincoln Sant’anna, por serem pessoas que conseguem me evoluir, me acalmar, me situar, me acordar para a vida e estão sempre dispostos a resolver alguma questão. Fico muito grata, que além de profissionais incríveis, eu também posso saber que vocês são meus amigos (Sophia e Clara, obrigada por aturar a Tia Ju no telefone!).

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.

As outras pessoas que eu possa ter me esquecido de citar, porém estão no meu coração, orações e pensamentos, um enorme muito obrigada!

– Quem estará nas trincheiras ao teu lado?

– E isso importa?

– Mais do que a própria guerra.

(Adeus às armas – Ernest Hemingway, 1929)

RESUMO

OLIVELLA, Julianna Giordano Botelho. **Avaliação *in vitro* da capacidade da formação de biofilme, investigação dos mecanismos de resistência e virulência utilizando ensaios *in vivo* com larvas de *Galleria mellonella* com amostras de *Staphylococcus capitis* e *Staphylococcus hominis***. 2023. 116 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Staphylococcus coagulase-negativa (SCoN), membros da microbiota residente da pele humana, apresentam potencial de causar infecções oportunistas, sobretudo quando ocorre o rompimento da barreira cutânea. Dentre os SCoN, *Staphylococcus capitis* e *Staphylococcus hominis* destacam-se como uma das espécies mais frequentes em infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e a sua letalidade está diretamente associada à expressão de fatores de virulência e resistência aos agentes antimicrobianos por esses microrganismos. O estudo teve como objetivo a investigação dos aspectos fenotípicos de mecanismos de interação com superfícies abióticas e bióticas e com *Galleria mellonella*, e analisar genotipicamente os fatores de virulência e de resistência aos agentes antimicrobianos de amostras de *S. capitis* e *S. hominis* isoladas de hemoculturas. Foram isoladas 18 amostras de SCoN provenientes de hemoculturas de pacientes hospitalizados no HUPE/UERJ, sendo 12 amostras da espécie *S. capitis* e 6 amostras da espécie *S. hominis*. Foram determinados 6 perfis multirresistentes e 1 de não-multirresistência, sendo que todas as amostras foram consideradas sensíveis a vancomicina, teicoplanina e linezolida, enquanto 66,67% das amostras foram gentamicina-resistentes e 77,78% moxifloxacino-resistentes. O gene *mecA* foi detectado em 91,67% e 83,33% das amostras de *S. capitis* e *S. hominis* respectivamente. Já a produção de *slime* foi observada em 41,67% das *S. capitis* e 33,33% das *S. hominis* e todas as amostras foram capazes de aderir a superfície abiótica do vidro. Todas as amostras de *S. capitis* foram capazes de produzir biofilme na superfície hidrofóbica do poliestireno em diferentes intensidades, contudo 66,67% das amostras *S. hominis* não possuíram essa capacidade. Em relação a hidrofobicidade, 66,67% das amostras *S. capitis* e 83,33% das *S. hominis* foram consideradas hidrofílicas, enquanto hidrofóbicas 33,33% de *S. capitis* e 16,67% de *S. hominis* foram hidrofóbicas. Todas as 6 amostras representativas utilizadas no estudo foram capazes de produzir biofilme na superfície de aço e na superfície do pericárdio bovino, em todos os tempos propostos, além da superfície dos cateteres de poliuretano e silicone, formando um tapete espesso, confirmados também na análise por MEV. Foi detectado para 91,67% das amostras de *S. capitis* a presença do gene *icaA*, 75% do gene *atl*, 25% do gene *bap* e 16,67% do gene *fbp*. Para *S. hominis*, foi detectado a presença do gene *icaA* em 66,67% das amostras, 16,67% do gene *atl* e 16,67% do gene *fbp*. Nenhuma amostra foi positiva para os genes *aap*, *epbS* e *fnbA*. Foi possível observar nas 6 amostras representativas do estudo, a associação as células Detroit 562 e a capacidade de letalidade variável quando utilizado o modelo *in vivo* de *G. mellonella*, com mediana de sobrevivência no terceiro dia em 83,33% das amostras e com curvas sem diferença estatística, exceto a H15 (*S. hominis*). O aumento no número de infecções e aspectos multifatoriais, que favorecem a patogenicidade tanto de *S. capitis* quanto *S. hominis*, devem continuar sendo investigados, uma vez que, a disseminação da multirresistência no ambiente hospitalar, têm se tornado um crescente desafio para a saúde pública.

Palavras-chave: Hemocultura. *Staphylococcus capitis*. *Staphylococcus hominis*. Biofilme.

Multirresistência. Pericárdio bovino. *Galleria mellonella*.

ABSTRACT

OLIVELLA, Julianna Giordano Botelho. *In vitro evaluation of biofilm formation ability, investigation of resistance and virulence mechanisms by using in vivo assays with Galleria mellonella larvae of Staphylococcus capitis and Staphylococcus hominis strains*. 2023. 116 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Coagulase-negative Staphylococcus (CoNS), members of the resident microbiota of human skin, have the potential to cause opportunistic complications, especially when the skin barrier is disrupted. Among the SCoN, *Staphylococcus capitis*, and *Staphylococcus hominis* stand out as one of the most frequent species in complications related to health care (HAI), and their lethality is directly associated with the expression of virulence factors and resistance to antimicrobial agents by these microorganisms. The study aimed to investigate the phenotypic aspects of manipulation of interaction with abiotic and biotic surfaces and with *G. mellonella* and to genotypically analyze virulence factors and resistance to antimicrobial agents except *S. capitis* and *S. hominis* compensated from blood cultures. There were 18 samples of SCoN from blood cultures of patients hospitalized at HUPE/UERJ, 12 samples of the *S. capitis* species, and 6 samples of the *S. hominis* species. 6 multidrug-resistant and 1 non-multidrug-resistant profiles were determined, and all samples were considered sensitive to vancomycin, teicoplanin, and linezolid, while 66.67% of the samples were gentamicin-resistant and 77.78% moxifloxacin-resistant. The *mecA* gene was detected in 91.67% and 83.33% of the *S. capitis* and *S. hominis* samples respectively. The production of slime was observed in 41.67% of *S. capitis* and 33.33% of *S. hominis*, and all samples were able to adhere to the abiotic surface of the glass. All *S. capitis* samples were able to produce biofilm on the hydrophobic polystyrene surface at different intensities, however, 66.67% of *S. hominis* samples do not have this ability. Regarding hydrophobicity, 66.67% of *S. capitis* and 83.33% of *S. hominis* samples were considered hydrophilic, while 33.33% of *S. capitis* and 16.67% of *S. hominis* were hydrophobic. All 6 representative samples used in the study were able to produce biofilm on the steel surface and the surface of the bovine pericardium, in both standard times, in addition to the surface of the polyurethane and silicone catheters, forming a smooth mat, also confirmed in the analysis by ME V. The presence of the *icaA* gene, 75% of the *atl* gene, 25% of the *bap* gene and 16.67% of the *fbp* gene was detected for 91.67% of the *S. capitis* samples. For *S. hominis*, the presence of the *icaA* gene was detected in 66.67% of the sample, 16.67% of the *atl* gene, and 16.67% of the *fbp* gene. No samples were positive for *aap*, *epbS*, and *fnbA* genes. It was possible to observe in the 6 representative samples of the study, the association with Detroit 562 cells and the variable lethality capacity used in the in vivo model of *Galleria mellonella*, with median survival on the third day in 83.33% of the samples and with curves without difference statistics, except H15 (*S. hominis*). The increase in the number of multifactorial and multifactorial organisms, which favor the pathogenicity of both *S. capitis* and *S. hominis*, must continue to be investigated since the dissemination of multidrug resistance in the hospital environment has become a growing challenge for public health.

Keywords: Bloodculture. *Staphylococcus capitis*. *Staphylococcus hominis*. Biofilm. Multidrug-Resistance. Bovine Pericardium. *Galleria mellonella*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Etapas de desenvolvimento do biofilme	35
Figura 2 –	Conformidades da larvas de <i>G. mellonella</i> em situações diversas, desde sua forma viva natural, infectada e até total óbito	58
Figura 3 –	Perfis de susceptibilidade de amostras de <i>Staphylococcus capitis</i> (A) e <i>Staphylococcus hominis</i> (B) isoladas de hemoculturas frente aos 14 agentes antimicrobianos utilizados, segundo BrCAST (2023)	65
Figura 4 –	Produção de <i>slime</i> por amostras de <i>Staphylococcus capitis</i> e <i>Staphylococcus hominis</i> isoladas de hemoculturas pelo método do Agar Vermelho do Congo	67
Figura 5 –	Capacidade de produção de biofilme de amostras de <i>S. capitis</i> e <i>S. hominis</i> , sobre a superfície de aço, no período de 24 (A) e 48 horas (B)	70
Figura 6 –	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de <i>Staphylococcus capitis</i> (A) e <i>Staphylococcus hominis</i> (B) formando biofilme na superfície do aço	71
Figura 7 –	Capacidade de produção de biofilme por amostras de <i>Staphylococcus capitis</i> e <i>Staphylococcus hominis</i> , sobre pericárdio bovino (<i>patches</i>), no período de 24 (A) e 48 horas (B)	72
Figura 8 –	Formação de biofilme e aderência a superfície de membrana de pericárdio bovino, formadas por fibras de colágeno por amostras de <i>Staphylococcus capitis</i> e <i>Staphylococcus hominis</i> isoladas de hemoculturas	73
Figura 9 –	Amostra de <i>Staphylococcus capitis</i> (H2) isolado de hemocultura aderido ao cateter de silicone (A) e poliuretano (B) formando um tapete espesso em placa de ágar sangue	74
Figura 10 –	Amostra de <i>Staphylococcus hominis</i> (H15) isolado de hemocultura, aderido ao cateter de silicone (A) e poliuretano (B) formando um tapete espesso em placa de ágar sangue	74
Figura 11 –	Amostra de <i>Staphylococcus capitis</i> (H2) formando biofilme em superfície de cateter de silicone (A) e superfície de cateter de	

	poliuretano (B)	75
Figura 12 –	Amostra de <i>Staphylococcus hominis</i> (H15) formando biofilme em superfície de cateter de silicone (A) e superfície de cateter de poliuretano (B)	75
Figura 13 –	Capacidade de associação em células epiteliais DETROIT 562 por amostras de <i>Staphylococcus capitis</i> (H2, H4 e H9) e <i>Staphylococcus hominis</i> (H15)	77
Figura 14 –	Gráfico de sobrevivência das larvas de <i>Galleria mellonella</i> por tempo (dia), avaliando a interação com as amostras representativas de <i>Staphylococcus capitis</i> e <i>Staphylococcus hominis</i> provenientes de hemocultura	78
Figura 15 –	Árvore filogenética mostrando a posição do <i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i> H2 contra as cepas de tipo mais relacionadas ao gênero <i>Staphylococcus</i> com base nas sequências do gene 16S rRNA ..	81
Figura 16 –	Árvore filogenética baseada na abordagem MLSA mostrando a posição de <i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i> H2 contra as cepas mais relacionadas dentro do gênero <i>Staphylococcus</i> com base nas sequências de sete genes de manutenção (<i>femA</i> , <i>ftsZ</i> , <i>gap</i> , <i>pyrH</i> , <i>rpoB</i> e <i>tuf</i>)	82
Figura 17 –	Árvore filotaxonômica mostrando a posição de <i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i> H2 contra as cepas do tipo mais relacionadas dentro do gênero <i>Staphylococcus</i> com base em sequências completas do genoma	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Critérios utilizados para classificação de acordo com a aderência e formação de biofilme	51
Tabela 2 –	Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nos ensaios de PCR	56
Tabela 3 –	Identificação das espécies de <i>Staphylococcus capitis</i> e <i>Staphylococcus hominis</i> isolados de hemocultura, realizadas no LDCIC*	63
Tabela 4 –	Perfis de resistência aos agentes antimicrobianos de amostras de <i>Staphylococcus capitis</i> e <i>Staphylococcus hominis</i> isoladas de hemoculturas, avaliados pelos métodos de difusão em disco, CIM e/ou Etest® e a presença do gene de resistência <i>mecA</i>	66
Tabela 5 –	Aspectos fenotípicos e genotípicos relacionado aos perfis de resistência aos agentes antimicrobianos, capacidade de produção de <i>slime</i> , propriedades auto agregativas e de formação de biofilme das amostras de <i>Staphylococcus capitis</i> e <i>Staphylococcus hominis</i>	69
Tabela 6 –	Heterogeneidade de aspectos fenotípicos e genotípicos relacionados aos perfis de resistência, capacidade de produção de <i>slime</i> , propriedades auto agregativas e de formação de biofilme em superfícies diversas, interação com células humanas e com larvas de <i>Galleria mellonella</i> de amostras representativas de <i>Staphylococcus capitis</i> e <i>Staphylococcus hominis</i>	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAI	Identidade média de aminoácidos
Aap	Proteína associada ao acúmulo
AMH	Agar Mueller Hinton
AMP	Peptídeos antimicrobianos
ANI	Identidade média de nucleotídeos
ATCC	American Type Culture Collection
Atl	Autolisina de parede celular
Bap	Proteína associada ao biofilme
BrCAST	Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
CA	Califórnia
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CFO	Cefoxitina
CIM	Concentração inibitória mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLI	Clindamicina
cm	Centímetro
CRA	Ágar Vermelho do Congo
CVC	Cateteres venosos centrais
Da	Peso molecular
dDDH	Hibridização DNA-DNA digital
DA	Clindamicina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
DO	Densidade óptica
eDNA	DNA extracelular
Embp	Extracellular matrix binding protein
EPS	Matrix exopolissacarídea
epbS	Proteína de ligação a elastina
ERI	Eritromicina
EUA	Estados Unidos da América

F	Primer Foward
Fbe	Proteína ligadora de fibrinogênio
GEN	Gentamicina
GGDC	Calculadora genômica Genome-to-Genome Distance Calculator 3.0
G6PD	Enzima do tipo B glicose-6-fosfato desidrogenase
°C	Graus Celsius
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
Hz	Hertz
IRAS	Infecções relacionadas à assistência à saúde
kV	Kilovolt
LABAC	Laboratório de Bacteriologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto
LDCIC	Laboratório de Difteria e Corinebacterioses de Importância Clínica
LZD	Linezolida
MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight – Mass Spectrometry
<i>MATH</i>	Microbial Adhesion To Hydrocarbon
>	Maior
±	Mais ou menos
≤	Menor igual
µm	Micrômetro
MDR	Multidroga-resistente
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MEM	Eagle's Minimal Essential Medium
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
ml	Mililitro
MLSA	Análise de sequência multilocus
mm	Milímetro
MOX	Moxifloxacino
MR	Meticilina resistente

MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
MRSHo	<i>Staphylococcus hominis</i> resistente a meticilina
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MSCRAMM	Componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas de matriz adesiva
NaCl	Cloreto de sódio
Não-MDR	Não Multidroga-resistente
nm	Nanômetro
ng	Nanograma
NOR	Norfloxacino
pb	Pares de base
PBP2a	Proteína ligadora de penicilina modificada
PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PDR	Pandroga-resistentes
PEN	Benzilpenicilina
PFGE	Eletroforese em gel de campo pulsado
PIA	Adesina intercelular polissacarídica
%	Porcentagem
pmol	Picomol
PRA	Perfil de resistência aos agentes antimicrobianos
PSA	Adesina capsular polisacarídica
PSM	Peptídeos de modulina solúveis em fenol
PVL	Leucocidina de Panton-Valentine
R	Primer reverse
R	Resistente
RIF	Rifampicina
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
rpm	rotações por minuto
S	Sensível
<i>Sc</i>	<i>Staphylococcus capitis</i>
SCC <i>mec</i>	Cassete Cromossomal Estafilocócico <i>mec</i>
SCoN	<i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa

<i>Sh</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>
Subsp.	Subespécie
SUT	Sulfazotrim
TEC	Teicoplanina
TET	Tetraciclina
TSB	Caldo Triptona Soja
TYGS	Type Strain Genome Server
U	Unidade
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFC	Unidades formadoras de colônia
USA	Estados Unidos da America
UTI	Unidade de terapia intensiva
UTIN	Unidade de terapia intensiva neonatal
VA	Vancomicina
VRE	<i>Enterococcus</i> resistentes a Vancomicina

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	18
1	GÊNERO <i>STAPHYLOCOCCUS</i>	19
1.1	<i>Staphylococcus</i> coagulase-negativo	22
1.2	<i>Staphylococcus</i> capitis	26
1.3	<i>Staphylococcus</i> hominis	28
1.4	Resistência aos antimicrobianos	29
1.5	Biofilme	34
1.6	Células epiteliais de carcinoma nasofaríngeo - Linhagem Detroit 562	39
1.7	<i>Galleria mellonella</i>	40
2	JUSTIFICATIVA	44
3	OBJETIVOS	45
3.1	Objetivo geral	45
3.2	Objetivos específicos	45
4	METODOLOGIA	47
4.1	Origem e identificação das amostras bacterianas	47
4.2	Identificação bacteriana pela técnica de MALDI-TOF	47
4.3	Análise dos perfis de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos ...	48
4.4	Avaliação da capacidade de formação de biofilme	49
4.4.1	<u>Método de crescimento em Ágar Vermelho do Congo (CRA)</u>	49
4.4.2	<u>Determinação da intensidade de aderência ao vidro</u>	50
4.4.3	<u>Avaliação da formação de biofilme em superfície de poliestireno</u>	50
4.4.4	<u>Aderência ao hidrocarboneto <i>n</i>-Hexadecano</u>	51
4.4.5	<u>Pesquisa da aderência bacteriana em cateteres de poliuretano e de silicone</u>	51
4.4.6	<u>Análise estrutural dos biofilmes pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV)</u>	52
4.4.7	<u>Avaliações quantitativas da aderência em superfície de aço</u>	53
4.4.8	<u>Avaliações quantitativas da aderência em superfície de pericárdio bovino</u>	53
4.5	Deteção de genes <i>mecA</i> (resistência), <i>icaA</i>, <i>atl</i>, <i>fbp</i>, <i>aap</i>, <i>bap</i>, <i>fnbA</i> e <i>epbS</i> (biofilme) pela técnica de PCR	53
4.6	Associação bacteriana com células epiteliais humanas da linhagem DETROIT 562	56

4.7	Ensaio <i>in vivo</i> de interação, infecção e letalidade utilizando larvas de <i>Galleria mellonella</i>	57
4.8	Sequenciamento genômico	58
4.8.1	<u>Extração e purificação do DNA genômico</u>	58
4.8.2	<u>Quantificação do DNA genômico</u>	59
4.8.3	<u>Avaliação da qualidade de DNA genômico</u>	60
4.8.4	<u>Sequenciamento, montagem e anotação do genoma bacteriano</u>	60
4.9	Taxonomia genômica bacteriana	61
4.10	Análise estatística	62
5	RESULTADOS	63
5.1	Origem e identificação das amostras	63
5.2	Perfis de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos e detecção do gene <i>mecA</i> que codifica resistência a cefoxitina e oxacilina	64
5.3	Expressão da produção de <i>slime</i>	66
5.4	Determinação do padrão de aderência ao vidro	67
5.5	Avaliação da formação de biofilme em superfície de poliestireno	68
5.6	Aderência ao hidrocarboneto <i>n</i>-Hexadecano	68
5.7	Avaliações quantitativas da aderência em superfície de aço	70
5.8	Avaliações quantitativas da aderência em superfície de pericárdio bovino	71
5.9	Pesquisa da aderência e formação de biofilme em cateteres de poliuretano e silicone (técnica de rolamento)	74
5.10	Presença de genes relacionados com a formação de biofilme	76
5.11	Associação bacteriana com células epiteliais humanas da linhagem DETROIT 562	77
5.12	Ensaio de infecção e letalidade em superfície abiótica de larva de <i>Galleria mellonella</i>	78
5.13	Sequenciamento genômico	79
5.14	Taxonomia genômica bacteriana	79
6	DISCUSSÃO	85
	CONCLUSÃO	97
	REFERÊNCIAS	100

INTRODUÇÃO

O gênero *Staphylococcus* possui atualmente 64 espécies e 10 subespécies, sendo divididos em dois grupos, os *Staphylococcus* coagulase-positiva, que produzem a enzima coagulase, sendo a espécie *Staphylococcus aureus* a mais conhecida e estudada por produzir muitas toxinas que contribuem para a virulência dessa bactéria, aumentando sua habilidade de invadir o corpo e danificar os tecidos, provocando desde infecções superficiais, como foliculite e abscessos até infecções sistêmicas; e os *Staphylococcus* coagulase-negativa (SCoN), que não produzem a enzima coagulase e eram considerados comensais, mas nas últimas décadas foram reconhecidos como agentes causadores de diversas doenças humanas, compreendendo diversas espécies como *Staphylococcus capitis* e *Staphylococcus hominis* (PARTE *et al.*, 2020; VIEIRA, 2017; GONÇALVES, TIMM, 2020).

Os SCoN são considerados colonizadores simbióticos naturais da pele de animais e humanos. Contudo, quando há o rompimento da barreira cutânea, devido a traumas ou uso de dispositivos médicos, podem tornar-se potentes patógenos oportunistas. Esses patógenos podem estar diretamente relacionados a infecções relacionadas a assistência à saúde (IRAS). A patogenicidade dessas espécies está associada principalmente a sua capacidade de produzir biofilme e resistência aos agentes antimicrobianos (EHLERSSON *et al.*, 2017; CARVALHO, 2018; KUMAR *et al.*, 2018; PINHEIRO-HUBINGER *et al.*, 2021).

Considerado um grande avanço na medicina, o surgimento dos antimicrobianos causou um impacto direto na diminuição de índices de mortalidade. Atualmente, com o uso indiscriminado dessas drogas para tratamento de infecções, é observada cada vez mais, a multidroga-resistência (MDR) desses microrganismos, sendo considerado um fator crítico na saúde global, relacionado ao aumento da letalidade nas infecções hospitalares (KUMAR *et al.*, 2018; PINHEIRO-HUBINGER *et al.*, 2021).

Para a análise de diversos aspectos, correlacionados a humanos, como a virulência de patógenos, a toxicidade de compostos e a atividade de algum determinado agente antimicrobiano, as larvas de *Galleria mellonella* têm sido comumente utilizadas como modelos experimentais *in vivo* alternativos. Elas possuem diversas vantagens técnicas, dentre elas, seu baixo custo de manutenção, a presença de um sistema imune inato, facilidade de inoculação e até o momento livre de restrições éticas e legais (CAMPOS-SILVA *et al.*, 2019; SHEEHAN, DIXON, KAVANAGH, 2019).

1 GÊNERO *STAPHYLOCOCCUS*

Como em diversos gêneros, a história da descoberta dos estafilococos foi norteadada por muitas renomeações e reclassificações de espécies, em virtude principalmente a divergência em seu conceito e na ausência de ferramentas para identificação. Diversos cirurgiões já haviam relatado sobre um possível microrganismo semelhante aos estafilococos, como por exemplo o cirurgião alemão Theodor Billroth em 1874, que já havia encontrado a “*Coccobacteria septica*” e Robert Koch que tinha isolado uma bactéria semelhante de uma lesão purulenta em 1878 (SANTOS *et al.*, 2007; BECKER, HEILMANN, PETERS, 2014).

Com a evolução das pesquisas na época, em 1882, o cirurgião escocês Alexandre Ogston propôs o termo “*Staphylococcus*”, a uma bactéria encontrada a partir da investigação de um abscesso cirúrgico. O nome dado a esse gênero é derivado da palavra grega “*staphyle*”, que significa cachos de uvas, já que as bactérias piogênicas estavam à disposição causando doenças em humanos (SANTOS *et al.*, 2007; BECKER, HEILMANN, PETERS, 2014; VIEIRA, 2017; CARVALHO, 2018).

Todavia, a descrição formal desse gênero para “*Micrococcus*” e particularmente “*Staphylococcus*”, pela sua patogenicidade, veio a acontecer em 1884, graças ao cirurgião alemão, Friedrich Rosenbach, que através dos microrganismos isolados de abscessos em experimentos com animais, também dividiu o gênero *Staphylococcus* em duas espécies: *Staphylococcus (pyogenes) aureus* e *Staphylococcus (pyogenes) albus*. Todavia, em 1891 nos Estados Unidos, o patologista William Welch descreveu um microrganismo como “*Staphylococcus epidermidis albus*” sendo um colonizador quase constante da epiderme humana, encontrado em feridas assépticas (BECKER, HEILMANN, PETERS, 2014; VIEIRA, 2017).

Muitas dúvidas acerca dessa classificação ainda persistiam, porém, diversas pesquisas continuaram avaliando as diferenças entre a morfologia, arranjo de colônias e fenótipos importantes. No início dos anos 1900, houve uma divisão temporária dos estafilococos em dois gêneros: *Aurococcus* (incluindo o *Aurococcus aureus*, relacionados a tecidos “doentes”) e *Albococcus* (incluindo o *Albococcus epidermidis*, basônimo de *Staphylococcus epidermidis*). Somente em 1981, com a hibridização do DNA, a comparação do gene 16S rRNA e o fornecimento de mais dados nas pesquisas, que foi possível classificar essas bactérias em dois gêneros distintos: *Staphylococcus* e *Micrococcus*, que se diferenciam em conteúdo DNA Guanina-Citosina, na presença ou não de ácidos teicoicos na parede celular e no tamanho das células bacterianas (BECKER, HEILMANN, PETERS, 2014; VIEIRA, 2017).

Até o ano de 1930, a classificação das bactérias do gênero *Staphylococcus* era baseada na produção de pigmento, método que já era considerado problemático na época. Na década de 1940, a partir de um critério de classificação binomial sugerido pelo pesquisador John Fairbrother, foi possível a diferenciação de espécies do gênero (principalmente das patogênicas) em dois grupos, a partir da análise da produção ou não da enzima coagulase. Esta enzima tem função na coagulação do plasma sanguíneo, através da conversão do fibrinogênio em fibrina sendo importante na proteção contra os macrófagos e ao sistema imune do hospedeiro, encapsulando e protegendo as células estafilocócicas (BECKER, HEILMANN, PETERS, 2014; VIEIRA, 2017; AL-TALIB, ABDULJALA, HAMODAT, 2020; ASANTE *et al.*, 2021; SMITH; ANDAM, 2021).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. então passaram a ser divididas em dois grupos: *Staphylococcus* coagulase-positivo, tendo como principal representante a espécie *Staphylococcus aureus* e os SCoN, compreendendo várias espécies, como: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus capitis*, dentre outros (SENG *et al.*, 2017; VIEIRA, 2017; LE, PARK, OTTO, 2018; ARGEMI *et al.*, 2019; MENG *et al.*, 2020; AL-TAMIMI *et al.*, 2020; GONÇALVES, TIMM, 2020).

O gênero possui outras características como serem cocos Gram-positivos, imóveis, a maioria anaeróbios facultativos, não esporulados, raramente encapsulados e produtores da enzima catalase. Quanto à sua disposição, podem estar de maneira isolada ou como um aglomerado irregular semelhante a um cacho de uvas, consequência direta da divisão celular em três planos perpendiculares. Tem 0,5 a 1,5µm de diâmetro, suas colônias podem ser brancas, amarelas, creme ou laranja. São mesófilas com temperatura ótima de crescimento entre 35°C e 40°C e com o pH ideal para desenvolvimento variando entre 4,0 e 9,8. Fermentam glicose na ausência ou presença de oxigênio (aspecto de diferenciação para *Micrococcus* spp.), resistentes ao dessecamento e tolerantes a altas concentrações de NaCl (até 10%) (SANTOS *et al.*, 2007; SOUZA, 2009, VIEIRA, 2017; CARVALHO, 2018; GONÇALVES, TIMM, 2020).

Atualmente o gênero *Staphylococcus*, pertencente à família *Staphylococcaceae* que possui atualmente 64 espécies e 10 subespécies. Vivem em simbiose com seu hospedeiro, geralmente animais de sangue quente, colonizando-o de maneira ubíqua. São integrantes da microbiota saudável da pele, glândulas e outros sítios anatômicos, auxiliando no metabolismo de produtos, principalmente quando associados a outras bactérias Gram-positivas, sendo consideradas uma possível barreira inicial contra microrganismos patogênicos (VIEIRA, 2017; PARTE *et al.*, 2020; CARVALHO, 2018; GONÇALVES, TIMM, 2020).

A partir do rompimento da barreira cutânea, seja por algum trauma ou uso de dispositivo médico invasivo, os *Staphylococcus* spp. tornam-se potentes patógenos oportunistas, sendo considerados um dos principais gêneros relacionadas a assistência à saúde (IRAS). Podem estar envolvidos em infecções de pele e tecidos moles, no sistema esquelético, no sistema respiratório, infecções de corrente sanguínea e a associadas a dispositivos médicos implantados, havendo uma preocupação ainda maior quando relacionados a pacientes imunossuprimidos (CALKINS *et al.*, 2016; EHLERSSON *et al.*, 2017; SENG *et al.*, 2017; LE, PARK, OTTO, 2018; CUI *et al.*, 2019; SOUSA *et al.*, 2019).

As IRAS afetam nosocômios de todo o mundo, com maior prevalência em países em desenvolvimento. Essas infecções podem ser adquiridas independente da situação do paciente, seja internado em alguma unidade de saúde ou até mesmo os que estão iniciando sua admissão hospitalar e poderiam, segundo estudos, serem evitadas em até 60%, através de boas práticas de higiene e limpeza nos ambientes nosocomiais. Como consequências, as IRAS não só geram a internação hospitalar prolongada e disseminação de microrganismos resistentes a antimicrobianos, mas contribuem com o elevado custo ao sistema de saúde e ao próprio paciente, além de altas taxas de morbidade e mortalidade (AHMED *et al.*, 2019; ALI, AFZAL, 2020; MUMTAZ *et al.*, 2020).

Tanto no ambiente colonizado quanto a infecção de tecidos do hospedeiro, grande populações de bactérias do gênero *Staphylococcus* podem persistir por longos períodos, afetando diretamente na dificuldade de seu tratamento. Seu potencial de patogenicidade e de virulência podem estar relacionadas a uma combinação de fatores, dentre eles a capacidade de produzir substâncias como coagulase, hialuronidase, hemolisinas, leucocidinas, nucleases, proteases, enterotoxinas e exoproteínas, além da resistência aos agentes antimicrobianos e a competência em formar biofilme, promovendo sua permanência tanto em superfícies abióticas quanto em tecidos vivos (SOUZA, 2009; VIEIRA, 2017; KUMAR *et al.*, 2018; GONÇALVES, TIMM, 2020; SOARES; VIEGAS; CABRAL, 2022).

Essas espécies também podem estar presentes em meio ambiente como solo, água e ar, onde sua distribuição ampla possibilita encontrá-las em alimentos, tanto como contaminantes quanto como auxiliares nos processos tecnológicos de maturação de alimentos como queijos e carnes (SANTOS *et al.*, 2007; CALKINS *et al.*, 2016; VIEIRA, 2017; CARVALHO, 2018; GONÇALVES, TIMM, 2020).

1.1 *Staphylococcus coagulase-negativo*

Os SCoN são colonizadores naturais da pele e membranas mucosas humanas, tendo como início de sua proliferação nos primeiros momentos de vida. No passado, eram consideradas bactérias pertencentes a microbiota da pele e mucosas, considerados contaminantes quando isoladas de amostras clínicas e não como agentes causadores de infecções endógenas, diferentemente quando encontrados amostras de *S. aureus*, por exemplo. Esse tipo de conduta devia-se a falta de informação da sua capacidade patogênica e do desconhecimento de seus fatores de virulência (EHLERSSON *et al.*, 2017; ARGEMI *et al.*, 2019; AL-TALIB, ABDULJALA, HAMODAT, 2020; MENG *et al.*, 2020; MICHELS *et al.*, 2021; ASANTE *et al.*, 2021; SMITH; ANDAM, 2021).

A partir do final da década de 70, começa então a ser relatado na literatura, o isolamento dos SCoN causadores de infecções nosocomiais, principalmente associados a dispositivos médicos invasivos. Esse patamar de patógeno oportunista é observado até os dias atuais, relacionando pacientes gravemente doentes ou imunocomprometidos tanto fazendo o uso de antimicrobianos de amplo espectro quanto da utilização constante de dispositivos médicos transitórios ou permanentes, como cateteres intravasculares e dispositivos protéticos, resultando em dificuldade de tratamento, podendo levar ao óbito do paciente. Os SCoN são considerados patógenos causadores de muitas infecções crônicas em pacientes nosocomiais e que por consequência acabam impactando os serviços de saúde com um alto custo do tratamento em virtude do aumento do tempo de internação e necessidade de cuidados intensivos. Contudo, os SCoN podem também acometer indivíduos saudáveis, como por exemplo, a infecção do trato urinário de mulheres pela espécie *S. saprophyticus*, onde anteriormente era considerada contaminante, hoje em dia já é relacionada ao seu poder patogênico (KLINE; LEWIS, 2016; KUMAR *et al.*, 2018; TREVISOLI *et al.*, 2018; CARTER *et al.*, 2018; HEILMANN, ZIEBUHR, BECKER *et al.*, 2019; SHIN *et al.*, 2019, MENG *et al.*, 2020; MICHALIK *et al.*, 2020; MICHELS *et al.*, 2021; THAKKER *et al.*, 2021; ASANTE *et al.*, 2021; SMITH; ANDAM, 2021; GARBACZ *et al.*, 2021).

Os SCoN também têm sido cada vez mais isolados na prática clínica, tanto em sítios clinicamente relevantes como em sítios naturalmente estéreis, como hemocultura. A hemocultura é considerada um exame laboratorial importante para o diagnóstico de bacteremia, podendo haver possibilidades de contaminações quando a antissepsia é inadequada. As infecções de corrente sanguínea relacionadas a cateteres e endocardite infecciosa quando causadas por SCoN, são mais encontradas no ambiente nosocomial, sendo 30-40% das espécies

responsáveis por essas infecções, comprovadas em diferentes coortes mundiais nos últimos anos (OSAKI et al, 2020; MICHELS *et al.*, 2021; ASANTE *et al.*, 2021).

Já que o sangue é um material biológico normalmente estéril, o diagnóstico de identificação de hemoculturas por um patógeno, geralmente, tem um alto valor preditivo para uma possível infecção, especialmente quando relacionados a pacientes com suspeita de sepse ou choque séptico e endocardite infecciosa. Ao acontecer tal indicação, um conjunto de hemoculturas (correspondente a um frasco aeróbio e um anaeróbio) deve ser obtido antes do início da antibioticoterapia (*Centers for Disease Control and Prevention – CDC*, 2019). Para definir uma possível infecção sanguínea por SCoN, duas hemoculturas devem ser positivas em até 5 dias. Porém, quando há sintomas clínicos de infecções, apenas uma é o suficiente. Também deve ser verificado outros critérios como: ausência de outra infecção, presença de duas ou mais amostras da mesma espécie, a presença ou não de um dispositivo invasivo, a melhora dos sintomas e inflamações após a antibioticoterapia. A partir da hemocultura positiva e o perfil de resistência do patógeno, é possível distinguir uma infecção ou contaminação do material colhido (OSAKI et al, 2020; MICHELS *et al.*, 2021; PINHEIRO-HUBINGER *et al.*, 2021).

O rompimento da barreira cutânea associado com os SCoN, podem gerar infecções endógenas em pacientes predispostos, como idosos com comorbidades, recém-nascidos e/ou prematuros, pacientes com cateteres, implantes protéticos, diálise ou pacientes imunocomprometidos. Os SCoN estão relacionados a sepse neonatal em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN), colaborando diretamente com a alta morbimortalidade (PEREIRA-RIBEIRO *et al.*, 2019; MICHALIK *et al.*, 2020; MICHELS *et al.*, 2021; PINHEIRO-HUBINGER *et al.*, 2021; ASANTE *et al.*, 2021; SMITH; ANDAM, 2021).

Atualmente, os SCoN são considerados importantes quando relacionados as infecções nosocomiais, sendo afetado de forma crítica pela resistência antimicrobiana, ainda mais quando essa capacidade de ser resistente é associada a múltiplos antimicrobianos. Essas espécies, quando MDR, são reconhecidas como reservatório de genes que codificam essas resistências, bem como, terem possível capacidade de transferir esses genes para outras espécies bacterianas. Esse fato, possivelmente é relacionado tanto ao uso indiscriminado de antimicrobianos, quanto ao aumento significativo de procedimentos médicos invasivos (PEREIRA *et al.*, 2019; AL-TALIB, ABDULJALA, HAMODAT, 2020; MENG *et al.*, 2020; PINHEIRO-HUBINGER *et al.*, 2021; SMITH; ANDAM, 2021).

Espécies de SCoN estão sendo cada vez mais estudados também na área veterinária, mesmo que seu papel como patógeno infeccioso em animais ainda seja mínimo e sua relevância

para humanos ainda não seja muito estudada. Porém, diversos estudos analisaram que bactérias podem ser transmitidas entre hospedeiros através do cruzamento da barreira de espécies (MICHALIK *et al.*, 2020; MICHELS *et al.*, 2021).

Os SCoN têm ausência de fatores de virulência importantes, como as toxinas citolíticas, que influenciam diretamente na permanência dentro do organismo hospedeiro. Essa característica, em contrapartida, é encontrada facilmente em amostras altamente virulentas de *S. aureus*. Os SCoN possuem habilidades que promovem sua persistência e evasão do sistema imunológico do hospedeiro, como a formação de biofilme e a produção do ácido poli-c-DL-glutâmico, garantindo sua patogenicidade (EHLERSSON *et al.*, 2017; CUI *et al.*, 2019; NWIBO *et al.*, 2019; PEREIRA *et al.*, 2019; MICHALIK *et al.*, 2020; TEKELI, ÖCAL, DOLAPÇI, 2020; MICHELS *et al.*, 2021).

As espécies dos SCoN possuem uma grande diversidade, onde *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* (isoladas de áreas com grande quantidade de glândulas apócrinas), *S. capitis* e *S. hominis* (isoladas da cabeça humana, braços, axilas e pernas), são considerados os principais patógenos quando relacionados a infecções nosocomiais, assim como *S. saprophyticus*, que coloniza o reto e o trato geniturinário. Porém deve-se ressaltar que a espécie *S. epidermidis*, encontrada nas partes úmidas da pele humana como axilas, áreas perineais e conjuntiva ocular, é a mais estudada a nível molecular e genômico. Outras espécies são encontradas em diversos locais na pele humana como a espécie *Staphylococcus pettenkoferi* que também pode ser encontrada dentro do organismo e a *Staphylococcus auriculares* que faz parte da microbiota do ouvido externo humano (BECKER, HEILMANN, PETERS, 2014; ARGEMI, 2019; TEKELI, ÖCAL, DOLAPÇI, 2020; MENG *et al.*, 2020).

Outra espécie significativa é *Staphylococcus lugdunensis*, encontrada na região pélvica, axilas e extremidades inferiores, que tem sido mais investigada ultimamente devido a sua gravidade no organismo do hospedeiro. A espécie *S. saprophyticus* também faz parte da microbiota gastrointestinal de bovinos e suínos, sendo um contaminante comum quando o organismo se alimenta desses tipos de carne malcozidas. Também existem espécies encontradas em águas próprias para consumo como o *Staphylococcus pasteurii*, além de espécies relacionadas a cultura inicial de comidas fermentadas como: *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus condimenti*, *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus piscifermentans*, *Staphylococcus succinus* e *Staphylococcus xylosus* (BECKER, HEILMANN, PETERS, 2014; ARGEMI *et al.*, 2019).

Recentemente outras novas espécies também foram relacionadas a amostras clínicas: *Staphylococcus jettensis*, *Staphylococcus massilliensis*, *Staphylococcus petrasii* e *S.*

pettenkoferi, porém seus fatores de virulência ainda não foram elucidados na literatura (BECKER, HEILMANN, PETERS, 2014; HEILMANN, ZIEBUHR, BECKER *et al.*, 2019; MICHELS *et al.*, 2021).

Entre 2015 e 2020, seis espécies de SCoN foram descritas, uma delas proveniente de ambiente aquático no rio Argen alemão: *Staphylococcus argensis*, outra ambiental em seu entorno e até em território Antártico: *Staphylococcus edaphicus*, já analisada quanto a presença de elementos gênicos móveis difundindo possivelmente genes de resistência para outros microrganismos. Outras três espécies também foram descritas em 2019: *Staphylococcus caeli* (atmosfera de uma propriedade de coelhos), *Staphylococcus pseudoxylosus* (mastite bovina) e *Staphylococcus debuckii* (leite bovino). Já em 2020, foi encontrada em pele humana e hemoculturas a espécie *Staphylococcus borealis*. No ano de 2021, quatro espécies provenientes de animais também foram identificadas: *Staphylococcus caledonicus*, *Staphylococcus canis*, *Staphylococcus durrellii* e *Staphylococcus lloydii*. Em 2022, duas espécies foram descritas: *Staphylococcus taiwanensis* de sangue humano (geneticamente mais próxima ao *S. haemolyticus*) e *Staphylococcus ratti* de ratos de laboratório. Já a espécie mais recentemente descrita em 2023, é a *Staphylococcus shinii*, oriunda da planta *Allium schoenoprasum* (cebolinha). Com a ausência de dados, ainda não é possível associar essas espécies recentes de SCoN aos impactos infecciosos nos seres humanos (FOUNTAIN *et al.*, 2019; MICHELS *et al.*, 2021; NEWSTEAD *et al.*, 2021; KOVAŘOVIC *et al.*, 2022; LIN *et al.*, 2022; CHO *et al.*, 2022).

Métodos para a identificação fenotípica de SCoN como morfologia de colônias, atividades enzimáticas, incluindo kits de perfil analítico, são consideradas formas antiquadas quando comparamos com a tecnologia atual. Além disso, o uso de métodos moleculares mais precisos, como a identificação por análise genotípica (utilizando genes 16S rRNA, *rpoB*, *tuf* e *soda*), obtém-se resultados fidedignos. Atualmente, para identificação a nível de espécies de SCoN, a técnica mais utilizada é de MALDI-TOF (Ionização e dessorção a laser assistida por matriz - Tempo de Vôo, do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight*) onde as espécies bacterianas têm sua proteína ribossomal comparada a um banco de dados de referência padrão. Esse protocolo ampliou o campo do diagnóstico laboratorial clínico, substituindo o método tradicional por um menos trabalhoso, considerado padrão ouro, mais veloz e confiável. Além disso, existem espécies com crescimento fastidioso e lento, que podem complicar a sua identificação, por exemplo *Staphylococcus saccharolyticus* (EHLERSSON *et al.*, 2017; SAHA *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020; MICHELS *et al.*, 2021).

A publicação dos genomas dos SCoN, tem sido uma técnica essencial para o entendimento da patogenicidade dessas bactérias. Fatores de virulência de impacto clínico como toxinas, fatores de adesão, produção de biofilme, hemolisinas, exoenzimas e superantígenos e os seus genes relacionados, ainda são pouco estudados. No entanto, é de conhecimento que essas enzimas e toxinas exercem possíveis papéis cruciais em algumas consequências refletidas no organismo hospedeiro em relação aos SCoN como destruição do tecido e disseminação, que facilita a invasão em tecidos próximos. Os fatores de virulência atuam diretamente no mecanismo de infecção de um patógeno com seu hospedeiro, em geral, os SCoN não possuem determinantes responsáveis pela agressão, mas são capazes de aderir, invadir e persistir no organismo infectado (ARGEMI, 2019; THARMALINGAM *et al.*, 2019; MICHALIK *et al.*, 2020; SOARES; VIEGAS; CABRAL, 2022).

1.2 *Staphylococcus capitis*

Staphylococcus capitis é uma espécie isolada principalmente da área da cabeça de humanos, mas também pode ser proveniente dos braços e ocasionalmente das pernas, além de ser considerada parte da microbiota natural. Foi identificado pela primeira vez por Kloos e Schleifer em 1975 e possui duas subespécies: *Staphylococcus capitis* subsp. *urealyticus* e *Staphylococcus capitis* subsp. *capitis*. Normalmente são diferenciadas pelas características da subespécie *urealyticus*, que possui colônias maiores, produz ácido a partir da maltose em anaerobiose e tem perfil de ácidos graxos, além dessas subespécies terem variações das sequências de DNA (EHLERSSON *et al.*, 2017; TEVELL *et al.*, 2017; AZIMI *et al.*, 2020; GOMES, 2021; DOUEDI *et al.*, 2021).

É a terceira espécie mais estudada dentre os SCoN, sendo isolados em 5% de amostras clínicas relacionadas a SCoN e estudos de seu genoma completos estão com foco na virulência, compreendendo aspectos como a capacidade de colonização e persistência na pele humana, relacionando diretamente a infecções associadas a dispositivos médicos, como também na disseminação da resistência antimicrobiana. Quando são a causa de infecções, estão geralmente atrelados a formação de biofilme, relacionando diretamente com casos de otite externa, celulite, peritonite de diálise peritoneal ambulatorial contínua, endocardite de válvula protética, meningite, osteomielite, espondilodiscite, bacteremia, infecções de corrente sanguínea associadas a cateteres, infecções articulares protéticas e sepse em neonatos na Unidade de Terapia Intensiva (UTI). Pacientes com sistema imunológico suprimido ou doença cardíaca

subjacente são considerados altamente susceptíveis a infecções por *S. capitis* (EHLERSSON *et al.*, 2017; ARGEMI, 2019; NWIBO *et al.*, 2019; AZIMI *et al.*, 2020; O’SULLIVAN *et al.*, 2020; THAKKER *et al.*, 2021).

Outras particularidades que protegem o *S. capitis* da ação do hospedeiro e da antibioticoterapia foram encontrados em seu genoma, como, reguladores de virulência putativos (como homólogos *agr*), *loci* de produção de biofilme, genes codificadores de exoenzimas (como metaloproteases e hemolisinas), modulina fenol solúvel (PSMs) e componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas de matriz adesiva (MSCRAMM) (ARGEMI *et al.*, 2019; JASINSKA *et al.*, 2021).

Infecções relacionadas a essa espécie são consideradas questões de suma importância na clínica pois estão atreladas a multirresistência antimicrobiana em ambientes nosocomiais. Diversos estudos anteriores analisaram a correlação da sepse neonatal com amostras de *S. capitis* resistentes a oxacilina e susceptibilidade reduzida à vancomicina e heterorresistência à vancomicina de subpopulações de amostras oriundas de hemoculturas de neonatos em UTI. (TEVELL *et al.*, 2017; CARTER *et al.*, 2018; ARGEMI *et al.*, 2019; YU *et al.*, 2020).

S. capitis é considerado um patógeno oportunista emergente causando infecções sanguíneas e quando acometem pacientes neonatais tendem a níveis altos de morbidade em relação a outras espécies de SCoN. Estudos da eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) para a investigação de clonalidade bacterianas tem sido realizado, onde foi encontrado um clone multirresistente específico denominado NRCS-A. Considerado altamente endêmico em Unidades de Terapia Intensiva Neonatais (UTIN), pode ter sido também a causa da maioria das sepSES por *S. capitis* no mundo. Nesse ambiente, essa espécie tem sido frequentemente isolada de cateteres venosos centrais (CVC), sendo sugestivo que sua capacidade de formação de biofilme estaria relacionada diretamente ao seu potencial de causar infecções. A falha na antibioticoterapia em casos associados a dispositivos médicos implantados e infectados por *S. capitis*, está diretamente relacionada a resistência aos β -lactâmicos, aminoglicosídeos e a resistência ou heterorresistência a vancomicina. A resistência a esses antimicrobianos de uso comum em UTIN são relacionadas aos genes que codificam essa resistência pertencentes ao cassete SCC*mec* nesses clones. A disseminação desses clones resistentes e altamente endêmicos correlacionados a bacteremias, faz com que se torne uma grande preocupação para a saúde pública (SIMÕES *et al.*, 2016; BUTIN *et al.*, 2017, ORY *et al.*, 2019, QU *et al.*, 2020; WIRTH *et al.*, 2020; PINHEIRO-HUBINGER *et al.*, 2021). Já foi relatado em um estudo francês a existência do sequenciamento de um outro clone, com o pulsotipo NRCS-C isolado de

hemocultura, sem muita descrição na literatura quanto ao seu impacto nas infecções (LEMRISS *et al.*, 2016).

Recentemente, através de estudos genômicos, foi possível avaliar amostras de *S. capitis* quanto a produção de peptídeos antimicrobianos (AMP), que podem ser o possível futuro do tratamento de infecções associadas a resistência antimicrobiana de última geração. Essa espécie foi capaz de produzir bacteriocinas, peptídeos ribossômicos que auxiliam a bactéria que o produz a se estabelecer no hospedeiro, eliminando a concorrência e interagindo com o sistema imunológico e essa produção é considerada comum entre os SCoN (O’SULLIVAN *et al.*, 2020).

1.3 *Staphylococcus hominis*

Staphylococcus hominis é uma espécie de SCoN que pode ser encontrada colonizando a pele dos braços, pernas e axilas, participando da microbiota humana, de animais, assim como no meio ambiente. É a terceira espécie de SCoN mais frequentemente isolada de hemocultura proveniente de pacientes hospitalizados, sendo considerados potenciais patógenos oportunistas que podem causar bacteremia, sepse, endocardite infecciosa, peritonite, osteomielite, meningite, infecções ósseas e articulares, particularmente em pacientes imunocomprometidos, sendo normalmente relacionados a sua capacidade de formação de biofilme na superfícies de dispositivos médicos atrelados ao corpo humano (SZCZUKA; TELEGA; KAZNOWSKI, 2015; MENDOZA-OLAZARAN *et al.*, 2015; CALKINS *et al.*, 2016; SOROUGH *et al.*, 2017; SZCZUKA *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2019; AZIMI *et al.*, 2020; ROMERO *et al.*, 2021; MURAKI *et al.*, 2022).

Essa espécie produz ácido a partir da trealose e é raramente resistente a novabiocina. Os mecanismos de patogenicidade relacionados a *S. hominis* ainda não foram determinados com exatidão. Contudo, o aumento de amostras resistentes aos antimicrobianos é considerado um problema para o tratamento das infecções relacionadas a essa espécie, sendo relatado nas amostras a resistência a oxacilina e a linezolida e além da sensibilidade diminuída à vancomicina. Estudos relatam que *S. hominis* tem a possibilidade de carrear novos tipos de SCC*mec*, graças a novas combinações dos genes *mec* e *ccr* (MENDOZA-OLAZARAN *et al.*, 2015; SOROUGH *et al.*, 2017; SZCZUKA *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2019; AZIMI *et al.*, 2020; ROMERO *et al.*, 2021). A espécie *S. hominis* revelou ser uma espécie geneticamente diversa, onde através da sua investigação genômica foi possível avaliar o impacto significativo

da recombinação gênica na geração dessa diversidade (SZCZUKA; TELEGA; KAZNOWSKI, 2014).

A emergência de *S. hominis* resistente a metilina (MRSHo) é uma grande e crescente preocupação relacionada a resistência aos agentes antimicrobianos. Como em outras espécies do gênero *Staphylococcus* spp., tanto a capacidade de adquirir resistência a múltiplos antimicrobianos quanto a formação de biofilme em dispositivos médicos invasivos de diversos materiais, ou no tecido de hospedeiros, são considerados fatores de patogenicidade importantes relacionados a essa espécie (SZCZUKA; TELEGA; KAZNOWSKI, 2014; ROMERO *et al.*, 2021).

A partir dessa espécie, duas subespécies já foram descritas: *S. hominis* subsp. *hominis* e *S. hominis* subsp. *novobiosepticus*, possuindo poucos relatos de sua diversidade genômica. Esta segunda subespécie geralmente é relatada como multirresistente e tem como características ter resistência a novobiocina e não formar ácido aerobicamente a partir da trealose ou N-acetilglucosamina. Porém, poucos estudos têm caracterizado a diversidade genômica das subespécies de *S. hominis*, principalmente pelo fato de que a diferenciação entre as duas subespécies pode ser difícil, pois *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* parece formar um táxon parafilético (PEREIRA *et al.*, 2019).

1.4 Resistência aos antimicrobianos

É estimado que mais de 700.000 pessoas venham a óbito anualmente por infecções causadas por bactérias resistentes aos antimicrobianos. O aumento crescente dessas resistências, ainda mais quando relacionados a pacientes imunocomprometidos, prejudica ainda mais a eficácia do antimicrobiano e limita as opções terapêuticas. Entender os processos associados a resistência aos antimicrobianos pode ajudar a fornecer importantes estratégias preventivas e terapêuticas contra esses patógenos e infecções resistentes, impedindo assim, o prognóstico crítico de um aumento de 10 milhões de mortes anuais até 2050, maiores números de óbitos do que quando relacionado ao câncer, gerando um custo global de U\$100 trilhões, além da necessidade de criar antimicrobianos cada vez mais potentes para o tratamento dessas infecções (NWIBO *et al.*, 2019; THARMALINGAM *et al.*, 2019; YU *et al.*, 2020; PINHEIRO-HUBINGER *et al.*, 2021; KMIHA *et al.*, 2023).

A resistência antimicrobiana está presente em diversos elementos gênicos, sendo como os mais relevantes clinicamente os transposons, integrons e plasmídeos, normalmente

relacionados a mecanismos horizontais de transferências de genes como conjugação, transdução e transformação. Essas transferências gênicas dependem de diversos fatores como o grau de interação entre organismos, pressão seletiva do ambiente, condições ambientais, o mecanismo de transferência de genes compatível e restrições do hospedeiro. Os estafilococos patogênicos podem ser tanto receptores como transmissores de plasmídeos carreadores de resistência, pela sua coexistência com outras espécies bacterianas no ambiente onde está inserido. A determinação do seu perfil de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos acaba sendo de extrema importância para que possa ser possível analisar a epidemiologia, bem como realizar o tratamento correto desses pacientes acometidos por IRAS (HEILMANN, ZIEBUHR, BECKER *et al.*, 2019; NWIBO *et al.*, 2019; SHIN *et al.* 2019, AL-TALIB, ABDULJALA, HAMODAT, 2020; YU *et al.*, 2020).

Quando a resistência aos agentes antimicrobianos está diretamente atrelada a espécies do gênero *Staphylococcus*, é observado um problema crescente de saúde pública global. A capacidade dos SCoN de adquirir resistência aos antimicrobianos e de ser um potencial reservatório da evolução e disseminação de genes de resistência, independentemente de seu ambiente (nosocomial ou comunitário), é um aspecto muito importante que conflita diretamente ao manejo de infecções estafilocócicas atualmente pelo mundo (MENG *et al.*, 2020; MICHELS *et al.*, 2021; GARBACZ *et al.*, 2021).

A sua capacidade de transferência gênica envolvendo diversos microrganismos, limita por consequência, as futuras opções de tratamento. Para que seja possível lidar com o número crescente de bactérias resistentes, é necessário que haja um diagnóstico precoce e identificação correta do microrganismo em questão, para que não ocorra o uso indiscriminado e incorreto de antimicrobianos. Especificamente, é de conhecimento a urgência da análise da resistência em amostras MDR e amostras meticilina resistentes (MR). Além disso, a existência de amostras pandroga-resistentes (PDR), capazes de ter resistência a todos os antimicrobianos disponíveis é o impulsionador para a aceleração de pesquisas e desenvolvimento de novos antimicrobianos para seu tratamento, não deixando de negligenciar seu uso e suas consequências diretas para o futuro (KUMAR *et al.*, 2018; HEILMANN, ZIEBUHR, BECKER, 2019; CUI *et al.*, 2019; SHEEHAN, DIXON, KAVANAGH, 2019; MENG *et al.*, 2020; MICHELS *et al.*, 2021; ASANTE *et al.*, 2021; GARBACZ *et al.*, 2021).

Os SCoN nosocomiais ou associados a IRAS geralmente apresentam um grande perfil de resistência, devido à alta pressão seletiva dos antimicrobianos de uso terapêutico ou profilático, favorecendo diretamente seu surgimento e disseminação. As maiores taxas de resistência estão relacionadas aos β -lactâmicos (penicilina e oxacilina), gentamicina,

clindamicina, ciprofloxacina e eritromicina. SCoN quando comparados ao *S. aureus* caracterizam-se por baixa patogenicidade, porém sua multirresistência e características específicas de cada paciente em relação a terapia, geram dificuldade em combatê-los (HEILMANN, ZIEBUHR, BECKER, 2019; CUI *et al.*, 2019; SHEEHAN, DIXON, KAVANAGH, 2019; NWIBO *et al.*, 2019; YU *et al.*, 2020; MICHELS *et al.*, 2021; ASANTE *et al.*, 2021).

Usualmente, o tratamento de uma amostra de SCoN susceptível é feito a partir do uso de penicilina anti-estafilocócica (oxacilina, por exemplo). Todavia, quando a amostra apresenta resistência a esse antimicrobiano, usualmente, também são resistentes a outros grupos clássicos para o tratamento como: macrolídeos, lincosamidas, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e sulfonamidas. Sendo necessário a implementação de novas terapias antimicrobianas, chamadas de segunda linha, utilizando antimicrobianos como a vancomicina, a daptomicina e a linezolida. Porém, infecções por SCoN resistentes a esses antimicrobianos já estão em nossa realidade mundial e representam hoje um desafio crítico em ambientes hospitalares no mundo todo (ALTAMIMI *et al.*, 2020; MICHELS *et al.*, 2021; GARBACZ *et al.*, 2021).

A presença do gene *mecA* está associada a resistência a oxacilina, porém quando um SCoN adquire esse gene, consegue obter resistências associadas a outros tipos de classes de antimicrobianos. Esse gene está localizado no SCC*mec*, altamente conservado nos SCoN. Esse gene codifica uma proteína ligadora de penicilina modificada (PBP2a) e tem como resultado que os antimicrobianos β -lactâmicos acabam se tornando ineficazes contra os SCoN resistentes. Essa resistência é frequentemente identificada e quando associada a restrições de uso de outros antimicrobianos, é necessário a utilização da vancomicina como tratamento das infecções. Pode ocorrer a necessidade de terapia combinada com aminoglicosídeos devido a sua sinergia com efeito bactericida. Porém já existem relatos de resistência a aminoglicosídeos nos SCoN através da observação de inativação por modificação de antimicrobiano através de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMA) (SZCZUKA *et al.*, 2018; LONCARIC *et al.*, 2019; PEREIRA *et al.*, 2019; SHIN *et al.*, 2019; AL-HAQAN *et al.*, 2020; DHAOUADI *et al.*, 2020; GARBACZ *et al.*, 2021; ALBERT *et al.*, 2023).

Entretanto, o gene *mecA* não é mais considerado o único gene relacionado com a resistência à meticilina em espécies de *Staphylococcus* spp., principalmente em *S. aureus*. Um homólogo localizado recentemente em um novo SCC*mec*, tipo XI, nomeado inicialmente de *mecALGA251* e depois de *mecC* e seu produto proteico intitulado de PBP2c, codificando também esse tipo de resistência. Esse gene faz parte do complexo de genes *mec* da classe E e possui aproximadamente 69% das sequências similares de seu precursor, descoberto em uma

cepa de MRSA isolada de infecção de hemocultura (LONCARIC *et al.*, 2019; VENUGOPAL *et al.*, 2019; DHAOUADI *et al.*, 2020; ALBERT *et al.*, 2023).

Existem três elementos básicos que compõem o SCC $_{mec}$: genes do complexo *mec*, genes do complexo *ccr* e regiões “*junkyard*”, de tamanhos e estrutura genética variável. O complexo *mec*, que compreende o gene *mec*, seus genes reguladores e sequências de inserção associadas, é classificado em 5 classes: de A à E, com base nas diferenças das sequências, nos elementos regulatórios e onde se localiza no gene *mec*. Já o complexo *ccr*, que contém genes que medeiam a inserção ou não do SCC $_{mec}$, recebeu números de 1 a 9 com base na combinação de diferentes alótipos *ccr*. A combinação desses dois complexos, geram 14 tipos de elementos SCC $_{mec}$ (I ao XIV), relatados até agora. Quando relacionado aos SCoN, existem fortes evidências que sugerem a ampla diversidade desse cassete nesses microrganismos, graças a aspectos que dificultam sua tipagem, como novas combinações dos dois complexos, diferenças na ampliação do gene *ccr* e a existência de múltiplos genes do complexo *crr*. Esse elemento móvel é considerado um veículo para a transferência de genes de resistência entre SCoN e *S. aureus* e é utilizado para inferir a filogenética de amostras de *Staphylococcus* spp. (SZCZUKA *et al.*, 2018; LONCARIC *et al.*, 2019; SHIN *et al.*, 2019; TEKELI, ÖCAL, DOLAPÇI, 2020; MENG *et al.*, 2020; PINHEIRO-HUBINGER *et al.*, 2021).

Os glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina) estão sendo cada vez mais utilizados no tratamento de SCoN, que atuam na inibição da síntese da parede celular, o que levou ao surgimento de amostras com suscetibilidade reduzida aos mesmos. Entre os SCoN, a resistência aos glicopeptídeos é mais comum em *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* e é uma preocupação clínica significativa. Em particular, a resistência à teicoplanina tornou-se mais comum que a resistência à vancomicina em espécies de SCoN, sendo a heteroresistência à vancomicina cada vez mais relatada em ambientes hospitalares. No entanto, a resistência homogênea aos glicopeptídeos é raramente observada (EHLERSSON *et al.*, 2017; BAKTHAVATCHALAM *et al.*, 2017; MICHELS *et al.*, 2021) e quando associada a amostras resistentes também a meticilina, acaba por limitar o conjunto de terapêuticas disponíveis. Tanto a resistência à vancomicina quanto a teicoplanina, é mediada pelos genes *vanA*, sendo encontrado em maior quantidade, em ambos, e *vanB* (menos encontrado) porém, somente mediando resistência à vancomicina (ROSIN, 2017; AL-TAMIMI *et al.*, 2020; YU *et al.*, 2020).

Recentemente, um novo grupo semi-sintético derivados dos glicopeptídeos foram criados, os lipoglicopeptídeos: oritavancina, telavancina e dalbavancina. A atividade desses antimicrobianos assemelham-se a dos glicopeptídeos, obviamente, e suas principais indicações são infecções agudas de pele e de sua estrutura. Seu uso clínico ainda é limitado, ainda mais

por terem efeitos colaterais relevantes como reação a infusão e possíveis interações medicamentosas (oritavancina), insuficiência renal (televancina) e sintomas gastrointestinais e elevação das enzimas hepáticas (dalbavancina) (MICHELS *et al.*, 2021).

Já a daptomicina é um lipopeptídeo cíclico, que atinge a membrana celular de bactérias Gram-positivas, assemelhando a ação dos glicopeptídeos. Mesmo tendo uma baixa resistência relacionada aos SCoN, esse antimicrobiano foi prioritariamente associado a infecções bacterianas agudas na pele por cocos Gram-positivos e sendo uma alternativa a linezolida no tratamento de infecções por *Enterococcus* resistentes a Vancomicina (VRE). Ele ainda é utilizado em ambiente nosocomial nas infecções articulares protéticas por estafilococos resistentes a oxacilina, vancomicina e bacteremia por *S. aureus*, incluindo endocardite. Sua consequência adversa de uso é a toxicidade muscular reversível (MICHELS *et al.*, 2021).

O moxifloxacino é um antimicrobiano pertencente a quarta geração das fluorquinolonas, que representam um grande avanço da antibioticoterapia, sendo uma das principais opções terapêuticas para várias infecções. São considerados antimicrobianos de amplo espectro, atuando em bactérias tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas, particularmente contra as bactérias comunitárias, incluindo os principais cocos Gram-positivos como, o gênero *Staphylococcus*. Acredita-se que este antimicrobiano atue inibindo as topoisomerase de DNA do tipo II (girases) e topoisomerase do tipo IV, que são necessárias para a síntese de mRNA bacterianos (transcrição) e replicação do DNA, resultando na morte celular da bactéria. O tratamento com moxifloxacino geralmente é muito bem tolerado pelos pacientes com baixa incidência de eventos adversos (PUBCHEM, 2022).

Com o aumento global dos patógenos MDR, o uso da linezolida tem sido cada vez mais utilizado desde os anos 2000, sendo considerada a oxazolidinona mais amplamente utilizada para tratamento de infecções. Pertencem a essa classe de antimicrobianos as drogas bacteriostáticas que inibem a síntese proteica. O seu principal papel era tratamento de infecções por VRE, porém poucos recomendam o seu uso como tratamento de primeira linha para combater SCoN. O uso imprudente da linezolida está associado ao surgimento de amostras resistentes, em particular da espécie *S. epidermidis*. SCoN, como na maioria das bactérias, desenvolvem mais facilmente resistência a linezolida após serem expostos ao antimicrobiano, podendo transmitir essa resistência facilmente para outras espécies do gênero *Staphylococcus*. Essa resistência pode estar relacionada as mutações do domínio V da sequência 23S rRNA, na sequência 50S rRNA ou ainda na aquisição de genes *cfrA*, *cfrB* e *optrA*, sendo que somente 1 a 2% dos casos abrigam a resistência a linezolida. Toxicidade da medula óssea, acidose láctica

e neuropatias são efeitos colaterais graves e parcialmente irreversíveis desse antimicrobiano (BUTIN *et al.*, 2017; MICHELS *et al.*, 2021).

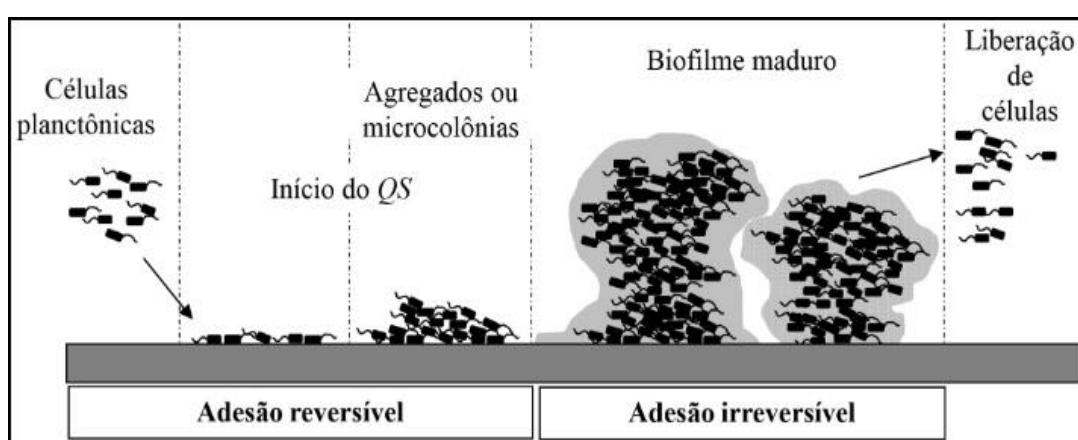
1.5 Biofilme

Estima-se que 80% das infecções microbianas sejam relacionadas a capacidade dos microrganismos produzirem biofilme, refletindo diretamente na despesa mundial relacionada a saúde, sendo necessário o enfoque em novas possíveis estratégias terapêuticas. Biofilmes desempenham papéis importantes nas infecções relacionadas a dispositivos médicos, como dispositivos circulatórios, cateteres urinários, lentes de contato, implantes ortopédicos e cardíacos, onde é formado uma matriz extracelular composta por bactérias e biopolímeros. Eles podem se formar tanto em superfícies bióticas quanto abióticas, sendo extremamente difíceis de extinguir, pois dentro do biofilme as bactérias são protegidas tanto do sistema imune do paciente quanto da terapia antimicrobiana (CAMPOS-SILVA *et al.*, 2019; GRAF *et al.*, 2019; AL-HAQAN *et al.*, 2020; MICHALIK *et al.*, 2020; MICHELS *et al.*, 2021). Informações sobre a formação e estrutura do biofilme associados ao gênero *Staphylococcus* são mais estudadas em *S. aureus* e *S. epidermidis*, deixando limitado o conhecimento desses aspectos em correlação a outras espécies estafilocócicas (SZCZUKA; TELEGA; KAZNOWSKI, 2014).

O biofilme é formado por um aglomerado de multicamadas celulares embutidos em uma matriz extracelular polissacarídica (constituída de substâncias poliméricas como polissacarídeos, DNA extracelular (eDNA) e proteínas, podendo variar em relação a condição ambiental e diferentes espécies bacterianas. Esses compostos facilitam a adesão e protegem o microrganismo contra a ação não só dos antimicrobianos, como também da atuação do sistema imunológico do hospedeiro. A colonização da superfície e desenvolvimento do biofilme acontece geralmente em cinco estágios: (i) adesão reversível, onde células planctônicas são fracamente ligadas ao substrato por interações como eletrostática, van der Waals ou interações hidrofóbicas, estabelecidas por componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas de matriz adesiva (MSCRAMM), que acabam se ligando ao fibrinogênio, fibronectina e colágeno constituintes do tecido do hospedeiro; (ii) adesão irreversível, quando as células aderem ao substrato e formam aglomerados; (iii) primeira parte da maturação do biofilme, onde o aglomerado celular amadurece e acaba se dispondo gradualmente em camadas associadas a matriz exopolissacarídea (EPS) (nessa etapa há a detecção e sinalização de *quorum sensing*), tendo também a produção de ácidos teicóicos, proteínas e DNA, onde as estruturas ficam num formato de cogumelo para facilitar a entrega de nutrientes a camadas mais profundas

do biofilme; (iv) segunda parte da maturação do biofilme, quando os aglomerados celulares atingem espessura máxima e (v) dispersão do biofilme, onde as células deixam o biofilme para disseminar para locais distais, devido a atividade do surfactante, como os peptídeos de modulina solúvel em fenol (PSM), assumindo papéis importantes na integridade e estruturação do biofilme (**Figura 1**) (LE, PARK, OTTO, 2018; KOT; SYTYKIEWICZ; SPRAWKA, 2018; GRAF *et al.*, 2019; JASINSKA *et al.*, 2021; ZAMMUTO *et al.*, 2023).

Figura 1 - Etapas de desenvolvimento do biofilme



Fonte: Trentin; Giordani; Macedo (2013)

O uso prolongado de dispositivos médicos implantáveis, principalmente em pacientes críticos, são as principais causas das infecções associadas ao biofilme relacionado aos SCoN. A adesão bacteriana e a formação de biofilme em superfícies bióticas, como tecidos biológicos do hospedeiro e abióticas, como a superfície lisa de biomateriais tem suma importância e são intensamente ligadas a autoprodução da matriz extracelular, constituída de EPS (também conhecidos como *slime*), proteínas, DNA extracelular e lipídeos. Essa matriz garante a comunidade organizada de células bacterianas formadoras do biofilme menor susceptibilidade a desinfetantes e agentes antimicrobianos, além de proteger contra mecanismos de defesa e imunidade do hospedeiro (UYANIK *et al.*, 2014; ZAMMUTO *et al.*, 2023).

A capacidade de biofilmes aderirem em superfícies abióticas é facilitada principalmente por proteínas de superfície como a adesina intercelular polissacarídica (PIA), constituída por poli-b(1-6)-N-acetilglicosamina e sendo reguladas pelo *operon icaADBC* (*locus ica*), composto por quatro genes, que codificam as proteínas necessárias para a geração da PIA. Também com papéis significativos na formação de biofilme, temos o gene *icaA* que faz mediação entre a

adesão intercelular de bactérias e o acúmulo de multicamadas de biofilme e o gene *icaD*, que tem papel importante na expressão máxima da N-acetil glucosaminil transferase, resultando na expressão da adesina capsular polissacarídica (PSA). O transporte do gene *icaA* associado a formação de biofilme e do gene *mecA* relacionado a resistência a oxacilina garantem aos SCoN a persistência por muito tempo no ambiente hospitalar (KOT; SYTYKIEWICZ; SPRAWKA, 2018; AHMED *et al.*, 2019; GRAF *et al.*, 2019; AL-HAQAN *et al.*, 2020; JASINSKA *et al.*, 2021).

Outro produto que tem sido associado à adesão do biofilme ao hospedeiro são as hidrolases peptídeoglicanas ou autolisinas, que promovem um papel importante na remodelação e degradação da parede celular bacteriana, além da atividade autolítica gerando a liberação de eDNA. No gênero *Staphylococcus*, a autolisina principal (Atl) é uma proteína homóloga de função semelhante, que facilita condições de crescimento, divisão e separação celular bacteriana, auxiliando diretamente no desenvolvimento do biofilme. O gene correspondente *atl* expressa uma proteína bifuncional com domínios amidase e glucosaminidase, que resulta numa adesão significativa em superfície de poliestireno (HEILMANN, ZIEBUHR, BECKER, 2019; PORAYATH *et al.*, 2018; KLUJ *et al.*, 2018; LEONARD *et al.*, 2023).

A proteína Bap (associada ao acúmulo do biofilme), foi originalmente identificada como fator de virulência em *S. aureus*, encontrado em mastite bovina. Mais tarde, os genes relacionados a essa proteína foram encontradas em SCoN também de mastite de animais e em amostras de pacientes hospitalares de *Staphylococcus cohnii* e *S. haemolyticus*. A proteína Embp, relacionada ao gene *ebp* de *S. epidermidis*, regula a adesão intercelular e a ligação a fibronectina (HEILMANN, ZIEBUHR, BECKER, 2019).

Quando as principais proteínas extracelulares e plasmáticas do hospedeiro, como a fibronectina, fibrinogênio, heparina e vitronectina, são associadas as proteínas Bap e Atl, há um maior fortalecimento da mediação dessa ligação associada a formação do biofilme (PORAYATH *et al.*, 2018).

A matriz do biofilme associado aos estafilococos é normalmente composta por polissacarídeos como a PIA, porém também pode conter outras proteínas, incluindo a proteína associada a acúmulo (Aap) e DNA extracelular. A aap é uma proteína ancorada na parede celular, codificada pelo gene *aap* e é composta por dois domínios A e B. O domínio A é primeiramente envolvido na adesão da bactéria a células epiteliais ou superfícies plásticas, e após esse primeiro momento ocorre a clivagem desse domínio, liberando o B que aumenta o acúmulo de célula a célula, proporcionando a formação do biofilme. Impressionantemente, já

foi relatada em estudos a possibilidade de espécies formarem biofilme através da aap, mesmo que sejam incapazes de produzir a PIA (ALABDULLATIF, RAMIREZ-ARCOS, 2018).

Fatores de virulência estafilocócica permitem a colonização comensal e sua persistência. Sendo as adesinas um dos fatores que permitem que as bactérias consigam se aderir aos componentes da matriz do hospedeiro, podendo se ligar ao colágeno, fibronectina, elastina, laminina e sialoproteína óssea. As proteínas de ligação à fibronectina (relacionados ao genes *fnbA* e *fnbB*) e a proteína de ligação ao colágeno (genes *cnb*) colaboram para a virulência em doenças invasivas, sendo frequentemente detectados em amostras estafilocócicas encontrados em infecções de pele e em pessoas de doença invasiva. Codificado pelo gene *epbS*, a proteína de ligação a elastina de *S. aureus* (EbpS) é uma proteína associada a superfície celular, que se liga a elastina, o principal componente da matriz extracelular da fibra elástica, promovendo a colonização de tecidos dos mamíferos. Já a interação com o fibrinogênio é facilitada por uma proteína ligadora de fibrinogênio (Fbe/SdrG), codificada pelo gene *fbp* (KOT; SYTYKIEWICZ; SPRAWKA, 2018; NOWROUZIAN *et al.*, 2021; MAURIN *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2022).

Na literatura, existem fortes evidências que a transferência horizontal de genes é também a responsável por transmitir o fator de virulência entre as espécies. Os reguladores chave da virulência nas infecções estafilocócicas são a codificação ou supressão de dois loci divergentes: do regulador de gene acessório (*agr*) e regulador do acessório estafilocócico (*sar*). O sistema *agr* modula fatores de virulência como proteases, lipases, nucleases e expressão de proteínas de ligação a superfície e *sar* pode tanto modular o sistema *agr* (formando um *locus agr* independente de proteínas associadas a parede celular) como modular a proteína de ligação a fibronectina, adesinas, proteína A e exoproteínas (MICHALIK *et al.*, 2020; SOARES; VIEGAS; CABRAL, 2022).

Quando comparamos as bactérias cultivadas de forma planctônicas (que pouco refletem as condições naturais desse microrganismo) com o biofilme, observamos diversas alterações nas taxas de crescimento, no metabolismo e no perfil de expressão gênica. Ou seja, quando se unem em um biofilme, acabam agregando características importantes de sobrevivência e geram uma grande dificuldade em seu tratamento, pois reduzem sua atividade metabólica e são protegidas pela matriz polissacarídica que o reveste, atuando como uma barreira protetora contra os agentes antimicrobianos e o próprio sistema imunológico de seu hospedeiro (GRAF *et al.*, 2019).

A terapia médica para tratar infecções associadas ao biofilme pode refletir em grandes desafios, incluindo primeiramente a abordagem dos riscos para o pacientes antes de

procedimentos, bem como a utilização de recursos do sistema de saúde sem excesso de custo. Por não existir um antimicrobiano disponível capaz de eliminar totalmente um biofilme já estabelecido em um dispositivo médico, seu controle deve ser realizado através de remoção cirúrgica do material contaminado e a inserção de um novo. Além disso, o entendimento da formação do biofilme microbiano e a busca de novas opções de tratamento, evitando a administração prolongada, são aspectos importantes para o conhecimento de pesquisas (LE, PARK, OTTO, 2018; CAMPOS-SILVA *et al.*, 2019).

É considerado um grave problema quando há a formação de biofilme em implantes de materiais artificiais, podendo levar a infecções. Isso pode ocorrer em dispositivos médicos que estão em contato direto com o sangue. Sua ocorrência, quando relacionada a pacientes submetidos a bioimplantes, tem aumentado de maneira significativa, tornando-se preocupante, pois o processo de adesão bacteriana influencia diretamente na morbimortalidade de pacientes e custos envolvidos. Neste caso, patógenos como *S. CoN* e *S. aureus*, utilizam-se tanto da exploração de componentes extracelulares e elementos plasmáticos para colonizar tecidos quanto buscam a proteção contra mecanismos imunológicos do hospedeiro (MORAES *et al.*, 2013; SUED-KARAM *et al.*, 2022).

Os biomateriais são dispositivos de origem natural ou sintética, que entram em contato com sistemas biológicos, podendo ter aplicações diagnósticas, vacinais, cirúrgicas ou terapêuticas. Para que sejam utilizados, é necessário o tratamento químico afim de eliminar a possibilidade de transmissão de microrganismos, como por exemplo o glutaraldeído em membrana de pericárdio bovino. Sua funcionalidade é diversa, podendo variar entre tecidos de partes moles, regeneração óssea, odontologia, ortopedia, substitutos de válvulas cardíacas, entre outros (PIRES *et al.*, 2015; ANJOS, 2015).

As infecções bacterianas constituem uma grave complicação no período pós-operatório. Durante as últimas décadas foram efetuadas inúmeras tentativas para evitar as infecções relacionadas pelos implantes ortopédicos. Entretanto, esses implantes estão sujeitos a infecções relacionadas a biofilmes bacterianos, incluindo superfícies de aço cirúrgico, que só podem ser erradicados por remoção traumática do implante e acompanhada por terapia antimicrobiana (DAROUICHE, 2004; EHRLICH *et al.*, 2006).

O conhecimento das propriedades físico-químicas de uma bactéria é importante para avaliar o seu processo de adesão bacteriana, onde há uma necessidade de obter parâmetros da superfície celular como o tipo de carga, relacionada diretamente aos grupos funcionais como carboxílicos fosfóricos, hidroxila e amina. Em superfícies de bactérias Gram-negativas, esses

grupos estão associados ao peptídeo glicano e ácidos teicóicos, enquanto para as Gram-negativas aos lipopolissacarídeos, fosfolipídeos e proteínas (HAMADI *et al.*, 2011).

A avaliação da hidrofobicidade bacteriana é um fator importante na capacidade do microrganismo aderir, invadir e causar danos ao hospedeiro, bem como estar influenciando diretamente na formação e desenvolvimento do biofilme em múltiplas superfícies, relacionando a diferentes espécies de microrganismos patogênicos. Para medir a hidrofobicidade, é utilizado a técnica de *Microbial Adhesion To Hydrocarbon (MATH)*, através da análise da interação ao hidrocarboneto alifático de cadeia longa, o *n*-Hexadecano (MATTOS-GUARALDI *et al.*, 1999; ROSEMBERG, 2006; PUBCHEM, 2022).

Esse tipo de fenótipo está sendo utilizado para avaliar situações associadas a diversas espécies de microrganismos como: formação de biofilme em *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosas*, microrganismos de solo que degradam petróleo, a influência de compostos naturais nos níveis de hidrofobicidade de *S. capitis*, formação do tubo germinativo e agregação celular em *Candida spp.*, entre outros (ROSEMBERG, 2006; KHUSRO *et al.*, 2020).

1.6 Células epiteliais de carcinoma nasofaríngeo - Linhagem Detroit 562

Dados recentes revelaram que espécies do gênero *Staphylococcus spp.*, anteriormente categorizadas como bactérias extracelulares, são, na verdade, capazes de invadir inúmeros tipos de células hospedeiras, fagócitos e células não fagocíticas como fibroblastos e células epiteliais, entre outras. Patógenos oportunistas podem ter uma variedade de fatores de virulência que facilitam a ligação com células e permitem a invasão tecidual. Quando relacionados aos *Staphylococcus spp.*, os sistemas reguladores como os loci *agr* e *sar*, responsáveis pela regulação de moléculas associadas a células, podem ser responsáveis pela associação bacteriana (VAN WAMEL 1998; SOUZA *et al.*, 2012; JASINSKA *et al.*, 2021).

Bactérias, quando internalizadas nas células hospedeiras, são capazes de induzir a apoptose e podem sobreviver e persistir de maneira intracelular por muitos dias. Além disso, elas podem possuir resistência aos agentes antimicrobianos e aos próprios componentes do sistema imune do hospedeiro, que dificultam a sua eliminação. A morte celular, quando induzida pelo *S. aureus*, por exemplo, é associada a capacidade de secretar toxinas citolíticas, como a toxina α (alfa) ou leucocidina de Pantón-Valentine (PVL). Porém quando relacionadas aos SCoN como *S. epidermidis*, raramente estão associadas a persistência celular, ainda que

associadas a infecções invasivas, devido possivelmente a um menor número de fatores de virulência em comparação ao *S. aureus* (SOUZA *et al.*, 2012; JASINSKA *et al.*, 2021).

Para que as espécies, principalmente do gênero *Staphylococcus*, iniciem e estabeleçam infecções, a adesão delas as células do hospedeiro é um passo inicial importante. Essas espécies expressam diversas proteínas e/ou adesinas como o MSCRAMM, que se ligam a compostos que constituem a superfície celular, como fibrinogênio, fibronectina, colágeno e outros. Após a adesão ao tecido, o biofilme do *Staphylococcus* spp. é capaz de se proliferar e produzir uma matriz extracelular, com componentes importantes como o PIA, eDNA, ácidos teicóicos e proteínas. O PIA é considerado essencial para a formação do biofilme e garante a evasão quanto a resposta imune do hospedeiro (JASINSKA *et al.*, 2021)

A célula epitelial humana Detroit 562 é derivada do líquido pleural de uma mulher adulta com carcinoma faríngeo primário. Essas células possuem uma enzima do tipo B glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), uma enzima codificada por um gene *housekeeping* que desempenha papel vital na prevenção de danos celulares em espécies reativas de oxigênio (ROS) (DOMON *et al.*, 2019; JASINSKA *et al.*, 2021; RICHARDSON; O'MALLEY, 2022).

Poucos estudos correlacionam o gênero *Staphylococcus* e associação a célula Detroit 562, sendo um dos primeiros estudos relacionados ao MRSA e essas culturas celulares (VAN WAMEL *et al.*, 1998). A maior parte dos dados obtidos na literatura estão associados aos *S. aureus*, onde alguns estudos avaliam juntamente outras espécies como, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *S. epidermidis*, também associados ao uso de compostos bactericidas, vírus ou outros microrganismos, que podem alterar a capacidade de associação bacteriana com a célula Detroit 562. (GREEN *et al.*, 2011; DOMON *et al.*, 2019; ARBELÁEZ *et al.*, 2021; JASINSKA *et al.*, 2021).

1.7 *Galleria mellonella*

A pesquisa translacional microbiológica, frequentemente utilizando mamíferos como padrão ouro, possui uma nova oportunidade para aumentar conhecimentos através do uso de modelos de animais invertebrados, como sistemas alternativos que incluem diversas formas como a infecção da corrente sanguínea de peixes, infecção de trato digestivo de *Caenorhabditis elegans* e o uso de insetos para avaliar diferentes aspectos da patogênese microbiana (JORJÃO *et al.*, 2018; CAMPOS-SILVA *et al.*, 2019; SHEEHAN, DIXON, KAVANAGH, 2019; SOARES; VIEGAS; CABRAL, 2022).

Estudos utilizando organismos vivos são necessários para a compreensão de mecanismos de interação, adesão e dano tecidual de patógenos. Um dos experimentos *in vivo* disponíveis para essa análise é a utilização do modelo de *Galleria mellonella*. A *G. mellonella* (Linnaeus, 1758), também chamada de grande mariposa da cera (*greater wax moth*), é uma lepidóptera pertencente à família *Pyralidae*, tem ampla distribuição geográfica e seu habitat consiste nas colmeias de abelhas do gênero *Apis*. É considerada uma das mais destrutivas pragas que infestam a apicultura, devido a alimentação de suas larvas ser a base de mel, pele da pupa das abelhas, pólen coletado pelas abelhas operárias, cera do favo de mel e as ninhadas (JORJÃO *et al.*, 2018; EL-ELA *et al.*, 2021; SOARES; VIEGAS; CABRAL, 2022).

A *G. mellonella* é considerada uma praga holometábola típica e apresenta quatro estágios de desenvolvimento: ovo, larvas, pré-pupa/pupa e inseto adulto, na forma de mariposa. Seus ovos são brancos ou levemente rosados e levam de 5 a 8 dias, na temperatura de 24-27°C, para eclodirem e se tornarem larvas. Já as larvas são brancas ou bege e medem de 1 a 23 mm, e levam em torno de 6 a 7 semanas para o próximo nível de desenvolvimento. Elas tecem fios de sedas em todos seus estágios de muda (8 a 10) e no último tece seu verdadeiro casulo (JORJÃO *et al.*, 2018; EL-ELA *et al.*, 2021; SOARES; VIEGAS; CABRAL, 2022).

Logo após, as larvas se tornam pupas avermelhadas e imobilizadas, e daí até virarem mariposa levam de 1 a 8 semanas, sem alimentação do inseto nesse período. As mariposas são avermelhadas ou bege claro, ativas durante a noite e podem colocar 50 a 150 ovos. Mariposas macho são ligeiramente menores e mais claras que as fêmeas, e as fêmeas apresentam probóscide bifurcada e palpos labiais projetando-se para frente com aparência de bico. Todo o ciclo de vida desse inseto corresponde a aproximadamente 40 dias, dependendo das condições ambientais como temperatura e oferta de alimento. As *G. mellonella* foram relatadas pela primeira vez associadas as colmeias de *Apis cerana* (Fabricius, 1793), espalhando-se mundialmente como uma importante praga (JORJÃO *et al.*, 2018; EL-ELA *et al.*, 2021; SOARES; VIEGAS; CABRAL, 2022).

Para estudos que necessitam análise da virulência de patógenos bacterianos ou fúngicos, medir toxicidade de compostos e determinar a atividade *in vivo* de antimicrobianos, correlacionados a humanos, as larvas de *G. mellonella* têm sido amplamente utilizadas como modelos experimentais alternativos de hospedeiros. Os inóculos no corpo dos hospedeiros são precisos e seu sistema imunológico tem alto grau de semelhança e funcionalidade com a dos mamíferos, envolvendo tanto respostas celulares como humorais. Assim é possível analisar a patogenicidade bacteriana e os determinantes de virulência de maneira similar ao uso dos modelos convencionais (GIBREEL; UPTON, 2013; JORJÃO *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2018;

CAMPOS-SILVA *et al.*, 2019; SHEEHAN, DIXON, KAVANAGH, 2019; SOUSA *et al.*, 2019; ANTOINE *et al.*, 2021; EMERY; BUTT; COATES, 2021; SOARES; VIEGAS; CABRAL, 2022).

Dentre os mecanismos de defesa pertencentes a *G. mellonella*, é possível observar a presença da primeira linha física de defesa, através da cutícula que reveste completamente o inseto, a base de quitina, um polissacarídeo formado por múltiplas camadas de N-acetilglicosamina. Logo que o patógeno ultrapassa essa barreira, identificam-se outras formas de defesa, a respostas imunes a celular e a humoral. A resposta imune celular nesse organismo consiste na utilização de hemócitos (semelhantes aos fagócitos em mamíferos), que tem como funções: fagocitose, encapsulamento, nodulação e coagulação da hemolinfa. Enquanto a resposta imune humoral é formada por diversos peptídeos que auxiliam na neutralização e eliminação do patógeno, como a melanina, responsável tanto pela melanização do patógeno quanto pela cicatrização do inseto, moléculas do tipo complemento e peptídeos antimicrobianos (JORJÃO *et al.*, 2018; SOARES; VIEGAS; CABRAL, 2022).

Outras diversas vantagens técnicas que esse modelo *in vivo* possui são o baixo custo de manutenção laboratorial, facilidade em seu manuseio (possibilitando trabalhos em larga escala), ausência de restrições éticas, susceptibilidade a diversos patógenos, produção de resultados em curto espaço de tempo e a fácil observação de resultado, pois uma vez infectada o corpo da larva escurece devido a melanização e a motilidade diminui, diferentemente de outros invertebrados. Larvas de *G. mellonella* têm sido usadas para estudar a virulência de bactérias, independentemente de suas características fenotípicas, sendo possível encontrar estudos relacionando as bactérias *S. aureus*, espécies de *Streptococcus* spp., *Corynebacterium ulcerans*, *Pseudomonas aeruginosas*, *Bacillus cereus*, dermatófitos, espécies de *Aspergillus* spp., *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* (GIBREEL; UPTON, 2013; JORJÃO *et al.*, 2018; ANDREA; KROGFELT; JENSSEN, 2019; CAMPOS-SILVA *et al.*, 2019; LOURÊDO, 2019; SHEEHAN, DIXON, KAVANAGH, 2019; SOUSA *et al.*, 2019; ANTOINE *et al.*, 2021; SOARES; VIEGAS; CABRAL, 2022).

Quando relacionadas a virulência das bactérias estafilocócicas, é sabido que os modelos de mamíferos são considerados “padrão ouro” nas análises, porém são complexos e de baixo rendimento. Quando há a utilização da *G. mellonella* como modelo *in vivo* de ensaios sobre virulência torna-se mais simples de iniciar, previsíveis, reproduzíveis e quantificáveis, além de relativamente mais rápidos. Essas larvas são utilizadas para testes da atividade de agentes antimicrobianos, sendo sua morte rápida nos ensaios, ser um possível marcador laboratorial

alternativo capaz de saber se tal espécie bacteriana é capaz de causar doença aguda grave (GIBREEL; UPTON, 2013; BOAKES *et al.*, 2016).

2 JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, espécies de SCoNs têm sido reconhecidos como importantes agentes etiológicos de processos infecciosos diversos, visto que é apontado como um dos principais agentes de IRAS, relacionados aos dispositivos médicos invasivos. O tratamento de infecções por esses patógenos tem se tornado cada vez mais um desafio para a saúde pública mundial, devido ao aumento da expressão da resistência bacteriana a múltiplos agentes antimicrobianos utilizados na prática clínica, despertando também o interesse de investigadores sobre os aspectos relacionados à patogenicidade e resistência aos antimicrobianos.

A capacidade de invadir células e tecidos dos hospedeiros é um dos mais importantes fatores de virulência relacionadas a infecções persistentes. Os mecanismos de patogenicidade de *S. capitis* e *S. hominis* ainda são pouco elucidados, porém, acredita-se que sua habilidade de causar infecção está diretamente relacionada a sua capacidade de formar biofilme.

Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que a capacidade de formação de biofilme em superfícies abióticas (cateteres de silicone e poliuretano, vidro, poliestireno) é capaz de favorecer a evolução de diferentes tipos de infecção causadas por amostras de SCoN. O uso de biomateriais implantáveis (como por exemplo: aço cirúrgico e membrana de pericárdio bovino), têm o objetivo de corrigir os mais diversos tipos de problemas relacionados à saúde humana, contudo a formação de biofilme nestes biomateriais gera grande preocupação a respeito da morbimortalidade dos pacientes.

Deste modo, estudos adicionais permanecem necessários para avaliar os processos multifatoriais de virulência que contribuem para a patogênese da sepse por *S. capitis* e *S. hominis*. É muito importante a compreensão mais profunda da patogenicidade das espécies em questão nesse estudo, para que possam ser elaboradas estratégias preventivas e terapêuticas eficientes contra as infecções relacionadas a esses patógenos nosocomiais, necessitando de cada vez mais políticas de saúde públicas, que reflitam no controle e vigilância dessas espécies. A capacidade desses microrganismos ultrapassarem as barreiras hematológicas ainda é motivo de investigação, pois os mecanismos envolvidos neste processo de invasão ainda não foram esclarecidos.

Sendo assim, é necessário então, que se estabeleça a vigilância permanente tanto da patogenicidade quanto da resistência dos *S. capitis* e *S. hominis* e aos antimicrobianos utilizados na clínica, além de ser imprescindível, medidas cuidadosas no controle de infecção para limitar a propagação de amostras multirresistentes dentro e fora das unidades de saúde.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo geral, investigar aspectos fenotípicos e genotípicos da capacidade de aderência e formação de biofilme em superfícies bióticas e abióticas, mecanismos de resistência e virulência, além da patogenicidade para larvas de *G. mellonella* de amostras de *S. capitis* e *S. hominis* isoladas de hemoculturas.

3.2 Objetivos específicos

- a) Identificação das amostras de SCoN, previamente isoladas de hemoculturas, por métodos fenotípicos e pela técnica de MALDI-TOF;
- b) Análise do perfil de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos diversos segundo Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST) através:
 - a. do teste de disco-difusão;
 - b. da determinação de concentração inibitória mínima (CIMs);
- c) Investigação da presença de perfis de multirresistência (MDR) aos agentes antimicrobianos testados;
- d) Pesquisa do gene codificador de resistência a oxacilina (*mecA*) através de ensaios de PCR;
- e) Avaliação dos seguintes aspectos quanto a capacidade de formação de biofilme:
 - a. Produção de *slime* em meio Agar Vermelho do Congo (CRA);
 - b. Formação de biofilme em superfícies abióticas (vidro, poliestireno, aço e cateter);
 - c. Formação de biofilme em superfície biótica (membrana de pericárdio bovino);
 - d. Pesquisa das propriedades hidrofóbicas utilizando ensaios com hidrocarboneto *n*-Hexadecano;

- e. Pesquisa dos genes *icaA*, *atl*, *fbp*, *aap*, *bap*, *fnbA* e *epbS*, codificadores de produção de *slime* e formação de biofilme utilizando ensaios de PCR;
- f. Análise morfológica e estrutural pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da formação de biofilmes em superfícies bióticas e abióticas;
- f) Investigação da capacidade da interação bacteriana através de ensaios de interação celular utilizando células epiteliais humanas da linhagem Detroit 562;
- g) Avaliação do potencial de virulência de amostras de diferentes perfis fenotípicos e genotípicos de *S. capitis* e *S. hominis* isoladas de sangue utilizando *G. mellonella* como modelo experimental de infecção;
- h) Realização do sequenciamento do DNA e análise genômica:
 - a. Extração, purificação, quantificação e análise da qualidade do DNA genômico para o sequenciamento do genoma bacteriano;
 - b. Sequenciamento, montagem e anotação do genoma bacteriano;
 - c. Confirmação taxonômica do genoma sequenciado.

4 METODOLOGIA

4.1 Origem e identificação das amostras bacterianas

Foram analisadas 18 amostras de SCoN previamente isoladas de hemoculturas de pacientes de diversos setores internados no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE/UERJ), durante os anos de 2010, 2013 e 2014. As amostras foram isoladas e caracterizadas preliminarmente no Laboratório de Bacteriologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto (LABAC/HUPE/UERJ).

Os microrganismos estudados foram obtidos da Bacterioteca do Laboratório de Difteria e Corinebacterioses de Importância Clínica – LDCIC – Disciplina de Microbiologia e Imunologia – FCM/UERJ, mantidos e estocados em solução de GC-Glicerol a 20% (Medium Base, Difco Labs, Detroit, MI, USA), em temperatura de -20°C (até o momento da realização dos testes).

Testes fenotípicos foram realizados para a identificação preliminar das amostras, incluindo: semeadura em Ágar *Chapman*, coloração de Gram, testes de produção de catalase, coagulase e desoxirribonuclease (DNase). As amostras foram semeadas em Ágar Sangue de Carneiro 5% para verificar a produção de hemólise, além da morfologia celular e pureza da cultura bacteriana (KONEMAN *et al.*, 2008).

4.2 Identificação bacteriana pela técnica de MALDI-TOF

As amostras preliminarmente isoladas e identificadas no LABAC/HUPE/UERJ, tiveram sua identificação confirmadas por MALDI-TOF e analisadas no LDCIC, pelo método direto de identificação (THEEL *et al.*, 2012; WOUDSTRA *et al.*, 2023). Os perfis de proteínas bacterianas obtidos foram comparados com um banco de dados de espectros de massa de referência bacteriana para identificação rápida no gênero e espécie, e foi considerado o *score* $\geq 1,900$ para confiabilidade da identificação das espécies estudadas.

As amostras foram semeadas em Agar Muller Hinton e incubadas a 35 °C por 24 horas. Em seguida, as amostras foram tocadas com um auxílio de alça bacteriológica estéril e depositada na placa metálica (*Sample target*) fornecida pelo fabricante do equipamento MALDI-TOF Microflex LT (Bruker Daltonics) de modo a conter ao menos 10^5 células

microbianas em cada poço. Em seguida, foi adicionado aos poços 1µl de ácido fórmico a 70% afim de obter a extração da bactéria alvo. A placa inoculada foi então mantida em fluxo laminar até a completa secagem do material depositado. A cada poço da placa metálica foi depositado 1µl da matriz composta por ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA, Sigma; Saint Louis, MO, EUA) preparado em acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético 2,5% (Sigma; Saint Louis, MO, EUA). Após secagem da mistura e a formação dos cristais, a placa de metal foi inserida no aparelho para a leitura das amostras. Os espectros de massa das amostras foram obtidos no modo linear, observando os seguintes parâmetros: frequência do laser 20 Hz; voltagem das fontes iônicas 1 e 2,20 kV e 18,6 kV, respectivamente; e faixa de peso molecular 2.000 a 20.000 Da.

Espectros foram coletados através da somatória de 240 disparos do laser, adquiridos através de quatro grupos de 60 disparos lançados em regiões distintas, aleatoriamente selecionadas, em um poço na placa metálica. Os espectros obtidos foram processados pelo software de bioinformática MALDI Biotyper versão 3.1 (Bruker Daltonics) em modo operacional padrão, o qual realiza a pesquisa em sua biblioteca de espectros de referência de maneira a encontrar aquele que mais se assemelha ao obtido com a amostra.

4.3 Análise dos perfis de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos

Foi realizado o método de disco-difusão para a determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, segundo BrCAST (2021, 2023), utilizando os seguintes antimicrobianos: benzilpenicilina (PEN; 10µg), cefoxitina (CFO; 30µg), ciprofloxacino (CIP; 5µg), norfloxacino (NOR; 10µg), gentamicina (GEN; 10µg), eritromicina (ERI; 15µg), clindamicina (DA; 02µg), tetraciclina (TET; 30µg), linezolida (LZD; 10µg), rifampicina (RIF; 05µg) e sulfazotrim (SXT; 25µg) (OXOID, Hants, UK). Foram consideradas como amostras multirresistentes (MDR), as amostras resistentes a três ou mais classes diferentes de antimicrobianos, de acordo com Magiorakos e colaboradores (2012).

Também foram realizados os testes de determinação de concentração inibitória mínima (CIM) em placas de microtitulação para vancomicina, teicoplanina e gentamicina, para os antimicrobianos linezolida e moxifloxacino foram utilizados tiras de gradiente Etest® (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) segundo normas estabelecidas pelo BrCAST (2023). O preparo da técnica foi feito com a produção da solução padrão onde foi pesado 10mg do antimicrobiano desejado, adicionado os solventes e diluentes específicos para cada

antimicrobiano e em seguida a solução foi filtrada através de uma membrana filtrante. Partindo da solução padrão, foi retirada uma alíquota que foi calculada pela fórmula: $C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$, onde C_i é a concentração inicial da solução; V_i é o volume inicial que vamos retirar da solução padrão 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 padrão. 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 a determinação da CIM. O último poço foi a amostra controle, onde foi colocado apenas o inóculo, sem adição de antimicrobianos. Conforme estabelecido pelo BrCAST (2023), para vancomicina - CIM $\leq 4\mu\text{g/ml}$ sensíveis e CIM $> 4\mu\text{g/ml}$ resistentes; teicoplanina - CIM $\leq 4\mu\text{g/ml}$ sensíveis e CIM $> 4\mu\text{g/ml}$ resistentes; gentamicina - CIM $\leq 2\mu\text{g/ml}$ sensíveis e CIM $> 2\mu\text{g/ml}$ resistentes; linezolida - CIM $\leq 4\mu\text{g/ml}$ sensíveis e CIM $> 4\mu\text{g/ml}$ resistentes e moxifloxacino – CIM $\leq 0,25\mu\text{g/ml}$ sensíveis e CIM $> 0,25\mu\text{g/ml}$ resistentes.

4.4 Avaliação da capacidade de formação de biofilme

As amostras de *S. hominis* e *S. capitis* foram previamente semeadas em Ágar Muller Hinton por 24 horas a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ e submetidas aos seguintes ensaios:

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

A capacidade da produção de *slime* foi avaliada pelo método de crescimento em Ágar Vermelho do Congo (CRA) (CHAIEB *et al.*, 2005; SUED *et al.*, 2017), onde as amostras foram semeadas em placa, em forma de *spot*, em triplicata, e incubadas por 18-24 horas a 37°C e, posteriormente, por 24 horas a temperatura ambiente (aproximadamente 30°C). Foram utilizadas as amostras de *S. epidermidis* ATCC 35984 como controle positivo e ATCC 12228 como controle negativo. Colônias negras demonstram resultado positivo e colônias vermelhas (ou de coloração rosa avermelhada) negativo.

4.4.2 Determinação da intensidade de aderência ao vidro

A aderência ao vidro foi avaliada, de maneira semiquantitativa, a partir do uso de tubos 13 x 100 mm contendo 5ml de Trypticase soy broth (TSB). Alíquotas das suspensões bacterianas (10^8 bactérias/ml) foram inoculadas nos tubos e incubadas por 48 horas a 37°C. A cada 48 horas, 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 – fortemente aderente; II (++) - bactérias aderidas nas laterais do tubo de vidro – moderadamente aderente; III (+) – bactérias formando um anel na interface entre o meio de cultura e o ar – fracamente aderente; e IV (-) ausência de bactérias aderidas – não aderente. Como controle positivo foi utilizada a amostra de *S. epidermidis* ATCC 35984 (MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1991).

4.4.3 Avaliação da formação de biofilme em superfície de poliestireno

A formação de biofilme em microplacas de poliestireno foi avaliada quantitativamente através de uma modificação do método descrito previamente por STEPANOVIC et al (2000), em que as amostras foram suspensas em TSB até atingir uma turvação equivalente a 0,5 McFarland e cultivadas a 37°C por 24 horas. Uma alíquota de 200µl de suspensão bacteriana em TSB foi dispensada em cada poço de placas de microtitulação de poliestireno contendo 96 poços. A microplaca foi incubada a 37°C por 24 horas e, em seguida, lavada 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 microplaca deixada em temperatura ambiente para secagem. Em seguida, 200µl de cristal violeta a 0,2% foram colocados em cada poço por 5 minutos e a microplaca foi lavada exaustivamente com água destilada. Depois de seca, foram adicionados aos poços 200µl de ácido acético a 33%, a fim de eluir o corante. A avaliação de formação de biofilme foi realizada pela leitura de cada poço utilizando espectrofotômetro (570nm). Todos os ensaios foram feitos em triplicata. Foram utilizados como controle positivo para o teste as amostras de *S. epidermidis* ATCC 12228 e como controle negativo, TSB estéril. Foi calculada a média dos valores da densidade óptica (DOc) dos três poços referentes ao controle negativo. De acordo com o valor dessa média, a habilidade da formação de biofilme das amostras foi classificada como: não aderentes (-),

fracamente aderentes (+), moderadamente aderentes (++) e fortemente aderentes (+++), como descrito na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Critérios utilizados para classificação de acordo com a aderência e formação de biofilme

Critério	Classificação da amostra
$DO \leq DOc$	não aderentes (biofilme -)
$DOc < DO \leq 2xDOc$	fracamente aderentes (biofilme +)
$2xDOc < DO \leq 4xDOc$	moderadamente aderentes (biofilme ++)
$DO > 4xDOc$	fortemente aderentes (biofilme +++)

Legenda: DO – densidade óptica da amostra; DOc – densidade óptica do controle negativo
Fonte: Stepanovic *et al* (2000).

4.4.4 Aderência ao hidrocarboneto *n*-Hexadecano

Foram preparadas suspensões com as amostras de *S. capitis* e *S. hominis* utilizando PBS em absorbância (DO) de aproximadamente 0.8 ($\lambda=570\text{nm}$) e aferidos em espectrofotômetro B295II (Micronal, Rio de Janeiro, RJ - Brasil). Em seguida, 2ml das suspensões bacterianas foram recobertas com uma camada de 400 μl de *n*-hexadecano (Sigma) e agitadas por um minuto em vórtex. Após 15 minutos, em temperatura ambiente, as fases se separam espontaneamente e a absorbância da suspensão bacteriana foram aferidas novamente. O percentual de partição da fase do hidrocarboneto foi determinado a partir da absorbância (DO) do inóculo bacteriano inicial da seguinte forma: [suspensão bacteriana inicial (DO 570nm) – fase aquosa após 15 minutos (DO 570nm)] / suspensão bacteriana inicial (DO 570nm)] x 100. Amostras apresentando afinidade ao hidrocarboneto inferior a 50% foram consideradas hidrofílicas (MATTOS-GUARALDI; FORMIGA; ANDRADE, 1999)

4.4.5 Pesquisa da aderência bacteriana em cateteres de poliuretano e de silicone (técnica de rolamento)

Essa técnica foi realizada segundo Gomes (2013) e Pereira (2014), onde as amostras foram retiradas do estoque e semeadas em Agar Mueller Hinton (AMH) e incubadas por 24

horas a 37°C. Em seguida uma colônia foi selecionada, semeada em TSB por 48 horas a 37°C em aerobiose. Posteriormente, esse caldo foi centrifugado a 3000rpm por 10 minutos e lavados 2X com PBS. A partir do sedimento, foi feita uma suspensão bacteriana padronizada em tampão PBS para obter uma turbidez equivalente a 0,5 da escala de McFarland que equivale a concentração de 10^8 microrganismos/ml. Logo, foram semeadas diluições de 1:100 e 1:1000 em AMH, incubadas a 37°C por 48 horas para realizar a contagem de unidade formadoras de colônias (UFC).

Para etapa inicial de interação das amostras de *S. hominis* e *S. capitis*, com os cateteres de poliuretano e silicone, um segmento de 4 a 5 cm de cateter estéril foi imerso na suspensão bacteriana (diluída 1:100) por 48 horas a 37°C. Posteriormente, o segmento de cateter foi retirado da suspensão bacteriana e o excesso de fluido da sua superfície e do lúmen foi removido através de agitação manual. Cada segmento de cateter foi então colocado em tubo estéril contendo 1ml de água estéril e homogeneizado por agitação em vórtex por 1 minuto.

Após passar pelo vórtex, foi feito o rolamento do segmento do cateter na superfície da placa de ágar sangue com o objetivo de verificar a presença de microrganismos aderidos (Maki *et al.*, 1977). Esse procedimento foi realizado em triplicata para cada amostra, e em seguida foi feita a média do crescimento bacteriano das UFC obtidas nas culturas a fim de se calcular o índice de aderência.

4.4.6 Análise estrutural dos biofilmes pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Foram avaliadas por MEV, amostras representantes de SCoN. Primeiramente foi obtida a produção de biofilme, segundo Stepanovic (2000), acrescentando pequenos segmentos de 0,5cm de implante ósseo de aço ou pericárdio bovino estéreis. O conteúdo de cada poço foi aspirado e lavado duas vezes com 1ml 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 (PEREIRA-RIBEIRO *et al.*, 2019). O controle negativo foi realizado com segmentos de implantes ósseo de aço ou pericárdio bovino estéreis, os quais também foram processados diretamente após a remoção da embalagem comercial.

4.4.7 Avaliações quantitativas da aderência em superfície de aço

Os ensaios foram realizados em microplacas de 24 poços, cada poço contendo 500µl de suspensões bacterianas em TSB (~10⁸ UFC/ml) e fragmentos de 0,5cm de implantes de aço estéreis e então, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Posteriormente os fragmentos foram transferidos para tubos contendo 500µl de salina e areia estéril e com auxílio do vórtex as células sésseis foram extraídas por abrasão. As suspensões obtidas foram submetidas à diluição seriada, para a contagem de bactérias viáveis em placa de Mueller Hinton (SOUZA *et al.*, 2015).

4.4.8 Avaliações quantitativas da aderência em superfície de pericárdio bovino

Os ensaios foram realizados em microplacas de 24 poços, cada poço contendo 500µl de suspensões bacterianas em TSB (~10⁸ UFC/ml). Fragmentos de 0,5 cm de membrana de pericárdio bovino estéril e então, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Posteriormente os fragmentos foram transferidos para tubos contendo 500µl de salina e areia estéril e com auxílio do vórtex as células sésseis foram extraídas por abrasão. As suspensões obtidas foram submetidas à diluição para a contagem de bactérias viáveis em placa de Mueller Hinton (SUED-KARAM *et al.*, 2022).

4.5 **Deteção de genes *mecA* (resistência), *icaA*, *atl*, *fbp*, *aap*, *bap*, *fnbA* e *epbS* (biofilme) pela técnica de PCR**

Ensaio de deteção da presença dos genes *mecA*, *icaA*, *atl*, *fbp*, *aap*, *bap*, *fnbA*, *epbS* foram realizadas pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os oligonucleotídeos descritos no **Tabela 2**.

A extração do DNA bacteriano foi realizada de acordo com Andrade-Oliveira e colaboradores (2020). Três a cinco colônias de cada amostra cultivada em AMH foram suspendidas em eppendorfs contendo solução de lise composta por 200µl de Chelex-100 (Bio-Rad, Richmond, CA) a 5% e 2µl de Proteinase-K (Invitrogen) a 20ng/ml. Foram mantidos a 56°C por 1 hora, homogeneizados por 10 segundos no vórtex e incubados a 100°C por 10 minutos. Do mesmo modo, os eppendorfs foram homogeneizados por 10 segundos utilizando

o vórtex e centrifugados a 12.000rpm por 3 minutos. Em seguida, foram coletados os sobrenadantes com DNA liberado e usados para a reação de PCR.

Os ensaios de PCR para o gene *mecA* foi realizado segundo Pereira-Ribeiro e colaboradores (2019). 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 *mecA*-F e *mecA*-R, 1,5U de Taq DNA polimerase (Biotools, Madrid, Espanha), 5µl do tampão da enzima 10X (10mM 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 ensaios de PCR para os genes *icaA* e *bap* foram realizadas segundo Potter e colaboradores (2009). A amplificação foi realizada em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient), utilizando volume total de 50µl para a reação composta de 3µl de DNA liberado, 200µM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) (Life Technologies), 50 pmol de cada primer *forward* e *reverse* (1µl), 2,5U de Taq DNA polimerase (Biotools, Madrid, Espanha), 2,5µl de tampão 10X Buffer (Sigma) (10mM Tris HCl, 25mM KCl) e 3mM de MgCl₂. A reação de amplificação realizada foi programada para desnaturação inicial de 92°C por 3 min, seguido de 30 ciclos de 92°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, seguido de uma etapa final de extensão de 72°C por 5 minutos.

Os ensaios de PCR para os genes *fbp* e *atl* foram realizadas segundo Barros e colaboradores (2015). A amplificação foi realizada em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient), utilizando volume total de 50µl para a reação composta de 3µl de DNA liberado, 250µM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) (Life Technologies), 25 pmol de cada primer *forward* e *reverse* (1µl), 1,0U de Taq DNA polimerase (Biotools, Madrid, Espanha), 2,5µl de tampão 10X Buffer (Sigma) (10mM Tris HCl, 25mM KCl) e 1,5mM de MgCl₂. A reação de amplificação realizada foi programado para desnaturação inicial de 92°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 92°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, seguido de uma etapa final de extensão de 72°C por 5 minutos.

O ensaio de PCR para o gene *aap* foi realizada segundo Araújo e colaboradores (2006). A amplificação foi realizada em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient), utilizando volume total de 25µl para a reação composta de 3µl de DNA liberado, 250µM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) (Life Technologies), 25pmol de

cada primer *forward* e *reverse* (1µl), 1,0U de *Taq* DNA polimerase (Biotools, Madrid, Espanha), 2,5µl de tampão 10X (Sigma) (10mM Tris HCl, 25mM KCl) e 50mM de MgCl₂. A reação de amplificação realizada foi programado para desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, e uma etapa final de extensão de 72°C por 5 minutos.

Os ensaios de PCR para os genes *fnbA* e *epbS* foram realizados segundo Serray e colaboradores (2016). A amplificação foi realizada em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient), utilizando volume total de 50µl para a reação composta de 5µl de DNA liberado, 200µM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) (Life Technologies), 100pmol de cada primer *forward* e *reverse* (1µl), 2,5U de *Taq* DNA polimerase (Biotools, Madrid, Espanha), 2,5µl de tampão 10X (Sigma) (10 mM Tris HCl, 25mM KCl) e 1.5mM de MgCl₂. A reação de amplificação realizada foi programado para desnaturação inicial de 94°C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos de 94°C por 45 segundos, 50°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, e uma etapa final de extensão de 72°C por 7 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*).

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

Gene	Sequência do Primer 5' → 3'	Tamanho do Amplicon (pb)	Referência
<i>mecA</i> F	TAG AAA TGA CTG AAC GTC CG	154 pb	Pereira-Ribeiro <i>et al</i> , 2019
<i>mecA</i> R	TTG CGA TCA ATG TTA CCT AG		
<i>icaA</i> F	CGA TGG GCT CAA GGT GG	287pb	Potter <i>et al</i> , 2009
<i>icaA</i> R	TTC TTT TCG TAG CGA CTG TC		
<i>bap</i> F	ATG GGA AAT AAA CAA GGT TTT TTA CC	694pb	Potter <i>et al</i> , 2009
<i>bap</i> R	CTT CTT GTT GTT TAT CTG GGC TC		
<i>fbp</i> F	GGT GAT ACC ATT TAC CGC AC	512pb	Barros <i>et al</i> , 2015
<i>fbp</i> R	CGT GCA TCG TAG TAG CGA TC		
<i>atl</i> F	TAA CTC AAC AAT CGA TGG CG	446pb	Barros <i>et al</i> , 2015
<i>atl</i> R	GTA CCC CAA GGT GCT ACT TG		
<i>aap</i> F	CAA CGA AGG CAG AAG AAG GA	719pb	Araújo <i>et al</i> , 2006
<i>aap</i> R	CAT CCC CAT CTT TCT TGC TG		
<i>fnbA</i> F	CAT AAA TTG GGA GCA GCA TCA	127pb	Serray <i>et al</i> , 2016
<i>fnbA</i> R	ATC AGC AGC TGA ATT CCC ATT		
<i>epbS</i> F	AGA ATG CTT TTG CAA TGG AT	652pb	Serray <i>et al</i> , 2016
<i>epbS</i> R	AAT ATC GTC AAT GCA CCG AT		

Legenda: pb = pares de bases; F= primer Forward; R = primer Reverse.

Fonte: A autora, 2023.

4.6 Associação bacteriana com células epiteliais de carcinoma nasofaríngeo humano da linhagem DETROIT 562

Os ensaios de interação bacteriana com células epiteliais de carcinoma nasofaríngeo humano da linhagem DETROIT 562 foram realizados baseados em metodologias previamente descritas (HIRATA JR *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2010). Quantidades equivalentes a 5×10^6

células/ml foram utilizadas para a obtenção de tapete confluyente para ensaios de associação bacteriana, em placas de microtitulação próprias para cultura de células de 96 poços (Corning, USA).

Para a realização dos ensaios de cultura de células, cultivos estacionários foram lavados e ressuspensos em meio de cultura MEM (Eagle's Minimal Essential Medium; Sigma Chemical co., St Louis, MO, USA). As células bacterianas foram lavadas três vezes com PBS (0,01M; pH 7,2) e ressuspensas em MEM até alcançar a DO_{1,0} ($\lambda = 570\text{nm}$). O inóculo bacteriano foi ajustado para uma contagem de 5×10^8 UFC/ml, equivalente à DO 1,0 de absorbância ($\lambda = 570\text{nm}$) aferido em espectrofotômetro B295 II (Micronal) e utilizado para infectar as monocamadas (MOI 100). As monocamadas celulares foram infectadas com 100 μl das suspensões bacterianas e incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ no período de 1 hora. Após os períodos de infecção, 10ml do meio de cultivo celular foram reservadas para a contagem de bactérias viáveis livres no sobrenadante e os tapetes celulares foram lavados 3 vezes com PBS para eliminação das bactérias não associadas e de resíduos do meio de cultivo celular. Os tapetes celulares foram, então, tratados com PBS contendo 0,1% de Triton X 100 por 30 segundos, para que as células fossem lisadas. As contagens de UFC/ml viáveis presentes no inóculo, sobrenadantes de cultivos infectados e lisados, foram obtidas por diluição seriada e cultivo em placas de AMH (HIRATA JR *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2010).

4.7 Ensaio *in vivo* de interação, infecção e letalidade utilizando larvas de *Galleria mellonella*

O ensaio *in vivo* de interação, infecção e letalidade utilizando larvas de *Galleria mellonella* foram realizados baseados em metodologias previamente descritas por Wang e colaboradores (2019), com modificações.

Foram previamente selecionadas três amostras representativas de cada espécie do estudo, sendo H2, H4 e H9 (três amostras de *S. capitis*) e H14, H15 e H18 (três amostras de *S. hominis*), para a análise de patogenicidade, utilizando larva de *G. mellonella* como modelo *in vivo*. Após a triagem randomizada, cinco larvas (em estágio final larval) pesando entre 200 e 250mg foram obtidas para cada amostra bacteriana a ser avaliada. Utilizando uma seringa *Hamilton* de precisão de 50 μl , 10 μl de suspensão bacteriana correspondente a 5×10^8 CFU/ml de tampão salina fosfato (PBS), foi injetada na última *proleg* esquerda de cada larva.

Posteriormente, as larvas foram incubadas com nenhuma luminosidade a 25°C, sendo observadas e avaliadas a cada 24 horas durante cinco dias. Essa avaliação da virulência em resposta a infecção tem como parâmetros principais a resposta a estímulos físicos e a melanização da larva, podendo variar a coloração de castanho a negro. Além de também ser investigada a letargia dos animais, bem como a alteração na atividade da formação dos casulos (**Figura 2**).

Figura 2 – Conformidades da larvas de *G. mellonella* em situações diversas, desde sua forma viva natural, infectada e até total óbito



Legenda: Larva de *G. mellonella* sem contaminação (A); Larva de *G. mellonella* com foco de infecção e processo significativo de melanização (B); Larva de *G. mellonella* em óbito, completamente escurecida (C).
Fonte: A autora, 2023.

4.8 Sequenciamento genômico

4.8.1 Extração e purificação do DNA genômico

A extração e purificação do DNA genômico foi realizada com a utilização do kit QIAamp® DNA Mini and Blood Mini (Qiagen), de acordo com as modificações descritas por Nakao e Popovic (1997), com acréscimos na etapa de lise bacteriana, pela utilização de 2 µl de solução de lisostafina (5mg/ml) (Sigma) e 2 µl de solução de mutanolisina (5000U/ml) (Sigma) concomitante a solução de lise do kit, e no volume de eluição do DNA bacteriano que foi alterado para 100 µl.

Inicialmente, foi realizada uma suspensão bacteriana com o isolado em 2 ml de tampão fosfato (pH 7.2). Em seguida, a suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 7.500 rpm. O

sobrenadante foi descartado, o sedimento foi suspenso em 170 µl da solução de 10 mM Tris-HCl (pH 8.0); 1mM EDTA, 10 µl da solução de lisozima a 100mg/ml, 2 µl de solução de lisostafina e 2 µl da solução de mutanolisina e a suspensão foi incubada por 30 minutos a 37°C. Após a incubação, foi adicionado 25 µl de proteinase K e 200 µl do tampão AL, seguida por homogeneização por vórtex e incubação por 2 horas a 70°C e por 30 minutos a 95°C. Por fim, após o período de incubação a suspensão foi centrifugada brevemente para retirar a água de condensação da tampa do microtubo.

A purificação do DNA extraído foi realizada após precipitação do DNA em 200 µl de etanol (96-100%) e homogeneização por vórtex por 15 segundos. A suspensão foi centrifugada para a remoção das gotículas da tampa do microtubo e todo o conteúdo foi transferido para outro microtubo com a coluna de purificação oferecida pelo kit e centrifugado por 1 minutos a 8.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e a coluna foi colocada em um novo microtubo. Foi adicionado na coluna, 500 µl do tampão AW1 e novamente centrifugado por 1 minutos a 8.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e a coluna foi colocada em um novo microtubo. Foi adicionado 500 µl do tampão AW2 e centrifugado por 3 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e a coluna foi colocada em um novo microtubo e novamente foi realizada uma centrifugação por 1 minuto a 14.000 rpm para retirar todo o resíduo de tampão que possa ter ficado retido na coluna. Por último, a coluna foi colocada em um novo microtubo e 100 µl de água ultrapura foram adicionados e deixado incubando em temperatura ambiente por 1 minuto. Uma última centrifugação foi realizada para a eluição do DNA bacteriano por 1 minutos a 8.000 rpm.

O DNA bacteriano foi conservado a -20 °C para posterior utilização no processo do sequenciamento genômico.

4.8.2 Quantificação do DNA genômico

A quantificação do DNA purificado foi realizada pelo método fluorométrico com a utilização do fluorômetro Qubit™ 4 (Invitrogen™) utilizando o kit Qubit dsDNA HS (Invitrogen™) de acordo com as instruções do fabricante. Após realizada a calibração do aparelho, a quantificação do DNA da amostra foi realizada com a utilização de 2 µl de DNA bacteriano.

4.8.3 Avaliação da qualidade de DNA genômico

Avaliação da qualidade do DNA genômico purificado foi realizada pelo método de espectrofotometria ótica com a utilização do Espectrofotômetro DS-11 Denovix (Life Science Technologies) usando uma razão de absorbância de 260 nm a 280 nm (A260/A280). Uma alíquota de 1 µl do DNA bacteriano foi utilizada para a realização da leitura ótica. Amostras com a relação A260/A280 dentro do intervalo de 1,8–2,0 foram consideradas de boa qualidade.

4.8.4 Sequenciamento, montagem e anotação do genoma bacteriano

A reação de sequenciamento do genoma foi realizada na Plataforma de Sequenciamento de Alto Desempenho da Patologia da FCM/UERJ, utilizando o sequenciador Illumina NextSeq 550 (Illumina). O preparo da biblioteca foi feito usando o kit DNA Illumina Nextera XT (Illumina). A quantificação da biblioteca foi avaliada através do método fluorométrico com a utilização do fluorômetro Qubit™ 4 (Invitrogen™) utilizando o kit Qubit dsDNA HS (Invitrogen™). A análise do tamanho da biblioteca foi realizada com o kit High Sensivity D1000 (Agilent) pelo sistema TapeStation (Agilent). Uma vez disponível a biblioteca com tamanhos esperados, esses fragmentos de DNA foram ligados aos adaptadores em ambas as extremidades (*paired-end reads*), gerando sequências identificadas como R1 e R2 no formato *fastq*. As leituras geradas tiveram a qualidade checada com a utilização do programa FastQC, versão 0.11.2 (ANDREWS, 2010). Após a avaliação da qualidade, o genoma foi montado utilizando o programa SPAdes (BANKEVICH *et al.*, 2012). Os contigs gerados na montagem dos genomas foram alinhados e ordenados utilizando o programa Mauve, versão 2.0 (DARLING; MAU; PERNA, 2010), usando como referência o genoma da cepa tipo *Staphylococcus capitis* CCM 2734 (BMDL00000000). O grau de contaminação do genoma foi realizado pelo programa Contamination Estimator by 16S (ContEst16S) (LEE *et al.*, 2017). Após o alinhamento e verificação de contaminantes, o genoma foi anotado pelo *Prokariotic Genome Annotation do National Center for Biotechnology Information* (NCBI), onde foi depositado.

4.9 Taxonomia genômica bacteriana

A sequência completa do genoma da cepa tipo *Staphylococcus capitis* CCM 2734 disponível no repositório público GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>) será utilizada como referência para as análises da taxonomia genômica bacteriana.

A identificação molecular pela similaridade e filogenia do gene 16S rRNA será realizada entre as espécies mais relacionadas ao isolado bacteriano de acordo com os valores obtidos pelo banco de dados da plataforma EZBioCloud, com a utilização do software 16S-based ID restrito para as espécies válidas (YOON *et al.*, 2017). Para a realização do estudo filogenético, as sequências mais relacionadas com a sequência do gene 16S da amostra H2 foram alinhadas com a utilização do programa ClustalX2.0 (THOMPSON *et al.*, 1997). A reconstrução da árvore filogenética foi realizada pelo programa MegaX (KUMAR *et al.*, 2018) com a utilização do método Neighbor-Joining, a partir de um modelo de referência de Kimura 2 parâmetros (KIMURA, 1980). A robustez da topologia foi realizada através da análise de *bootstrap* (1000 réplicas).

Adicionalmente, o grau de similaridade genômica da linhagem foi estimado conforme descrito anteriormente por Thompson e colaboradores (2013). A hibridização DNA-DNA digital (dDDH) foi realizada para avaliar a similaridade genômica com a utilização da calculadora genômica Genome-to-Genome Distance Calculator 3.0 (GGDC) (<http://ggdc.dsmz.de/ggdc.php#>) (MEIER-KOLTHOFF *et al.*, 2013), a identidade média de nucleotídeos (ANI) e aminoácidos (AAI) foram realizadas com a utilização dos softwares ANI Calculator (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/>) (GORIS *et al.*, 2007) e AAI Calculator (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/aai/>) (RODRIGUEZ-R; KONSTANTINIDIS, 2014), respectivamente. A análise taxonômica baseada em todo o genoma foi realizada pelo servidor gratuito Type Strain Genome Server (TYGS) (<https://tygs.dsmz.de>) (MEIER-KOLTHOFF; GÖKER, 2019).

Paralelamente, a análise de sequência multilocus (MLSA) foi realizada baseada nas sequências completas de seis genes de manutenção de acordo com protocolos previamente propostos para *Staphylococcus* spp. (SONG *et al.*, 2019). Para tanto, as sequências completas dos seis genes de manutenção: aminoacetiltransferase (*femA*), proteína de divisão celular (*ftsZ*), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gap*), uridilato quinase (*pyrH*), cadeia beta de RNA polimerase (*rpoB*) e fator de alongamento Tu (*tuf*) foram utilizadas. As seis sequências gênicas das espécies filogeneticamente relacionadas às linhagens deste estudo foram procuradas diretamente do GenBank ou recuperadas de sequências de genoma. Após a busca, elas foram

alinhas e trimadas separadamente com a utilização dos softwares ClustalX 2.0 (THOMPSON *et al.*, 1997) e BioEdit 7.2.5 (HALL, 1999), respectivamente, para que todos os genes tivessem o mesmo tamanho. Por fim, os genes foram concatenados na seguinte ordem: *femA-ftsZ-gap-pyrH-rpoB-tuf*. A análise filogenética foi calculada pelo método de máxima verossimilhança e o modelo inferência de Kimura 2 parâmetros (KIMURA, 1980). A robustez da topologia foi realizada através da análise de *bootstrap* (1000 réplicas).

Por fim, a análise da superárvore baseada no genoma completo das linhagens deste estudo foi realizada com a utilização do servidor Type Strain Genome (<https://tygs.dsmz.de>) (TYGS) versão 3.0 (MEIER-KOLTHOFF; GOKER, 2019).

4.10 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism, versão 9.0, considerando o intervalo de confiança de 95%. Para a avaliação foram utilizados testes estatísticos Anova (para análises quantitativas) e Kaplan-Meyer (para análise da sobrevivência de *G. mellonella*). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos, pelos menos, três vezes.

5 RESULTADOS

5.1 Origem e identificação das amostras

A identificação a nível de espécie das 18 amostras de SCoN previamente isoladas de hemoculturas obtidas de pacientes hospitalizados no HUPE/UERJ durante os anos de 2010, 2013 e 2014 foi confirmada pela técnica de MALDI-TOF, conforme demonstrado na **Tabela 3**. Das 18 amostras, 12 foram identificadas como *S. capitis*, onde 25% (n=3) foram isoladas nos anos de 2010, 33,33% (n=4) em 2013 e 41,67% (n=5) em 2014, enquanto 100% (n=6) das amostras identificadas como *S. hominis* foram isoladas em 2014 .

Tabela 3 – Identificação das espécies de *Staphylococcus capitis* e *Staphylococcus hominis* isolados de hemocultura, realizadas no LDCIC*

Amostras	Ano	Confirmação MALDI-TOF	Score
H3	2010	<i>Staphylococcus capitis</i>	1,960
H8	2010	<i>Staphylococcus capitis</i>	2,034
H9	2010	<i>Staphylococcus capitis</i>	1,959
H4	2013	<i>Staphylococcus capitis</i>	1,994
H5	2013	<i>Staphylococcus capitis</i>	1,961
H7	2013	<i>Staphylococcus capitis</i>	1,982
H11	2013	<i>Staphylococcus capitis</i>	1,968
H1	2014	<i>Staphylococcus capitis</i>	2,098
H2	2014	<i>Staphylococcus capitis</i>	1,951
H6	2014	<i>Staphylococcus capitis</i>	2,109
H10	2014	<i>Staphylococcus capitis</i>	1,927
H12	2014	<i>Staphylococcus capitis</i>	2,015
H13	2014	<i>Staphylococcus hominis</i>	2,241
H14	2014	<i>Staphylococcus hominis</i>	1,946
H15	2014	<i>Staphylococcus hominis</i>	2,006
H16	2014	<i>Staphylococcus hominis</i>	2,048
H17	2014	<i>Staphylococcus hominis</i>	2,049
H18	2014	<i>Staphylococcus hominis</i>	2,113

Legenda – *Laboratório de Difteria e Corinebacterioses de Importância Clínica; Score ideal $\geq 1,900$ (WOUDSTRA *et al.*, 2023)

Fonte: A autora, 2023.

5.2 Perfis de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos e detecção do gene *mecA* que codifica resistência a cefoxitina e oxacilina

Os dados apresentados na **Tabela 4** demonstraram que dentre as 12 amostras de *S. capitis*, onze codificaram o gene *mecA* pelo ensaio de PCR (91,67%). Entretanto, oito amostras (66,67%) *mecA*-positivas foram resistentes a cefoxitina (precursora da resistência a oxacilina) enquanto três (33,33%) não expressaram a resistência a cefoxitina. Já em relação as seis amostras de *S. hominis*, cinco (83,33%) apresentaram o gene *mecA*, sendo apenas quatro resistentes a cefoxitina (66,67%). Em contraste, foram observados em três amostras (25,00%) de *S. capitis* e uma amostra (16,67%) de *S. hominis* apresentando o gene *mecA*, porém com sensibilidade a cefoxitina. Interessantemente, apenas uma amostra de *S. capitis* (8,33%) e uma de *S. hominis* não apresentaram o gene *mecA* e foram sensíveis para cefoxitina.

Todas as amostras de *S. hominis* (100%) e nove (75,00%) amostras de *S. capitis* foram resistentes a benzilpenicilina, enquanto todas as 18 amostras testadas de ambas as espécies apresentaram sensibilidade para linezolida, teicoplanina e rifampicina. Quando avaliada a resistência a eritromicina, 75% (n=9) das amostras de *S. capitis* e 33,3% (n=2) das amostras de *S. hominis* expressaram esse fenótipo.

No presente estudo, todas as amostras de ambas as espécies foram resistentes a ciprofloxacino. Os resultados demonstraram resistência concomitante para ciprofloxacino, clindamicina e gentamicina com nove (75%) amostras de *S. capitis* e duas (33,33%) de *S. hominis* testadas (**Tabela 4**).

Adicionalmente, três (25%) amostras de *S. capitis* foram resistentes a sulfazotrim, nove (75%) resistentes a norfloxacino e nenhuma foi resistente a tetraciclina. Já em relação aos resultados das amostras de *S. hominis*, quatro (66,67%) ~~também~~ foi observada a resistência concomitante a norfloxacino, ciprofloxacino e clindamicina. No geral, apenas duas amostras *S. hominis* foram gentamicina-resistentes (33,34%), quatro amostras (66,67%) sulfazotrim-resistentes e apenas uma amostra tetraciclina-resistente (16,67%).

Os perfis de resistência das 12 amostras de *S. capitis* e seis amostras de *S. hominis* foram demonstrados na **Tabela 4, Figuras 3A e 3B**. Com relação a avaliação da expressão dos perfis de multirresistência aos agentes antimicrobianos, os dados demonstraram a presença de seis perfis MDR distintos e um perfil não-MDR: *S. capitis* – 75% (n=9) MDR (perfis MDR-1, MDR-2 e MDR-5) e 25% (n=3) não-MDR (perfil não-MDR); *S. hominis* – 83,33% (n=5) MDR (MDR-1, MDR-3, MDR-4 e MDR-6) e 16,67% (n=1) não-MDR (perfil não-MDR).

O perfil de resistência apresentando maior número de agentes antimicrobianos (MDR-1) foi detectado em cinco amostras de ambas as espécies analisadas no estudo, sendo três amostras de *S. capitis* e duas amostras de *S. hominis*, enquanto o perfil MDR-2 contendo nove antimicrobianos, foi observado em cinco amostras de *S. capitis*. Já em relação aos outros perfis, o MDR-3 e o MDR-4 com oito antimicrobianos (*S. hominis*), MDR-5 com sete antimicrobianos (*S. capitis*) e MDR-6 com três antimicrobianos (*S. hominis*), sendo possível observar a heterogeneidade dos perfis de resistência em ambas as espécies estudadas.

Através dos ensaios de concentração inibitória mínima, 100% das amostras foram consideradas vancomicina, teicoplanina e linezolida sensíveis. E em relação ao antimicrobiano gentamicina, nove (75,00%) amostras de *S. capitis* e três (75,00%) amostras de *S. hominis* foram consideradas resistentes, corroborando diretamente com o resultado do método de disco-difusão. Além disso, 10 (83,33%) amostras de *S. capitis* e quatro (66,67%) amostras de *S. hominis* foram consideradas resistentes para o antimicrobiano moxifloxacino.

Figura 3 - Perfis de susceptibilidade de amostras de *Staphylococcus capitis* (A) e *Staphylococcus hominis* (B) isoladas de hemoculturas frente aos 14 agentes antimicrobianos utilizados, segundo BrCAST (2023).
Fonte: A autora, 2023

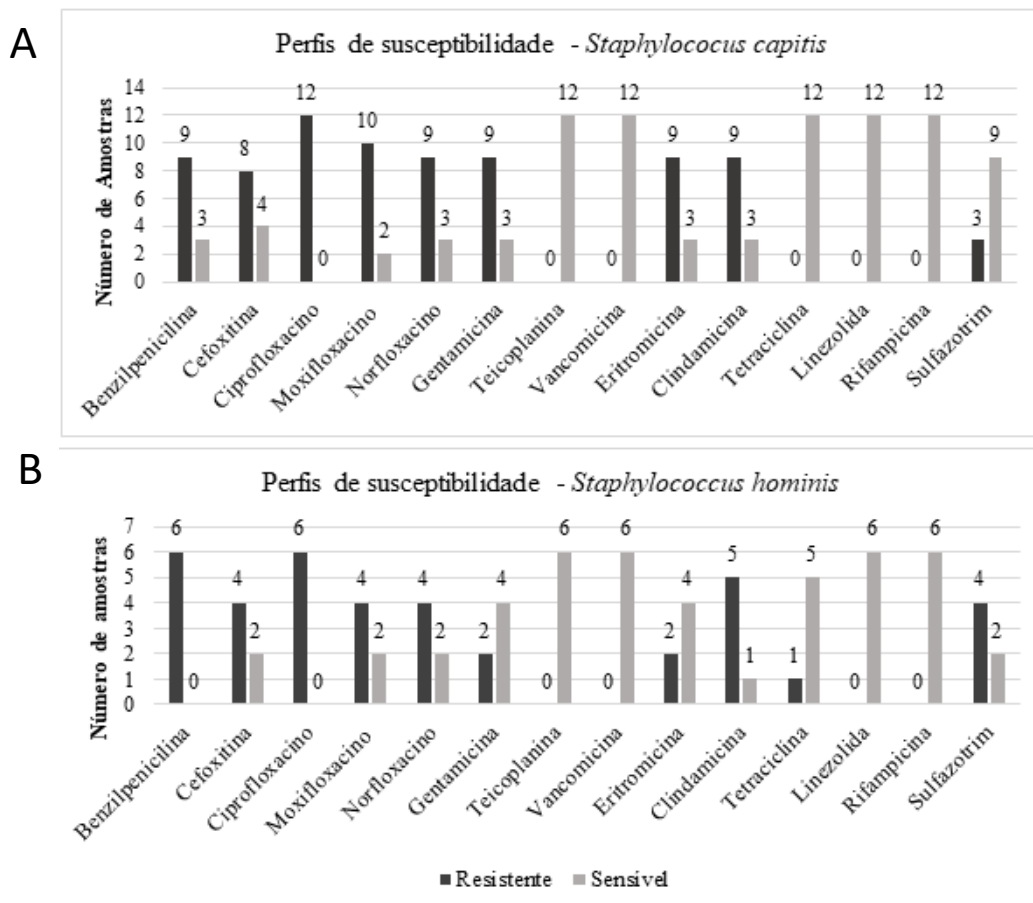


Tabela 4 – Perfis de resistência aos agentes antimicrobianos de amostras de *Staphylococcus capitis* e *Staphylococcus hominis* isoladas de hemoculturas, avaliados pelos métodos de difusão em disco, CIM e/ou Etest® e a presença do gene de resistência *mecA*

Amostra	Perfis de Resistência	CIM µg/ml/ Etest®					Gene <i>mecA</i>	PRA
		V A	T E C	G E N	L N Z	M O X		
H2 (<i>Sc</i>)	PEN, CFO, CIP, NOR, GEN, E, DA, SUT	S	S	R	S	R	+	MDR-1
H5 (<i>Sc</i>)		S	S	R	S	R	+	
H7 (<i>Sc</i>)		S	S	R	S	R	+	
H15 (<i>Sh</i>)		S	S	R	S	R	+	
H18 (<i>Sh</i>)		S	S	R	S	R	+	
H1 (<i>Sc</i>)	PEN, CFO, CIP, NOR, GEN, E, DA	S	S	R	S	R	+	MDR-2
H3 (<i>Sc</i>)		S	S	R	S	R	+	
H4 (<i>Sc</i>)		S	S	R	S	R	+	
H9 (<i>Sc</i>)		S	S	R	S	R	+	
H10 (<i>Sc</i>)		S	S	R	S	R	+	
H16 (<i>Sh</i>)	PEN, CFO, CIP, NOR, E, DA, SUT	S	S	S	S	R	+	MDR-3
H17 (<i>Sh</i>)	PEN, CFO, CIP, NOR, DA, SUT	S	S	R	S	R	+	MDR-4
H12 (<i>Sc</i>)	CIP, NOR, GEN, E, DA	S	S	R	S	R	+	MDR-5
H13 (<i>Sh</i>)	PEN, CIP, DA	S	S	S	S	S	+	MDR-6
H11 (<i>Sc</i>)	PEN, CIP	S	S	S	S	S	+	não-MDR
H14 (<i>Sh</i>)	PEN, CIP	S	S	S	S	S	-	
H8 (<i>Sc</i>)	CIP	S	S	S	S	R	+	
H6 (<i>Sc</i>)	CIP	S	S	S	S	S	-	

Legenda – (*Sc*): *Staphylococcus capitis*; (*Sh*): *Staphylococcus hominis*; Resultado positivo + e resultado negativo: -; Antimicrobianos utilizados: Benzilpenicilina (PEN), Cefoxitina (CFO), Ciprofloxacino (CIP), Norfloxacino (NOR), Gentamicina (GEN), Eritromicina (E), Clindamicina (DA), Tetraciclina (TET), Linezolida (LNZ), Rifampicina (RIF), Sulfazotrim (SUT), Vancomicina (VA), Teicoplanina (TEC); Avaliação quanto a susceptibilidade: Perfil de resistência aos agentes antimicrobianos (PRA); Resistente (R), Sensível (S), Multi-droga resistente (MDR), Não Multi-droga Resistente (não-MDR) e Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Fonte: A autora, 2023

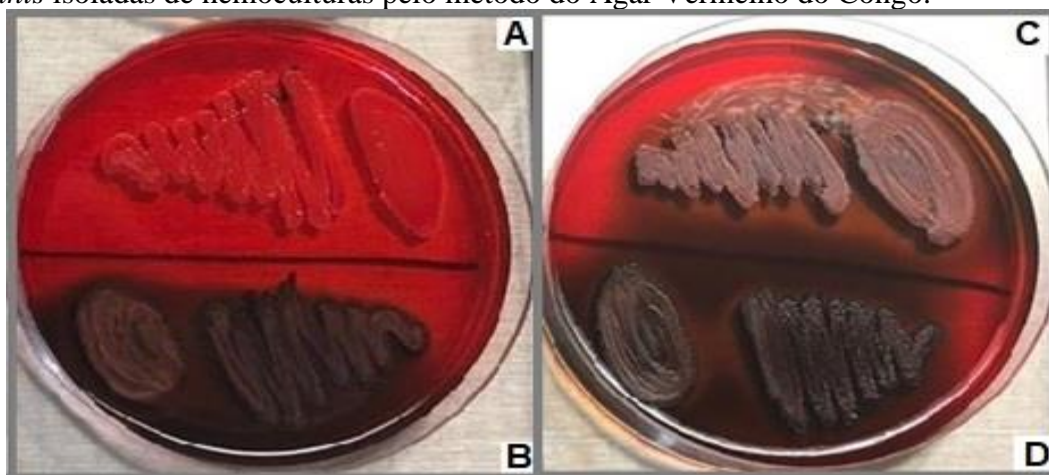
5.3 Expressão da produção de *slime*

Dentre as amostras de *S. capitis* analisadas, cinco (41,7%) foram *slime*-positivas, onde quatro (80,0%) delas tiveram perfil MDR e uma (20,0%) não-MDR. Para as amostras de *S.*

hominis MDR, duas (33,3%) amostras obtiveram produção de *slime*, enquanto quatro (66,7%) não foram produtoras do fenótipo, onde três amostras dispõem de perfis MDR (1, 3 e 4).

Os resultados da expressão da produção de *slime* foram representadas na **Tabela 5**, além de ilustradas na **Figura 4**.

Figura 4 – Produção de *slime* por amostras de *Staphylococcus capitis* e *Staphylococcus hominis* isoladas de hemoculturas pelo método do Agar Vermelho do Congo.



Legenda: Representação ilustrativa de matriz exopolissacarídea (*slime*) em meio Agar Vermelho do Congo (CRA) das amostras de *Staphylococcus capitis* e *Staphylococcus hominis*, isoladas de hemocultura: (A) ATCC *Staphylococcus epidermidis* 12228 (-), (B) ATCC *Staphylococcus epidermidis* 35984 (+), (C) H10: *Staphylococcus capitis* *slime*-negativa, (D) H13: *Staphylococcus hominis* *slime*-positiva.

Fonte: A autora, 2023.

5.4 Determinação de formação de biofilme no vidro

A análise semiquantitativa da formação de biofilme no vidro das 12 amostras de *S. capitis* e seis amostras de *S. hominis* isoladas de hemocultura geraram resultados demonstrados na **Tabela 5**.

Das 12 amostras de *S. capitis*, 10 (83,33%) foram classificadas como fortemente produtoras de biofilme (I; +++), enquanto duas (16,67%) amostras foram avaliadas como moderadamente produtoras de biofilme (II; ++). Das seis amostras de *S. hominis*, cinco (83,33%) foram classificadas como fortemente produtoras de biofilme (I; +++), enquanto uma (16,67%) amostra foi considerada como moderadamente produtora de biofilme (II; ++).

5.5 Avaliação da produção de biofilme em superfície de poliestireno

Os resultados da capacidade de produção de biofilme na superfície do poliestireno das 12 amostras de *S. capitis* e seis amostras de *S. hominis* isoladas de hemocultura estão demonstradas na **Tabela 5**.

As 12 amostras identificadas como *S. capitis* foram capazes de produzir biofilme na superfície hidrofóbica de poliestireno em intensidades diversas. Entretanto, seis (50%) amostras foram classificadas como fortemente produtoras de biofilme (+++), quatro (33,33%) amostras como moderadamente produtoras de biofilme (++) e duas (16,67%) fracamente produtoras de biofilme (+).

Em contraste ao observado para as amostras de *S. capitis*, as amostras de *S. hominis* foram capazes de produzir menos biofilme na superfície hidrofóbica de poliestireno. Sendo que duas (33,33%) amostras foram consideradas moderadamente aderentes (++) , enquanto quatro (66,67%) não aderiram (-) ao material analisado no experimento.

5.6 Aderência ao hidrocarboneto *n*-Hexadecano

Algumas amostras de *S. capitis* e *S. hominis* provenientes de hemoculturas apresentaram propriedades auto agregativas e hidrofóbicas, enquanto outras foram consideradas hidrofílicas e não-auto agregativas, na presença do hidrocarboneto *n*-Hexadecano. Dentre as 12 amostras de *S. capitis*, foram observadas oito (66,67%) amostras hidrofílicas e quatro (33,33%) amostras hidrofóbicas. Enquanto das seis amostras de *S. hominis*, a maioria (83,33%; n=5) foram identificadas como hidrofílicas e apenas uma (16,67%) como hidrofóbica (**Tabela 5**). Deste modo, as amostras de *S. capitis* e *S. hominis* foram consideradas mais hidrofílicas (72,22%; n=13) do que hidrofóbicas (27,78%; n=5).

Tabela 5 – Aspectos fenotípicos e genotípicos relacionado aos perfis de resistência aos agentes antimicrobianos, capacidade de produção de *slime*, propriedades auto agregativas e de formação de biofilme das amostras de *Staphylococcus capitis* e *Staphylococcus hominis*

Amostras	PRA	Produção de <i>slime</i>	Formação de biofilme		Interação com <i>n</i> -Hexadecano	Genes	
			Vidro Hidrofílico	Poliestireno Hidrofóbico		Virulência	Resistência
<i>Staphylococcus capitis</i>							
H7	MDR-1	+	I (+++)	III (+)	Hidrofóbica (56%)	<i>icaA, atl</i>	<i>mecA</i>
H1	MDR-2	+	I (+++)	II (++)	Hidrofílica (40%)	<i>icaA, bap</i>	<i>mecA</i>
H3	MDR-2	+	I (+++)	I (+++)	Hidrofóbica (80%)	<i>atl, fbp</i>	<i>mecA</i>
H12	MDR-5	+	I (+++)	I (+++)	Hidrofílica (26%)	<i>icaA, atl</i>	<i>mecA</i>
H6	não-MDR	+	I (+++)	II (++)	Hidrofílica (6%)	<i>icaA</i>	-
H4	MDR-2	-	I (+++)	I (+++)	Hidrofílica (12,5%)	<i>icaA, atl</i>	<i>mecA</i>
H8	não-MDR	-	I (+++)	I (+++)	Hidrofílica (41%)	<i>icaA, atl</i>	<i>mecA</i>
H11	não-MDR	-	I (+++)	I (+++)	Hidrofílica (17%)	<i>icaA</i>	<i>mecA</i>
H2*	MDR-1	-	I (+++)	II (++)	Hidrofóbica (70%)	<i>icaA, atl, bap</i>	<i>mecA</i>
H10	MDR-2	-	I (+++)	II (++)	Hidrofóbica (66%)	<i>icaA, atl</i>	<i>mecA</i>
H9	MDR-2	-	II (++)	I (+++)	Hidrofílica (21%)	<i>icaA, atl</i>	<i>mecA</i>
H5	MDR-1	-	II (++)	III (+)	Hidrofílica (30%)	<i>icaA, atl, bap, fbp</i>	<i>mecA</i>
<i>Staphylococcus hominis</i>							
H15	MDR-1	+	I (+++)	IV (-)	Hidrofóbica (56,5%)	-	<i>mecA</i>
H13	MDR-6	+	I (+++)	II (++)	Hidrofílica (37,5%)	-	<i>mecA</i>
H18	MDR-1	-	I (+++)	II (++)	Hidrofílica (38%)	<i>icaA</i>	<i>mecA</i>
H16	MDR-3	-	I (+++)	IV (-)	Hidrofílica (9%)	<i>icaA</i>	<i>mecA</i>
H17	MDR-4	-	I (+++)	IV (-)	Hidrofílica (13%)	<i>icaA</i>	<i>mecA</i>
H14	não-MDR	-	II (++)	IV (-)	Hidrofílica (4%)	<i>icaA, atl, fbp</i>	-

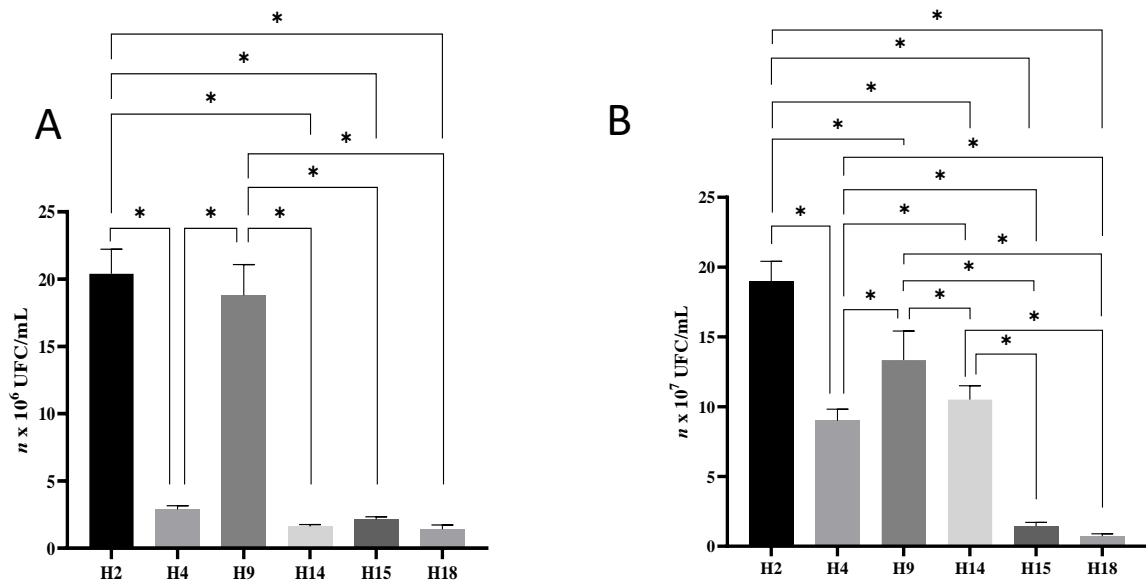
Legenda: *, Amostra submetida ao sequenciamento genômico; PRA: perfis de resistência aos agentes antimicrobianos; MDR: multirresistente; -: resultado negativo; +: resultado positivo; Biofilme no vidro: I (+++): fortemente produtor, com bactérias aderidas nas laterais do tubo de vidro e na interface entre o meio de cultura e o ar; II (++) : moderadamente produtor, com bactérias aderidas nas laterais do tubo de vidro; Poliestireno: I (+++) fortemente aderente e produtor de biofilme; II (++) : moderadamente aderente e produtor de biofilme; III (+): fracamente aderente e produtor de biofilme; IV (-): não produtor de biofilme; Fonte: A autora, 2023.

5.7 Avaliações quantitativas da formação de biofilme em superfície de aço

Nesse ensaio, foram utilizadas três amostras representativas de *S. capitis* e três de *S. hominis*, considerando a relevância dos perfis de resistência e demais fatores de virulência analisados. Independentemente das espécies, as amostras foram capazes de aderir a superfície do aço e formar biofilme, com destaque para as amostras H2 e H9 de *S. capitis*, em ambos os tempos (**Figura 5A e 5B**).

Como observado na **Figura 5A**, foram encontradas contagens de bactérias aderidas semelhantes para as amostras *S. capitis* H4 ($2,88 \pm 0,28 \times 10^6$), e *S. hominis* H14 ($1,60 \pm 0,13 \times 10^6$), H15 ($2,14 \pm 0,20 \times 10^6$) e H18 ($1,04 \pm 0,33 \times 10^6$), bem como para as amostras de *S. capitis* H2 ($20,40 \pm 1,82 \times 10^6$) e H9 ($18,80 \pm 2,28 \times 10^6$), nas primeiras 24 horas de interação com a superfície do aço. Já após 48 horas de interação (**Figura 5B**), valores semelhantes foram encontrados para as amostras H15 ($1,45 \pm 0,26 \times 10^7$) e H18 ($7,20 \pm 1,80 \times 10^6$) e significativamente maiores para a amostra H14 ($10,50 \pm 1,00 \times 10^7$), sendo todas as três da espécie *S. hominis*. Já entre as amostras representativas de *S. capitis*, verificaram-se diferentes valores de aderência bacteriana: H2 ($19,00 \pm 1,41 \times 10^7$), H4 ($9,00 \pm 0,82 \times 10^7$) e H9 ($13,33 \pm 2,08 \times 10^7$).

Figura 5 – Capacidade de formação de biofilme de amostras de *Staphylococcus capitis* e *Staphylococcus hominis* na superfície de aço, no período de 24 (A) e 48 horas (B)

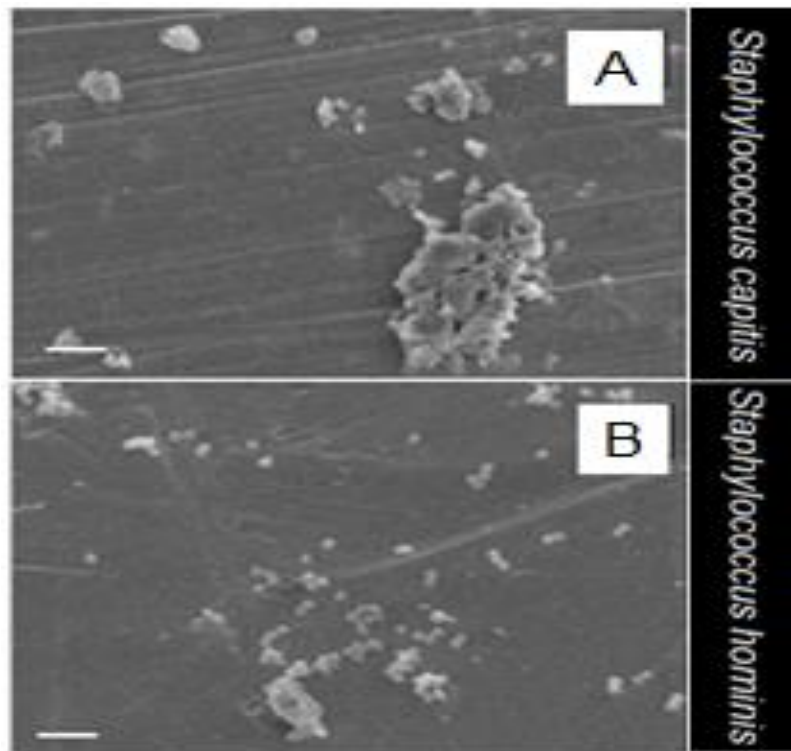


Legenda: (A) Contagem de bactérias aderidas em aço após 24 horas de interação; (B) Contagem de bactérias aderidas em aço após 48 horas de interação; * $p < 0,05$.

Fonte: A autora, 2023

Os resultados das análises por MEV da formação de biofilme realizados com as duas espécies *S. capitis* e *S. hominis* (amostras H2 e H15) foram demonstrados na **Figura 6**. Ambas as amostras *S. capitis* e *S. hominis*, apresentaram auto agregação e capacidade de formar biofilme na superfície do aço cirúrgico. Entretanto, a amostra *S. capitis* (H2) apresentou maior número de células agregadas, durante a capacidade de formação de biofilme (**Figura 6A**), do que a amostra de *S. hominis* (H15) (**Figura 6B**).

Figura 6 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de *Staphylococcus capitis* (A) e *Staphylococcus hominis* (B) formando biofilme na superfície do aço.



Fonte: A autora, 2023

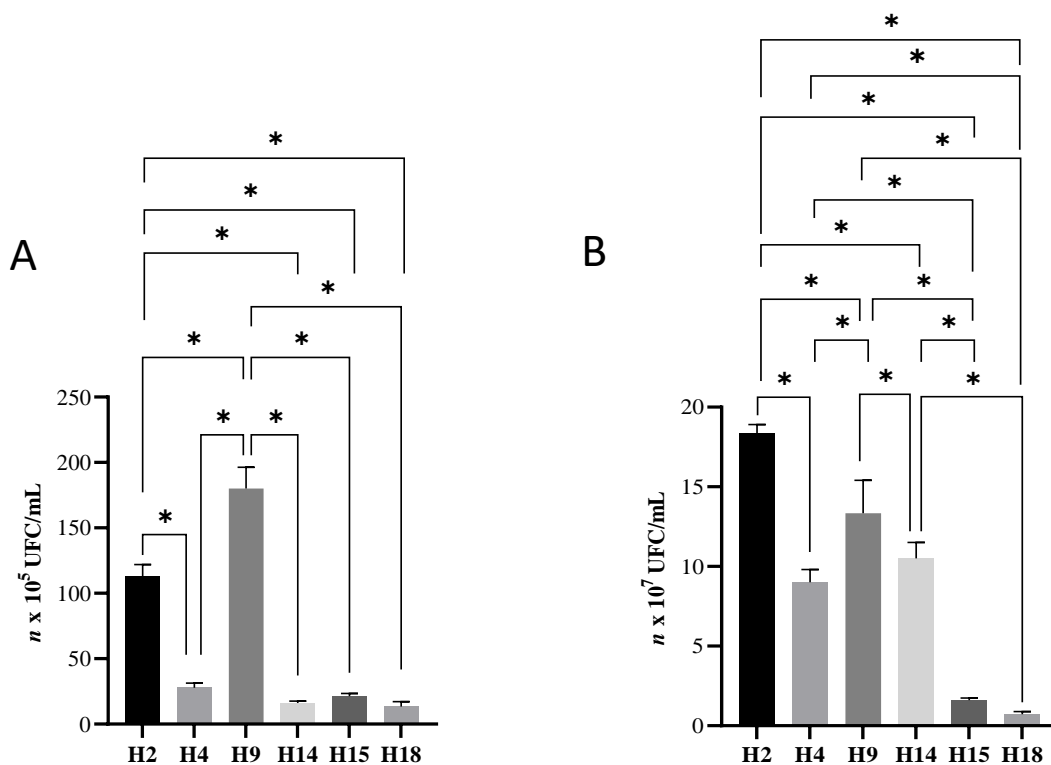
5.8 Avaliações quantitativas da formação de biofilme em superfície de pericárdio bovino

A produção de biofilme maduro (24 horas e 48 horas) em bioimplantes (*patches*) de pericárdio bovino foi observada para ambas as espécies testadas, com destaque para as três amostras de *S. capitis* em ambos os tempos de incubação e para a amostra H14 de *S. hominis* após 48 horas de interação (**Figuras 7A e 7B**).

Contagens semelhantes de bactérias aderidas foram encontradas para as amostras *S. capitis* H4 ($2,78 \pm 0,14 \times 10^6$) e *S. hominis* H14 ($1,62 \pm 0,13 \times 10^7$), H15 ($2,14 \pm 0,10 \times 10^7$) e H18 ($1,35 \pm 0,37 \times 10^7$), nas primeiras 24 horas de interação com a superfície do pericárdio bovino. Destacam-se os maiores números de bactérias aderidas apresentadas pelas duas amostras de *S. capitis* H2 ($11,25 \pm 0,95 \times 10^8$) e H9 ($18,00 \pm 1,63 \times 10^8$) (**Figura 7A**).

Após 48 horas de interação, valores equivalentes também foram encontrados para as amostras H15 ($1,60 \pm 0,14 \times 10^8$) e H18 ($0,72 \pm 0,17 \times 10^7$) e significativamente maiores para as amostras: H14 ($10,50 \pm 1,00 \times 10^7$) de *S. hominis* e para as amostras de *S. capitis* H2 ($18,33 \pm 0,57 \times 10^7$), H4 ($9,00 \pm 0,82 \times 10^7$) e H9 ($13,33 \pm 2,08 \times 10^7$) (**Figura 7B**).

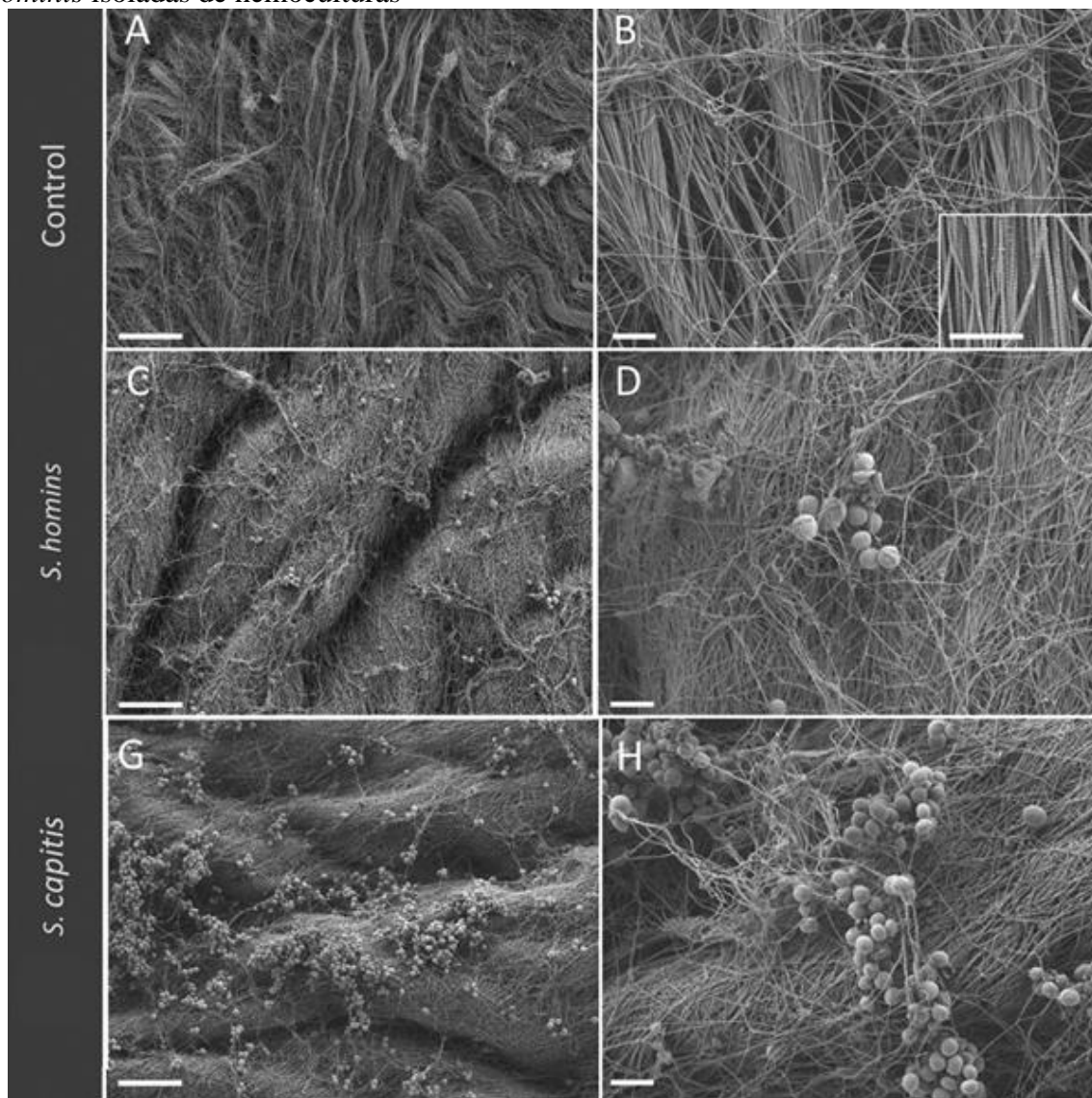
Figura 7 – Capacidade de produção de biofilme por amostras de *Staphylococcus capitis* e *Staphylococcus hominis*, sobre pericárdio bovino (*patches*), no período de 24 (A) e 48 horas (B).



Legenda: (A) Contagem de bactérias aderidas em pericárdio bovino após 24 horas de interação; (B) Contagem de bactérias aderidas em pericárdio bovino após 48 horas de interação; * $p < 0,05$. Fonte: A autora, 2023.

Os resultados das análises por MEV da produção de biofilme realizados com as duas espécies *S. capitis* e *S. hominis* (H2 e H15), foram demonstrados na **Figura 8**. Ambas as amostras *S. capitis* e *S. hominis*, apresentaram aumento de auto agregação e de formação de biofilme na superfície do pericárdio bovino. Entretanto, a amostra *S. capitis* (H2) apresentou maior capacidade de produção de biofilme do que a amostra de *S. hominis* (H15). Adicionalmente, os resultados demonstraram a habilidade das amostras de *S. capitis* e *S. hominis* de interagir com fibras de colágeno.

Figura 8 - Formação de biofilme e aderência a superfície de membrana de pericárdio bovino, formadas por fibras de colágeno por amostras de *Staphylococcus capitis* e *Staphylococcus hominis* isoladas de hemoculturas



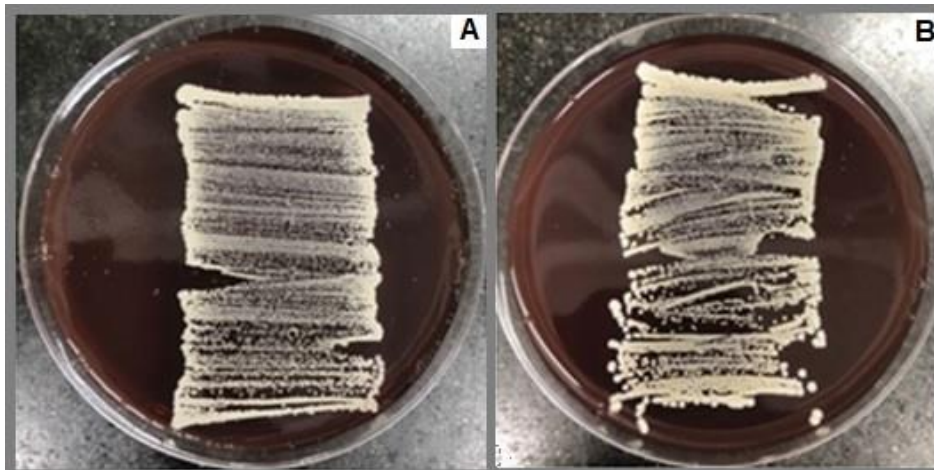
Legenda – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície interna do pericárdio bovino em interação com: (A, B) superfície do pericárdio bovino estéril (controle negativo), (C, D) amostra H2/MDR-1 – *Staphylococcus capitis* e, (E, F) amostra H15/MDR-1 – *Staphylococcus hominis*.

Fonte – A autora, 2023.

5.9 Pesquisa da aderência e formação de biofilme em cateteres de poliuretano e silicone (técnica de rolamento)

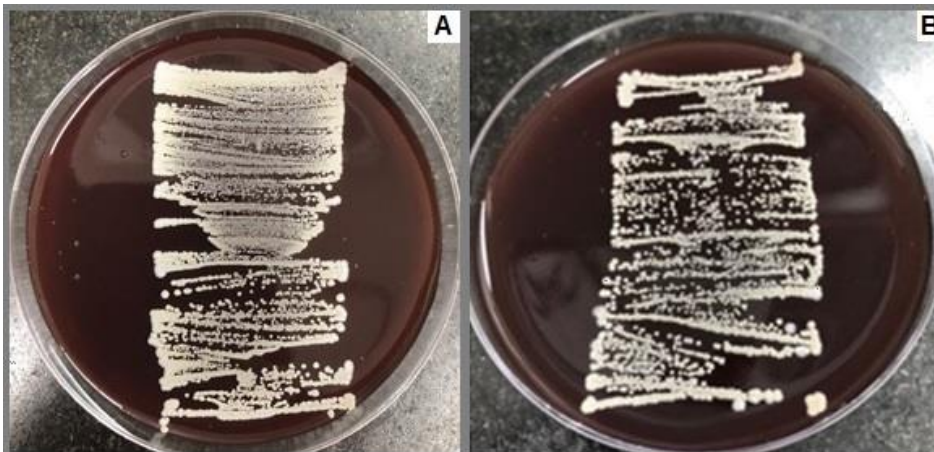
Os segmentos de cateter de poliuretano e silicone foram colonizados *in vitro* com as amostras H2 da espécie *S. capitis* e H15 da espécie *S. hominis* isoladas de hemoculturas. Uma grande quantidade de material de biofilme foi evidente. A avaliação da aderência e viabilidade dos microrganismos no segmento do cateter de poliuretano e silicone pelo método da técnica de rolamento em placa demonstrou a formação de tapetes espessos com essas bactérias (**Figura 9 e 10**).

Figura 9 – Amostra de *Staphylococcus capitis* (H2) isolado de hemocultura aderido ao cateter de silicone (A) e poliuretano (B) formando um tapete espesso em placa de ágar sangue.



Fonte: A autora, 2023.

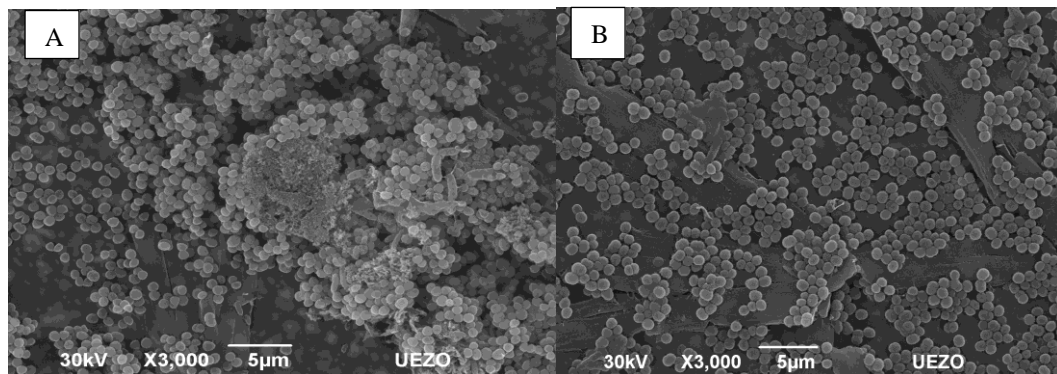
Figura 10 – Amostra de *Staphylococcus hominis* (H15) isolado de hemocultura, aderido ao cateter de silicone (A) e poliuretano (B) formando um tapete espesso em placa de ágar sangue.



Fonte: A autora, 2023

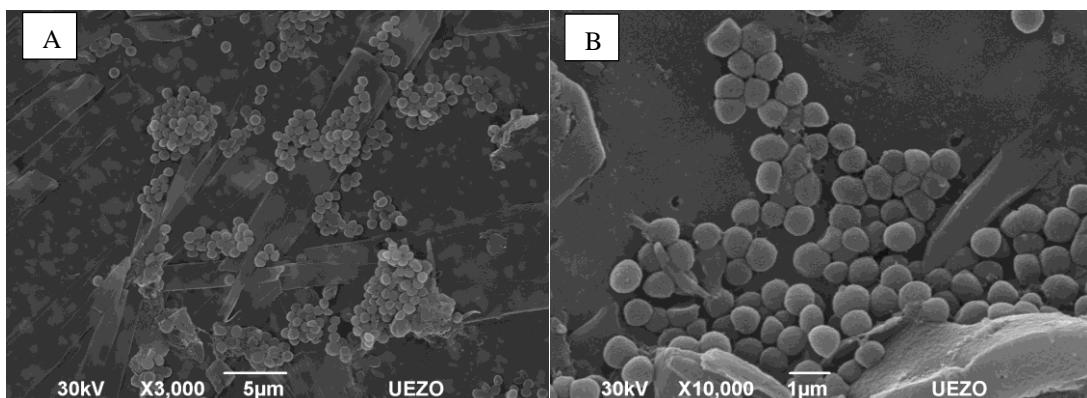
Para demonstrar a formação de biofilme na superfície de cateter de silicone e poliuretano pelas duas espécies estudadas, *S. capitis* e *S. hominis*, foi realizada a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), sendo as amostras H2 e H15 fotografadas (**Figura 11 e 12**).

Figura 11 – Amostra de *Staphylococcus capitis* (H2) formando biofilme em superfície de cateter de silicone (A) e superfície de cateter de poliuretano (B).



Fonte: A autora, 2023.

Figura 12 – Amostra de *Staphylococcus hominis* (H15) formando biofilme em superfície de cateter de silicone (A) e superfície de cateter de poliuretano (B).



Fonte: A autora, 2023.

5.10 Presença de genes relacionados com a formação de biofilme

Os dados obtidos pelos ensaios de PCR para detecção da presença de genes relacionados com a formação de biofilme, foram apresentados na **Tabela 5**: gene *icaA*, que codifica a produção de adesina polissacarídica intercelular; gene *fbp*, relacionado a proteína ligadora de fibrinogênio; gene *atl*, relacionado a produção de autolisina de parede celular; gene *aap*, proteína associada ao acúmulo do biofilme; gene *bap*, proteína associada ao biofilme; gene *fnbA*, proteínas ligadas à fibronectina, e gene *epbS*, proteína ligadora de elastina.

Dentre as 18 amostras analisadas, independentemente da espécie, nenhuma foi positiva para todos os genes estudados, mesmo possuindo múltiplos perfis MDR ou não-MDR. Além disso, foi observado que 38,89% das amostras foram positivas para produção de *slime* e apresentaram habilidade de produção de biofilme em intensidades variadas e em superfícies diversas, inclusive em biomaterial.

Analisando as 12 amostras de *S. capitis*, foi possível observar a presença de diferentes genes estudados, independente da produção de biofilme em diferentes intensidades e em superfície diversas, além da produção ou não de *slime*. As amostras H2 e H5, pertencentes ao maior perfil de resistência (MDR-2), conseqüentemente apresentaram a maior quantidade de genes relacionados ao biofilme, compreendendo os genes *icaA*, *atl* e *bap* e os genes *icaA*, *atl*, *fbp* e *bap*, respectivamente.

Contudo, todas as amostras de *S. capitis* foram capazes de albergar ao menos um gene proposto, onde sua maioria 11 (91,67%) amostras foram observadas a presença do gene *icaA*, independente da produção de *slime* ou de biofilme.

Curiosamente, das sete amostras de *S. capitis* não produtoras de *slime* e gene *icaA* positivas, seis (85,71%) foram positivas para o gene *atl* e somente uma obteve a presença do gene *fbp*. Nenhuma amostra de *S. capitis* foi considerada positiva para os genes *aap*, *fnbA* e *epbS*.

Apesar das seis amostras de *S. hominis* expressarem a habilidade de produção de biofilme em intensidades variadas em superfícies abióticas diversas e em bioimplante de pericárdio bovino, nenhuma amostra concomitantemente foi considerada produtora de *slime* e apresentaram o gene *icaA*. Entretanto, foi observado a produção de biofilme em múltiplas superfícies e *slime*-positivas em duas amostras (H13: MDR-6 e H15: MDR-5) independente da presença do gene *icaA*.

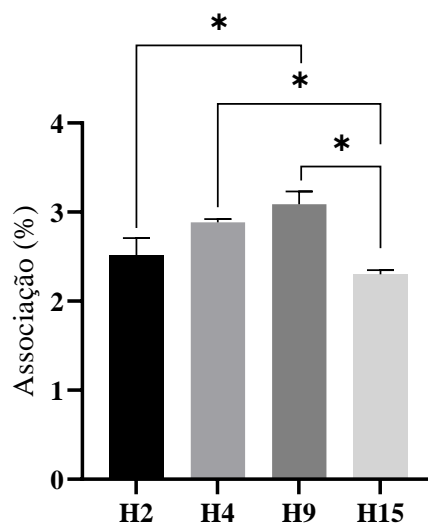
Dentre as quatro amostras *slime*-negativas, três apresentaram somente o gene *icaA*, enquanto a amostra H14 também foi positiva para os genes *fbp* e *atl*. Já para os genes *aap*, *fnbA* e *epbS*, nenhuma amostra de *S. hominis* foi considerada positiva.

As amostras de *S. hominis* (H13 e H15) não apresentaram nenhum dos genes de biofilme estudados. Entretanto, as amostras H3 e H5 (*S. capitis*) e H14 (*S. hominis*) codificada pelo gene *fbp*, pode estar associado a interação com o fibrinogênio, apresentando capacidade autoagregativa nas fibras de colágeno na superfície biótica do bioimplante de pericárdio bovino.

5.11 Associação bacteriana com células epiteliais humanas da linhagem DETROIT 562

Dentre as amostras analisadas neste estudo, três de *S. capitis* (H2, H4 e H9) e uma de *S. hominis* (H15) foram capazes de interagir com células epiteliais Detroit 562 (**Figura 13**), enquanto duas amostras de *S. hominis* (H14 e H18) não apresentaram essa capacidade. Percentuais de associação maiores foram encontrados para as amostras da espécie *S. capitis*: H2 ($2,51 \pm 0,19\%$), H4 ($2,88 \pm 0,03\%$) e H9 ($3,09 \pm 0,14\%$), enquanto a única amostra de *S. hominis* capaz de se associar ao tapete celular apresentou percentual ligeiramente menor ($2,30 \pm 0,04\%$).

Figura 13 – Capacidade de associação em células epiteliais DETROIT 562 por amostras de *Staphylococcus capitis* (H2, H4 e H9) e *Staphylococcus hominis* (H15).



Legenda: * $p < 0,05$

Fonte: A autora, 2023.

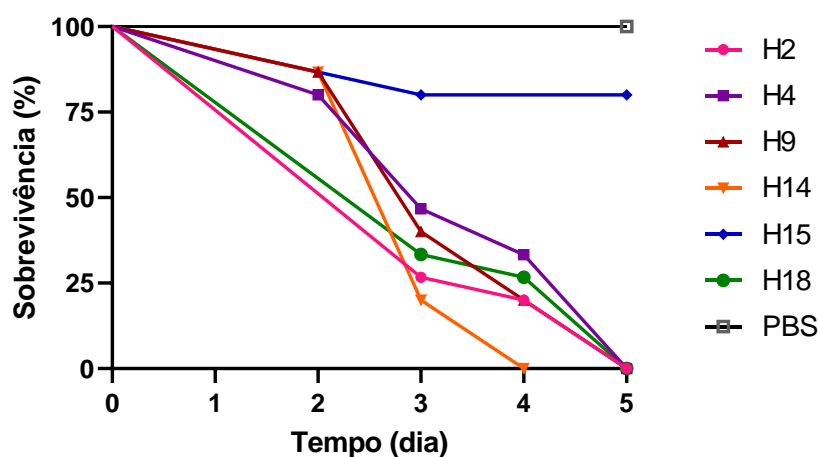
5.12 Ensaio de infecção e letalidade em superfície biótica de larva de *Galleria mellonella*

No experimento, as amostras representativas H2, H4 e H9 (três amostras de *S. capitis*) e H14, H15 e H18 (três amostras de *S. hominis*) foram capazes de levar a óbito as larvas de forma variável durante os 5 dias analisados. É possível verificar que todas as amostras de *S. capitis* foram capazes de matar as larvas, utilizadas no estudo, até o último dia de avaliação, diferentemente das amostras de *S. hominis*, onde uma delas matou apenas 20% (n=1) do modelo vivo proposto.

A mediana de sobrevivência, quando 50% da população do experimento está morta, é considerada no terceiro dia em 83,33% das amostras (n=5) e suas curvas não apresentaram diferença estatisticamente. Exceto a amostra H15 (*S. hominis*), que teve a sua mediana considerada como indefinida e sua curva difere das demais (**Figura 14**).

O controle negativo, utilizando o tampão PBS como solução injetável, foi satisfatório para a avaliação. Já que durante os 5 dias analisados, não teve capacidade de matar nenhum dos 5 espécimes definidos para o grupo controle.

Figura 14 – Gráfico de sobrevivência das larvas de *Galleria mellonella* por tempo (dia), avaliando a interação com as amostras representativas de *Staphylococcus capitis* e *Staphylococcus hominis* provenientes de hemocultura.



Legenda: Amostras *Staphylococcus capitis* – H2/MDR-1, H4/MDR-2 e H9/MDR-2, amostras de *Staphylococcus hominis* – H14/não-MDR, H15/MDR-1, H18/MDR-1, controle negativo – PBS.

Fonte: A autora, 2023.

Deste modo, os resultados obtidos no presente estudo, relacionados a heterogeneidade de aspectos fenotípicos e genotípicos relacionados aos perfis de resistência, capacidade de produção de *slime*, propriedades auto agregativas e de formação de biofilme em superfícies diversas, interação com células humanas e com larvas de *G. mellonella* de amostras representativas de *Staphylococcus capitis* e *Staphylococcus hominis* estão apresentados na **Tabela 6** e foram discutidos a seguir.

5.13 Sequenciamento genômico

Após a realização das etapas do sequenciamento do genoma do isolado *S. capitis* subsp. *urealyticus* H2 foi possível obter um genoma com tamanho de 2.656.684 pb, 32,7% de conteúdo G-C, N50 de 380469, L50 de 3 e com um total de 39 *contigs*. A avaliação da qualidade pelo ContEst16S foi inconclusiva, havendo somente uma cópia do gene 16S.

A anotação do genoma identificou 2.602 de sequências codificantes (CDS) e 62 de RNAs. O genoma bacteriano encontra-se depositado no repositório público NCBI.

5.14 Taxonomia genômica bacteriana

Os resultados encontrados a partir da análise do gene 16S evidenciaram similaridades para as espécies *Staphylococcus caprae* (99,93%), *S. capitis* subsp. *capitis* (99,93%), *S. capitis* subsp. *urealyticus* (99,72%), *S. saccharolyticus* (99,59%) e *S. epidermidis* (99,46%), não sendo possível a identificação correta a nível de espécie. Entretanto, no estudo filogenético da amostra H2 com as espécies mais relacionadas, foi possível evidenciar a formação de um clado distinto entre a amostra H2 e *S. capitis* subsp. *urealyticus* GTC 727^T, com um alto valor de *bootstrap* (65%), sendo possível relacionar a amostra H2 como pertencente a espécie *S. capitis* subsp. *urealyticus*, como demonstrado na **Figura 15**.

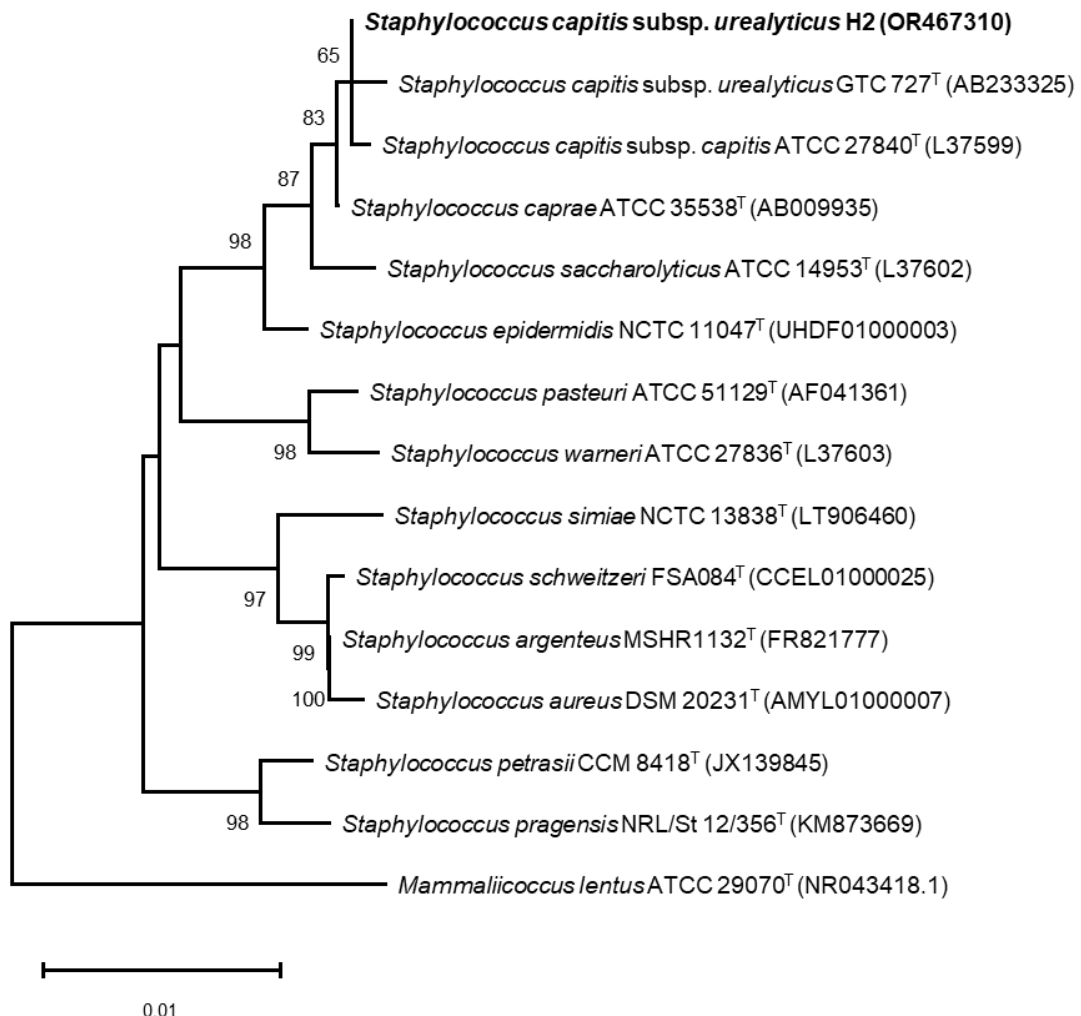
Os resultados obtidos através da hibridização *in silico* pelo GGDC mostraram que a amostra *S. capitis* subsp. *urealyticus* H2 quando analisada frente *S. caprae* NCTC 12196^T, *S. capitis* subsp. *capitis* DSM 20326^T, *S. capitis* subsp. *urealyticus* DSM 6717^T, *S. saccharolyticus* DSM 20359^T e *S. epidermidis* ATCC 14990^T, possuem dDDH de 26,30%, 70,90%, 89,60%, 22,80% e 22,40%, respectivamente.

Tabela 6 – Heterogeneidade de aspectos fenotípicos e genotípicos relacionados aos perfis de resistência, capacidade de produção de *slime*, propriedades auto agregativas e de formação de biofilme em superfícies diversas, interação com células humanas e com larvas de *Galleria mellonella* de amostras representativas de *Staphylococcus capitis* e *Staphylococcus hominis*

Amostras	Slime	n-Hexadecano	Formação de biofilme						Interação com células epiteliais humanas Detroit 562	Letalidade de <i>Galleria mellonella</i>	Genes	
			Vidro	Poliestireno	Aço	Silicone	Poliuretano	Pericárdio			Virulência	Resistência
H4/MDR-2	-	Hidrofílica	+++	+++	$\sim 9 \times 10^7$	+++	+++	$\sim 9 \times 10^7$	$2,88 \pm 0,03\%$	100%	<i>icaA, atl</i>	<i>mecA</i>
H2/MDR-1*	-	Hidrofóbica/AA	+++	++	$\sim 19 \times 10^7$	+++	+++	$\sim 18 \times 10^7$	$2,51 \pm 0,19\%$	100%	<i>icaA, atl, bap</i>	<i>mecA</i>
H9/MDR-2	-	Hidrofílica	++	+++	$\sim 13 \times 10^7$	+++	+++	$\sim 13 \times 10^7$	$3,09 \pm 0,14\%$	100%	<i>icaA, atl</i>	<i>mecA</i>
H15/MDR-1	+	Hidrofóbica/AA	+++	-	$\sim 1 \times 10^7$	+++	+++	$\sim 1 \times 10^8$	$2,30 \pm 0,04\%$	25%	-	<i>mecA</i>
H18/MDR-1	-	Hidrofílica	+++	++	$\sim 7 \times 10^6$	+++	+++	$\sim 0,7 \times 10^7$	Negativa	100%	<i>icaA</i>	<i>mecA</i>
H14/não-MDR	-	Hidrofílica	++	-	$\sim 10 \times 10^7$	+++	+++	$\sim 10 \times 10^7$	Negativa	100%	<i>icaA, atl, fbp</i>	-

Legenda: *, Amostra submetida ao sequenciamento genômico; -: resultado negativo; +: resultado positivo; +++: fortemente produtor de biofilme, ++: moderadamente produtor de biofilme; Fonte: A autora, 2023.

Figura 15 – Árvore filogenética mostrando a posição do *Staphylococcus capitis* subsp. *urealyticus* H2 contra as cepas de tipo mais relacionadas ao gênero *Staphylococcus* com base nas sequências do gene 16S rRNA.



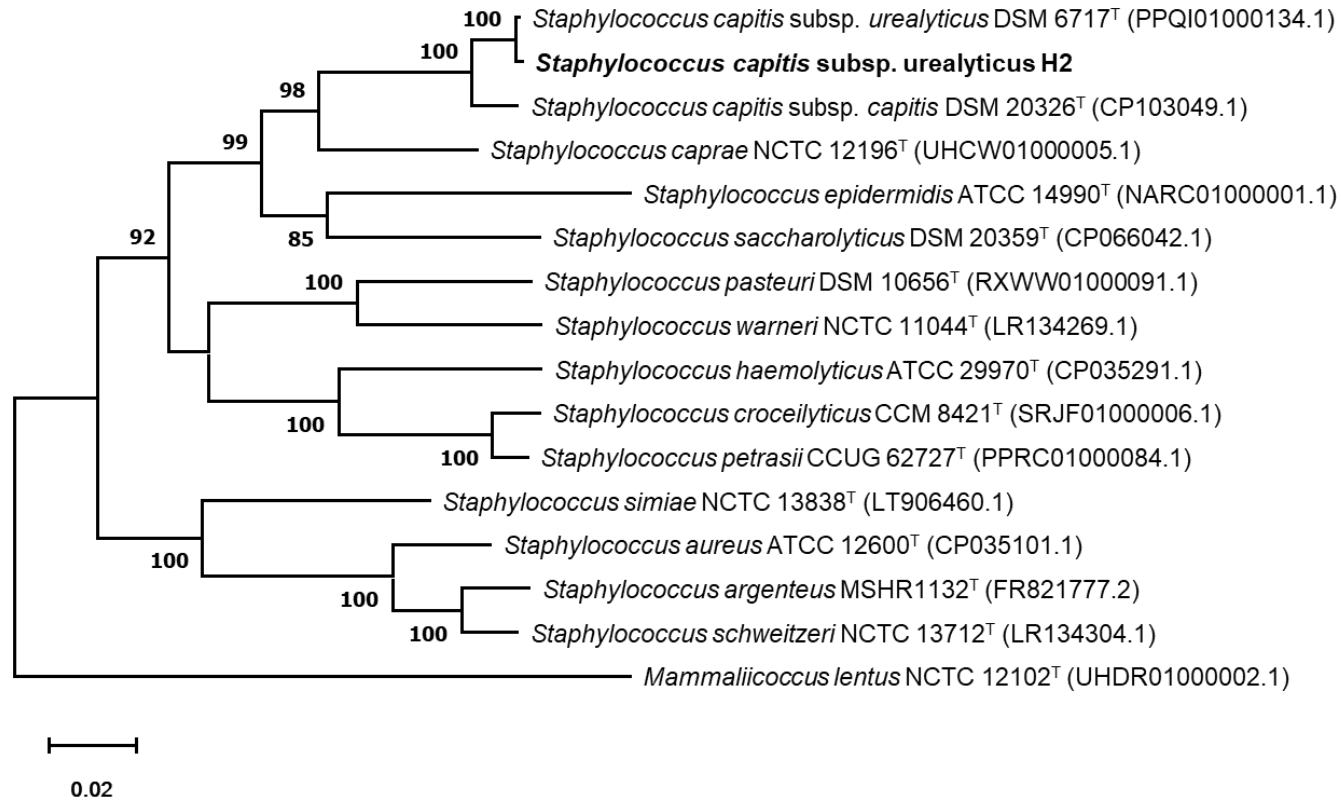
Legenda – O alinhamento foi realizado com sequências (1419-1551 pb) do gene 16S rRNA. Valores de *bootstrap* (>60%) com base em 1.000 repetições são marcados. A sequência de *Mammaliococcus lentus* ATCC 29070^T foi utilizada como grupo externo. Barra 0,01% de divergência de sequência estimada.

Fonte: A autora, 2023.

Os valores encontrados através do ANI/AAI entre *S. capitis* subsp. *urealyticus* H2 e as cepas tipo relacionadas foram respectivamente: *S. caprae* NCTC 12196 (83,35%/88,92%), *S. capitis* subsp. *capitis* DSM 20326 (96,42%/97,32%), *S. capitis* subsp. *urealyticus* DSM 6717 (98,89%/98,70%), *S. saccharolyticus* DSM 20359 (81,13%/83,69%) e *S. epidermidis* ATCC 14990 (80,78%/82,19%).

A árvore da MLSA com a utilização dos seis genes de manutenção da amostra *S. capitis* subsp. *urealyticus* H2 e das cepas tipo relacionadas posicionou a amostra *S. capitis* subsp. *urealyticus* H2 juntamente com *S. capitis* subsp. *urealyticus* DSM 6717^T em um clado distinto com valor de *bootstrap* máximo (100%) evidenciando uma pequena distância filogenética entre as linhagens, como observado na **Figura 16**.

Figura 16 – Árvore filogenética baseada na abordagem MLSA mostrando a posição de *Staphylococcus capitis* subsp. *urealyticus* H2 contra as cepas mais relacionadas dentro do gênero *Staphylococcus* com base nas sequências de sete genes de manutenção (*femA*, *ftsZ*, *gap*, *pyrH*, *rpoB* e *tuf*).

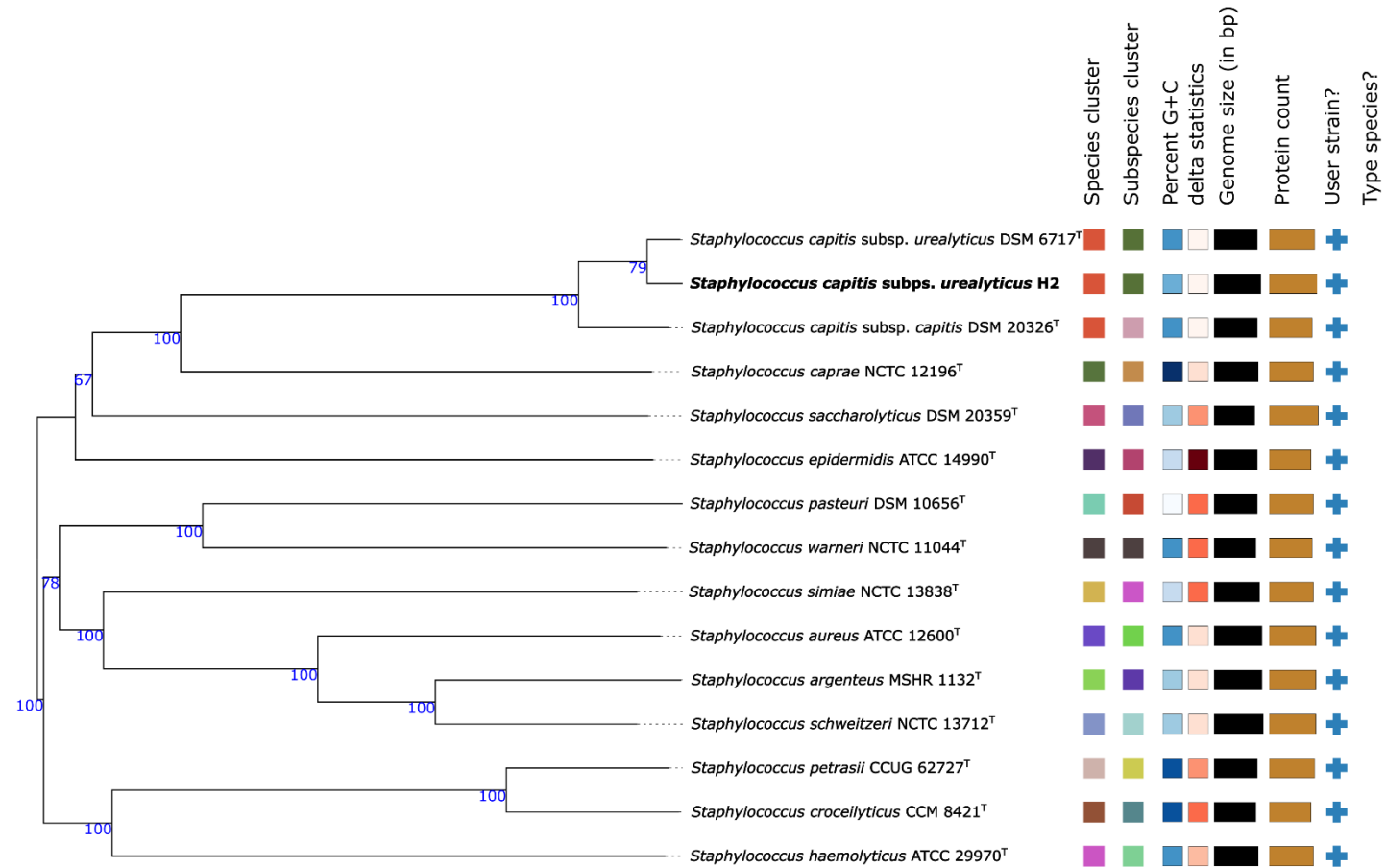


Legenda – Os valores de *bootstrap* (>60%) são mostrados com base em 1.000 repetições. As sequências de *Mammaliicoccus lentus* NCTC 12102^T foi usado como grupo externo. Barra 0,02% de divergência de sequência estimada.

Fonte: A autora, 2023.

Por fim, a reconstrução da árvore filotaxonômica a partir da sequência do genoma da amostra *S. capitis* subsp. *urealyticus* H2 e as sequências dos genomas das cepas tipo de *S. caprae* NCTC 12196, *S. capitis* subsp. *capitis* DSM 20326, *S. capitis* subsp. *urealyticus* DSM 6717, *S. saccharolyticus* DSM 20359 e *S. epidermidis* ATCC 14990, evidencia a formação de um claro distinto formado pela amostra *S. capitis* subsp. *urealyticus* H2 e *S. capitis* subsp. *urealyticus* DSM 6717^T com um valor confiável de *bootstrap* (79%). O clado formado confirma que a amostra *S. capitis* subsp. *urealyticus* H2 de fato pertence a espécie *capitis* e a subsp. *urealyticus* e indica a relação com a subsp. *capitis* mostrando um segundo clado incluindo a *S. capitis* subsp. *capitis* DSM 20326^T também com valor de *bootstrap* máximo (100%). A árvore filogenômica com todas as cepas tipo relacionadas a amostra *S. capitis* subsp. *urealyticus* H2 é mostrada na **Figura 17**.

Figura 17 – Árvore filotaxonômica mostrando a posição de *Staphylococcus capitis* subsp. *urealyticus* H2 contra as cepas do tipo mais relacionadas dentro do gênero *Staphylococcus* com base em sequências completas do genoma



Legenda - As sequências genômicas foram analisadas pelo Type (Strain) Genome Server (TYGS) com parâmetros padrão. Árvore inferida com FastME 2.1.6.1 a partir de distâncias GBDP calculadas a partir de sequências do genoma. Os comprimentos dos ramos são dimensionados em termos da fórmula de distância GBDP d5. Os números acima das ramificações são valores de suporte pseudo-*bootstrap* GBDP (>60%) de 100 replicações, com um suporte médio de ramificação de 93,7%.

Fonte: A autora, 2023

6 DISCUSSÃO

Durante muito tempo, *Staphylococcus* coagulase-negativo (SCoN) foram considerados apenas como contaminantes de hemoculturas e de outros sítios de infecções. Contudo, nas últimas décadas, tem se observado a emergência desse grupo de microrganismos como importantes agentes etiológicos associados a infecções nosocomiais e/ou comunitárias, estando diretamente relacionados ao aumento de casos de IRAS (SUED *et al.*, 2017).

Nas infecções nosocomiais de corrente sanguínea, é notada a prevalência de SCoN em 30-40% das amostras, sendo também relacionadas a outras importantes infecções como as de trato urinário, endocardite e infecções associadas a dispositivos médicos invasivos (ASANTE *et al.*, 2021).

Em um estudo recente, foi observado em 28% de hemoculturas positivas, apresentando amostras das espécies *S. epidermidis* e *S. hominis* (OSAKI *et al.*, 2021). Em outros estudos, relacionados a unidade hospitalar neonatal na Alemanha e no Kuwait, foram isolados predominantemente espécies de SCoN de bacteremias (*S. capitis*, *S. hominis*, *S. warneri* e outros), além de *Escherichia coli* e *S. aureus* quando associados a sepse (TRÖGER *et al.*, 2016; AL-HAQAN *et al.*, 2020).

A semelhança do observado no hospital universitário HUPE, em estudo recente realizado no Brasil, os autores também identificaram SCoN relacionados a hemoculturas de pacientes adultos hospitalizados, entretanto a maioria das espécies foi identificada como *S. capitis* e *S. hominis* (SERRA *et al.*, 2023). Adicionalmente, um estudo em outro continente, também analisou amostras SCoN provenientes de hemoculturas coletadas de bacteremia e ponta de cateter, isolou essas duas espécies em menor quantidade (20,7% de *S. hominis* e 3,8% de *S. capitis*) quando comparada a outras espécies (ÖCAL; TEKELI; DOLAPÇI, 2022).

Patógenos nosocomiais, por permanecerem viáveis e persistirem em superfícies bióticas e abióticas por muito tempo, são considerados fontes contínuas de transmissão cruzada, a partir de pacientes hospitalizados até trabalhadores da área da saúde. A transmissão desses patógenos e a eliminação de suas fontes continuam sendo um desafio, principalmente em UTIs de países em desenvolvimento (ARGEMI *et al.*, 2019; ALI, AFZAL, 2020; MICHALIK *et al.*, 2020).

Atualmente, a identificação correta a nível de espécies dos SCoN e a determinação do perfil de susceptibilidade, tem se tornado cada vez mais importante nos laboratórios de bacteriologia, visto que relacionadas a amostras nosocomiais, essas espécies possuem um reconhecido potencial patogênico. Isso deve-se ao crescente envolvimento com infecções que podem evoluir para sepse, principalmente em neonatos, indivíduos imunocomprometidos e

pacientes que utilizam cateteres e próteses (PEREIRA-RIBEIRO *et al.*, 2019; MICHELS *et al.*, 2021; NAING *et al.*, 2023; VILLARREAL-SALAZAR *et al.*, 2023; ZHOU *et al.*, 2023).

Diversos estudos demonstram que a técnica de MALDI-TOF MS é uma maneira confiável e rápida para identificar os SCoN a nível de espécie, podendo ser analisadas amostras provenientes de múltiplos ambientes, nosocomiais ou não (PEREIRA *et al.*, 2019; SAHA *et al.*, 2020; NAING *et al.*, 2023; VILLARREAL-SALAZAR *et al.*, 2023; WOULDSTRA *et al.*, 2023; ZHOU *et al.*, 2023). No presente estudo, todas as amostras de *S. capitis* e *S. hominis* foram identificadas com confiabilidade utilizando como parâmetro *score* maior que 1,900.

O aumento da resistência aos agentes antimicrobianos é considerado uma preocupação global de saúde pública atual. Esse fato pode interferir diretamente no tratamento das infecções hospitalares, sendo mais ainda dificultado quando esse patógeno expressa multirresistência, ou seja, resistentes a 3 ou mais grupos de antimicrobianos, principalmente relacionados ao uso clínico (MAGIORAKOS *et al.*, 2012; WHO, 2015)

O método de disco difusão é amplamente utilizado pelos laboratórios de microbiologia clínica por ser de fácil execução. Shin e colaboradores (2019) e Serra e colaboradores (2023), encontraram em amostras clínicas de SCoN isoladas em 2014, 2018 até 2021, respectivamente, resistência a múltiplos antimicrobianos como ciprofloxacino, clindamicina, eritromicina, gentamicina, e outros. Contudo, divergem quanto a avaliação a vancomicina, linezolida e teicoplanina, onde no primeiro estudo foi detectada a susceptibilidade, corroborando com nossos resultados e ano da coleta e já no segundo mais recente, observa-se a resistência a esses antimicrobianos em algumas amostras, sendo um alerta quanto ao aumento da resistência e o futuro da saúde pública mundial.

Atualmente, a capacidade de diversas espécies de SCoN expressarem multirresistência tem aumentado significativamente, ainda mais quando associados a resistência a meticilina (MRSCoN) sendo encontradas em todo o mundo, relacionadas diretamente ao aumento da morbidade e mortalidade (SUED *et al.*, 2017; GOULART, 2023; IKHIMIUKOR *et al.*, 2023).

No Kuwait, foi reportada a multirresistência em praticamente metade das amostras de SCoN isolados de hemoculturas de neonatos, utilizando CIM para verificar a susceptibilidade a vancomicina e a teicoplanina. A maioria das amostras foi fenotipicamente resistente a benzilpenicilina, gentamicina e cefoxitina, apresentando em 90% dessas amostras o gene *mecA* e ausência total do gene *mecC* (AL-HAQAN *et al.*, 2020). Em nosso estudo também ocorreu a presença significativa de multirresistência em 77,78% das amostras (n=14), certamente contribuindo para a transferência gênica de resistências no ambiente hospitalar, conforme enfatizado previamente pelo nosso grupo de pesquisa (PEREIRA, 2018). Todas as 18 amostras

presentemente testadas foram sensíveis a vancomicina e teicoplanina, utilizando a mesma metodologia. No entanto, 83,33% (n=15) das amostras foram resistentes a benzilpenicilina, 61,11% (n=11) apresentaram resistência a gentamicina e 66,67% (n=12) resistência a cefoxitina, além de 72,22% (n=13) consideradas positivas para gene *mecA*.

Ao contrário dos resultados do presente estudo, em um artigo anterior foi reportado que apenas 44% das amostras de *S. capitis* foram multirresistentes, onde a maioria também foram consideradas resistentes a cefoxitina e expressavam o gene *mecA* (EHLERSSON *et al.*, 2017). Entretanto, no atual estudo foi detectada a presença do gene *mecA* em 4 amostras sensíveis a cefoxitina e resistência ao norfloxacino e sulfazotrim, em contrapartida ao previamente reportado, que observou a sensibilidade em suas amostras.

Pereira-Ribeiro e colaboradores (2019) afirmaram que a grande parte das infecções por SCoN adquirida dentro dos hospitais pode ser causada por amostras que possuem resistência a múltiplos antimicrobianos, como a gentamicina, eritromicina, ciprofloxacino e benzilpenicilina, refletindo provavelmente na pressão seletiva no ambiente hospitalar, pelo uso indiscriminado de antimicrobianos. A emergência de amostras multirresistentes é considerada um problema de saúde global, visto que a OMS prevê que até 2050 a resistência bacteriana será responsável por 10 milhões de mortes a mais que o câncer (KMIHA *et al.*, 2023).

Amostras de *S. capitis* foram isoladas de pacientes em estágio pré-operatório e apresentando resistência a eritromicina, clindamicina, gentamicina, ciprofloxacino e norfloxacino além da sensibilidade a vancomicina, linezolida, rifampicina, sulfazotrim e teicoplanina (TEVELL *et al.*, 2017). Outros pesquisadores recentemente apresentaram perfis de susceptibilidade de 3 amostras de *S. capitis* provenientes de líquido cefalorraquidiano de um paciente internado, utilizando como parâmetro múltiplos antimicrobianos relacionados com o presente estudo, também associados a resistência a benzilpenicilina, eritromicina, clindamicina, moxifloxacino e ciprofloxacino, e a sensibilidade a vancomicina, teicoplanina e tetraciclina (YU *et al.*, 2022). Na Turquia, foi analisado o efeito da vancomicina *in vitro* em 16 amostras colonizadoras de cateteres, sendo, 15 amostras de *S. hominis* e uma amostra de *S. capitis*, onde todas as amostras foram consideradas sensíveis à vancomicina (ÖCAL *et al.*, 2017). Em um estudo relacionado a um caso de bacteremia associada ao cateter em paciente hospitalizado com neoplasia no pâncreas, foi observada a presença de amostras de *S. hominis* sensíveis a vancomicina, linezolida e clindamicina (MURAKI *et al.*, 2022). A partir de hemoculturas, foram detectadas em um total de amostras de *S. hominis* a resistência a oxacilina e 93,75% vancomicina-sensíveis (SOUROUSH *et al.*, 2017). Todos esses resultados corroboraram com os dados obtidos na presente investigação, o que possivelmente confirmam a relação da

resistência aos agentes antimicrobianos com a dificuldade no tratamento dos pacientes e a disseminação desses microrganismos no ambiente nosocomial.

O fenômeno da resistência aos antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos é conhecido a mais de 50 anos. Embora a meticilina não seja mais utilizada, o termo resistência à meticilina persiste e representa a resistência a praticamente todos os β -lactâmicos, exceto as cefalosporinas de 5ª geração. Essa resistência relacionada a espécies do gênero *Staphylococcus* é atrelada a aquisição de um elemento genético móvel *SCCmec*, que possui o gene de resistência *mecA*, altamente conservado. Esse gene codifica uma proteína ligadora de penicilina modificada, a PBP2a, com uma menor afinidade aos antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos. Uma variante homóloga, o gene *mecC*, foi descoberta em amostras de MRSA oriundas de humanos e de diversas espécies animais na Europa, e possui cerca de 70% de similaridade de identidade de nucleotídeos com o gene *mecA* (EL AILA *et al.*, 2023; KMIHA *et al.*, 2023). De acordo com os resultados obtidos neste estudo, pode ser ressaltado que a resistência fenotípica apresentada por amostras de *S. capitis* e *S. hominis* positivas para o gene *mecA* está associada a produção de PBPs modificadas, ligadas a inibição das transpeptidases, alterando assim síntese e multiplicação da parede celular bacteriana na presença de β -lactâmicos (FERGESTAD *et al.*, 2020).

S. capitis, geralmente considerado uma espécie pouco virulenta tem sido relatada como causa de sepse hospitalar de início tardio nas unidades de terapia intensiva neonatal. Recentemente, um estudo da França identificou um clone de *S. capitis* multirresistente, denominado NRCS-A, apresentando resistência a meticilina e aminoglicosídeos com menor susceptibilidade a vancomicina. O ambiente da UTIN e especialmente as incubadoras, constituem reservatório do NRCS-A dos quais podem se difundir dentro do ambiente hospitalar (THORN *et al.*, 2020).

A capacidade de aderência e de formação de biofilme em dispositivos médicos implantados, tem sido reportado para diferentes espécies de SCoN. Entretanto, poucas investigações têm sido relacionadas com *S. capitis* e *S. hominis* e seus fatores de virulência (ESMAIL *et al.*, 2023; VILLARREAL-SALAZAR *et al.*, 2023). No presente estudo, todas as amostras foram capazes de aderir e formar biofilme em diferentes superfícies de natureza abióticas e bióticas com variadas intensidades, expondo assim a necessidade de pesquisar e analisar esse fenótipo. Estudos recentes também demonstraram que espécies de *S. capitis*, *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de biofilme podem ser capazes de resistir a altas concentrações de antimicrobianos quando comparadas a bactérias não-produtoras (ZHOU *et al.*, 2013; ZAMMUTO *et al.*, 2023).

Infecções crônicas ou recorrentes, relacionadas ao biofilme, são frequentemente associadas a uma difícil erradicação. O complexo processo da formação de biofilme envolve a aderência bacteriana, produção de *slime* e outras características específicas de superfície, que dependem das propriedades físico-químicas, hidrofobicidade e outras particularidades. Diversos estudos demonstram que os SCoN são capazes de produzir *slime* na fase inicial da formação de biofilme em superfícies abióticas e biomateriais (UYANIK *et al.*, 2014; VASILEIOU *et al.*, 2018; CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA *et al.*, 2023). Entretanto, recentemente foi reportada a correlação da produção de *slime* e a formação de biofilme não foi observada para amostras de 12 espécies de SCoN previamente estudadas, incluindo *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. carnosus*, *S. xilosus* e *S. saprophyticus*. (CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA *et al.*, 2023). Naquela oportunidade, os pesquisadores não testaram amostras de *S. capitis* e *S. hominis*.

Embora a maioria das amostras de *S. hominis* e *S. capitis*, incluindo as *S. capitis* subsp. *capitis* e *S. capitis* subsp. *urealyticus*, sejam caracterizadas como capazes de metabolizar sacarose (BANNERMAN; KLOOS, 1991), no presente estudo foi demonstrada a produção de *slime* em apenas 39,89% das amostras, sendo cinco de *S. capitis* e duas de *S. hominis*. Somente uma amostra de *S. capitis* expressou perfil não-MDR. Deste modo, assim como previamente observado para as diversas espécies de SCoN, não houve correlação da produção de *slime* e a formação de biofilme em superfícies abióticas diversas para amostras de *S. capitis* e *S. hominis* isoladas de hemoculturas. Adicionalmente, não foi observada a correlação da metabolização da sacarose e produção de *slime*.

Outros estudos também associam a produção de *slime* e de biofilme aos SCoN e *S. aureus* oriundos de diversas fontes: como em alimentos congelados, isolados de amostras clínicas (cateteres, sangue, urina, pus, tubo endotraqueal e outros), em hemoculturas provenientes de bacteremias e pontas de cateter e de hemocultura de neonatos (RAMPELOTTO *et al.*, 2018; SHRESTHA; BASUDHA; KHANAL, 2018; TAHAEI *et al.*, 2020; MANANDHAR *et al.*, 2021; ÖCAL; TEKELI; DOLAPÇI, 2022; CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA *et al.*, 2023).

Recentemente, um estudo caracterizou a formação de biofilme na superfície do vidro em intensidades forte e moderada por amostras clínicas de SCoN (MANANDHAR *et al.*, 2021). Interessantemente, a maioria das amostras SCoN provenientes de hemocultura de neonatos e de outros sítios clínicos, foram consideradas não formadoras de biofilme na superfície do vidro (RAMPELOTTO *et al.*, 2018; SHRESTHA; BHATTARAI; KHANAL; 2018). Em contraste, os resultados obtidos na presente investigação caracterizaram a maioria das amostras de *S.*

capitis e *S. hominis* como fortemente produtoras de biofilme no vidro (83,33%; n=15) e algumas moderadamente produtoras (16,67%; n=3), independente da produção de *slime*. Amostras incapazes de formar biofilme no vidro não foram observadas.

As superfícies hidrofóbicas estão relacionadas a uma maior facilidade de colonização de alguns microrganismos (MORAES *et al.*, 2013). Embora todas as amostras de *S. capitis* tenham sido capazes de formar biofilme na superfície hidrofóbica do poliestireno em diferentes intensidades, a maioria (66,67%) das amostras de *S. hominis* não apresentaram essa propriedade. De acordo com o trabalho realizado por Pereira e colaboradores (2018) do nosso grupo de pesquisa, a formação de biofilme na superfície de poliestireno foi caracterizada em diferentes intensidades, para amostras de *S. haemolyticus* isolados de hemocultura. Presentemente, para as amostras de *S. capitis* e *S. hominis* que foram formadoras de biofilme em poliestireno não foi observada correlação com a produção de *slime*, hidrofobicidade e perfis de resistência.

Os ensaios de interação com hidrocarboneto *n*-Hexadecano permitem avaliar a hidrofobicidade e propriedades de auto agregação bacteriana. Em geral, diferentes métodos que avaliam a hidrofobicidade podem divergir quanto a seus resultados, devido ao fato de certas bactérias apresentarem componentes de superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas, expressos em intensidades variadas (MATTOS-GUARALDI *et al.*, 1999; ROSEMBERG *et al.*, 2006). Trabalho realizado com *Corynebacterium diphtheriae*, demonstrou que a amostra 241, sacarose positiva, apresentou forte capacidade de formação de biofilme no vidro, menor capacidade de interação com o poliestireno, não auto agregativa e hidrofílica na presença do *n*-Hexadecano. Em contraste, a amostra CDC 8392 apresentou ausência de formação de biofilme no vidro, fortemente formadora de biofilme no poliestireno, hidrofóbica e auto agregativa (MATTOS-GUARALDI *et al.*, 1999). No trabalho atual, foi possível verificar que a maioria das amostras de *S. capitis* e *S. hominis* (66,67% n=12) foi caracterizada como hidrofílica, fortemente formadoras de biofilme na superfície do vidro e com menor capacidade de formar biofilme no poliestireno. A produção de *slime* não teve correlação com as propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas das amostras, além da auto agregação bacteriana. Similarmente ao observado para amostra *C. diphtheriae* 241, as amostras de *S. capitis* e *S. hominis* são sacarose-positivas.

A interação de bactérias com biomateriais tem sido crucial no condicionamento do progresso de infecções nosocomiais severas. Para as espécies de estafilococos, duas explicações possíveis sobre a capacidade de colonizar materiais artificiais são a produção bacteriana de *slime* polissacarídico e a presença de adesinas que interagem com proteínas da matriz do hospedeiro que, *in vivo*, são adsorvidas na superfície do biomaterial. A formação de biofilme

bacteriano tem sido considerada como um fator de virulência que contribui para infecções associadas a catéteres e outros dispositivos médicos invasivos. Neste estudo, tanto em amostras *S. capitis* e *S. hominis* provenientes de hemoculturas, foi possível detectar uma elevada quantidade de biofilme associado aos cateteres de poliuretano e silicone, formando um tapete espesso. Em um estudo recente foi observado a formação de biofilme significativo em cateter desses mesmos materiais relacionados a amostras de SCoN incluindo *S. capitis* e *S. hominis* (CANGUI-PANCHI et al., 2022).

De acordo com os resultados relacionados com a formação de biofilme em aço e membrana de pericárdio bovino, ressalta-se que os números de células microbianas aderidas nessas superfícies estão associadas a formação de biofilme maduro. O número de procedimentos para o uso de biomateriais implantáveis de aço tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas, embora novas tecnologias facilitem os procedimentos relacionados ao implante e infecções associadas aos dispositivos invasivos (SOUSA et al., 2017; SUED-KARAM et al., 2022).

Os ensaios de MEV tiveram como objetivo principal informações qualitativas da estrutura do biofilme, a observação de bactérias aderidas e a sua organização tridimensional. Demonstrado pela MEV nos biomateriais de aço, as seis amostras representativas de *S. capitis* e *S. hominis* apresentaram um aumento da auto agregação e de produção do biofilme em superfície do aço em 24 e 48 horas. As amostras H2 e H15 apresentaram um maior aumento na formação do biofilme nessa superfície, onde a amostra de *S. capitis* (H2) apresentou maior produção do que *S. hominis* (H15). Segundo Vasconcelos (2018), amostras de *S. capitis* e *S. hominis* isoladas de fômites provenientes de centros cirúrgicos, também foram capazes de aderir e formar biofilme nessa superfície abiótica. A estrutura do biofilme foi característica de isolados fortemente aderentes, produzindo uma camada espessa de matriz extracelular, como mostrado em outros estudos (BAILLIF et al., 2013; BARROS et al., 2015). Portanto foi demonstrado nesse estudo, que as amostras MDR de *S. capitis* e *S. hominis* foram capazes de formar biofilme nas superfícies de cateteres de poliuretano e silicone, de natureza hidrofóbica e hidrofílica, respectivamente, utilizados como dispositivos médicos implantados.

No presente estudo foi observado a aderência as fibras de colágeno e formação de biofilme em membranas de pericárdio bovino, por amostras de *S. capitis* e *S. hominis*. Estudos *in vitro* demonstraram que *S. epidermidis* e *S. aureus* também aderem a superfícies metálicas (SUBBIAHDOSS et al., 2012). Sendo assim, destaca-se a preocupação devido à grande capacidade de sobrevivência e disseminação das espécies SCoN, exercendo influência sobre a morbimortalidade dos pacientes, contribuindo para onerar os serviços de saúde tanto em países

industrializados como nos países em desenvolvimento. Não foi encontrado na literatura estudos envolvendo as espécies *S. capitis* e *S. hominis* e a formação de biofilme em membrana de pericárdio bovino, porém Sued-Karam e colaboradores (2022) investigaram esse método em amostras de *S. haemolyticus* isolados de hemoculturas, onde foi verificada a alta capacidade de formação de biofilme nesse biomaterial, em nosso laboratório de pesquisa.

A virulência em isolados de SCoN é atribuída principalmente à sua capacidade de colonizar superfícies e materiais sintéticos, favorecendo a formação de biofilme, mediado, na maioria das vezes, pelo gene *ica* (AL-HAQAN *et al.*, 2020; JASINSKA *et al.*, 2021; CANGUI-PANCHI *et al.*, 2022).

Pereira-Ribeiro e colaboradores (2019) demonstraram que a expressão do gene *ica* leva à produção da adesina intercelular polissacarídica (PIA), o que contribui para a formação de biofilme. A expressão do gene *ica* e subsequente formação de biofilme em *Staphylococcus* spp. parece ser ativada por antimicrobianos β -lactâmicos como a oxacilina. A expressão do operon *ica* está sujeita à regulação ambiental, sendo parcialmente controlada por fatores de transcrição em resposta ao estresse causado por sub-CIMs dos antimicrobianos (BARROS *et al.*, 2015; SUED *et al.*, 2017). A expressão do gene *ica* é regulada por múltiplos genes, como *sigB*, *sar*, e o gene regulador acessório, podendo interagir e regular a formação de biofilmes. A presença do gene de adesão *ica* pode explicar o papel dos vários mecanismos de aderência na patogênese da infecção. No entanto, alguns estudos não encontraram associação entre a detecção do gene *ica* e a formação de biofilmes, sendo essa habilidade uma possível estratégia de sobrevivência (PEREIRA, 2018; PEREIRA-RIBEIRO *et al.*, 2019; JASINSKA *et al.*, 2021). No atual estudo, foi evidenciado que a formação de biofilme foi independente da presença do gene *icaA*. Adicionalmente foi demonstrado que em nenhuma das amostras de *S. capitis* e 50,00% (n=3) das amostras de *S. hominis*, não relacionaram a presença do gene *icaA* e a formação do biofilme em poliestireno. A ausência de biofilme, apesar da presença de *icaA*, pode ser devido a várias razões, como a inativação do operon *ica* pela ação do repressor *icaR*, ou por regulação pós-transcrição. Estudos anteriores corroboraram com nossos resultados, uma vez que foi observado em amostras de *S. capitis* e *S. hominis* provenientes de hemoculturas, a capacidade de formação de biofilme na ausência do gene *icaA* (ÖCAL, TEKELI E DOLAPÇI, 2022; HOSBUL *et al.*, 2021). Vários fatores de virulência estão associados ao biofilme de *ica*-independentes, como a proteína de ligação ao fibrinogênio (*fbe*), a enzima de síntese de polissacarídeos capsulares (*cap8D*), virulência associada a parede celular ancorada a proteína (*sasH*), regulador acessório estafilocócico (*sarA*), dois componentes genéticos do sistema *arlRS* e o maior gene de autolisina *atl* (BAKTHAVATCHALAM *et al.*, 2017; KLUJ *et al.*, 2018).

No atual estudo, o gene *atl* foi encontrado em 55,56% das amostras, que codificam as autolisinas, que são hidrolases de peptidoglicano, envolvidas em vários processos celulares tais como: divisão e separação celular, além da lise de células bacterianas induzidas por antimicrobianos e também estão envolvidas na aderência inicial da formação de biofilme (KLUJ *et al.*, 2018; HOSBUL *et al.*, 2021).

A fibronectina é uma glicoproteína de alto peso molecular e um componente da matriz extracelular que se liga às proteínas da membrana celular denominadas integrinas, mas também pode se ligar à fibrina e ao colágeno. Fibrinogênio é uma glicoproteína encontrada no plasma sanguíneo. O fibrinogênio desempenha um papel importante no processo de coagulação sanguínea, em que o fibrinogênio é transformado em sua forma insolúvel, fibrina. A proteína ligadora de fibrinogênio é um importante fator de virulência em infecções causadas por *S. aureus*, pois não se liga apenas ao fibrinogênio, mas também pode interferir com a agregação de plaquetas e a cascata do complemento dentro do hospedeiro. Em um estudo foi observada uma taxa de 5,66% do gene *fbp*, condizente também com nossos resultados, onde este gene foi detectado em somente duas amostras de *S. capitis* e uma amostra da espécie *S. hominis* (SERRAY *et al.*, 2016).

A PIA juntamente com Embp, Bap e Aap (proteínas associadas ao acúmulo de biofilme) são responsáveis pela aderência e acumulação intercelular, permitindo a formação do biofilme (JASINSKA *et al.*, 2021). No presente trabalho foi observada a ausência do gene *aap* nas amostras *S. capitis* e *S. hominis* mesmo apresentando a capacidade de formar biofilme fortemente em diversas superfícies, já que esse gene codifica uma proteína importante na aderência e agregação intercelular que permite a formação do biofilme, tendo papel importante nos biofilmes *ica*-independentes. A presença do gene *bap* parece não ser um dos principais fatores relacionados a formação de biofilme para amostras das espécies *S. capitis* e *S. hominis* isoladas de hemocultura, uma vez que a presença do gene foi detectada em apenas três amostras de *S. capitis*. Adicionalmente não foram detectados os genes *epbS* e *fnbA* que codificam a proteína de ligação a elastina e a fibronectina, respectivamente. Em um estudo recente, foi correlacionada a presença do gene *aap* sugerindo que seus biofilmes sejam compostos principalmente por fatores proteicos, diferente do observado nos dados relacionados a composição do biofilme no nosso estudo (SALGUEIRO *et al.*, 2017).

A capacidade de aderência bacteriana é considerada o primeiro passo na complexa interação em células eucarióticas ou superfícies teciduais do hospedeiro, necessitando a utilização de diversos mecanismos como ligantes e receptores, que influenciam diretamente na interação entre hospedeiro e microrganismo. É reconhecido que a espécie *S. aureus* possua

múltiplos fatores de aderência, que regulam essa associação com células epiteliais humanas. Porém, poucos estudos reportam a capacidade do gênero *Staphylococcus* de interagir com células Detroit 562, sendo as investigações centralizadas na virulência de *S. aureus* e também relacionadas a outros microrganismos (VAN WAMEL *et al.*, 1998; SAKARYA *et al.*, 2009; RIDLEY; DOUGLAS; WHAWELL, 2012; JASINSKA *et al.*, 2021).

Em um estudo recente, foi demonstrada a capacidade da associação de células epiteliais humanas Detroit 562 com amostras de *S. aureus* e *S. epidermidis* fortemente produtoras de biofilme em poliestireno e a possível relação com os genes do operon *ica*. As espécies foram capazes de associar rapidamente as células Detroit 562, porém estatisticamente as amostras de *S. epidermidis* apresentaram menor capacidade de associação do que as de *S. aureus* (JASINSKA *et al.*, 2021). Esse resultado obtido com uma espécie relevante de SCoN, é similar ao que foi encontrado no presente estudo, onde três amostras de *S. capitis* foram capazes de interagir com maior intensidade as células epiteliais Detroit 562, enquanto uma amostra de *S. hominis* interagiu em menor intensidade. Entretanto, duas amostras de *S. hominis* não interagiram com as células de linhagem Detroit 562. Estudos adicionais permanecem necessários para avaliar detalhadamente os processos de invasão e persistência dessas espécies com as células epiteliais humanas de origens diversas.

Modelos experimentais *in vivo* são essenciais para o estudo de patogenicidade e virulência bacteriana, além do tratamento de doenças em humanos. A utilização de larvas de *G. mellonella* está cada vez mais frequente, devido as suas diversas vantagens como facilidade no manuseio, sistema imune semelhantes aos mamíferos, viabilidade econômica, entre outros. Além disso, quando pessoas se deparam com exemplares na fase larval de *G. mellonella* em algum ambiente são prontamente descartadas, sendo muito interessante a oportunidade de utilizá-las na área da pesquisa e saúde (SOARES *et al.*, 2022; LEBEURRE *et al.*, 2019).

Diversos estudos relacionam o uso de larvas de *G. mellonella* como modelo experimental para diferentes espécies bacterianas. Entretanto, para *Staphylococcus* spp. só foram reportados estudos das análises associadas a *S. aureus* e a uma espécie de SCoN: *S. lugdunensis* (LEBEURRE *et al.*, 2019; CUNHA *et al.*, 2020; HARDY *et al.*, 2020). No atual estudo foi demonstrada a patogenicidade de *S. capitis* e *S. hominis* para larvas de *G. mellonella*, onde todas as amostras testadas de *S. capitis* expressaram elevado grau de virulência, sendo capaz de induzir a letalidade total das larvas utilizadas. Enquanto, as amostras de *S. hominis* variaram quanto ao potencial de letalidade para *G. mellonella*, uma vez que duas amostras de *S. hominis* induziram totalmente a letalidade das larvas enquanto uma parcialmente, não havendo relação com o fato de as amostras serem MDR ou não.

A confirmação molecular da amostra *Staphylococcus capitis* subsp. *urealyticus* H2 pela similaridade do gene 16S rRNA não foi possível chegar a nível de espécie bacteriana devido a estreita relação com as espécies *S. caprae*, *S. saccharolyticus*, *S. epidermidis*, *S. capitis* subsp. *capitis*. Entretanto com base na análise filogenética do gene 16S rRNA identificamos a relação filogenética com a espécie *S. capitis* subsp. *urealyticus* com alta confiabilidade quando baseado nos valores obtidos do *bootstrap*. Nossos resultados foram semelhantes aos resultados encontrados por Kovařovic e colaboradores (2021), quando observa que através do gene 16S rRNA não possui um poder discriminatório capaz de chegar a uma identificação fidedigna. Também neste trabalho, Kovařovic e colaboradores (2021), observaram que o estudo filogenético direcionava com mais clareza a posição das espécies, sendo possível identificar as espécies que se relacionam.

Como esperado, as análises taxonômicas baseadas nas análises da dDDH, ANI e AAI, direcionou o grupo de espécies estreitamente relacionadas com a amostra *S. capitis* subsp. *urealyticus* H2, excluindo as espécies *S. caprae*, *S. saccharolyticus* e *S. epidermidis* como possibilidades de pertencerem a amostra deste trabalho, uma vez que todos os valores foram abaixo do necessário para a caracterização a nível de espécie, dDDH (>70%) ANI/AAI (95-96%) (GORIS *et al.*, 2007; MEIER-KOLTHOFF *et al.*, 2013; RODRIGUEZ-R; KONSTANTINIDIS, 2014).

As análises da MLSA e da árvore filotaxonômica corroboraram entre si e com a análise filogenética através da sequência do gene 16S rRNA, evidenciando a topologia das árvores em que a amostra *S. capitis* subsp. *urealyticus* H2 e a espécie *S. capitis* subsp. *urealyticus* DSM 6717^T formam um clado distinto e relacionado entre si. Ademais, com base nas análises taxonômicas obtidas pelo servidor TYGS, também é possível observar que a amostra *S. capitis* subsp. *urealyticus* H2 e *S. capitis* subsp. *urealyticus* DSM 6717^T, compartilham entre si, mais de 79% de dDDH, o que mostra a distinção entre a amostra *S. capitis* subsp. *urealyticus* H2 e a espécie *S. capitis* subsp. *capitis* DSM 20326^T. Ambas as análises são observadas através das colunas colorimétricas mostradas na **Figura 17** (MEIER-KOLTHOFF; GÖKER, 2019).

Deste modo, estudos adicionais permanecem necessários para avaliar os processos multifatoriais de virulência que contribuem para a patogênese de amostras de *S. capitis* e *S. hominis*. Avançar no conhecimento sobre a virulência, assim como a epidemiologia das infecções causadas por essas bactérias no ambiente hospitalar e a evolução clínica dos pacientes são fatores fundamentais, para que sejam elaborados diagnósticos mais acurados e que ocorra melhorias quanto a indicação de agentes antimicrobianos específicos, subsidiando favoravelmente a decisão de tratamento das infecções. A capacidade desses microrganismos

ultrapassarem as barreiras hematológicas ainda é motivo de investigação, pois os mecanismos envolvidos neste processo de invasão ainda não foram esclarecidos.

CONCLUSÃO

Os dados obtidos permitiram verificar aspectos conclusivos relacionados aos objetivos específicos propostos no presente estudo.

O isolamento de amostras de *S. capitis* e *S. hominis* a partir de hemoculturas confirmam que essas espécies de SCoN patogênicos estão cada vez mais relacionadas com casos de IRAS, especialmente quando relacionadas a dispositivos médicos invasivos e também como causa de morbidade e mortalidade. Portanto, a correta identificação de *S. capitis* e *S. hominis* são essenciais para a efetiva terapia antimicrobiana e são fundamentais na vigilância, controle e prevenção de surtos de amostras *Staphylococcus* spp. resistentes aos agentes antimicrobianos. A técnica de MALDI-TOF permitiu a confirmação da identificação correta das espécies *S. capitis* e *S. hominis*, além de resultados rápidos obtidos em apenas alguns minutos e utilizando uma pequena quantidade de inóculo.

A heterogeneidade dos perfis de resistência foi observada tanto nas amostras de *S. capitis* e *S. hominis*, sendo descritos diversos perfis MDR e não-MDR, alertando a necessidade de maior vigilância, controle e prevenção quanto ao uso indiscriminado de agentes antimicrobianos. Todas as amostras foram consideradas vancomicina, teicoplanina e linezolida sensíveis. A maioria das amostras resistentes a cefoxitina (precursora da resistência a oxacilina) também apresentaram o gene *mecA*. Entretanto, para algumas amostras de *S. capitis* e *S. hominis* essa correlação não foi observada, demonstrando que a resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos pode estar relacionada a outros genes e/ou fatores.

A produção de *slime* utilizando o meio Vermelho do Congo acrescido de sacarose, foi observada para algumas amostras de *S. capitis* e *S. hominis* isoladas de hemoculturas. Aproximadamente metade das amostras (>50%) de ambas as espécies foram incapazes de produzir *slime* nesses experimentos. Adicionalmente, não foi observada a correlação entre a produção de *slime* e a capacidade de formação de biofilme em diferentes superfícies bióticas e abióticas das amostras testadas.

As amostras de *S. capitis* e *S. hominis* expressaram maior capacidade de formação de biofilme na superfície abiótica hidrofílica do vidro, quando comparada com a superfície hidrofóbica do poliestireno. Inclusive, algumas amostras de *S. hominis* mostraram-se incapazes de formar biofilme no poliestireno, apesar de fortemente produtoras de biofilme no vidro.

Uma vez que *S. capitis* e *S. hominis* estão associados a infecções de corrente sanguínea relacionada ao uso de cateteres, particularmente em pacientes imunocomprometidos, os resultados também permitiram concluir que esses patógenos, expressando perfis MDR ou não-MDR, apresentam a capacidade de formar biofilme em cateteres de poliuretano e de silicone.

A formação de biofilme por *S. capitis* e *S. hominis* não foi diretamente relacionada a presença dos genes *ica* além dos demais genes testados (*aap*, *bap*, *fbp*, *fnbA*, *epbS*), indicando possivelmente o envolvimento de outros genes e mecanismos neste processo. Deste modo, os dados enfatizam que a formação de biofilme dessas espécies é complexa e que os mecanismos moleculares da formação de biofilme ainda não foram totalmente elucidados.

A relação entre a formação de biofilme bacteriano e as propriedades hidrofóbicas das amostras de *Staphylococcus* spp. permanece pouco estudada. No presente estudo foi documentado pela primeira vez que as superfícies celulares das amostras de *S. capitis* e *S. hominis* isoladas de sangue foram caracterizadas predominantemente como hidrofílicas, com bactérias exibindo pouca auto agregação. A auto agregação pode ser um fator importante para quando avaliamos a aderência e formação de biofilme em superfícies abióticas hidrofóbicas, além de outros mecanismos relacionados aos processos infecciosos, inclusive interações com células epiteliais humanas, conforme documentado com células da linhagem Detroit 562.

O modelo experimental *in vivo* utilizando *G. mellonella* mostrou-se eficaz para avaliação da patogenicidade das amostras de *S. capitis* e *S. hominis*, devido alto grau de similaridade do seu sistema imunológico com o dos mamíferos, envolvendo tanto respostas celulares como humorais. Uma das grandes vantagens do uso desse modelo nas pesquisas é a facilidade de observação dos resultados, pois uma vez infectada, o corpo da larva escurece devido a melanização, a motilidade é diminuída e ocorre sua morte. No presente estudo também foi documentado pela primeira vez que amostras *S. capitis* e *S. hominis* são patogênicas para larvas de *G. mellonella*, expressando elevado grau de virulência. Amostras MDR de *S. capitis* e *S. hominis* foram capazes de causar a morte de todas as larvas utilizadas nos experimentos. Interessantemente, ao contrário do esperado, uma amostra de *S. hominis* não-MDR foi capaz de matar todas as larvas, enquanto uma amostra MDR matou fracamente as larvas.

A elevada incidência de patógenos emergentes nosocomiais multirresistentes têm sido relatado como um problema mundial, onde os SCoN, têm se mostrado cada vez mais importantes neste cenário, devido ao fato de estarem envolvidos em IRAS. Dentre a maioria das IRAS que tem como porta de entrada a pele e as mucosas, pelo rompimento da barreira cutânea, a identificação de SCoN como participantes desses processos infecciosos é de extrema importância para o conhecimento das características fisiopatológicas. Desta forma, o

conhecimento epidemiológico acerca das infecções causadas por SCoN contribuirá para o manejo clínico dessas infecções, otimizando a assistência terapêutica.

REFERÊNCIAS

- Ahmed A, Satti L, Zaman G, Gardezi A, Sabir N, Khadim MT. Catheter related recurrent blood stream infection caused by linezolid-resistant, methicillin resistant *Staphylococcus haemolyticus*; an emerging super bug. *Journal of the Pakistan Medical Association*. 2019; 69(2): 261-263.
- Alabdullatif M, Ramirez-Arcos S. Biofilm-associated accumulation-associated protein (Aap): A contributing factor to the predominant growth of *Staphylococcus epidermidis* in platelet concentrates. *Vox Sanguinis*. 2019; 114(1): 28-37.
- Albert E, Sahin-Tóth J, Horváth A, Papp M, Biksi I, Dobay O. Genomic Evidence for Direct Transmission of *mecC*-MRSA between a Horse and Its Veterinarian. *Antibiotics (Basel)*. 2023; 12(1): 408-421.
- Al-Haqan A, Boswihi SS, Pathan S, Udo EE. Antimicrobial resistance and virulence determinants in coagulase-negative staphylococci isolated mainly from preterm neonates. *PLoS ONE*. 2020; 15(8): e0236713.
- Ali SA, Afzal, E. Role of prophylactic antibiotics in elective surgeries and postoperative surgical infections. *International Surgery Journal*. 2020; 7(7): 2208-2212.
- Al-Talib NA, Abduljala MH, Hamodat ZMA. A Review on *Staphylococcus* sp. and its pathogens. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*. 2020; 11(2): 755-759.
- Al-Tamimi M, Abu-Raideh J, Nisreen Himsawi N, Khasawneh A, Hasan, Hawamdeh H. Methicillin and vancomycin resistance in coagulase-negative *Staphylococci* isolated from the nostrils of hospitalized patients. *Journal of Infection in Developing Countries*. 2020; 14(1): 28-35.
- Andrade-Oliveira AL, Rossi CCR, Souza-Silva T, Giambiagi-deMarval M. *Staphylococcus nepalensis*, a commensal of the oral microbiota of domestic cats, is a reservoir of transferrable antimicrobial resistance. *Microbiology (Reading)*. 2020; 166 (8): 727-734.
- Andrea A, Krogfelt KA, Jenssen H. Methods and challenges of using the greater wax moth (*Galleria mellonella*) as a model organism in antimicrobial compound discovery. *Microorganisms*. 2019; 7(3): 85.
- Andrews, S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Disponível em: <<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>>. Acesso em: 12 abr. 2023.
- Anjos PP, Cavalcante AS, Anjos CP, Santos CRB, Brandão e Vandesmet LCS. Análise microbiológica de fômites de funcionários de um hospital. *Revista Expressão Católica Saúde*. 2018; 3(1).

Antoine C, Laforêt F, Blasdel B, Fall A, Duprez J-N, Mainil J, Delcenserie V, Thiry D. In Vitro Characterization and In Vivo Efficacy Assessment in *Galleria mellonella* Larvae of Newly Isolated Bacteriophages against *Escherichia coli* K1. *Viruses*. 2021; 13: 1-19.

Araújo GL. Produção de biofilme, detecção dos genes *icaAD*, *atlE* e *aap* e resistência aos antimicrobianos em cepas de *Staphylococcus epidermidis* resistentes a metilina (MRSE). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2006.

Arbeláez, MIA, Silva ACAP, Navegante G, Valente V, Barbugli PA, Vergani CE. Proto-Oncogenes and Cell Cycle Gene Expression in Normal and Neoplastic Oral Epithelial Cells Stimulated With Soluble Factors From Single and Dual Biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021; 11: 627043.

Argemi X, Hansmann Y, Prola K, Prévost G. Coagulase-Negative Staphylococci Pathogenomics. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; Mar 20(5).

Asante J, Hetsa BA, Amoako DG, Abia ALK, Bester LA, Essack SY. Multidrug-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Bloodstream in the uMgungundlovu District of KwaZulu-Natal Province in South Africa: Emerging Pathogens. *Antibiotics*. 2021; 10(2): 1-10.

Azimi T, Mirzadeh M, Sabour S, Nasser A, Fallah F, Pourmand MR. Coagulase-negative staphylococci (CoNS) meningitis: a narrative review of the literature from 2000 to 2020. *New Microbes and New Infections*. 2020; 37: 1-15.

Baillif S, LeDuff F, Hartmann DJ, Kodjikian L. *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Formation and Structural Organization on Different Types of Intraocular Lenses under *in vitro* Flow Conditions. *Ophthalmic Research*. 2013; 50(2): 83-90.

Bakthavatchalam YD, Sudarsanam TD, Babu P, Munuswamy E, Prabaa D, Sethuvel M, Sethuvel DPM, Ragupathi NKD, Veeraraghavan B. Methicillin susceptible teicoplanin resistant *Staphylococcus haemolyticus* from bloodstream infection: Novel mutation in teicoplanin resistant operon (*tcaRAB*). *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2017; 70(4): 458-460.

Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*. 2012; 19(5): 455-477.

Bannerman TL, Kloss WE. *Staphylococcus capitis* subsp. *urealyticus* subsp. nov. from human skin. *International journal of systematic bacteriology*. 1991; 41(1): 144-147.

Barros EM, Lemos M, Souto-Padrón T, Giambiagi-Demarval M. Phenotypic and genotypic characterization of biofilm formation in *Staphylococcus haemolyticus*. *Current Microbiology*. 2015; 70(6): 829-34.

Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. *Clinical microbiology reviews*. 2014; 27(4): 870-926.

Boakes E, Marbach H, Lynham S, Ward M, Edgeworth JD, Otter JA. Comparative analysis of phenol-soluble modulín production and *Galleria mellonella* killing by community-associated and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Medical Microbiology*. 2016; 65: 1429-1433.

Butin M, Martins-Simões P, Pichon B, Leyssenes D, Bordes-Couecous S, Meugnieri H, Rouards C, Lemaitre N, Schramm F, Kearns A, Spiliopoulou I, Hyyryäinen H-L, Dumitrescu O, Vandeneschi F, Dupieux C, Laurent F. Emergence and dissemination of a linezolid-resistant *Staphylococcus capitis* clone in Europe. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017; 72(4): 1014-1020.

Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - BrCAST, “Método de Disco-Difusão para teste de sensibilidade aos antimicrobianos,” pp. 1–29, 2021.

Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - BrCAST, “Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos,” 2023.

Calkins S, Couger MB, Jackson C, Zandler J, Hudgins GC, Hanafy RA, Budd C, French DP, Wouter D, Hoff WD, Youssef N. Draft genome sequence of *Staphylococcus hominis* strain Hudgins isolated from human skin implicates metabolic versatility and several virulence determinants. *Genomics Data*. 2016; 10: 91-96.

Campos-Silva, R. Brust, FR, Trentin DS, Macedo AJ. Alternative method in *Galleria mellonella* larvae to study biofilm infection and treatment. *Microbial Pathogenesis*. 2019; 137: 1-5.

Cangui-Panchi SP, Nacato-Toapanta AL, Enriquez-Martínez LJ, Reyes J, Garzon-Chavez D, Machado A. Biofilm-forming microorganisms causing hospital-acquired infections from intravenous catheter: A systematic review. *Current research in microbial sciences*. 2022; 3: 100175.

Carter GP, Ussher JE, Silva AG, Baines SL, Heffernan H, Riley TV, Broadbent R, van der Linden A, Lee J, Monk IR, Stinear TP, Howden BP, Williamson DA. Genomic Analysis of Multiresistant *Staphylococcus capitis* Associated with Neonatal Sepsis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2018; 62 (11): e00898-18.

Carvalho JF. Efeito de antibiótico vetorizado com nanopartículas magnéticas para tratamento da infecção por *Staphylococcus aureus* multirresistente. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 2018.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Blood Culture Contamination: An Overview for Infection Control and Antibiotic Stewardship Programs Working with the Clinical Laboratory. 2019. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/antibiotic-use/core-elements/pdfs/fs-bloodculture-508.pdf>>. Acesso em: agosto 2020.

Chaieb K, Mahdouani K, Bakhrouf A. Detection of *icaA* and *icaD* loci by polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needless in a dialysis unit. *The Journal of Hospital Infection*. 2005; 61(3): 225-230.

Chajęcka-Wierzchowska W, Gajewska J, Zakrzewski AJ, Caggia C, Zadernowska, A. Molecular Analysis of Pathogenicity, Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMMs) and Biofilm Genes of Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Ready-to-Eat Food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2023; 20(2): 1375.

Cho G-S, Li B, Brinks E, Franz CMAP. Characterization of antibiotic-resistant, coagulase-negative staphylococci from fresh produce and description of *Staphylococcus shinii* sp. nov. isolated from chives. *The Journal of Microbiology*. 2022; 60(9): 877-889.

Cui J, Liang Z, Mo Z, Zhang J. The species distribution, antimicrobial resistance and risk factors for poor outcome of coagulase-negative staphylococci bacteraemia in China. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. 2019; 8(65):1-10.

Cunha MG, de Cassia Orlandi Sardi J, Freires IA, Franchin M, Rosalen PL. Antimicrobial, anti-adherence and antibiofilm activity against *Staphylococcus aureus* of a 4-phenyl coumarin derivative isolated from Brazilian geopolis. *Microbial pathogenesis*. 2020; 139: 103855.

Darouiche RB. Treatment of infections associated with surgical implants. *New England Journal of Medicine*. 2004; 50(14): 1422-1429.

Darling AE, Mau B, Perna NT. Progressive Mauve: Multiple Genome Alignment with gene gain, loss and rearrangement. *Plos One*, 2010; 5(6).

Dhaouadi S, Soufi L, Campanile F, Dhaouadi F, Sociale M, Lazzaro L, Cherif A, Stefani S, Elandoulsi RB. Prevalence of methicillin-resistant and susceptible coagulase-negative staphylococci with the first detection of the *mecC* gene among cows, humans, and manure in Tunisia. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2020; 55(1): 1-20.

Domon H, Hiyoshi T, Maekawa T, Yonezawa D, Tamura H, Kawabata S, Yanagihara K, Kimura O, Kunitomo E, Terao Y. Antibacterial activity of hinokitiol against both antibiotic-resistant and -susceptible pathogenic bacteria that predominate in the oral cavity and upper airways. *Microbiology and Immunology*. 2019; 63(6): 213-222.

Douedi S, Odak M, Ravin A, Campbell N. *Staphylococcus capitis* Endocarditis of a Native Valve. *Cureus*. 2021; 13(6): e15738.

Ehlersson G, Hellmark B, Svartström O, Stenmark B, Söderquist B. Phenotypic characterisation of coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures in newborn infants, with a special focus on *Staphylococcus capitis*. *Acta Paediatrica*. 2017; 106(10): 1576-1582.

Ehrlich GD, Stoodley P, Kathju S, Zhao Y, McLeod BR, Balaban N, Hu FZ, Sotereanos NG, Costerton JW, Stewart PS, Post JC, Lin Q. Engineering approaches for the detection and control of orthopaedic biofilm infections. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2005; (437): 59-66.

El Aila NA, Al Laham NA, Naas T. Prevalence of *mecA* and *Panton-Valentine Leukocidin* Genes in *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates from Gaza Strip Hospitals. *Microorganisms*. 2023; 11(5): 1155.

El-Ela ASA, Dessoky ES, Masry S, Arshad A, Munawar A, Qamer S, Abdelkhalek A, Behiry SI, Kordy A. Plasticity in life features, parasitism and super-parasitism behavior of Bracon hebetor, an important natural enemy of *Galleria mellonella* and other lepidopteran host species. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2021; 28: 3351-3361.

Emery H, Butt TM, Coates CJ. Nutraceutical intervention protects against bacterial and chemical-induced gastrotoxicity in a non-mammalian model, *Galleria mellonella*. *Food and Chemical Toxicology*. 2021; 154: 1-10.

Fergestad ME, Stamsås GA, Angeles DM, Salehian Z, Wasteson Y, Kjos M. Penicillin-binding protein PBP2a provides variable levels of protection toward different β -lactams in *Staphylococcus aureus* RN4220. *MicrobiologyOpen*. 2020; 9(8): 1-11.

Fountain K, Gibbon MJ, Loeffler A, Feil EJ. Closed genome sequences of *Staphylococcus lloydii* sp. nov. and *Staphylococcus durrellii* sp. nov. isolated from captive fruit bats (*Pteropus livingstonii*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2019; 71(3).

Frank KL, Patel R. Poly-N-acetylglucosamine is not a major component of the extracellular matrix in biofilms formed by *icaADBC*-positive *Staphylococcus lugdunensis* isolates. *Infection and Immunity*. 2007; 75: 4728-4742.

Garbacz K, Wierbowska M, Kwapisz E, Kosecka-Strojek M, Bronk M, Saki M, Międzobrodzki J. Distribution and antibiotic-resistance of different *Staphylococcus* species identified by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) isolated from the oral cavity. *Journal of Oral Microbiology*. 2021; 13: 1-8.

Gibreel TM, Upton M. Synthetic epidermicin NI01 can protect *Galleria mellonella* larvae from infection with *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2013; 68: 2269-2273.

Gonçalves TG, Timm CD. Produção de biofilme por *Staphylococcus* coagulase-negativo: uma revisão. *Arquivos do Instituto Biológico*. 2020; 87: 1-9.

Gomes DLR, Peixoto RS, Barbosa EAB, Napoleão F, Sabbadini PS, Dos Santos KRN, Mattos-Guaraldi AL, Hirata Jr R. SubMIC of penicillin and erythromycin enhance biofilm formation and hydrophobicity of *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Journal of Medical Microbiology*. 2013, 62: 754-760.

Gomes, JG. *Quorum Sensing e Staphylococcus capitis*. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2021.

Goulart DB. Pathogenicity and Antimicrobial Resistance in Coagulase-Negative Staphylococci. *Journal of Biosciences and Medicines*. 2023; 11: 9-29.

Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2007; 57 (1): 81–91.

Graf AC, Leonard A, Schauble M, Riechmann LM, Hoyer J, Maas S, Lalk M, Becher D, Pane-Farre J, Riedel K. Virulence factors produced by *Staphylococcus aureus* biofilms have a moonlighting function contributing to biofilm integrity. *Molecular & Cellular proteomics*. 2019; 18(6): 1036-1053.

Green LR, Monk PN, Partridge LJ, Morris P, Gorringe AR, Read RC. Cooperative Role for Tetraspanins in Adhesin-Mediated Attachment of Bacterial Species to Human Epithelial Cells. *Infection and Immunity*. 2011; 79 (6): 2241-2249.

Hall, TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999; 41:95-98

Hamadi F, Latrache H, Zahira H, Bengourram J, Kouider N, Elghmari A, Habbari K. Evaluation of the relative cell surface charge by using microbial adhesion to hydrocarbon. *Mikrobiologija*. 2011; 80 (4): 1-4.

Hardy BL, Bansal G, Hewlett KH, Arora A, Schaffer SD, Kamau E, Bennett JW, Merrell Ds. Antimicrobial Activity of Clinically Isolated Bacterial Species Against *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*. 2020; 10: 2977.

Heilmann C, Ziebuhr W, Becker K. Are coagulase-negative staphylococci virulent? *Clinical Microbiology and Infection*. 2019; 25(9): 1071-1080.

Hirata Jr R, Souza SMS, Rocha-deSouza CM, Andrade AFB, Monteiro-Leal LH, Formiga LCD, Mattos-Guaraldi AL. Patterns of adherence to HEp-2 cells and actin polymerisation by toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Microbial pathogenesis*. 2004; 36(3): 125-130.

Hosbul T, Gul-Yurtsever S, Guney-Kaya K, Oryasin E, Bozdogan B. Molecular Detection of Virulence Associated Genes in Coagulase Negative Staphylococci Isolated from Blood Culture. *Clinical laboratory*. 2021; 67(11).

Ikhimiukor OO, Souza SSR, Marcovici MM, Nye GJ, Gibson R, Andam CP. Leaky barriers to gene sharing between locally coexisting coagulase-negative *Staphylococcus* species. *Communications Biology*. 2023; 6 (482): 1-11.

Izano EA, Amarante MA, Kher WB, Kaplan JB. Differential roles of poly- N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Applied and environmental Microbiology*. 2008; 74.

Jasinska E, Bogut A, Magrys A, Olender A. Evaluation of the role of staphylococci in the pathomechanism of conjunctivitis. *International ophthalmology*. 2021; 41(7): 2585-2600.

Jorjão AL, Oliveira LD, Scorzoni L, Figueiredo-Godoi LMA, Prata MCA, Jorge AOC, Junqueira JC. From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for in vivo microbiological studies. *Virulence*. 2018; 9(1): 383-389.

Kaiser TD, Pacheco FC, Lima AA, Pereira EM, Santos KR, Nunes AP. Evaluation of methods commonly used in laboratories to determine the susceptibility to oxacillin among *Staphylococcus* sp samples isolated from a hospital in Vitória, State of Espírito Santo. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2010; 43(3):298-303.

Khusro A, Aarti C, Paray BA, Agastian P. Effect of *Mentha piperita* L. stress at sub-inhibitory dose on some functional properties of coagulase-negative *Staphylococcus hominis*. *Journal of King Saud University – Science*. 2020; 32(4): 2293-2300.

Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 1980; 16(2):111–120.

Kline KA, Lewis AL. Gram-Positive Uropathogens, Polymicrobial Urinary Tract Infection, and the Emerging Microbiota of the Urinary Tract. *Microbiology Spectrum*. 2016; 4(2): 1-54.

Kluj RM, Ebner P, Admaek M, Ziemert N, Mayer C, Borisova M. Recovery of the Peptidoglycan Turnover Product Released by the Autolysin Atl in *Staphylococcus aureus* Involves the Phosphotransferase System Transporter MurP and the Novel 6-phospho-N-acetylmuramidase MupG. *Frontiers in Microbiology*. 2018, 16(9): 1-14.

Kmiha S, Jouini A, Zerriaa N, Hamrouni S, Thabet L, Maaroufi A. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Burned Patients in a Tunisian Hospital: Molecular Typing, Virulence Genes, and Antimicrobial Resistance. *Antibiotics (Basel)*. 2023; 12(6): 1030.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schrecchenberger PC, Win WC. *Diagnóstico Microbiológico: Texto e atlas colorido*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2008.

Kornienko M, Ilina E, Lubasovskaya L, Pripitnevich T, Favola O, Sukhikh G, Govorun V. Analysis of nosocomial *Staphylococcus haemolyticus* by MLST and MALDI-TOF mass spectrometry. *Infection, Genetics and Evolution*. 2016; 39: 99-105.

Kot B, Sytykiewicz H, Sprawka I. Expression of the Biofilm-Associated Genes in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Biofilm and Planktonic Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018; 19 (11): 3487-3501.

Kovařovic V, Sedláček I, Petráš P, Králová S, Mašlaňová I, Švec P, Neumann-Schaal M, Botka T, Gelbíčová T, Staňková E, Doškař J, Pantůček R. *Staphylococcus ratti* sp. nov. Isolated from a Lab Rat. *Pathogens*. 2022; 11(1):51.

Kumar S, Jitendra, Das A, Mane P, Sangwan J, Kumari S. Isolation, Identification and AntibioGram of Coagulase Negative *Staphylococcus* (CoNS) Isolated from Various Clinical Samples at a Tertiary Care Teaching Hospital, Jaipur, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2018; 7 (1): 3048-3059.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular biology and evolution*. 2018; 35(6):1547–9.

Le K, Park MD, Otto M. Immune Evasion Mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Infection. *Frontiers in Microbiology*. 2018; 9: 1-8.

Lee I, Chalita M, Ha SM, Na SI, Yoon SH, Chun J. ContEst16S: an algorithm that identifies contaminated prokaryotic genomes using 16S RNA gene sequences. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2017; 67(6), 2053–2057.

Lebeurre J, Dahyot S, Diene S, Paulay A, Aubourg M, Argemi X, Giard JC, Tournier I, François P, Pestel-Caron M. Comparative Genome Analysis of *Staphylococcus lugdunensis* Shows Clonal Complex-Dependent Diversity of the Putative Virulence Factor, *ess*/Type VII *Locus*. *Frontiers in microbiology*. 2019; 10, 2479.

Lemriss H, Dumont Y, Lemriss S, Martins-Simões P, Butin M, Lahlou L, Rasigade JP, El Kabbaj S, Laurent F, Ibrahim A. Genome Sequences of Multiresistant *Staphylococcus capitis* Pulsotype NRCS-A and Methicillin-Susceptible *S. capitis* Pulsotype NRCS-C. *Genome Announcements*. 2016; 4(3): 1-2.

Leonard AC, Goncheva MI, Gilbert SE, Shareefdeen H, Petrie LE, Thompson LK, Khursigara CM, Heinrichs DE, Cox G. Autolysin-mediated peptidoglycan hydrolysis is required for the surface display of *Staphylococcus aureus* cell wall-anchored proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2023; 120(12).

Li L, Chen H, Liu Y, Xu S, Wu M, Liu Z, Qi C, Zhang G, Li J, Huang X. Synergistic effect of linezolid with fosfomycin against *Staphylococcus aureus* in vitro and in an experimental *Galleria mellonella* model. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2018; 1-8.

Lin Y-T, Hung W-C, Wan T-W, Li H, Lee T-F, Hsueh P-R, Teng L-J. *Staphylococcus taiwanensis* sp. nov., isolated from human blood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2022; 72(2).

Loncaric I, Kübber-Heiss A, Posautz A, Ruppitsch W, Lepuschitz S, Schauera B, Feßler AT, Krametter-Frötscher R, Harrison EW, Holmes MA, Künzel F, Szostak MP, Hauschild T, Desvars-Larrive A, Misic D, Rosengarten R, Walzerb C, Slickers P, Monecke S, Ehrlich R, Schwarz S, Spargser J. Characterization of *mecC* gene-carrying coagulase-negative *Staphylococcus* spp. isolated from various animals. *Veterinary Microbiology*. 2019; 230: 138-144.

Magiorakos, A-P, Srinivasan A, Carrey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*. 2012; 18 (3): 268-281.

Maki DG, Weise CE, Sarafin HW. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infections. *The New England Journal of Medicine*. 1977; 296 (23): 1305-1309.

- Manandhar S, Singh A, Varma A, Pandey S, Shrivastava N. Phenotypic and genotypic characterization of biofilm producing clinical coagulase negative staphylococci from Nepal and their antibiotic susceptibility pattern. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2021; 20(1): 41.
- Mattos-Guaraldi AL, Formiga LC. Relationship of biotype and source to the hemagglutination and adhesive properties of *Corynebacterium diphtheriae*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1991; 24:399-406.
- Mattos-Guaraldi AL, Formiga LC, Andrade AF. Cell surface hydrophobicity of sucrose fermenting and nonfermenting *Corynebacterium diphtheriae* strains evaluated by different methods. *Current Microbiology*. 1999; 38 (1): 37-42.
- Maurin C, Courrier E, He Z, Rigaille J, Josse J, Laurent F, Gain P, Thuret G, Verhoeven PO. Key Role of Staphylococcal Fibronectin-Binding Proteins During the Initial Stage of *Staphylococcus aureus* Keratitis in Humans. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2021. 9(11): 1-9.
- Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk H-P, Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics*. 2013; 14:60.
- Meier-Kolthoff JP, Göker M. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature Communications*. 2019; 10(1):2182.
- Mendoza-Olazarán S, Morfín-Otero R, Villarreal-Treviño L, Rodríguez-Noriega E, Llacá-Díaz J, Camacho-Ortiz A, González GM, Casillas-Vega N, Garza-González E. Antibiotic Susceptibility of Biofilm Cells and Molecular Characterisation of *Staphylococcus hominis* isolates from Blood. *PLoS One*. 2015; 10(12): 1-13.
- Meng X, Zhang G, Sun B, Liu S, Wang Y, Gao M, Fan Y, Zhang G, Shi G, Kang X. Rapid Detection of *mecA* and *femA* Genes by Loop-Mediated Isothermal Amplification in a Microfluidic System for Discrimination of Different Staphylococcal Species and Prediction of Methicillin Resistance. *Frontiers in Microbiology*. 2020; 11: 1-12.
- Michalik M, Samet A, Podbielska-Kubera A, Savini V, Międzobrodzki J, Kosecka-Strojek M. Coagulase-negative staphylococci (CoNS) as a significant etiological factor of laryngological infections: a review. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2020; 19(26): 1-10.
- Michels R, Last K, Becker SL, Papan C. Update on Coagulase-Negative Staphylococci – What the Clinician Should Know. *Microrganisms*. 2021; 9(830): 1-13.
- Moraes MN, Silveira WC, Teixeira LEM, Araújo ID. Mecanismos de adesão bacteriana aos biomateriais. *Revista Médica de Minas Gerais*. 2013; 23(1): 99-104.
- Mumtaz K, Aslam N, Mehdi N, Kiran N, Farzand S, Rahman MU. Awareness among Health Care Professionals regarding nosocomial pathogens and role of fomites in their transmission. *The Professional Medical Journal*. 2020; 27(5): 1032-1037.

Muraki R, Morita Y, Tatsuta K, Ida S, Kitajima R, Hirotsu A, Takeda M, Kikuchi H, Hiramatsu Y, Fukazawa A, Kuroda G, Kakizawa K, Takeuchi H. Refractory postoperative *Staphylococcus hominis* bacteremia in a patient with an ACTH-producing pancreatic neuroendocrine neoplasm: a case report. *Surgical case reports*. 2022; 8(1): 126.

Naing SY, Duim B, Broens EM, Schweitzer V, Zomer A, van der Graaf-van Blois L, van der Meer C, Stellingwerff L, Fluit AC, Wagenaar JA. Molecular Characterization and Clinical Relevance of Taxonomic Reassignment of *Staphylococcus schleiferi* Subspecies into Two Separate Species, *Staphylococcus schleiferi* and *Staphylococcus coagulans*. *Microbiology spectrum*. 2023; 11(2): 1-9.

Nakao H, Popovic T. Development of a direct PCR assay for detection of the diphtheria toxin gene. *Journal of clinical microbiology*. 1997, 35(7): 1651-1655.

Nepal N, Mahara P, Subedi S, Rijal KR, Ghimire P, Banjara MR, Shrestha UT. Genotypically Confirmed Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* With vanB Gene Among Clinical Isolates in Kathmandu.

Newstead LL, Harris J, Goodbrand S, Varjonen K, Nutall T, Paterson GK. *Staphylococcus caledonicus* sp. nov. and *Staphylococcus canis* sp. nov. isolated from healthy domestic dogs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2021; 71(1).

Nowrouzian FL, Ljung A, Hesselmar B, Nilsson S, Adlerberth I, Wold AE. Bacterial Carriage of Genes Encoding Fibronectin-Binding Proteins Is Associated with Long-Term Persistence of *Staphylococcus aureus* in the Nasal and Gut Microbiota of Infants. *Applied and environmental microbiology*. 2021; 87(15): 1-14.

Nwibo DD, Panthee S, Hamamoto H, Sekimizu K. Molecular characterization of multi-drug resistant coagulase negative cocci in non-hospital environment. *Drug discoveries & Therapeutics*. 2019; 13(3): 145-149.

Öcal DN, Dolapçı I, Gençtürk Z, Tekeli A. *In vitro* effect of vancomycin and daptomycin on biofilm formation of coagulase-negative *Staphylococci* strains. *Mikrobiyoloji Bülteni*. 2017; 51(3): 220-235.

Öcal D, Tekeli A, Dolapçı I. Investigation of Biofilm Formation Properties of Coagulase Negative *Staphylococci* Isolated from Catheter-Related Bloodstream Infections. *Mikrobiyoloji bülteni*. 2022; 56(3): 506-524.

Ory J, Cazaban M, Richaud-Morel B, Maio MD, Dunyach-Remy C, Pantel A, Sotto A, Laurent F, Lavigne JP, Butin M. Successful implementation of infection control measure in a neonatal intensive care unit to combat the spread of pathogenic multidrug resistant *Staphylococcus capitis*. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. 2019; 8(57): 1-6.

Osaki S, Kikuchi K, Moritoki Y, Motegi C, Ohyatsu S, Nariyama T, Matsumoto K, Tsunashima H, Kikuyama T, Kubota J, Nagumo K, Fijioka H, Kato R, Murakawa Y. Distinguishing coagulase-negative *Staphylococcus* bacteremia from contamination using blood-culture positive bottle detection pattern and time to positivity. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2020; 26(7): 672-675.

O'Sullivan JN, O'Connor PM, Rea MC, O'Sullivan O, Walsh CJ, Healy B, Mathur H, Field D, Hill C, Ross RP. Nisin J, a Novel Natural Nisin Variant, Is Produced by *Staphylococcus capitis* Sourced from the Human Skin Microbiota. *Journal of Bacteriology*. 2020; 202(3): e00639-19.

Parte, A.C., Sardà Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J.P., Reimer, L.C. and Göker, M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2020; 70, 5607-5612. Acesso em: 27 ago 2020.

Pereira EM, Mattos CS, Santos OC, Ferreira DC, Oliveira TLP, Laport MS, Ferreira EO, Santos KRN. *Staphylococcus hominis* subspecies can be identified by SDS-PAGE or MALDI-TOF MS profiles. *Scientific Reports*. 2019; 9(1): 1-7.

Pereira PMA, Binatti VB, Sued BPR, Ramos JN, Peixoto RS, Simões C, Castro EA, Duarte JLMB, Vieira VV, Hirata Jr R, Santos KRN, Mattos-Guaraldi AL, Pereira JAA. *Staphylococcus haemolyticus* disseminated among neonates with bacteremia in a neonatal intensive care unit in Rio de Janeiro, Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2014; 78(1): 85-92.

Pereira, PMA. **Aspectos fenotípicos e genotípicos da formação de biofilme e interação com superfícies abióticas e bióticas no potencial de virulência de *Staphylococcus haemolyticus* relacionados com quadros de bacteremias**. 2018. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Pereira-Ribeiro PMA, Sued-Karam BR, Faria YV, Nogueira BA, Colodette SS, Fracalanza SE, Duarte SL, Junior RH, Mattos-Guaraldi AL. Influence of antibiotics on biofilm formation by different clones of nosocomial *Staphylococcus haemolyticus*. *Future Microbiology*. 2019; 14(9):789–799.

Pinheiro-Hubinger L, Riboli DFM, Abraão LM, Franchi EPLP, Cunha, MLRS. Coagulase-Negative Staphylococci Clones Are Widely Distributed in the Hospital and Community. *Pathogens*. 2021; 10(792): 1-18.

Pires ALR, Bierhalz ACK, Moraes AM. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. *Química Nova*. 2015; 38(7).

Porayath C, Suresh MK, Biswas R, Nair BG, Misra N, Pal S. Autolysin mediated adherence of *Staphylococcus aureus* with Fibronectin, Gelatin and Heparin. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018; 110: 179-184.

Potter A, Ceotto H, Giambiagi-De-Marval M, Dos Santos KRN, Nes IF, Bastos MCF. The gene *bap*, involved in biofilm production, is present in *Staphylococcus* spp. strains from nosocomial infections. *The Journal of Microbiology*. 2009; 47(3).

PUBCHEM. Moxifloxacina. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/moxifloxacin#section=Top>>. Acesso em: 08/04/2022.

PUBCHEM. Hexadecano. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11006>. Acesso em: 15/05/2022.

Qu Y, Li Y, Cameron DR, Easton CD, Zhu X, Zhu M, Salwiczek M, Muir BW, Thissen H, Daley A, Forsythe JS, Peleg AY, Lithgow T. Hyperosmotic Infusion and Oxidized Surfaces Are Essential for Biofilm Formation of *Staphylococcus capitis* From the Neonatal Intensive Care Unit. *Frontiers in Microbiology*. 2020; 11: 1-12.

Rampelotto RF, Lorenzoni VV, Silva DC, Coelho SS, Wust V, Garzon LR, Nunes MS, Meneghetti B, Brites PC, Hörner M, Hörner R. Assessment of different methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures of newborns. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2018; 51(6): 761-767.

Richardson SR, O'Malley GF. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. Treasure Island: StatPearls Publishing; 2022.

Rocha J, Silva V, Poeta P, Botelho J. Manaia CM. Searching for links between environmental and clinical *mecA*+ *Staphylococcus aureus*: A comparative genomics study. *The Science of the total environment*. 2023; 895.

Rodriguez-R LM, Konstantinidis KT. Bypassing Cultivation To Identify Bacterial Species. *Microbe*. 2014; 9(3):111-118.

Romero LC, Silva LP, Pereira VC, Corrente JE, Cunha MLRS. Caracterização fenotípica e genotípica da resistência antimicrobiana em *Staphylococcus hominis* isolados de hemocultura. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2021; 25(S1): 171-172.

Rosemberg M. Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty-five years of doing MATH. *FEMS Microbiology Letters*. 2006; 262 (2):129-134.

Rosin APM. Avaliação do perfil clonal, resistência e virulência de isolados de *Enterococi* resistente à vancomicina em pacientes com doenças hematológicas ou submetidos a transplante de medula óssea. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Saha S, Meenawat A, Sahu C, Srivastava V, Yadav S, Kumar V. Bacterial Identification and Monitoring Around Two-Piece Dental Implants by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). *Journal of Laboratory Physicians*. 2020; 12(1): 49-55.

Salgueiro VC, Iorio NLP, Ferreira MC, Chamon RC, Dos Santos KRN. Methicillin resistance and virulence genes in invasive and nasal *Staphylococcus epidermidis* isolates from neonates. *BMC Microbiology*. 2017; 17(1): 15.

Santos AL, Santos DO, Freitas CC, Ferreira BLAF, Afonso IF, Rodrigues CR, Castro HC. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2007; 43(6): 413-423.

Santos CS, Santos LS, Souza MC, Dourado FS, Dias AASO, Sabbadini OS, Pereira GA, Cabral MC, Hirata Jr R, Mattos-Guaraldi AL. Non-opsonic phagocytosis of homologous non-toxigenic and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains by human U-937 macrophages. *Microbiology and immunology*. 2010; 54(1): 1-10.

- Schuenck RP, Pereira EM, Iorio NL, Santos KR. PCR assay to identify methicillin resistance of *staphylococcus haemolyticus*. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 2008; 52:431-435.
- Seng R, Leungtongkam U, Thummeepak R, Chatdumrong W, Sitthisak S. High prevalence of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci isolated from a university environment in Thailand. International Microbiology. 2017; 20(2): 65-73.
- Serra N, Carlo PD, Andriolo M, Mazzola G, Diprima E, Rea T, Anastasia A, Fasciana TMA, Pipitò L, Capra G, Cascio A. *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci from Bloodstream Infections: Frequency of Occurrence and Antimicrobial Resistance, 2018–2021. Life (Basel). 2023; 13(6): 1356.
- Serray B, Oufriid S, Hannaoui I, Bourjilate F, Soraa N, Mliji M, Sobh M, Hammoumi A, Timonouni M, El-Azhari M. Genes encoding adhesion factors and biofilm formation in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Morocco. The Journal of Infection in Developing Countries. 2016; 10(8): 863-886.
- Sheehan G, Dixon A, Kavanagh K. Utilization of *Galleria mellonella* larvae to characterize the development of *Staphylococcus aureus* infection. Microbiology (Reading). 2019; 165(8): 863-875.
- Shin E, Hong H, Lee HJ, Lee Y. Antimicrobial Resistance Profiles and Molecular Characteristics of Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Two Tertiary Hospitals Before and 15 Years After Implementation of the Separation of Drug Prescribing and Dispensing Policy of Korea. Microbial Drug Resistance. 2019; 00(00): 1-10.
- Shrestha LB, Bhattarai NR, Khanal B. Comparative evaluation of methods for the detection of biofilm formation in coagulase-negative staphylococci and correlation with antibiogram. Infection and Drug Resistance. 2018; 11: 607-613.
- Simões PM, Lemriss H, Dumont Y, Lemriss S, Rasigade JP, Assant-Trouillet S, Ibrahim, Kabbaj SE, Butin M, Laurent F. Single-Molecule Sequencing (PacBio) of the *Staphylococcus capitis* NRCS-A clone Reveals the Basis of Multidrug Resistance and Adaptation to the Neonatal Intensive Care Unit Environment. Frontiers in Microbiology. 2016; 7: 1-11.
- Smith JT, Andam CP. Extensive Horizontal Gene Transfer within and between Species of Coagulase-Negative Staphylococcus. Genome Biology and Evolution. 2021; 13(9): 1-14.
- Soares GF, Viegas BF, Cabral AKLF. *Galleria mellonella*: an invertebrate model study to activating the virulence of the *Sporothrix schenckii* Complex. Brazilian Journal of Development. 2022; 8(8): 59909-59922.
- Song M, Li Q, He Y, Lan L, Feng Z, Fan Y, Liu H, Qin F, Chen D, Yang M. A Comprehensive Multilocus Sequence Typing Scheme for Identification and Genotyping of *Staphylococcus* Strains. Foodborne pathogens and disease. 2019; 16(5): 331–338.

Soroush S, Jabalameli F, Taherikalani M, Eslampour M, Beigverdi R, Emaneini M. Characterization of biofilm formation, antimicrobial resistance, and staphylococcal cassette chromosome mec analysis of methicillin resistant *Staphylococcus hominis* from blood cultures of children. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Online version, 2017.

Sousa AKA, Ribeiro FOS, Oliveira TM, Araujo AR, Dias JN, Albuquerque P, Silva-Pereira I, Oliveira ACJ, Quelemes PV, Leite JRSA, Silva DA. Quaternization of angico gum and evaluation of anti-staphylococcal effect and toxicity of their derivatives. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020; 150; 1175-1183.

Souza AG. Caracterização fenotípica e molecular de amostras de *Staphylococcus coagulase* negativo isoladas de infecções da corrente sanguínea de pacientes de dois hospitais gerais da cidade de São Paulo. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2009.

Souza MC, Dos Santos LS, Sousa LP, Faria YV, Ramos JN, Sabbadini PS, Da Santos CS, Nagao PE, Vieira VV, Gomes, DLR, Júnior RH, Mattos-Guaraldi AL. Biofilm formation and fibrinogen and fibronectin binding activities by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* invasive strains. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2015; 107(6):1387-1399.

Stepanovic S, Vukovic D, Davic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*. 2000; 40(2):175-179.

Subbiahdoss G, Domingues JFS, Kuijer R, van der Mei HC, Busscher HJ. Bridging the Gap Between In Vitro and In Vivo Evaluation of Biomaterial-Associated Infections. *In: Moriarty TF, Zaat SAJ, Busscher HJ. Biomaterials Associated Infection: Immunological Aspects and Antimicrobial Strategies*. 1. ed. Nova Iorque: Springer, 2012. p. 87-105.

Sued BPR, Pereira PMA, Faria YV, Ramos JN, Binatti VB, Dos Santos KRN, Seabra SH, Junior RH, Vieira VV, Mattos-Guaraldi AL, Pereira JAA. Sphygmomanometers and thermometers as potential fomites of *Staphylococcus haemolyticus*: biofilm formation in the presence of antibiotics. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2017; 112(3): 188-195.

Sued-Karam BR, Pereira-Ribeiro PM, Vasconcelos RS, Oliveira GGC, Ribeiro FC, Olivella JGB, Nogueira BA, Fracalanza SEL, Santos LS, Torres EJJ, Mattos-Guaraldi AL. Biofilm Formation in Bovine Pericardium Biomaterial by Multi-Drug Resistant *Staphylococcus haemolyticus* Nosocomial Blood Isolates. *International Journal of Science and Research Methodology*. 2022; 21(1): 13-32.

Szczuka E, Telega K, Kaznowski A. Biofilm formation by *Staphylococcus hominis* strains isolated from human clinical specimens. *Folia Microbiologica*. 2014; 60(1): 1-5.

Szczuka E, Grabska K, Kaznowski A. In vitro activity of rifampicin combined with daptomycin or tigecycline on *Staphylococcus haemolyticus* biofilms. *Current microbiology*. 2015;1-6.

Szczuka E, Krzyminska S, Bogucka N, Kaznowski A. Multifactorial mechanisms of the pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus hominis* isolated from bloodstream infections. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2018; 111(7): 1259-1265.

Tahaei SAS, Stájer A, Barrak I, Ostorházi E, Szabó D, Gajdács M. Correlation Between Biofilm-Formation and the Antibiotic Resistant Phenotype in *Staphylococcus aureus* Isolates: A Laboratory-Based Study in Hungary and a Review of the Literature. *Infection and Drug Resistance*. 2021; 14: 1155-1168.

Tekeli A, Öcal DN, Dolapçı, I. Detection of *sasX* Gene and Distribution of SCC*mec* Types in Invasive and Non-invasive Coagulase-negative Staphylococci. *Balkan Medical Journal*. 2020; 37(4): 215-221.

Tevell S, Hellmark B, Nilsson-Augustinsson Å, Söderquist B. *Staphylococcus capitis* isolated from prosthetic joint infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2017; 36(1): 115-122.

Tharmalingam N, Khader R, Fuchs BB, Mylonakis E. The Anti-virulence Efficacy of 4-(1,3-Dimethyl-2,3-Dihydro-1H-Benzimidazol-2-yl) Phenol Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*. 2019; 10: 1-12.

Thakker RA, Chatila K, Reynoso D, Karnath B. Native and Prosthetic Valve *Staphylococcus capitis* Endocarditis: A Review of the Literature. *Cardiology Research*. 2021; 12(3): 140-145. Trentin DS, Giordani RB, Macedo AJ. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. *Revista Liberato*. 2013; 14(22): 213-236.

Theel ES, Schmitt BH, Hall L, Cunningham SA, Walchak RC, Patel R, Wengenack NL. Formic acid-based direct, on-plate testing of yeast and *Corynebacterium* species by Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012; 50(9): 3093-3095.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids research*. 1997; 25(24): 4876-4882.

Trevisoli LE, Bail L, Rodrigues LS, Conte D, Palmeiro JK, Dalla-Costa LM. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight: a promising alternative method of identifying the major coagulase-negative Staphylococci species. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2018; 51(1): 85-87.

Tröger B, Härtel C, Buer J, Dördelmann M, Felderhoff-Müser U, Höhn T, Hepping N, Hillebrand G, Kribs A, Marissen J, Olbertz D, Rath P-M, Schmidtke S, Siegel J, Herting E, Göpel W, Steinmann J, Stein A. Clinical Relevance of Pathogens Detected by Multiplex PCR in Blood of Very-Low-Birth Weight Infants with Suspected Sepsis – Multicentre Study of the German Neonatal Network. *PLoS ONE*. 2016; 11(7): 1-10.

Van Wamel WJ, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Verhoef J, Fluit AC. The effect of culture conditions on the in-vitro adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*. 1998; 47: 705-709.

Vasconcelos, RS. **Heterogeneidade de perfis de resistência, expressão de multirresistência e de produção de biofilme em superfícies abióticas e biomateriais utilizados em procedimentos cirúrgicos (aço e pericárdio bovino) na presença de agentes antimicrobianos de amostras de *Staphylococcus capitis* e *Staphylococcus hominis* detectadas em fômites diversos em ambiente hospitalar.** 2021. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Vasileiou NGC, Chatzopoulos DC, Gougoulis DA, Sarrou S, Katsafadou AI, Spyrou V, Mavrogianni VS, Petinaki E, Fthenakis GC, Slime-producing staphylococci as causal agents of subclinical mastitis in sheep. *Veterinary Microbiology*. 2018; 224: 93-99;

Venugopal N, Mitra S, Tewari R, Ganaiel F, Shome R, Rahman H, Shome BR. Molecular detection and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci isolated from cattle, animal handlers, and their environment from Karnataka, Southern Province of India. *Veterinary World*. 2019; 12(11): 1760-1768.

Vieira TR. Pesquisa de *Staphylococcus* spp. coagulase negativa em queijo colonial inspecionado: identificação, perfil de genes de enterotoxinas clássicas e de resistência à penicilina e à meticilina. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2017.

Villarreal-Salazar V, Mendoza-Olazarán S, Flores-Treviño S, Garza-González E, Bocanegra-Ibarias P, Morfín-Otero R, Camacho-Ortiz A, Rodríguez-Noriega E, Villarreal-Treviño L. Rapid methicillin resistance detection and subspecies discrimination in *Staphylococcus hominis* clinical isolates by MALDI-TOF MS. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2023; 41: 83-89.

Wang C, Fang R, Zhou B, Tian X, Zhang X, Zheng X, Zhang S, Dong G, Cao J, Zhou T. Evolution of resistance mechanisms and biological characteristics of rifampicin resistant *Staphylococcus aureus* strains selected in vitro. *BMC Microbiology*. 2019; 19(220): 1-8.

Wang HY, Chung CR, Wang Z, Li S, Chu BY, Horng JT, Jih J, Lee TY. A large-scale investigation and identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* based on peaks binning of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight MS spectra. *Briefings in bioinformatics*. 2021; 22(3): 1-13.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global action plan on antimicrobial resistance. Geneva: WHO; 2015.

Wirth T, Bergot M, Rasigade JP, Pichon B, Barbier M, Martins-Simões P, Jacob L, Pike R, Tissieres P, Picaud JC, Kearns A, Supply P, Butin M, Laurent F, the International Consortium for *Staphylococcus capitis* neonatal sepsis, the ESGS Study Group of ESCMID. Niche specialization and spread of *Staphylococcus capitis* involved in neonatal sepsis. *Nature Microbiology*. 2020; 5(5): 735-745.

Woudstra S, Wenten N, Zhang Y, Leimbach S, Kirkeby C, Gussmann MK, Krömker V. Reservoirs of *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp. Associated with Intramammary Infections of Dairy Cows. *Pathogens*. 2023; 12(5): 1-14.

Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, Chun, J. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2017; 67:1613-1617.

Yu X, Zheng B, Xiao F, Jin Y, Guo L, Xu H, Luo Q, Xiao Y. Effect of Short-Term Antimicrobial Therapy on the Tolerance and Antibiotic Resistance of Multidrug-Resistant *Staphylococcus capitis*. *Infection and Drug Resistance*. 2020; 13: 2017-2026.

Zammuto V, Spanò A, Agostino E, Macrì A, De Pasquale C, Ferlazzo G, Rizzo MG, Nicolò MS, Guglielmino S, Gugliandolo C. Anti-Bacterial Adhesion on Abiotic and Biotic Surfaces of the Exopolysaccharide from the Marine *Bacillus licheniformis* B3-15. *Marine Drugs*. 2023; 21(5): 313.

Zhang X, Xiong T, Gao L, Wang Y, Liu L, Tian T, Shi Y, Zhang J, Zhao Z, Lu D, Luo P, Zhang W, Cheng P, Jing H, Gou Q, Zeng H, Yan D, Zou Q. Extracellular fibrinogen-binding protein released by intracellular *Staphylococcus aureus* suppresses host immunity by targeting TRAF₃. *Nature Communications*. 2022; 13(1): 1-11.

Zhou W, Niu D, Gao S, Zhong Q, Liu C, Liao X, Cao X, Zhang Z, Zhang Y, Shen H. Prevalence, biofilm formation, and mass spectrometric characterization of linezolid-resistant *Staphylococcus capitis* isolated from a tertiary hospital in China. *Journal of global antimicrobial resistance*. 2023; 33: 155-163.