



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Guilherme Goulart Cabral de Oliveira

Heterogeneidade na habilidade de produção de biofilme em biomaterial implantável, superfícies abióticas, resistência a agentes antimicrobianos e genes de virulência de amostras de *Staphylococcus haemolyticus*

Rio de Janeiro

2022

Guilherme Goulart Cabral de Oliveira

Heterogeneidade na habilidade de produção de biofilme em biomaterial implantável, superfícies abióticas, resistência a agentes antimicrobianos e genes de virulência de amostras de *Staphylococcus haemolyticus*

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, 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 Luíza de Mattos-Guaraldi

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

Rio de Janeiro

2022

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

O48 Oliveira, Guilherme Goulart Cabral de.

Heterogeneidade na habilidade de produção de biofilme em biomaterial implantável, superfícies abióticas, resistência a agentes antimicrobianos e genes de virulência de amostras de *Staphylococcus haemolyticus* / Guilherme Goulart Cabral de Oliveira – 2022.

80 f.

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

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

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

1. *Staphylococcus haemolyticus* – Patogenicidade – Teses. 2. Biofilmes – Teses. 3. Materiais biocompatíveis – Teses. 4. Anti-Infecciosos – Teses. 5. Infecção hospitalar – Prevenção & controle – Teses. I. Mattos-Guaraldi, Ana Luiza de. II. Ribeiro, Paula Marcelle Afonso Pereira. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.98:579.86

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo
CRB7/7341

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

Assinatura

Data

Guilherme Goulart Cabral de Oliveira

**Heterogeneidade na habilidade de produção de biofilme em biomaterial implantável,
superfícies abióticas, resistência a agentes antimicrobianos e genes de virulência de
amostras de *Staphylococcus haemolyticus***

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

Aprovada em 19 de dezembro de 2022.

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

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

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

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora: _____

Prof.^a Dra. Louisy Sanches dos Santos Sant'Anna

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Bruna Ribeiro Sued Karam

Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Cassius de Souza

Fundação Educacional da Região dos Lagos

Rio de Janeiro

2022

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao professor Raphael Hirata Júnior (*in memoriam*). Que os ensinamentos e o amor que o senhor deixou em terra fiquem eternizados em nossas memórias e corações.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha fé e convicção, pois sem esses elementos essenciais eu não chegaria e venceria mais essa etapa. Agradeço imensamente aos meus pais Laura Goulart dos Reis de Oliveira e Jorge João Cabral de Oliveira por me darem a base de minha formação moral e pessoal. A minha esposa Isabelle Christine de Moraes Motta, por sempre me acompanhar desde o início desta caminhada, me incentivando e me apoiando durante todo o trajeto. Ao meu irmão Gustavo Goulart Cabral de Oliveira por fazer parte de minha vida.

Ao meu falecido professor e orientador professor Raphael Hirata Júnior, por todos os ensinamentos que obtive em nossos anos de convivência na UERJ.

As minhas orientadoras Prof^a Ana Luíza de Mattos Guaraldi e Prof^a. Paula Marcele Afonso Pereira Ribeiro por toda a ajuda, apoio, dedicação e carinho comigo durante todo o período em que estive no laboratório, desde o tempo da graduação à aluno de pós-graduação. Sem vocês esse trabalho jamais se realizaria.

Aos meus colegas do curso de pós-graduação pelos momentos de aprendizado e crescimento profissional que pude vivenciar. Ao corpo de docentes do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia pelo carinho, ensinamento e constante apoio no desenvolvimento e concretização deste projeto. A equipe da Secretária do PPGMicro, em especial a Carla Freitas, que sempre foi solícita e disponível, assim como a toda a equipe técnica do Departamento de Microbiologia, pelos ensinamentos e ajuda.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório 3, em especial à Dryelle Rodrigues, Bruna Sued, Juliana Olivella, Barbara Nogueira, Cintia Santos, Louisy Sanches, Felipe Cabral e a todos os amigos que obtive ao longo desse trajeto. Vocês fizeram parte desta história e agradeço a todos.

Aos professores da faculdade de odontologia que me apoiaram e incentivaram a seguir com este e outros sonhos na área, em especial a Prof^a Fernanda Brito, Prof Cesar Perez e a Prof^a Luciana Sassone.

Agradeço as instituições FAPERJ, CNPq, 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. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

OLIVEIRA, Guilherme Goulart Cabral de. *Heterogeneidade na habilidade de produção de biofilme em biomaterial implantável, superfícies abióticas, resistência a agentes antimicrobianos e genes de virulência de amostras de Staphylococcus haemolyticus*. 2022. 80 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Staphylococcus haemolyticus pertence ao grupo dos *Staphylococcus* coagulase-negativos, sendo a segunda espécie mais frequentemente isolada de amostras clínicas. A capacidade de formação de biofilme em diferentes superfícies, associada a sua resistência a múltiplos antimicrobianos fazem dessa espécie um patógeno emergente relevante, principalmente em ambiente nosocomial. O aumento do uso de biomateriais e dispositivos médicos implantáveis acarretam na elevação de procedimentos cirúrgicos e hospitalização de pacientes, oferecendo a oportunidade para que cepas dessa espécie possam colonizar o hospedeiro, ou seu dispositivo médico e provocar infecções graves. Este estudo teve por objetivo avaliar a habilidade de produção de biofilme em biomaterial implantável (pericárdio bovino), superfícies abióticas, resistência a agentes antimicrobianos e genes de virulência de amostras de *S. haemolyticus* isoladas de hemoculturas. Para a identificação das espécies a serem avaliadas foi utilizada a técnica de MALDI-TOF MS e o ensaio de PCR multiplex. Os perfis de resistência aos antimicrobianos foram verificados através das técnicas de disco-difusão e determinação da CIM (oxacilina, teicoplanina e vancomicina). A capacidade de produção de biofilme foi investigada pelos testes do Ágar Vermelho do Congo e ensaios de aderência em superfícies abióticas (poliestireno e vidro). Foi utilizado PCR para a pesquisa da presença de genes *icaA*, *fbp*, *atl* e *aap* relacionados com propriedades adesivas e produção de biofilme. E a microscopia eletrônica de varredura foi empregada para a análise qualitativa e estrutural do biofilme formado sobre o pericárdio bovino. De forma global, os dados sugerem que, apesar de ser um micro-organismo com potencial capacidade para colonizar e formar biofilme em biomateriais, a produção de biofilmes nas superfícies analisadas não depende diretamente da presença dos genes de virulência estudados, não sendo possível correlacionar à resistência aos antimicrobianos com a aderência nas superfícies testadas, enfatizando a natureza multifatorial desse mecanismo.

Palavras-chave: *Staphylococcus haemolyticus*. Biofilme. Biomateriais. Membrana de pericárdio bovino. Resistência aos antimicrobianos.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Guilherme Goulart Cabral de. *Heterogeneity in the ability to produce biofilm on implantable biomaterial, abiotic surfaces, resistance to antimicrobial agents and virulence genes of Staphylococcus haemolyticus sample*. 2022. 80 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Staphylococcus haemolyticus belongs to the coagulase-negative Staphylococci group, the second most frequently isolated species from clinical samples. The biofilm formation ability on different surfaces, associated with the multi-resistant profile, makes this species a relevant emerging pathogen, especially in the nosocomial environment. The increased use of biomaterials and implantable medical devices leads to an increase in surgical procedures and hospitalization, creating opportunities for strains of this species to colonize the host, or its medical device, and cause severe infections. This study aimed to evaluate the ability of biofilm production on implantable biomaterial, abiotic surfaces, resistance to antimicrobial agents, and virulence genes of *S. haemolyticus* samples isolated from blood cultures. The MALDI-TOF MS technique and the multiplex PCR were used to identify the species. Antimicrobial resistance profiles were verified using disk-diffusion techniques and MIC determination (oxacillin, teicoplanin, and vancomycin). Biofilm production ability was investigated by Congo Red Agar tests and adherence tests on abiotic surfaces (polystyrene and glass). PCR was used to investigate the presence of *icaA*, *fbp*, *atl* and *aap* genes related to adhesive properties and biofilm production. And scanning electron microscopy was used for the qualitative and structural analysis of the biofilm formed on the bovine pericardium. Overall, the data suggest that, despite being a microorganism with the potential ability to colonize and form a biofilm on biomaterials, the production of biofilms on analyzed surfaces does not directly depend on the presence of the studied virulence genes, and it is not possible to correlate with resistance to antimicrobials with adherence to tested surfaces, emphasizing the multifactorial nature of this mechanism.

Keywords: *Staphylococcus haemolyticus*. Biofilm. Biomaterials. Bovine pericardium patches.

Resistance to Antimicrobial agents.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Etapas de desenvolvimento e maturação do biofilme.....	29
Figura 2 –	Representação ilustrativa de matriz exopolissacarídea (<i>slime</i>) em meio Vermelho do Congo de amostras de <i>Staphylococcus haemolyticus</i> isoladas de hemoculturas	54
Figura 3 –	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície interna de membrana (<i>patch</i>) do pericárdio bovino interagindo com amostras MDR de <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	59

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Número de amostras de <i>Staphylococcus haemolyticus</i> isoladas de hemoculturas de pacientes adultos e neonatos (2008 – 2014) no HUPE/UERJ analisadas no presente estudo.....	45
Gráfico 2 –	Percentuais de amostras de <i>Staphylococcus haemolyticus</i> isolados de hemoculturas no HUPE expressando resistência aos doze agentes antimicrobianos testados.....	47
Gráfico 3 –	Número de amostras de <i>Staphylococcus haemolitycus</i> obtidas de hemoculturas expressando resistência a oxacilina e apresentando o gene <i>mecA</i> , obtidas de pacientes internados no HUPE em diferentes anos (2008-2014).....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Descrição dos oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de mPCR para identificação de amostras de <i>Staphylococcus haemolyticus</i> e gene <i>mecA</i> ...	37
Tabela 2 –	Descrição dos oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de PCR que apresentam genes que codificam adesinas de amostras de <i>Staphylococcus</i> spp.....	42
Tabela 3 –	Resultados dos métodos moleculares MALDI-TOF MS e mPCR relacionados a identificação das amostras de <i>Staphylococcus haemolyticus</i> (n=72) isoladas de hemoculturas de pacientes adultos (n=42) e neonatos (n=30) internados no HUPE/UERJ.....	46
Tabela 4 –	Perfis de resistência, expressão de multirresistência (MDR) e Não-MDR de amostras de <i>Staphylococcus haemolyticus</i> isoladas de hemoculturas para 12 agentes antimicrobianos avaliados pelos métodos de difusão em disco e/ou concentração inibitória mínima.....	47
Tabela 5 –	Concentrações Inibitória Mínima (CIM) dos agentes antimicrobianos oxacilina, teicoplanina e vancomicina apresentados para as amostras de <i>Staphylococcus haemolyticus</i> isoladas de hemoculturas.....	49
Tabela 6 –	Concentrações Inibitória Mínima (CIM) à oxacilina e presença do gene <i>mecA</i> em amostras de <i>Staphylococcus haemolyticus</i> isoladas de hemoculturas.....	52
Tabela 7 –	Heterogeneidade na produção de biofilme em superfícies abióticas, <i>slime</i> no meio Vermelho do Congo e da presença de genes relacionados com as propriedades adesivas e a formação de biofilme de amostras de <i>Staphylococcus haemolyticus</i> isoladas de hemoculturas.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aap	<i>Accumulation-associated protein gene</i>
Aap	Proteína Associada à Acumulação
Atl	Autolisina
atl	<i>Autolysin gene</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Bap	Proteína Associada ao Biofilme
Cf	Concentração final
CHL	Cloranfenicol
Ci	Concentração inicial
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLO	Cloranfenicol
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CRA	Agar Vermelho do Congo
CTI	Centro de Terapia Intensiva
DA	Clindamicina
DIMI	Disciplina de Microbiologia e Imunologia
DMIP	Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EF-G	Fator de Alongamento
ER	Eritromicina
Fbp	<i>Fibronectin binding protein gene</i>
FCM	Faculdade Ciências Médicas
FOX	Cefoxitina
GEN	Gentamicina
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
I	Intemediário
IcaA	<i>Intercellular adhesion A gene</i>
IcaB	<i>Intercellular adhesion B gene</i>

<i>IcaC</i>	<i>Intercellular adhesion C gene</i>
<i>IcaD</i>	<i>Intercellular adhesion D gene</i>
<i>IcaABC</i>	Operon de genes mediadores de biofilme
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
LZD	Linezolida
MALDI-TOF MS	Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz
MDR	Multirresistente
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MIC	Concentração inibitória mínima
Mpcr	<i>Multiplex polymerase chain reaction</i>
MRSH	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> multirresistente
MXF	Moxifloxacina
NaCl	Cloreto de Sódio
não-MDR	Não-multirresistente
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORSH	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> resistente a oxacilina
OXA	Oxacilina
Pb	Pares de bases
PBP2A	<i>Penicillin-binding protein 2A</i>
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PIA	Adesina Polissacarídica Intercelular
PLF	Proteína Ligadora de Fibrinogênio
PSA	Adesina Polissacarídica Capsular
R	Resistente
RIF	Rifampicina
RNA	Ácido Ribonucleico
Rpm	Rotações por minuto
Rna	Ácido ribonucleico ribossômico
S	Sensível
SCCmec	<i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i>

SCNs	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativos
SH-F	Oligonucleotídeo para a detecção do gene <i>mvaA</i>
SH-R	Oligonucleotídeo para a detecção do gene <i>mvaA</i>
TE	Tampão mistura de Tris-HCl e EDTA
TEI	Teicoplanina
<i>tcaRAB</i>	Operon de resistência a teicoplanina
TSB	<i>Trypticase Soy Broth</i>
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VAN	Vancomicina
Vf	Volume final
Vi	Volume inicial

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
cm	Centímetro
G	Força G
°C	Graus Celsius
Hz	Hertz
μg	Micrograma
μl	Microlitros
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
mg	Miligrama
mm	Milímetro
mM	Milimolar
ml	Mililitros
nm	Nanômetro
pmol	Picomol
x	Sinal de multiplicação
%	Porcentagem
kb	Quilobase
kV	Quilovolts
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFC/ml	Unidades Formadoras de Colônias por mililitro
U	Unidade Internacional

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	16
1	REVISÃO DA LITERATURA.....	18
1.1	O gênero <i>Staphylococcus</i>.....	18
1.2	<i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos (SCNs).....	19
1.3	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>.....	21
1.4	Infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS).....	22
1.5	Resistência aos agentes antimicrobianos.....	23
1.6	Aderência em dispositivos médicos e a formação de biofilme.....	27
1.7	Biomateriais – pericárdio bovino.....	30
1.8	Justificativa.....	32
2	OBJETIVOS.....	34
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1	Origem e identificação das amostras bacterianas.....	35
3.2	Reativação das amostras e confirmação da identificação bacteriana pela técnica de Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz – MALDI-TOF MS.....	35
3.3	Ensaio de PCR multiplex (mPCR) para identificação de amostras de <i>S. haemolyticus</i> e detecção do gene <i>mecA</i>.....	36
3.4	Determinação dos perfis de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos.....	37
3.5	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de agentes antimicrobianos.....	38
3.6	Produção de <i>slime</i> em meio Ágar Vermelho do Congo.....	39
3.7	Avaliação da produção de biofilme em superfícies abióticas.....	39
3.7.1	<u>Análise qualitativa e semi-quantitativa da aderência e formação de biofilme no vidro.....</u>	39
3.7.2	<u>Análise qualitativa e semi-quantitativa da aderência e formação de biofilme no poliestireno.....</u>	40
3.8	Avaliação quantitativa da aderência e produção de biofilme em superfície de biomaterial – membrana de pericárdio bovino.....	41

3.9	Análise estrutural do biofilme de <i>S. haemolyticus</i> em pericárdio bovino pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	41
3.10	Detecção dos genes que codificam adesinas e formação de biofilme.....	42
3.11	Análise dos dados.....	43
3.12	Considerações éticas.....	44
4	RESULTADOS.....	45
4.1	Número de amostras isoladas e identificação pela técnica de MALDI-TOF MS.....	45
4.2	Perfis de susceptibilidade e de multirresistência aos agentes antimicrobianos.....	47
4.3	Perfis de susceptibilidade a oxacilina e detecção do gene <i>mecA</i>.....	51
4.4	Heterogeneidade na produção de biofilme em superfícies abióticas, <i>slime</i> no meio Vermelho do Congo e da presença de genes de virulência.....	53
4.5	Análise quantitativa e estrutural de biofilme do <i>S. haemolyticus</i> em pericárdio bovino.....	57
5	DISCUSSÃO.....	60
	CONCLUSÕES.....	67
	REFERÊNCIAS.....	69
	ANEXO A – Artigo 1: <i>Staphylococcus aureus</i> biofilms: an opportunistic pathogen with multidrug resistance (artigo publicado)	77
	ANEXO B – Artigo 2: Biofilm-Producing Ability of <i>Staphylococcus</i> spp. Multidrug-Resistance isolated from Hospitalized Patients with Osteomyelitis (artigo publicado)	78
	ANEXO C – Artigo 3: Biofilm Formation in Bovine Pericardium Biomaterial by Multi-Drug Resistant <i>Staphylococcus haemolyticus</i> Nosocomial Blood Isolates (artigo publicado)	79
	ANEXO D – Artigo 4: Biofilm formation, multidrug-resistance and clinical infections of <i>Staphylococcus haemolyticus</i>: A brief review (artigo publicado)	80

INTRODUÇÃO

Staphylococcus coagulase negativos (SCNs), são um grupo de micro-organismos comensais da microbiota da pele e mucosas de seres humanos e animais. O aumento de estudos sobre os micro-organismos desse grupo vem crescendo nos últimos anos, devido a sua relevância cada vez maior como patógenos emergentes, relacionados à infecções humanas graves, especialmente em pacientes imunocomprometidos, com comorbidades, hospitalizados por períodos de longa duração e/ou que fazem uso de dispositivos médicos invasivos, como cateteres (ELTWISY, 2020; PAIN et al., 2019; PEREIRA-RIBEIRO et al., 2019).

A determinação classificatória dos SCNs isolados de materiais clínicos - como: contaminantes, comensais regulares, ou clinicamente relevantes - é um dos maiores desafios para clínicos e microbiologistas. Apesar da difícil distinção entre as origens das linhagens, o grau de patogenicidade resume-se às estratégias de virulência empregadas pelas diversas espécies, bem como aos mecanismos de defesa do hospedeiro (BECKER, HEILMANN, PETERES, 2014; SUED-KARAM, PEREIRA-RIBEIRO, 2022).

A agilidade e precisão da identificação na categoria de espécie é um fator relevante para a tomada de decisão clínica precisa pelos médicos, aumentando assim as chances de sucesso nos tratamentos terapêuticos propostos (ASANTE et al., 2020; BOUCHAMI et al., 2011). Métodos bioquímicos de identificação estão gradualmente sendo substituídos por métodos moleculares, como o por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS). Técnicas moleculares como PCR proporcionam maior precisão e reprodutibilidade e, portanto, são recomendados na especiação dos SCNs. MALDI-TOF MS é uma técnica de identificação e tem uma aplicação útil na detecção de toxinas demonstrando alta precisão e reprodutibilidade quando utilizado na identificação de SCNs (BECKER, HEILMANN, PETERS, 2014; BOUCHAMI et al., 2011; PEREIRA-RIBEIRO et al., 2019).

Associados à agilidade no diagnóstico, os avanços tecnológicos contribuíram para a compreensão dos mecanismos moleculares de patogenicidade das espécies de SCNs, principalmente em casos de espécies com elevada virulência, como *Staphylococcus haemolyticus* (ASANTE et al., 2020; PEREIRA-RIBEIRO et al., 2019). Reconhecido patógeno nosocomial relevante, especialmente devido aos seus mecanismos de virulência, envolvendo resistência a agentes antimicrobianos e formação de biofilme (AHMED et al,

2019; FREDHEIM et al., 2009; HEILMANN, ZIEBUHR, BECKER, 2019; PEREIRA-RIBEIRO et al., 2022).

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 O gênero *Staphylococcus*

Pertencente à família *Staphylococcaceae*, os *Staphylococcus* spp. são cocos Gram-positivos, imóveis, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, catalase-positivos, com diâmetro variando entre 0,5 e 1,5 μm , mesófilos, resistentes à salinidade e crescem em temperaturas entre 7°C a 48,5 °C, capazes de desenvolver em pH entre 4,2 a 9,3 e com crescimento ótimo entre pH 7,0 a 7,5 (KARAM, 2018; SANTANA et al., 2021).

Atualmente, o gênero *Staphylococcus*, é composto de 85 espécies e 30 subespécies validadas. Os representantes desse gênero podem ser encontrados na pele e em mucosas de humanos e animais (LPSN, 2022). Foram isolados e descritos, pela primeira vez, em 1878, por Robert Koch, sendo em 1879 cultivado em meio líquido por Louis Pasteur. Em 1884 Anton Julius F. Rosenbach obteve colônias puras em seus estudos, e fez a primeira descrição taxonômica, dividindo o gênero em duas espécies com base na presença de pigmento na colônia – *Staphylococcus pyogenes aureus* e *Staphylococcus pyogenes albus* (FELIX JUNIOR, 2007; KEIM, 2005).

Uma característica laboratorial marcante das bactérias desse gênero é a produção de uma enzima denominada coagulase. Clinicamente, a coagulase estimula a formação de uma camada de fibrina sobre a região colonizada pelo micro-organismo, dificultando a ação do sistema imunológico do hospedeiro e de agentes antimicrobianos (JIMÉNEZ et al., 2011; SILVA SANTOS et al., 2009). A expressão desta enzima subdividiu o grupo em coagulase-positivo e coagulase-negativo. *Staphylococcus aureus* é o principal representante do grupo coagulase-positivos. Dentre os coagulase-negativos, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus* e *S. lugdunensis* são considerados membros relevantes, provocando infecções distintas nos seres humanos (LOONEN et al., 2011; PODKOWIK et al., 2013; ROGER, FEY, RUUP, 2009).

A patogenicidade de espécies de *Staphylococcus* está relacionada com: sua elevada versatilidade em adaptar-se a diferentes ambientes comunitários e nosocomiais; sua capacidade de formar biofilme em diferentes superfícies; além de sua plasticidade gênica - que conferem a habilidade de adquirir e expressar uma diversidade de genes envolvidos na

produção de proteínas adesivas e de resistência aos agentes antimicrobianos (ARGEMI et al. 2019; SILVA-SANTANA et al., 2021).

1.2 *Staphylococcus coagulase negativos* (SCNs)

Os SCNs são considerados micro-organismos comensais da pele e mucosas de seres humanos e raramente provocam doenças em hospedeiros sadios. Contudo, a literatura relata o envolvimento dessas bactérias em doenças infecciosas graves como: endocardites, osteomielites, infecções do trato urinário, entre outras. Atualmente, os SCNs são considerados micro-organismos potencialmente patogênicos e têm recebido crescente atenção de órgãos de vigilância epidemiológica ao redor do mundo (KORNIENKO et al., 2016; PEREIRA-RIBEIRO et al., 2019), sendo as espécies: *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. capitis*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. simulans*, as principais de relevância clínica em seres humanos (ALMEIDA, MAMIZUKA, 2015; ARGEMI et al., 2019, ASANTE et al., 2020). Destacando-se *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* como as duas espécies mais isoladas e associadas a infecções graves.

S. epidermidis é a espécie mais prevalente e persistente da pele e mucosas, representando 65% a 90% das amostras de estafilococos observadas nesses sítios, sendo a primeira espécie do grupo dos SCNs associada a infecções graves e de importância clínica, principalmente nos casos de sepse, com destaque para recém-nascidos (ARGEMI et al., 2019; FREEMAN et al., 1990). *S. haemolyticus*, a segunda espécie mais isolada de hemoculturas humanas e vem atraindo a atenção de pesquisadores devido ao seu comportamento patogênico oportunista, assim como o seu perfil de resistência aos antimicrobianos (FREDHEIM et al., 2009; PEREIRA-RIBEIRO et al., 2019; SUED et al., 2017).

S. saprophyticus é a segunda espécie isolada de infecções do trato urinário, mas também pode ser encontrada no sistema gastrointestinal. *S. lugdunensis* é geralmente associado à endocardite de válvulas naturais e protéticas, peritonite, osteomielite, infecções do trato urinário, dentre outras infecções. *S. hominis* e *S. capitis* são comumente encontrados nas amostras clínicas e não costumam causar doenças no homem, porém, estão sendo cada vez mais reconhecidas como patógenos oportunistas, podendo provocar quadros infecciosos sistêmicos em pacientes imunocomprometidos (JIANG et al., 2012; PARK et al., 2010; PEREIRA, 2012; SCHLAG et al., 2010).

Devido ao grande número de espécies potencialmente patogênicas, as infecções por SCNs apresentam grande relevância em ambientes nosocomiais, principalmente, em pacientes que fazem uso de materiais implantados, dispositivos médicos e imunocomprometidos. Durante a prática de procedimentos hospitalares cirúrgicos, micro-organismos constituintes da microbiota da pele ou da mucosa podem adentrar nos tecidos mais profundos e colonizar novas áreas provocando quadros de infecções relevantes, acarretando um impacto direto na recuperação do paciente e em despesas hospitalares (BECKER, HEILMANN, PETER, 2014; HEILMANN, ZIEBUHR, BECKER, 2019).

Outras condições de risco associadas à aquisição de infecções hospitalares por SCNs incluem: internações de longa permanência, nascimento prematuro e exposição a procedimentos de alto risco. Assim, são reconhecidos como uma das principais causas de infecções nosocomiais em unidades de terapia intensiva (UTI) neonatal (CHANG et al., 2003; CHAVES et al., 2005; KLOOS, BANNERMAN, 1994; PEREIRA et al., 2014; RUPP et al., 2005).

Apesar do aumento de infecções associadas às bactérias pertencentes ao grupo dos SCNs, dados epidemiológicos relacionados à identificação em nível de espécie, vem sendo uma das principais dificuldades enfrentadas em diferentes países, incluindo o Brasil. A identificação desses micro-organismos é necessária para diagnósticos mais eficazes, específicos e tratamento imediato (ASANTE et al., 2020; BECKER, HEILMANN, PETERS, 2014; BOUCHAMI et al., 2011).

A especiação com métodos bioquímicos vem sendo gradualmente substituída por métodos moleculares, como PCR, métodos espectrométricos, como MALDI-TOF MS. Métodos moleculares como PCR proporcionam maior precisão, tipabilidade e reprodutibilidade e, portanto, são recomendados na especiação de SCNs (ASANTE et al., 2020; BOUCHAMI et al., 2011; KIM et al., 2018).

A técnica de identificação por MALDI-TOF MS emergiu como uma alternativa mais ágil para identificação bacteriana, baseada na ionização de material de amostra co-cristalizado (proteínas de células microbianas) por pulsos curtos de laser. Tal técnica tem uma aplicação útil na detecção de toxinas e tem demonstrado alta precisão e reprodutibilidade quando usado para identificar SCNs. Todavia, apesar de suas notórias vantagens, seu elevado custo e despesas de manutenção e atualização de seu banco de dados limitam sua presença em muitos laboratórios de análises clínicas no Brasil. Além disso, a técnica foi relatada como incapaz de detectar espécies raras em cerca de 50% dos casos (KORNIENKO et al., 2016; PAIM et al., 2013; PEREIRA-RIBEIRO et al., 2019; SCHULTHESS et al., 2013).

1.3 *Staphylococcus haemolyticus*

S. haemolyticus é um micro-organismo considerado pertencente à microbiota da pele e tecidos moles (LEE, 2017). De todas as espécies que constituem os SCNs, *S. haemolyticus* é a segunda mais frequentemente isolada de hemocultura, principalmente em pacientes internados fazendo uso de dispositivos médicos. Atualmente, essa espécie vem sendo relatada como agente etiológico de diferentes quadros infecciosos em ambiente nosocomial como bacteremia, pneumonia, peritonite, otites e infecções no trato urinário (ELTWISY et al., 2020; NATSIS, COHEN, 2018).

Os principais fatores de virulência associados ao *S. haemolyticus* são a capacidade de resistência aos agentes antimicrobianos e a habilidade de formação de biofilme em diferentes superfícies. Sua plasticidade gênica confere a capacidade de adquirir e expressar genes de micro-organismos de outros gêneros, podendo expressar um elevado número de proteínas que contribuem para a resistência aos antimicrobianos e patogenicidade (PEREIRA-RIBEIRO et al., 2022; RODRIGUEZ-ARANDA et al., 2009; ROGER, FEY, RUPP, 2009).

Esta bactéria vem sendo considerada um patógeno emergente e de monitoramento importante em unidades hospitalares, devido ao aumento de casos de infecções nosocomiais relacionados principalmente por cepas com elevado perfil de resistência aos antimicrobianos (ARGEMI et al., 2019; NATSIS, COHEN, 2018; RODRIGUEZ-ARANDA et al., 2009; ROGER, FEY, RUPP, 2009). Em pacientes neonatos, há um aumento no número de evidências de infecções provocadas por cepas que expressam perfis MDR a diversos agentes antimicrobianos (PEREIRA et al., 2014).

A habilidade de colonizar superfícies de dispositivos médicos e de formar biofilme é outro fator de patogenicidade relevante dos *S. haemolyticus*. A colonização e infecção estão associadas à quebra da cadeia asséptica durante procedimentos médicos, onde o micro-organismo coloniza o material e tem acesso a tecidos mais vascularizados (PEREIRA-RIBEIRO et al., 2019; RODRIGUEZ-ARANDA et al., 2009). Embora os mecanismos de patogenicidade de *S. haemolyticus* ainda serem pouco elucidados, acredita-se que sua habilidade de causar infecção está diretamente relacionada a capacidade de formar biofilme. Contudo, alguns estudos têm indicado que em sua maioria, as cepas produzem biofilme independente da presença do gene *ica*, associado a produção de proteínas envolvidas na formação do biofilme (BARROS et al., 2015; FREDHEIM et al., 2009; PEREIRA-RIBEIRO et al., 2019; SZCZUKA, GRABSKA, KAZNOWSKI, 2015).

A capacidade de invadir células e tecidos dos hospedeiros é outro fator de virulência importante relacionado a infecções persistentes por *S. haemolyticus*. Cepas de origem clínica e resistentes à meticilina foram testadas quanto a alguns fatores de virulência como: capacidade de aderir, invadir, causar toxicidade e quanto a sua atividade apoptótica em cultura de células (KRZYMINSKA et al., 2015). A caracterização molecular de *S. haemolyticus* tem demonstrado que as infecções em hospitais são causadas por um número limitado de tipos de clones que possuem a capacidade de persistir por vários anos em setores específicos. Além disso, a disseminação geográfica dos clones de *Staphylococcus haemolyticus* multirresistentes tem sido observada (BOUCHAMI et al., 2011).

1.4 Infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS)

As Infecções relacionadas à assistência à Saúde (IRAS) representam uma condição localizada ou sistêmica, resultante de uma reação adversa à presença de um agente infeccioso adquirido após admissão do paciente nos serviços de saúde. Atualmente é considerado problema de saúde mundial, constituindo uma das principais causas de mortalidade e morbidade em pacientes internados em UTI e no aumento de despesas hospitalares, visto que pacientes comprometidos por elas tendem a permanecer mais tempo internados e requerem tratamentos mais longos (MARQUES, FERREIRA, CARNEIRO, 2011; PAVONEZE, FORTALEZA, 2014).

O ambiente hospitalar pode ser caracterizado como um ambiente propício à propagação das IRAS, visto que pode ocorrer a seleção dos micro-organismos infecciosos resistentes em decorrência do uso indiscriminado de agentes antimicrobianos e por comportar pacientes com diferentes vulnerabilidades à infecção e realizações de procedimentos invasivos, tais como: instalação de drenos, cateter venoso central, cateter vesical e uso do ventilador mecânico (NOGUEIRA et al., 2009).

Aproximadamente dois terços das IRAS são de origem autógena, ou seja, o desenvolvimento da infecção a partir da microbiota do paciente, o qual pode ser de origem comunitária ou intra-hospitalar. Em ambas as situações, a colonização precede a infecção, sendo difícil determinar se o paciente trouxe o micro-organismo da comunidade ou adquiriu de fonte exógena durante a internação (PEREIRA et al., 2005).

Bactérias do gênero *Staphylococcus* são frequentemente isoladas de infecções associadas a dispositivos permanentes, em hospedeiros comprometidos e transplantados, decorrente, principalmente, da quebra da cadeia asséptica durante o procedimento médico/cirúrgico (PEREIRA-RIBEIRO et al., 2019; SUED et al., 2017;). O principal fator de virulência de *Staphylococcus* spp. relacionados às IRAS é a sua capacidade de aderência em diferentes tipos de superfícies e materiais, incluindo em dispositivos médicos como cateteres, sondas e próteses. Observou-se um crescente número de cepas de SCNs apresentando perfis MDR aos agentes antimicrobianos e com isso a dificuldade no tratamento das infecções, despertando o interesse médico por essas espécies relacionadas a IRAS (PEREIRA-RIBEIRO et al., 2019; SUED-KARAM et al., 2022).

Com o passar dos anos, ocorreu um aumento no número de notificações dessas infecções, principalmente provocadas por bactérias com perfis de multirresistência a antimicrobianos utilizados nas práticas nosocomiais. Possivelmente, decorrente das unidades hospitalares servirem de ambientes capazes de exercer uma seletividade para bactérias resistentes a agentes antimicrobianos, associado ao fato de comportar pacientes com diferentes morbidades que os tornam susceptíveis a infecções decorrentes de procedimentos médicos invasivos e uso de dispositivos implantáveis (MARQUES, FERREIRA, CARNEIRO, 2011; NOGUEIRA et al., 2009; PAVONEZE, FORTALEZA, 2014).

O uso indiscriminado de agentes antimicrobianos contribuiu para alteração e seleção no perfil de resistência de várias espécies de bactérias. Esse impacto foi observado em pacientes críticos com internação prolongada em UTI, onde há maior utilização de dispositivos invasivos e exposição a micro-organismos multirresistentes, impactando em maior gravidade de pacientes críticos com internação prolongada. No Brasil, dados relacionados ao desenvolvimento de IRAS em UTI no ano de 2017 revelam que o micro-organismo com perfil de resistência a antimicrobianos com maior prevalência foi *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos, com 77,7%, seguido por *Staphylococcus* coagulase negativo resistente à oxacilina com 72,2% (EUZÉBIO et al., 2021)

1.5 Resistência aos agentes antimicrobianos

A presença de *Staphylococcus* spp. resistentes aos antimicrobianos foi constatada, na década de 1940, logo após a introdução da penicilina. A resistência aos agentes

antimicrobianos é um fenômeno, na maioria das vezes de base genética, relacionado à existência de genes contidos no micro-organismo que codificam a expressão de diferentes estruturas e mecanismos bioquímicos que impedem a ação dos antimicrobianos (TAVARES, 2014).

O aumento dos surtos causados por clones de SCNs resistentes a agentes antimicrobianos em UTI e é considerado uma condição emergente e preocupante (BECKER, HEILMANN, PETERS, 2014; ROGER, FEY, RUPP, 2009). Entre todas as espécies desse grupo, *S. haemolyticus* recebe um destaque especial, pois é conhecida por ser resistente à maioria dos agentes antimicrobianos, incluindo cefalosporinas, penicilinas, macrolídeos, tetraciclina, quinolonas e aminoglicosídeos. Relatos de IRAS associados ao *S. haemolyticus* vêm aumentando e contribui para a sobrevivência e disseminação do patógeno em ambiente hospitalar (PEREIRA-RIBEIRO et al., 2022).

Os mecanismos de aquisição de genes de resistência pelos estafilococos são variados, sendo a transferência horizontal um dos mecanismos mais utilizados, facilitada pela transdução de fagos e conjugação de plasmídeos. Os plasmídeos podem ser reservatórios e vetores de resistência e virulência à antimicrobianos, mesmo na ausência de pressão seletiva. A transferência horizontal de plasmídeos pode ocorrer não apenas entre cepas de uma mesma espécie, mas também entre diferentes espécies de *Staphylococcus* (MORES, 2021).

É bem conhecido que o mecanismo de resistência à metilina determina a resistência a todos os antimicrobianos β -lactâmicos: penicilina, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos. A resistência à metilina em *Staphylococcus* spp. é devido à expressão de uma proteína de ligação à penicilina modificada, PBP2A, que é codificada pelos genes *mecA* ou *mecC*, que é carregado pelo cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*), ou a outros mecanismos, como a hiperprodução de β -lactamase. Este segmento de DNA, variando de 21-67 kb, carrega o gene *mecA* e os genes *mecR1* e *mecI* que codificam o indutor MecR e a proteína repressora MecI, respectivamente (complexo gene *mec*). Em adição, esse elemento carrega ainda o complexo gene *ccr*, o qual codifica recombinases responsáveis pela mobilidade do SCC*mec*. Além do gene *mecA*/ *mecC*, o SCC*mec* pode carrear outros genes de resistência a antimicrobianos. Assim, o SCC*mec* pode ser definido como uma ilha de resistência a antimicrobianos. A presença do gene *mecA*, no entanto, não é exclusiva de *S. aureus*, uma vez que outras espécies deste mesmo gênero também o adquiriram. Acredita-se que foram os SCNs, em especial *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, os principais responsáveis pela transferência desse gene para *S. aureus* (PEREIRA-RIBEIRO et al., 2022; TAVARES, 2014).

A análise das sequências do gene *mecA* em cepas de referência do GenBank de *S. aureus*, *S. haemolyticus* e *S. epidermidis* apontaram 99,95% de similaridade, o que corroboram com a teoria da transferência interespecie do gene *mecA* (BARROS et al., 2015; PEREIRA et al., 2014; PEREIRA-RIBEIRO et al., 2019; SUED et al., 2017).

Os tipos de SCC*mec* são classificados de acordo com a combinação de dois elementos: o complexo *ccr* e o complexo *mec*, resultando em diferentes tipos de SCC*mec*. Foram relatados também vários subtipos de SCC*mec*. As sequências entre os complexos ou depois deles foram classificadas como regiões “*junkyard*” ou região J, sendo descritos 14 tipos de SCC*mec*, tipo I ao XIV, classificados de acordo com o tipo do complexo *mec* e do complexo *ccr* (UEHARA, 2022).

As opções de tratamento para SCNs são limitadas porque muitas amostras são meticilina-resistentes. Assim, os glicopeptídeos (particularmente a vancomicina) são confiáveis, especialmente em infecções causadas por *S. haemolyticus*. Entretanto, *S. haemolyticus* foi abordado como o primeiro SCN a expressar suscetibilidade diminuída à teicoplanina e à vancomicina (ROGER, FEY, RUPP, 2009).

S. haemolyticus também pode servir como um doador de genes de resistência para espécies como *S. aureus*. *S. haemolyticus* foi o primeiro patógeno Gram-positivo a adquirir resistência aos glicopeptídeos (KRISTOF et al., 2011). A resistência aos glicopeptídeos por cepas de SCNs foi relatada desde 1990 e tem sido considerada um problema emergente, sendo a resistência à teicoplanina mais comum que a resistência à vancomicina. Essa resistência é atribuída ao *operon* de resistência à teicoplanina (*tcaRAB*) formado pelos genes *tcaR*, *tcaA* e *tcaB*; a deleção, ou mutação da região genômica do *locus tcaRAB* pode promover o aumento do nível de resistência à teicoplanina. Algumas cepas de *S. haemolyticus* apresentam a capacidade de inativar o gene *tcaA*, aumentando a resistência à teicoplanina (BAKTHAVATCHALAM et al., 2017).

A resistência à vancomicina já foi observada em outras espécies no grupo dos SCNs, resistência esta, decorrente da plasticidade genômica dos estafilococos e ao uso generalizado de antimicrobianos em ambientes hospitalares e na comunidade, que estimulam a aquisição de elementos genéticos móveis, mutações no DNA e rearranjos nas sequências de inserção de genes associados à superfície dos genomas bacterianos (AL-TAMIMI et al., 2020; RODRIGUEZ-ARANHA et al., 2009; ROGER, FEY, RUPP, 2009; PAIN et al., 2019). Na maioria dos casos, as amostras de *S. haemolyticus* que apresentaram heterorresistência à vancomicina foram isolados de pacientes com infecções na corrente sanguínea e/ou

procedimentos invasivos submetidos, incluindo o uso de cateteres e próteses de válvulas cardíacas (BAKTHAVATCHALAM et al., 2017).

O uso contínuo de agentes antimicrobianos está fortemente associado à emergência de patógenos multirresistentes no ambiente hospitalar. Os SCNs de forma geral têm adquirido resistência a uma grande variedade de agentes antimicrobianos, com diferentes mecanismos e espectros de ação, incluindo rifampicina, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol, macrolídeos, clindamicina e sulfonamidas (ROGER, FEY, RUPP, 2009). A linezolida é um antimicrobiano do grupo oxazolidinona usado para o tratamento de infecções graves causadas por bactérias Gram-positivas resistentes a outros antimicrobianos. O uso deste fármaco é aprovado como um medicamento alternativo a ser administrado em infecções na corrente sanguínea relacionada ao uso de cateter, e apesar do pouco tempo de uso, a resistência a linezolida tem sido identificada entre amostras de SCNs. A resistência é mediada pela aquisição do gene *cfr* e também por mutações em proteínas ribossômicas. Em estudos anteriores, amostras de estafilococos resistentes à linezolida, incluindo cepas de *S. haemolyticus*, foram relatadas com uma frequência cada vez maior ao redor do mundo (BECKER, HEILMANN, PETERS, 2014; GUPTA et al., 2020; RAJAN, PRAKASH, GOPAL, 2017).

Não se sabe ao certo qual o mecanismo utilizado pelos estafilococos para a resistência a linezolida, contudo vários genes com potenciais de resistência foram encontrados no genoma de *S. haemolyticus*, como *norA*, *norB*, *van*, *cfr*, *lmrB* (bombas de efluxo), *blaZ* (β -lactamase), *fusB* (proteína de ligação EF-G de resistência ao ácido fusídico), *ermA* (rRNA adenina N-6-metiltransferase) e AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia (aminoglicosídeo bifuncional N-acetiltransferase e aminoglicosídeo fosfotransferase) e a maioria dos genes de resistência aos agentes antimicrobianos identificados foram associados a elementos transposon, sugerindo que os genes podem ser disseminados para outras cepas, ou espécies (KIM et al., 2018; MORES, 2021).

Estudos epidemiológicos observaram resistência à teicoplanina, linezolida e oxacilina em diferentes cepas de *S. haemolyticus* isoladas de ambientes hospitalares, evidenciando a importância do monitoramento dos padrões de susceptibilidade desta espécie para melhor manejo tanto do tratamento empírico quanto o específico (PEREIRA-RIBEIRO, 2019; RODRIGUEZ-ARANDA, 2009).

S. haemolyticus foi um dos primeiros SCNs com genoma completo publicado. O aumento de clones clínicos de *S. haemolyticus* MDR está se tornando um problema emergente em ambientes hospitalares. A vigilância, o monitoramento do perfil bacteriano isolado nos

hospitais e a tipagem molecular são procedimentos relevantes necessários para o controle da disseminação e evolução de infecções por *S. haemolyticus*. (PAIN et al., 2019; RODRIGUEZ-ARANHA et al., 2009).

1.6 Aderência em dispositivos médicos e a formação de biofilme

A Organização Mundial da Saúde (OMS) definiu o termo dispositivo médico como qualquer instrumento, aparelho, implemento, máquina, implante, reagente para uso *in vivo*, *software*, material ou outro artigo semelhante ou relacionado, pretendido pelo fabricante para ser usado, isoladamente ou em combinação, para seres humanos, para um ou mais fins médicos específicos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022). Atualmente, tem sido crescente em todo o mundo, o uso de dispositivos médicos bióticos e abióticos na assistência à saúde e serviços relacionados, incluindo internação e ambulatório, serviços diagnósticos ou terapêuticos, serviços de laboratório, medicamentos, cuidados de enfermagem, vida assistida e pesquisas microbiológicas (ARONSON, HENAGHAN, FERNER, 2020).

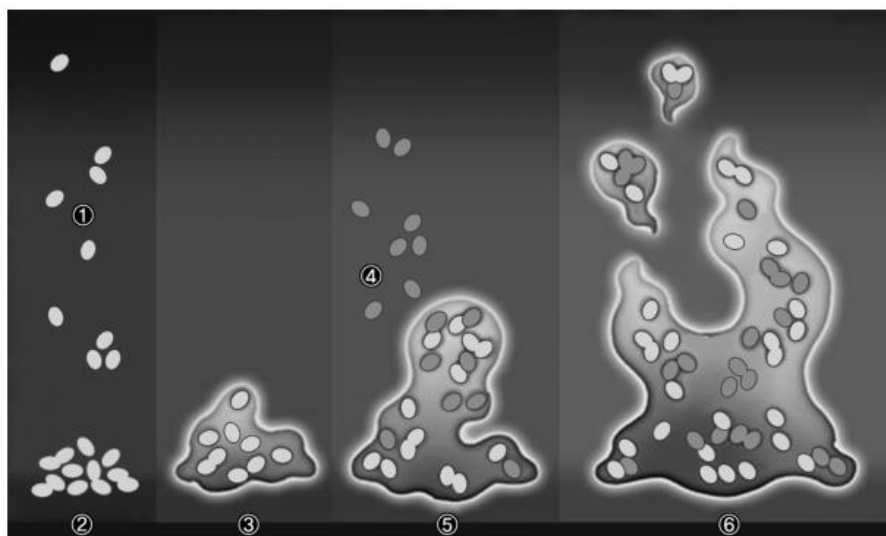
A implantação de dispositivos médicos requer uma equipe multiprofissional e técnicas adequadas para evitar contaminações por bactérias exógenas ou comensais durante os procedimentos. A contaminação por SCNs em dispositivos médicos é uma realidade, principalmente em pacientes fazendo uso de cateteres. Estudos relatam esta contaminação como um problema emergente em ambientes hospitalares, devido a perfis MDR de amostras clínicas isoladas e as baixas alternativas de fármacos para terapias antimicrobianas (LOBO et al, 2010; PEREIRA et al., 2014; PEREIRA-RIBEIRO et al., 2019).

Diversos estudos demonstraram que a colonização e persistência dos micro-organismos em dispositivos médicos ocorrem principalmente em decorrência da capacidade de formação de biofilme nas superfícies abióticas. Sendo o biofilme definido como comunidades microbianas sésseis, organizadas em várias camadas, e incorporados em uma matriz polimérica extracelular (que pode ser composta de polissacarídeos, proteínas ou DNA extracelular produzidos pelas próprias bactérias), facilitando a aderência do micro-organismo, além de fornecer proteção contra os mecanismos de defesa do hospedeiro e a ação de agentes antimicrobianos, contribuindo também, como foco para disseminação do patógeno (HONG et al., 2016; SILVA-SANTANA et al., 2021; TRENTIN, GIODANI, MACEDO, 2013).

Inúmeras variáveis determinam a formação de biofilme, como a permanência do contato com a superfície do dispositivo em tempo necessário para ocorrer à aderência irreversível e posterior multiplicação e agregação de outras células bacterianas (SANTANA et al., 2021). Infecções associadas ao biofilme são de difícil tratamento, decorrente da dificuldade da penetração do antimicrobiano e do sistema imunológico do hospedeiro apresentar baixa atividade sobre a complexa matriz polimérica formada (PEREIRA-RIBEIRO et al., 2019; SILVA-SANTANA et al., 2021; TRENTIN, GIODANI, MACEDO, 2013).

A Figura 1 mostra a formação e maturação do biofilme em etapas complexas. Iniciando com a ligação de células bacterianas planctônicas (número 1) a uma superfície de origem biótica ou abiótica ocorrendo à fixação inicial à superfície (número 2). Posteriormente, a esta etapa, ocorre à fase de multiplicação aumentando a massa bacteriana (número 3). Após a multiplicação dos micro-organismos colonizadores iniciais há o recrutamento de bactérias de outras espécies e a coagregação (número 4), etapa fundamental para o aumento da complexidade do biofilme e sua maturação (número 5). Em um biofilme maduro há uma comunicação química entre as células bacterianas, uma arquitetura complexa com canais e poros, formando uma estrutura tridimensional, a qual pode ser bem espessa e patogênica. Algumas células são capazes de escapar do biofilme podendo ser levadas a novos sítios, reiniciando o processo de colonização (número 6) (SILVA-SANTANA et al., 2021). A competência em formar biofilme em diferentes superfícies é um dos principais fatores de virulência dos SCNs, o que facilita sua permanência em materiais sintéticos e de uso hospitalar (SUED et al., 2017).

Figura 1 - Etapas de desenvolvimento e maturação do biofilme



Fonte: SILVA-SANTANA et al., 2021.

Diferentes genes estão associados à aderência dos SCNs em dispositivos médicos de origem biótica e/ou abiótica (ARGEMI et al., 2019). O *operon icaADBC* apresenta os principais genes que codificam as proteínas envolvidas na formação do biofilme, dentre elas a adesina polissacarídica intercelular (PIA), que faz a mediação entre a aderência intercelular de bactérias e a acumulação de multicamadas de biofilme e a adesina polissacarídica capsular (PSA), que oferece proteção contra a resposta imune do hospedeiro, através da formação da cápsula bacteriana, além de ser responsável pelo processo de fixação da bactéria à superfície (LAVERTY, GORMAN, GILMORE, 2014; WEISSER et al., 2010).

A expressão do *operon icaADBC* é controlada por uma complexa variedade de condições e fatores como: anaerobiose, alta temperatura, estresse, tensão de oxigênio, níveis de glicose e osmolaridade (HERNÁNDEZ et al., 2010). A expressão dos genes *icaA*, *icaD* e *icaC* é um requisito necessário para a produção de PIA. A presença do gene *icaB*, é importante para catalisar a desacetilação da sequência poli-N-acetilglicosamina, aumentando a virulência e as propriedades adesivas da PIA. (ALMEIDA, MAMIZUKA, 2015; LAVERTY, GORMAN, GILMORE, 2014). A aderência intercelular mediada pela proteína associada ao acúmulo (Aap), de forma independente ou em cooperação com o *operon ica*, é bem descrito (OCAL et al., 2017).

Estudo da presença e expressão do gene *ica* pode esclarecer os diferentes mecanismos de aderência na patogênese de infecções associadas a dispositivos médicos e contribuir no desenvolvimento de novas medidas preventivas e terapêuticas para a erradicação de biofilme em hospitais. No entanto, foi demonstrado que PIA não é necessariamente o principal

componente de biofilmes formados por todas as amostras de SCNs (PEREIRA-RIBEIRO et al., 2019).

Acredita-se que a produção do biofilme mediada por PIA forneça vantagens seletivas na colonização de alguns dispositivos invasivos. *S. haemolyticus* pode produzir biofilme, através de uma via *ica*-independente. Mecanismos de aderência intercelular mediados pelas proteínas Aap e Bap, são mais detalhadamente investigados em espécies de *Staphylococcus*, porém, componentes adicionais, como: DNA, RNA e outros polissacarídeos, também apresentam relevância na formação de biofilmes (BARROS et al., 2015).

Proteínas e autolisinas ligadas à superfície dos *Staphylococcus* spp. são responsáveis pela ligação com o colágeno, a vitronectina, fibronectina, fibrinogênio e outras proteínas presentes na matriz extracelular que intensificam a fixação desse micro-organismo a superfícies presentes em biomateriais implantados. Podemos destacar a autolisina Atl, que é codificada pelo gene *atl*, que se liga às proteínas do plasma, a proteína ligadora de fibrinogênio (PLF), codificada pelo gene *fbp*. A capacidade de expressar essa proteína é crucial para a aderência em dispositivos médicos bióticos, tecidos e órgãos transplantados, invasão e internalização na célula hospedeira (ELTWISY et al., 2020; LAVERTY, GORMAN, GILMORE, 2014; LAZZAROTTO, 2010; LEMBRE, VENDRELY, DI MARTINO, 2014).

A expressão da proteína Aap é outro fator amplamente estudado na formação de biofilme por SCNs, esta é codificada pelo gene *aap*, que apresenta atividade capaz de mediar à formação de biofilme após a clivagem enzimática por enzimas do próprio micro-organismo, após a fase de maturação final do biofilme, ou por enzimas do hospedeiro (SCHILCHER, HORSWILL, 2020).

1.7 Biomateriais de pericárdio bovino

Com a necessidade de induzir, ou facilitar o processo de cicatrização de lesões de grandes dimensões, assim como a de reparar cirurgicamente a falha de um órgão ou até mesmo parte dele, iniciou-se a utilização de membranas biológicas como implantes, sendo proposta a denominação de bioprótese. Posteriormente, todos esses materiais de origem biótica, ou abiótica, utilizados isoladamente, ou combinados, para propósitos médicos específicos foram englobados em um grupo denominado dispositivos médicos (ARONSON,

HENEGHAN, FERNER, 2020; COSTA, SILVA, ANDRADE, 2016; PIRES, BIERHALZ, MORAES, 2015).

Nos últimos anos, grande variedade de dispositivos médicos vem sendo desenvolvidos com diferentes propriedades físico-químicas e mecânicas, dependendo da aplicação biomédica prevista, incluindo regeneração tecidual, sistemas de liberação de medicamentos, novos enxertos vasculares, ou suportes para engenharia de tecidos *in vitro* e *in vivo* (WACHESK, 2016).

Os tecidos utilizados como membranas biológicas têm uma característica comum: são ricos em tecido conjuntivo e suas propriedades os tornam bioimplantes altamente eficazes para apoiar a reparação de tecidos (PIRES et al., 1997; PISO, 2016). O pericárdio bovino, material heterólogo, é um material de origem biológica altamente resistente, de fácil manejo cirúrgico, maleável e sem problemas de reação com corpo estranho. Além disso, é um tecido de fácil acesso e habitualmente representa um material de interesse no processo industrial de bovinos (COSTA, 2009). As membranas de pericárdio bovino são um dos tecidos biológicos mais amplamente utilizados na forma de remendo em diversas cirurgias. Na cirurgia cardiovascular tem sido utilizado para correção de inúmeras cardiopatias como substituto das paredes atrial, ventricular, arterial e venosa e para reconstrução do saco pericárdico (COSTA, 2009; PIRES et al., 1997).

Apesar de promissor, o uso de tais dispositivos enfrenta um desafio quanto a mal preservação e prevenção de contaminação. Para a utilização dos bioimplantes, é necessário submetê-lo a tratamento químico, sendo diferentes agentes propostos para tratamento e conservação de tecidos biológicos a serem implantados em homens e animais, buscando principalmente eliminar a possibilidade de transmissão de micro-organismos (COSTA, 2009; PIRES, BIERHALZ, MORAES, 2015). A aderência bacteriana aos biomateriais é um processo de alta complexidade que demanda importante preocupação médica dada a sua evidente influência sobre a morbimortalidade dos pacientes que fazem uso de próteses, além do aumento de gastos hospitalares decorrentes do aumento do tempo de internações e necessidade de uso de medicações específicas e exames elaborados (MORAES et al., 2013).

1.8 Justificativa

As espécies de SCNs têm sido reconhecidas como importantes agentes etiológicos de processos infecciosos diversos, visto que são apontadas como um dos principais agentes de IRAS, sobretudo em infecções nosocomiais e também relacionadas ao uso de 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.

S. haemolyticus é frequentemente isolado de hemoculturas de pacientes hospitalizados de diferentes faixas etárias, incluindo neonatos, por serem vulneráveis a infecções devido à baixa imunidade, além da utilização de dispositivos médicos invasivos favorecendo a colonização, invasão e disseminação sistêmica destes micro-organismos.

Estudos de aspectos clínico-epidemiológicos das infecções por *S. haemolyticus* no ambiente hospitalar, são fundamentais para diagnósticos mais acurados com indicação de agentes antimicrobianos específicos e consequente evolução clínica dos pacientes. Medidas terapêuticas mais específicas, evitando a antibioticoterapia empírica, reduzirão o aparecimento e disseminação de patógenos MDR, principalmente no ambiente hospitalar, evitando novos casos de infecções e/ou surtos nosocomiais. As infecções causadas por *S. haemolyticus* estão incluídas entre os problemas de Saúde Pública devido ao crescente aumento da resistência bacteriana aos diversos agentes antimicrobianos utilizados na prática clínica, inclusive o uso de agentes antimicrobianos de última geração (glicopeptídeos - vancomicina e teicoplanina) que passaram a constituir uma das principais opções terapêuticas nas infecções nosocomiais causadas por *Staphylococcus* spp.

As habilidades de interação e invasão de células e tecidos dos hospedeiros são mecanismos de virulência relacionadas às infecções persistentes mais investigados. Os fatores de virulência relacionados com a patogenicidade de diferentes amostras de *S. haemolyticus* ainda não foram totalmente esclarecidos. 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 *S. haemolyticus*.

Há décadas evidencia-se o uso de biomateriais implantáveis, incluindo a membrana de pericárdio bovino. Portanto, a capacidade de ocorrer infecções e a morbimortalidade dos pacientes tornou-se motivo de preocupação pelo nosso grupo de pesquisa, inclusive por *S. haemolyticus* além de outros *Staphylococcus* spp.. Deste modo, estudos relacionados aos aspectos fenotípicos e genotípicos da capacidade de formação de biofilme nestes biomateriais e em superfícies abióticas, assim como da resistência aos agentes antimicrobianos são fundamentais para o monitoramento da patogenicidade de amostras de *S. haemolyticus*, além de ser imprescindível para medidas de controle de infecções e limitação da propagação de amostras expressando perfis MDR dentro e fora das unidades de saúde.

2 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo geral a análise fenotípica e genotípica da habilidade de formação de biofilmes em superfícies abióticas e em biomaterial implantável e de perfis de resistência a agentes antimicrobianos de amostras de *S. haemolyticus* isoladas de hemoculturas de neonatos e adultos internados em um hospital universitário no período de 2008 -2014.

Neste sentido, os seguintes objetivos específicos foram desenvolvidos:

- a) identificação pela técnica de MALDI-TOF MS das amostras de *S. haemolyticus* previamente isoladas e mantidas na coleção de cultura;
- b) análise comparativa entre a técnica de MALDI-TOF MS e ensaios de PCR multiplex (mPCR) para a identificação de *S. haemolyticus*;
- c) determinação de perfis de susceptibilidade a agentes antimicrobianos diversos pelo teste de disco-difusão;
- d) determinação de Concentração Inibitória Mínima de oxacilina, vancomicina e teicoplanina;
- e) análise dos perfis MDR e não-MDR aos agentes antimicrobianos;
- f) avaliar a correlação entre a presença de gene *mecA* e o perfil de sensibilidade a oxacilina;
- g) avaliação da capacidade de formação de *slime* em meio Vermelho do Congo;
- h) pesquisa de produção de biofilme em superfície abiótica hidrofílica do vidro;
- i) pesquisa de produção de biofilme em superfície abiótica hidrofóbica de poliestireno;
- j) pesquisa da presença de genes *icaA*, *fbp*, *atl* e *aap* relacionados com propriedades adesivas e produção de biofilme de SCN;
- k) investigação quantitativa e qualitativa de formação de biofilme em biomaterial - membrana de pericárdio bovino; e
- l) análise estrutural utilizando ensaios de microscopia eletrônica de varredura de biofilme formado em membrana de pericárdio bovino.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem e identificação das amostras bacterianas

Foram analisadas 72 amostras de *S. haemolyticus* previamente isoladas de hemoculturas de pacientes adultos e neonatos de diversos setores do Hospital Universitário Pedro Ernesto – HUPE/UERJ, durante os anos de 2008, 2009, 2010, 2013 e 2014. As amostras foram isoladas e previamente caracterizadas com os seguintes testes fenotípicos: coloração de Gram, produção de catalase, cultivo em meio Ágar Manitol Salgado.

As amostras de espécies de SCN são mantidas na coleção de cultura, estocadas em caldo triptona soja (Difco Labs, Detroit, MI, USA) com 20% de glicerol em freezer à -80°C, na Disciplina de Microbiologia e Imunologia (DIMI/DMIP/FCM-UERJ) - Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

3.2 Reativação das amostras e confirmação da identificação bacteriana pela técnica de Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz - MALDI-TOF MS

As amostras foram semeadas em Ágar Sangue de Carneiro e incubadas a 35°C por 24 horas para análise de pureza, morfologia colonial e verificação da produção de hemólise (PROCOP et al., 2018). Após a reativação das amostras foi realizada a confirmação da identificação das cepas estocadas através da técnica de MALDI-TOF MS, segundo Kornienko et al. (2016). As amostras foram semeadas em Agar Muller Hinton e incubadas a 35°C por 24 h. Em seguida foram tocadas com um auxílio de alça bacteriológica esterilizada e depositada na placa metálica (Sample target) fornecida pelo fabricante do equipamento MALDI-TOF MS Microflex LT (Bruker Daltonics). A placa inoculada foi mantida em fluxo laminar até a completa secagem do material depositado. A cada poço da placa metálica foi inoculado 1µl da matriz composta por ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (Sigma; Saint Louis, MO, EUA) preparado em acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético 2,5% (Sigma; Saint Louis, MO, EUA).

Após secagem da mistura e 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 4 grupos de 42 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.

3.3 Ensaio de PCR multiplex (mPCR) para identificação de amostras de *S. haemolyticus* e detecção do gene *mecA*

A liberação do DNA bacteriano através de lise térmica foi realizada de acordo com Schuenck et al. (2008) com modificações. Três a cinco colônias de cada amostra cultivada em ágar sangue foram transferidas para 100 µL de tampão TE (10mM Tris-HCl [Sigma], 1mM EDTA [Sigma], pH 7,8). Esta suspensão foi mantida à temperatura de ebulição, aproximadamente 100°C, por 10 minutos e, em seguida centrifugada por 1 minuto a 7.000 x G. Em seguida os sobrenadantes foram coletados e utilizados para a reação de PCR. A identificação das amostras foi realizada pela detecção de segmentos genômicos específicos utilizando os oligonucleotídeos SH-F e SH-R para o gene *mvaA* de *S. haemolyticus* (SCHUENCK et al, 2008), com detecção simultânea do gene *mecA*, conforme descrito por Pereira et al. (2014). Os oligonucleotídeos utilizados estão descritos na Tabela 1. A amplificação foi realizada em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient), utilizando volume total de 50µL para a reação composta de 10 µL de DNA liberado, 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) (Life Technologies), 0,25 µM de cada um dos oligonucleotídeos SH-F, SH-R, MRS₁ e MRS₂, 1,5U de *Taq* DNA polimerase (Biotools, Madrid,Espanha), 5 µL do tampão da enzima 10x (10 mM Tris HCl, 25mM KCl) e 2 mM de MgCl₂.

Tabela 1 – Descrição dos oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de mPCR para identificação de amostras de *Staphylococcus haemolyticus* e gene *mecA*

Primer	Sequência do Primer 5'→3'	Tamanho do Amplicon	Referência
<i>SH-F</i> <i>SH-R</i>	GGT CGC TTA GTC GGA ACA AT CAC GAG CAA TCT CAT CAC CT	285 pb	SCHUENCK et al., 2008
<i>mecAF</i> <i>mecAR</i>	TAG AAA TGA CTG AAC GTC CG TTG CGA TCA ATG TTA CCT AG	154 pb	SANTOS et al., 1999

Legenda: pares de bases (pb).

Fonte: O autor, 2022.

Após realização de uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 3 min, foram realizados 30 ciclos de amplificação com desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 55°C por 1 min e extensão a 72°C por 2 min, seguido de uma etapa final de extensão, realizada a 72°C por 5 min.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em E-gel (agarose a 2% - Invitrogen), no equipamento de *E-gel iBase Power System* (Invitrogen), por 25 minutos. A visualização dos produtos de amplificação foi obtida em transiluminador de luz ultravioleta e, posteriormente, o gel foi fotografado (*Kodak Digital Science Electrophoresis Documentation & Analysis System 120*).

3.4 Determinação dos perfis de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos

Os perfis de susceptibilidade a 09 agentes antimicrobianos frente as amostras de *S. haemolyticus* foram avaliados pelo método do disco difusão em ágar, seguindo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2021) (PEREIRA-RIBEIRO et al., 2019): Cefoxitina (FOX 30 µg), Ciprofloxacina (CIP 5µg), Clindamicina (DA 2µg), Cloranfenicol (CLO 30µg), Eritromicina (ER 15µg), Gentamicina (GEN 10µg), Linezolida (LZD 30µg), Moxifloxacina (MXF 5µg), Rifampicina (RIF 5µg) (OXOID, Hants, UK). As amostras de *S. haemolyticus* que apresentaram resistência a três ou mais diferentes classes de agentes antimicrobianos foram consideradas MDR (SUED et al., 2017).

3.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de agentes antimicrobianos

O método de microdiluição em placa foi utilizado para determinação de Concentração Inibitória Mínima de oxacilina, vancomicina e teicoplanina, conforme as normas estabelecidas pelo CLSI (2021). As amostras de *S. haemolyticus* testadas foram inoculadas em placas de Petri contendo o meio de cultura Ágar Muller Hinton e incubados por 24 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Posterior o período de incubação, com o auxílio de uma alça calibrada, colônias crescidas na placa foram retiradas e semeadas em meio de cultura Caldo Muller Hinton e incubadas por 24 horas a 35°C . Após a incubação, o inóculo foi padronizado na turvação referente a 0,5 na escala-de McFarland, aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. O preparo da técnica foi feito com a produção da solução-mãe 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-mãe, foi retirada uma alíquota que foi calculada pela fórmula: $C_i \times V_i = C_f \times V_f$, onde C_i é a concentração inicial da solução; V_i é o volume inicial que vamos retirar da solução-mãe para obter a concentração desejada; C_f é a concentração final da solução; V_f é o volume final do meio. Depois foram colocados na microplaca 50µl do inóculo e 50µl da solução-mãe, ressaltando que para oxacilina a solução foi suplementada com 2% de NaCl. O primeiro poço onde não ocorreu crescimento bacteriano, avaliado pela turvação do meio de cultura, foi o utilizado para a determinação da CIM. O último poço foi utilizado amostra controle, onde foi colocado apenas o inóculo com o meio de cultura sem a adição de antimicrobianos. Para oxacilina, as amostras de *S. haemolyticus* que apresentaram $\text{CIM} \leq 0,5\mu\text{g/ml}$ foram consideradas sensíveis, e as amostras que apresentaram $\text{CIM} \geq 1\mu\text{g/ml}$, foram consideradas resistentes. Para vancomicina, as amostras de *S. haemolyticus* que apresentaram $\text{CIM} \leq 4\mu\text{g/ml}$ foram consideradas sensíveis, as amostras que apresentaram CIM com valores entre 8-16µg/ml foram consideradas intermediárias e $\text{CIM} \geq 32\mu\text{g/ml}$ foram consideradas resistentes. Para teicoplanina, as amostras que apresentaram $\text{CIM} \leq 8\mu\text{g/ml}$ foram consideradas sensíveis, as amostras que apresentaram $\text{CIM} = 16\mu\text{g/ml}$ foram consideradas intermediárias as amostras que apresentaram $\text{CIM} \geq 32\mu\text{g/ml}$ foram consideradas resistentes.

3.6 Produção de *slime* em meio Ágar Vermelho do Congo

A expressão da produção de *slime* foi avaliada pelo método de crescimento em Ágar Vermelho do Congo, anteriormente reportado por Chaieb, Mahdounai e Bakhrouf (2005) e Sued et al. (2017). Amostras de *S. haemolyticus* foram semeadas em placa contendo o meio de cultura Ágar Vermelho do Congo, 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). Colônias negras demonstram resultado positivo e colônias vermelhas ou rosa-avermelhadas, negativo. A amostra de *S. epidermidis* ATCC 35984 foi utilizada como controle-positivo do teste (colônias negras).

3.7 Avaliação da produção de biofilme em superfícies abióticas

Todas as 72 cepas de *S. haemolyticus* estudadas foram semeadas em Ágar Muller Hinton a 35°C ± 2°C e incubadas por 24 horas, e submetidos aos seguintes ensaios:

3.7.1 Análise qualitativa e semiquantitativa da aderência e formação de biofilme no vidro

Os ensaios de aderência e formação de biofilme no vidro foram realizados, baseados em metodologia descrita por Mattos-Guaraldi e Formiga (1991). Com auxílio de uma alça calibrada foi realizado uma suspensão bacteriana com aproximadamente 10⁸ UFC/ml, previamente padronizada através da técnica de diluição seriada e inoculação em meio de cultura sólido. Alíquotas das suspensões realizadas foram inoculadas em tubos 13 x 100 mm contendo 5 ml de caldo TSB e incubadas por 48h a 37°C. A cada 24h foi realizado a troca do meio por um novo. 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 e produtora de biofilme; II (++) - bactérias aderidas nas laterais do tubo de vidro –

moderadamente aderente e produtora de biofilme; III (+) – bactérias formando um anel na interface entre o meio de cultura e o ar – fracamente produtora de biofilme; e IV (-) ausência de bactérias aderidas – não produtora de biofilme. Como controle positivo para o teste foi utilizado a amostra de *S. epidermidis* ATCC 35984.

3.7.2 Análise qualitativa e semiquantitativa da aderência e formação de biofilme no poliestireno

As amostras foram previamente inoculadas em meio de cultura Mueller Hinton a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Após o período de incubação foram suspensas em caldo triptcaseína de soja até atingirem uma turvação equivalente a 0,5 McFarland. Uma alíquota de 200 μl de suspensão bacteriana em TSB foi dispensada nos poços de uma placa de microtitulação de poliestireno de 96 poços. A placa foi incubada a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24h e, em seguida, lavada duas vezes com 200 μl em tampão salina fosfato (PBS) e, posteriormente 200 μl de metanol foram adicionados a cada poço e mantidos por 15 minutos. Em seguida, o metanol foi retirado e a placa deixada dentro de um fluxo laminar previamente esterilizado em temperatura ambiente para secagem. Em seguida, 200 μl de cristal violeta a 0,2% foram colocados em cada poço por 5 minutos. A placa foi lavada exaustivamente com água destilada. Depois de seca, foram adicionados aos poços 200 μl 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, as amostras foram classificadas como: não aderentes (-), fracamente aderentes (+), moderadamente aderentes (++) e fortemente aderentes (+++) (PEREIRA et al., 2014).

3.8 Avaliação quantitativa da aderência e produção de biofilme em superfície de biomaterial – membrana de pericárdio bovino

Os ensaios foram realizados em microplacas de 24 poços, cada poço contendo 500 µl de suspensões bacterianas em caldo TSB ($\sim 10^8$ UFC/ml). Fragmentos de 0,5 cm de membrana de pericárdio bovino estéril e então, as placas foram incubadas a 37°C por 24h. 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 na base 10 para a contagem de colônias viáveis em placa de Mueller Hinton (SUED-KARAM et al., 2022).

3.9 Análise estrutural do biofilme de *S. haemolyticus* em pericárdio bovino pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Das amostras analisadas, foram selecionados dois representantes de *S. haemolyticus*, uma com a expressão de *slime* em meio Vermelho do Congo (SH-68A) e outra sem essa expressão (SH-09N). Os mesmos foram submetidos à técnica de formação de biofilme conforme descrito no item 3.8 em placas de 24 poços contendo pequenos segmentos de 0,5 cm de pericárdio bovino estéril. O conteúdo de cada poço foi aspirado e lavado duas vezes com 1 ml de solução salina (NaCl 0,9%) 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 pericárdio bovino estéreis, os quais também foram processados diretamente após a remoção da embalagem comercial.

3.10 Detecção dos genes que codificam adesinas e formação de biofilme

Ensaio de detecção da presença dos genes *icaA*, *fbp*, *atl* e *aap* foram realizadas pela técnica de PCR, utilizando os oligonucleotídeos descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Descrição dos oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de PCR que apresentam genes que codificam adesinas de amostras de *Staphylococcus* spp.

Primers	Sequência do Primer 5'→3'	Tamanho do Amplicon	Referências
<i>icaAF</i> <i>icaAR</i>	CGA TGG GCT CAA GGT GG TTC TTT TCG TAG CGA CTG TC	287 pb	POTTER et al., 2009
<i>fbpF</i> <i>fbpR</i>	GGT GAT ACC ATT TAC CGC AC CGT GCA TCG TAG TAG CGA TC	512 pb	BARROS et al., 2015
<i>atlF</i> <i>atlR</i>	TAA CTC AAC AAT CGA TGG CG GTA CCC CAA GGT GCT ACT TG	446 pb	BARROS et al., 2015
<i>aapF</i> <i>aapR</i>	CAA CGA AGG CAG AAG AAG GA CAT CCC CAT CTT TCT TGC TG	719 pb	ARAÚJO et al., 2006

Legenda: pares de base (pb).

Fonte: Adaptada de KARAM, 2018.

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

Os ensaios de PCR para os genes *icaA* foram realizadas segundo o trabalho publicado por Potter et al. (2009). A amplificação foi realizada em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient), utilizando volume total de 50 µL para a reação composta de 3 µL de DNA liberado, 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) (Life Technologies), 50 pmol de cada primer *forward* e *reverse* (1 µL), 2,5U de *Taq* DNA polimerase (Biotools, Madrid, Espanha), 2,5 µL de tampão 10X Buffer (Sigma) (10 mM 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 min, 52°C por 1 min e 72°C por 1 min, seguido de uma etapa final de extensão de 72°C por 5 min.

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

O ensaio de PCR para os genes *aap* foi realizada segundo Araújo et al. (2006). A amplificação foi realizada em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient), utilizando volume total de 25 µL para a reação composta de 3 µL de DNA liberado, 250 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) (Life Technologies), 25 pmol de cada primer *forward* e *reverse* (1 µL), 1,0U de *Taq* DNA polimerase (Biotools, Madrid, Espanha), 2,5 µL de tampão 10X (Sigma) (10 mM Tris HCl, 25mM KCl) e 50mM de MgCl₂. A reação de amplificação realizada foi programado para desnaturação inicial de 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min, e uma etapa final de extensão de 72°C por 5 min.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em E-gel (agarose a 2% - Invitrogen), no equipamento de *E-gel iBase Power System* (Invitrogen), por 25 minutos. A visualização dos produtos de amplificação foi obtida em transiluminador de luz ultravioleta e, posteriormente, o gel foi fotografado (*Kodak Digital Science Electrophoresis Documentation & Analysis System 120*).

3.11 Análise dos dados

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos, pelos menos, três vezes.

3.12 Considerações éticas

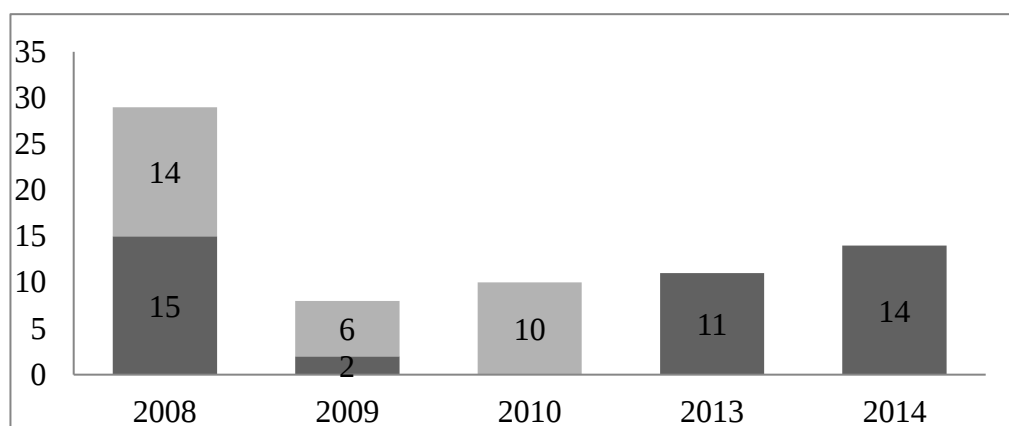
As atividades previstas nesta proposta foram submetidas à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, recebendo parecer favorável (CAAE: 0118.0.228.000-10).

4 RESULTADOS

4.1 Números de amostras isoladas e identificação pela técnica de MALDI-TOF MS

Amostras de *S. haemolyticus* foram isoladas de hemoculturas tanto de pacientes adultos (n=42) quanto de neonatos (n=30). Em 2008 pareceu ter ocorrido um surto epidêmico na UTI neonatal, uma vez que foi observado o aumento das amostras em neonatos (n=14), que permaneceram sendo isoladas durante os anos de 2009 (n=6) e 2010 (n=10). Enquanto 42 amostras de *S. haemolyticus* isoladas de hemoculturas de adultos incluiu: 2008 (n=15), 2009 (n=2), 2010 (n=0), 2013 (n=11), 2014 (n=14) (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Número de amostras de *Staphylococcus haemolyticus* isoladas de hemoculturas de pacientes adultos e neonatos (2008 – 2014) no HUPE/UERJ analisadas no presente estudo



Legenda: Amostras de neonatos/adultos: 2008 (n=14/15), 2009 (6/2), 2010 (10/0), 2013 (0/11), 2014 (0/14).

Fonte: O autor, 2022.

Os resultados obtidos pelos ensaios de mPCR confirmaram a identificação das 72 amostras de *S. haemolyticus* isoladas de hemoculturas de pacientes internados no HUPE em diferentes anos: 2008 (n=29), 2009 (n=8), 2010 (n=10), 2013 (n=11), 2014 (n=14). Adicionalmente, os resultados obtidos pelo método de MALDI-TOF MS, com scores $\geq 1,700$, foram confirmados por mPCR para a identificação das amostras de *S. haemolyticus* (Tabela 3).

Tabela 3 – Resultados dos métodos moleculares MALDI-TOF MS e mPCR relacionados a identificação das amostras de *Staphylococcus haemolyticus* (n=72) isoladas de hemoculturas de pacientes adultos (n=42) e neonatos (n=30) internados no HUPE/UERJ

Ano de Isolamento	Amostras de <i>S. haemolyticus</i>	MALDI-TOF (Score)	mPCR*
2008	SH-01N, SH-03N, SH-04N, SH-06N, SH-07N, SH-09N, SH-10N, SH-13N, SH-15A, SH-16 ^a , SH-19A, SH-21A, SH-23A, SH-24A, SH-25A, SH-26A, SH-28A	≥ 2,000	+
	SH-02N	1,998	+
	SH-08N	1,958	+
	SH-20A	1,954	+
	SH-27A	1,945	+
	SH-18A	1,931	+
	SH-29A	1,882	+
	SH-05N	1,856	+
	SH-11N	1,856	+
	SH-12N	1,852	+
	SH-14N	1,799	+
	SH-17A	1,757	+
	SH-22A	1,726	+
2009	SH-32N, SH-33N, SH-35N	≥ 2,000	+
	SH-34N	1,982	+
	SH-37A	1,888	+
	SH-31N	1,865	+
	SH-30N	1,856	+
	SH-36A	1,744	+
2010	SH-38N, SH-40N, SH-41N, SH-43N, SH-45N, SH-46N, SH-47N	≥ 2,000	+
	SH-39N	1,986	+
	SH-44N	1,896	+
	SH-42N	1,852	+
2013	SH-48A, SH-49A, SH-50A, SH-51A, SH-53A, SH-54A, SH-55A, SH-57A, SH-58A	≥ 2,000	+
	SH-52A	1,988	+
	SH-56A	1,931	+
2014	SH-59A, SH-61A, SH-62A, SH-63A, SH-64A, SH-65A, SH-66A, SH-67A, SH-68A, SH-69A, SH-71A, SH-72A	≥ 2,000	+
	SH-70A	1,908	+
	SH-60A	1,955	+

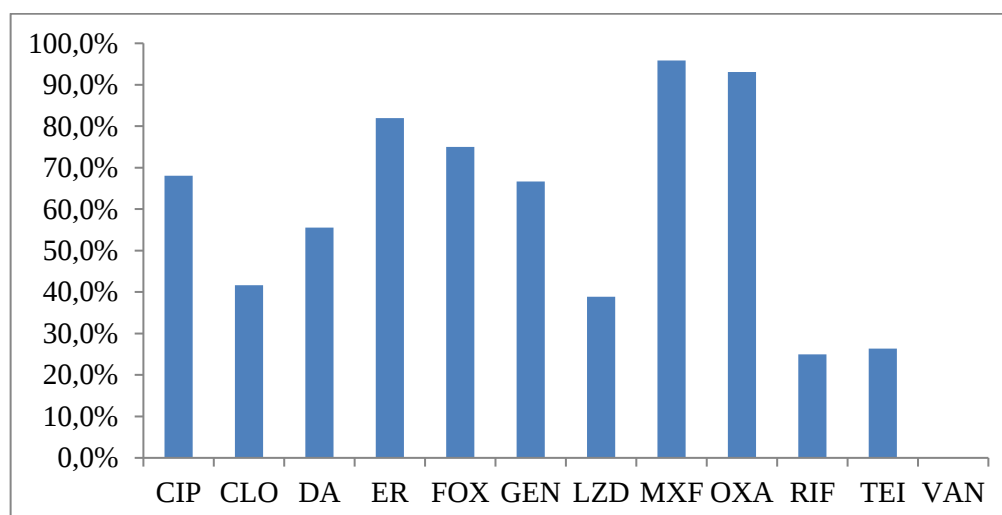
Legenda: Amostras isoladas de hemocultura de neonato (SH); *mPCR multiplex para identificação de *S. haemolyticus* pelos primers (SH_F e SH_R) (SCHUENCK, 2008); Amostras de neonatos/adultos: 2008 (n=14/15), 2009 (6/2), 2010 (10/0), 2013 (0/11), 2014 (0/14).

Fonte: O autor, 2022.

4.2 Perfis de susceptibilidade e de multirresistência aos agentes antimicrobianos

A expressão de multirresistência (MDR) e Não-MDR pelas 72 amostras de *S. haemolyticus* isoladas de hemoculturas avaliada para 12 agentes antimicrobianos pelos métodos de difusão em disco e/ou CIM está apresentada nas no Gráfico 2 e Tabelas 4 e 5.

Gráfico 2 – Percentuais de amostras de *Staphylococcus. haemolyticus* isolados de hemoculturas no Hospital Universitário Pedro Ernesto expressando resistência aos agentes antimicrobianos testados



Legenda: Ciprofloxacina (CIP); Cloranfenicol (CLO); Clindamicina (DA); Eritromicina (ER); Cefoxitina (FOX); Gentamicina (GEN); Linezolida (LZD); Moxifloxacina (MXF); Oxacilina (OXA); Rifampicina (RIF); Teicoplanina (TEI); Vancomicina (VAN)

Fonte: O autor, 2022.

Tabela 4 – Perfis de resistência, expressão de multirresistência (MDR) e Não-MDR de amostras de *Staphylococcus haemolyticus* isoladas de hemoculturas para 12 agentes antimicrobianos avaliados pelos métodos de difusão em disco e/ou concentração inibitória mínima (Continua)

Amostras	Perfis de Resistência	
SH-68A, SH-70A	CIP, CLO, DA, ER, FOX, GEN, LZD, MXF, OXA, RIF	MDR-01
SH-50A, SH-56A, SH-17A	CIP, CLO, DA, ER, FOX, GEN, LZD, MXF, OXA	MDR-02
SH-20A	CIP, CLO, DA, ER, FOX, GEN, MXF, OXA, RIF	MDR-03
SH-22A	CIP, CLO, DA, ER, GEN, LZD, MXF, OXA, TEI	MDR-04
SH-48A, SH-45N, SH-28A	CIP, DA, ER, FOX, GEN, LZD, MXF, OXA, RIF	MDR-05
SH-14N	CLO, DA, ER, FOX, GEN, LZD, MXF, OXA, TEI	MDR-06
SH-60A, SH-66A, SH-51A, SH-55A	CIP, CLO, DA, ER, FOX, GEN, MXF, OXA	MDR-07
SH-72A, SH-69A	CIP, CLO, DA, ER, GEN, MXF, OXA, RIF	MDR-08
SH-18A, SH-42N	CIP, CLO, ER, FOX, GEN, LZD, MXF, OXA	MDR-09
SH-24A	CIP, CLO, ER, FOX, LZD, MXF, OXA, TEI	MDR-10

Tabela 4 – Perfis de resistência, expressão de multirresistência (MDR) e Não-MDR de amostras de *Staphylococcus haemolyticus* isoladas de hemoculturas para 12 agentes antimicrobianos avaliados pelos métodos de difusão em disco e/ou concentração inibitória mínima (Conclusão)

Amostras	Perfis de Resistência	
SH-36A, SH-67A, SH-41N	CIP, DA, ER, FOX, GEN, LZD, MXF, OXA	MDR-11
SH-53A	CIP, DA, ER, FOX, GEN, MXF, OXA, RIF	MDR-12
SH-15A	DA, ER, FOX, GEN, LZD, MXF, OXA	MDR-13
SH-54A	CIP, CLO, DA, ER, GEN, MXF, OXA	MDR-14
SH-03N	CIP, CLO, DA, FOX, GEN, MXF, OXA	MDR-15
SH-01N, SH-04N, SH-12N	CIP, CLO, ER, FOX, GEN, MXF, OXA	MDR-16
SH-26A	CIP, DA, ER, LZD, MXF, OXA, RIF	MDR-17
SH-31N, SH-46N, SH-49A	CIP, DA, ER, FOX, GEN, MXF, OXA	MDR-18
SH-37A	CIP, DA, ER, FOX, LZD, MXF, OXA	MDR-19
SH-57A	CIP, DA, ER, GEN, LZD, MXF, OXA	MDR-20
SH-19A	CIP, ER, FOX, GEN, LZD, MXF, OXA	MDR-21
SH-59A	CIP, DA, ER, GEN, MXF, OXA, RIF	MDR-22
SH-08N	CIP, ER, FOX, GEN, MXF, OXA, RIF	MDR-23
SH-07N	CLO, ER, FOX, GEN, MXF, OXA, RIF	MDR-24
SH-10N	CIP, CLO, FOX, MXF, OXA, RIF	MDR-25
SH-65A	DA, ER, FOX, GEN, MXF, OXA, RIF	MDR-26
SH-61A	CIP, DA, ER, FOX, MXF, OXA	MDR-27
SH-35N	CIP, DA, FOX, GEN, LZD, MXF	MDR-28
SH-71A	CIP, ER, FOX, GEN, MXF, OXA	MDR-29
SH-02N	CIP, ER, FOX, LZD, MXF, OXA	MDR-30
SH-13N	CLO, DA, ER, GEN, MXF, OXA	MDR-31
SH-25A	DA, ER, GEN, MXF, OXA, TEI	MDR-32
SH-23A	DA, ER, GEN, LZD, MXF, OXA	MDR-33
SH-38N	CIP, ER, FOX, GEN, MXF	MDR-34
SH-16A	CIP, ER, FOX, LZD, MXF	MDR-35
SH-52A	CIP, ER, GEN, MXF, OXA	MDR-36
SH-09N, SH-11N	CLO, ER, FOX, MXF, OXA	MDR-37
SH-47N	CLO, DA, FOX, MXF, OXA	MDR-39
SH-33N	DA, ER, MXF, OXA, RIF	MDR-40
SH-43N	FOX, GEN, MXF, OXA, RIF	MDR-41
SH-62A	CIP, ER, MXF, OXA,	MDR-42
SH-64A	CIP, ER, OXA, TEI	MDR-43
SH-29A	CIP, FOX, LZD, MXF,	MDR-44
SH-32N	CIP, FOX, MXF, OXA	MDR-45
SH-06N	CLO, ER, MXF, OXA	MDR-46
SH-63A	ER, LZD, MXF, OXA	MDR-47
SH-39N	FOX, GEN, MXF, OXA	MDR-48
SH-44N	CIP, FOX, MXF, RIF	MDR-49
SH-05N	CIP, FOX, MXF, OXA	MDR-50
SH-30N	CIP, GEN, MXF, OXA	MDR-51
SH-27A	LZD, MXF, OXA	MDR-52
SH-40N	MXF, OXA	Não-MDR
SH-21A, SH-58A	ER, OXA	Não-MDR

Legenda: Ciprofloxacina (CIP); Cloranfenicol (CLO); Clindamicina (DA); Eritromicina (ER); Cefoxitina (FOX); Gentamicina (GEN); Linezolida (LZD); Moxifloxacina (MXF); Oxacilina (OXA); Rifampicina (RIF); Teicoplanina (TEI); não multirresistente (Não-MDR).

Fonte: O autor, 2022.

A resistência a oxacilina foi observada para a maioria das amostras de *S. haemolyticus* independente dos ensaios realizados: concentrações inibitórias mínimas e disco – difusão (Tabelas 4 e 5).

As amostras que apresentaram resultados intermediários foram consideradas como sensíveis com aumento de exposição aos agentes antimicrobianos testados. Cinco amostras (SH-01N, SH-17A, SH-19A, SH-23A, SH-24A).

A resistência à moxifloxacina foi observada em mais de 95% das amostras, seguido de oxacilina, eritromicina e cefoxitina, sendo 93%; 81,9% e 75%, respectivamente. Mais de 60% das cepas foram consideradas resistentes à ciprofloxacina e à gentamicina. Aproximadamente 50% das amostras foram clindamicina-resistentes, enquanto a resistência aos antimicrobianos cloranfenicol, rifampicina e teicoplanina, foram observadas em 41,6%, 25% e 6,94%% das amostras, respectivamente.

Dentre as 72 amostras de *S. haemolyticus* analisadas, as cepas SH-68A e SH-70A, expressaram resistência ao maior número de agentes antimicrobianos, apresentando resistência a dez dos doze antimicrobianos testados (Tabela 4).

Quando avaliado os perfis de multirresistência (MDR) das amostras, apenas as cepas SH-21A, SH-40N e SH-58A foram consideradas como não-MDR. A maioria das amostras MDR e não-MDR apresentaram perfis heterogêneos de resistência aos agentes antimicrobianos testados (Tabela 4). Dentre diferentes 52 perfis MDR expressos pelas amostras de *S. haemolyticus* isoladas de hemoculturas, os perfis MDR - 01, 02, 05, 07, 08, 09, 11, 16, 18 e 37 foram observados em mais de uma amostra.

Tabela 5 – Concentrações Inibitória Mínima (CIM) dos agentes antimicrobianos oxacilina, teicoplanina e vancomicina apresentados para as amostras de *Staphylococcus haemolyticus* isoladas de hemoculturas (Continua)

Amostras	CIM (µg/ml)		
	OXA	TEI	VAN
SH-24A	512 (R)	64 (R)	8 (I)
SH-25A	512 (R)	64 (R)	4 (S)
SH-14N, SH-22A	512 (R)	32 (R)	4 (S)
SH-15A	512 (R)	32 (R)	2 (S)
SH-65A, SH-58A	512 (R)	16 (I)	4 (S)
SH-02N	512 (R)	16 (I)	2 (S)
SH-17A, SH-19A	512 (R)	8 (S)	8 (I)
SH-30N, SH-18A, SH-67A, SH-68A, SH-37A	512 (R)	8 (S)	4 (S)
SH-33N, SH-34N	512 (R)	8 (S)	2 (S)
SH-55A	512 (R)	8 (S)	0,5 (S)

Tabela 5 – Concentrações Inibitória Mínima (CIM) dos agentes antimicrobianos oxacilina, teicoplanina e vancomicina apresentados para as amostras de *Staphylococcus haemolyticus* isoladas de hemoculturas (Conclusão)

Amostras	CIM (µg/ml)		
	OXA	TEI	VAN
SH-08N, SH-09N, SH-10N, SH-12N, SH-13N, SH-32N, SH-50A, SH-26A	512 (R)	4 (S)	4 (S)
SH-03N, SH-04N, SH-11N, SH-48A, SH-36A	512 (R)	4 (S)	2 (S)
SH-31N, SH-20A	512 (R)	2 (S)	4 (S)
SH-05N	512 (R)	1 (S)	4 (S)
SH-01N	512 (R)	0,5 (S)	8 (I)
SH-45N	256 (R)	16 (I)	2(S)
SH-47N, SH-52A, SH-51A	256 (R)	8 (S)	4 (S)
SH-66A	256 (R)	8 (S)	2 (S)
SH-56A	256 (R)	4 (S)	1 (S)
SH-71A	128 (R)	16 (I)	1 (S)
SH-54A	128 (R)	8 (S)	4 (S)
SH-06N	128 (R)	8 (S)	2 (S)
SH-60A	128 (R)	8 (S)	1 (S)
SH-39N, SH-40N, SH-53A	128 (R)	4 (S)	4 (S)
SH-70A	128 (R)	4 (S)	2 (S)
SH-72A	128 (R)	4 (S)	0,5 (S)
SH-59A, SH-28A	64 (R)	16 (I)	4 (S)
SH-27A	64 (R)	16 (I)	1 (S)
SH-64A	32 (R)	32 (R)	4 (S)
SH-69A	32 (R)	16 (I)	4 (S)
SH-49A, SH-57A	32 (R)	8 (S)	2 (S)
SH-61A	32 (R)	8 (S)	0,5 (S)
SH-62A	32 (R)	4 (S)	2 (S)
SH-63A	16 (R)	4 (S)	4 (S)
SH-41N	4 (R)	16 (I)	4 (S)
SH-46N	4 (R)	8 (S)	2 (S)
SH-07N	4 (R)	4 (S)	4 (S)
SH-23A	2 (R)	16 (I)	16 (I)
SH-21A	2 (R)	4 (S)	2 (S)
SH-42N	1 (R)	16 (I)	2 (S)
SH-43N	1 (R)	4 (S)	4 (S)
SH-35N	0,25 (S)	16 (I)	4 (S)
SH-44N, SH-16A	0,25 (S)	4 (S)	4 (S)
SH-38N	0,25 (S)	4 (S)	2 (S)
SH-29A	0,25 (S)	2 (S)	2 (S)

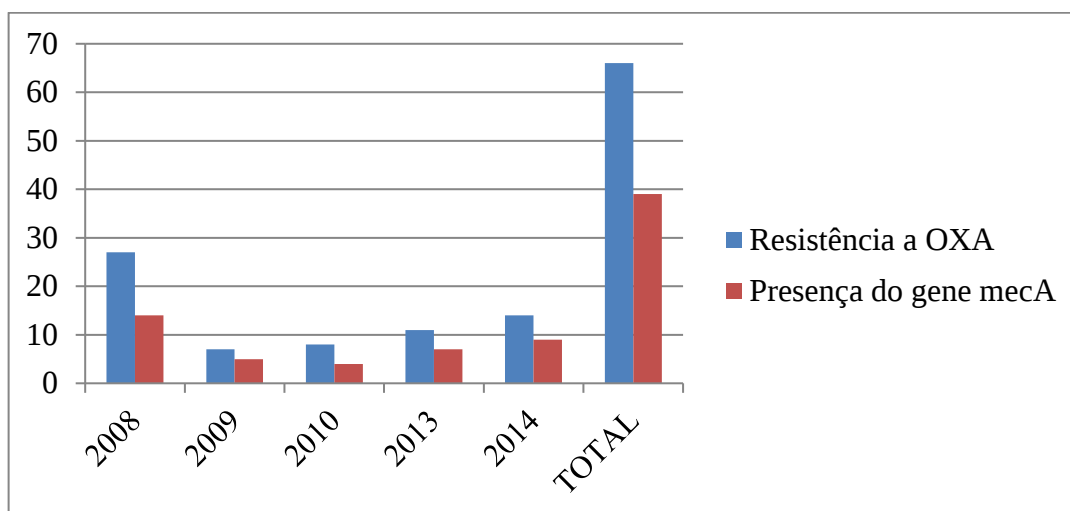
Legenda: Concentração inibitória mínima (CIM); oxacilina (OXA); vancomicina (VAN); teicoplanina (TEI); intermediário (I); resistente (R); sensível (S).

Fonte: O autor, 2022.

4.3 Perfis de susceptibilidade à oxacilina e detecção do gene *mecA*

Embora a resistência a oxacilina tenha sido observada na maioria das 72 amostras de *S. haemolyticus* (94,4%) e no decorrer de todos os anos estudados (2008-2014), a presença do gene *mecA* foi detectada em apenas 54,1% (n=39) das amostras. Interessantemente, 27 amostras oxacilina-resistentes não apresentaram o gene *mecA* (Gráfico 3 e Tabela 6). As amostras de *S. haemolyticus* oxacilina-resistentes apresentaram resultados similares tanto pelo método de CIM quanto de disco-difusão.

Gráfico 3 – Número de amostras de *Staphylococcus haemolyticus* obtidas de hemoculturas expressando resistência a oxacilina e apresentando o gene *mecA*, obtidas de pacientes internados no HUPE em diferentes anos (2008-2014)



Fonte: O autor, 2022.

Tabela 6 – Concentrações Inibitória Mínima (CIM) à oxacilina e presença do gene *mecA* em amostras de *Staphylococcus haemolyticus* isoladas de hemoculturas

Ano	Amostra	Perfil de susceptibilidade a oxacilina	Deteção do gene <i>mecA</i>
2008	SH-01N, SH-02N, SH-03N, SH-04N, SH-05N, SH-06N, SH-07N, SH-08N, SH-09N, SH-10N, SH-11N, SH-12N, SH-13N, SH-14N	R	+
	SH-15A, SH-17A, SH-18A, SH-19A, SH-20A, SH-21A, SH-22A, SH-23A, SH-24A, SH-25A, SH-26A, SH-27A, SH-28A	R	-
	SH-16A, SH-29A	S	-
2009	SH-30N, SH-31N, SH-32N, SH-33N, SH-34N	R	+
	SH-36A, SH-37A	R	-
	SH-35N	S	-
2010	SH-43N, SH-45N, SH-46N, SH-47N	R	+
	SH-39N, SH-40N, SH-41N, SH-42N	R	-
	SH-38N, SH-44N	S	-
2013	SH-48A, SH-49A, SH-51A, SH-53A, SH-55A, SH-56A, SH-57A	R	+
	SH-50A, SH-52A, SH-54A, SH-58A	R	-
2014	SH-59A, SH-60A, SH-64A, SH-65A, SH-66A, SH-67A, SH-69A, SH-70A, SH-72A	R	+
	SH-61A, SH-62A, SH-63A, SH-68A, SH-71A	R	-

Legenda: resistente (R); sensível (S); positivo (+); negativo (-).

Fonte: O autor, 2022.

Apesar de expressarem perfis MDR variados, cinco amostras de *S. haemolyticus* isoladas de hemoculturas foram oxacilina-sensíveis (gene *mecA*-negativas): três amostras isoladas de neonatos (SH-35N, SH-38N, SH-44N) e duas de adultos (SH-16A, SH-29A). Entretanto, as cinco amostras (SH-16A, SH-29A, SH-35N, SH-38N e SH-44N) apresentaram resistência aos antimicrobianos, ciprofloxacina, cefoxitina e moxifloxacina, além de eritromicina (n=2), gentamicina (n=2), rifampicina (n=1), teicoplanina (n=1), clindamicina (n=1) e linezolida (n=3) (Tabela 4).

4.4 Heterogeneidade na produção de biofilme em superfícies abióticas, *slime* no meio Vermelho do Congo e da presença de genes de virulência

Os resultados dos ensaios relacionados à produção de *slime* no meio Vermelho do Congo, a presença de genes que codificam adesinas e/ou autolisina e formação de biofilme em superfícies abióticas foram apresentados na Figura 2 e na Tabela 7.

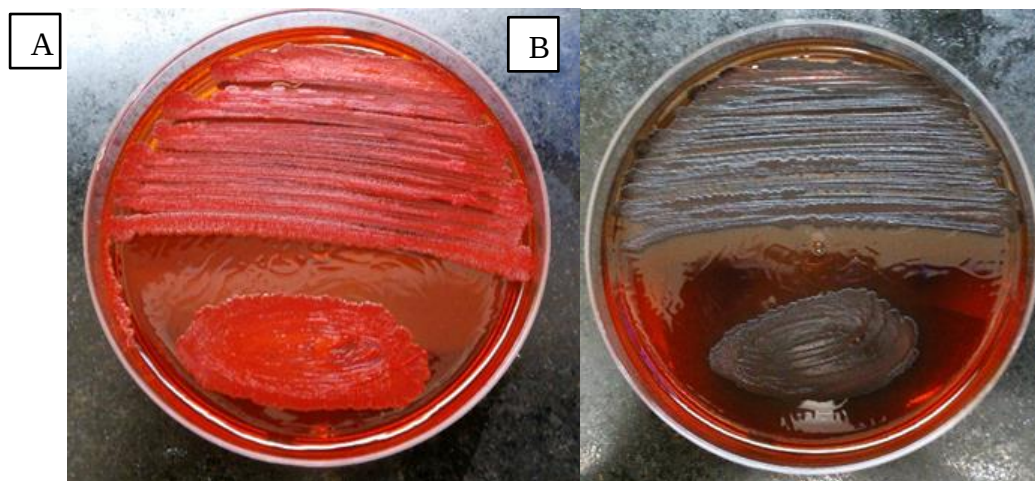
Os resultados da expressão de produção de *slime* pelo método do CRA das 72 amostras de *S. haemolyticus* isoladas de hemoculturas, 69,4% (n=50) foram positivas, incluindo duas amostras não-MDR (SH-40N, SH-58A).

As amostras de *S. haemolyticus* isoladas de hemoculturas (n=72) apresentaram variações na presença dos genes, principalmente *icaA* e *aap* que codificam a adesina polissacarídica intercelular (PIA) e a proteína Aap associada a aderência intercelular e acúmulo bacteriano, respectivamente.

Para todas as 22 amostras não produtoras de *slime* foi detectado o gene *atl*, codificador de autolisinas, que apresentam a capacidade de interagir com proteínas plasmáticas. Destas, o gene *fbp* que codifica a proteína ligadora de fibrinogênio (PLF) foi demonstrado em 21 amostras, exceto na amostra isolada de neonato SH-34N. Cinco amostras de *S. haemolyticus* não produtoras de *slime* apresentaram os quatro genes *atl*, *fbp*, *aap* e *icaA*.

Interessantemente, a ausência concomitante dos genes *atl*, *fbp*, *aap* e *icaA* só foi detectada em uma amostra produtora de *slime* de *S. haemolyticus* isolada de hemocultura adulto (SH-67A) expressando perfil MDR, oxacilina-resistente, gene *mecA*-positiva e fortemente produtora de biofilme no vidro e no poliestireno.

Figura 2 – Representação ilustrativa de matriz exopolissacarídea (*slime*) em meio Vermelho do Congo de amostras de *S. haemolyticus* isoladas de hemoculturas



Legenda: *slime*-negativa (SH-09N) apresentando colônias vermelhas (A); *slime*-positiva (SH-68A) que exibiu colônias de cor enegrecida (B).

Fonte: O autor, 2022.

Os resultados da análise qualitativa e semi-quantitativa da formação de biofilme em superfícies abióticas do vidro (hidrofílica) e do poliestireno (hidrofóbica) das amostras de *S. haemolyticus* isoladas de hemoculturas (n=72) foram demonstrados na Tabela 7.

A capacidade de aderência e produção de biofilme em superfícies abióticas foi observada em todas as amostras de *S. haemolyticus* isoladas de hemoculturas, expressando perfis MDR diversos e Não-MDR, oxacilina-resistentes e sensíveis (gene *mecA*-positivas e negativas). Entretanto, foi demonstrada heterogeneidade na produção de biofilme nas superfícies abióticas entre as amostras de uma única espécie de *S. haemolyticus*, isoladas do mesmo tipo de espécime clínico (hemocultura) de pacientes internados em uma unidade hospitalar.

A maioria das amostras (63,8%) de *S. haemolyticus* apresentaram atividades de aderência e de formação de biofilme na superfície hidrofílica do vidro em intensidades variadas: fortemente (n= 41), moderadamente (n=5), fracamente (n=23) e não aderentes (n=3). Células bacterianas sésseis mantiveram-se aderidas e viáveis nas laterais dos tubos de vidro, demonstrando a formação de biofilme pelas 46 amostras de *S. haemolyticus* capazes de aderir fortemente e moderadamente na superfície abiótica hidrofílica.

A produção de *slime* no meio vermelho do Congo não foi observada em todas as 46 amostras formadoras (fortemente e moderadamente) de biofilme na superfície do vidro. Os

genes *icaA*, *aap*, *atl* e *fbp* também foram encontrados em padrões variados de combinações para essas amostras.

S. haemolyticus também foi capaz de formar biofilme em superfície hidrofóbica de poliestireno, porém em menor intensidade: fortemente (n=6), moderadamente (n=42), fracamente (n=11) e não aderentes (n=7).

As seis amostras de *S. haemolyticus* (SH-48A, SH-49A, SH-58A, SH-60A, SH-66A, SH-71A) isoladas de hemoculturas que aderiram fortemente a superfície de poliestireno também produziram *slime* no meio vermelho do Congo, e os genes *aap*, *atl* e *fbp*, foram encontrados nessas amostras. Interessantemente, as amostras SH-48A, SH-58A, SH-60A, SH-66A, SH-71A também aderiram fortemente à superfície hidrofílica do vidro.

Os dados indicaram que a produção de *slime* no meio vermelho do Congo pelas amostras de *S. haemolyticus* isoladas de hemoculturas foram independentes da presença dos genes *icaA*, *aap*, *atl* e *fbp*, uma vez que as amostras apresentaram todos os genes e não produziram *slime*: SH-07N, SH-16A, SH-19A, SH-23A, SH-35N, SH-50A, SH-55A, SH-62A, SH-64A.

Os genes *icaA*, *aap*, *atl* e *fbp* também foram encontrados em padrões variados nas amostras de *S. haemolyticus* fortemente, moderadamente, fracamente e/ou não aderentes ao vidro e poliestireno.

Os resultados apresentados (Tabela 7) demonstraram que 86% das amostras isoladas de hemocultura e identificadas como *S. haemolyticus* foram capazes de produzir biofilme na superfície hidrofóbica de poliestireno em intensidades variadas, independente da presença do gene *mecA*, produção de *slime* e expressão de perfis de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos.

Tabela 7 – Heterogeneidade na produção de biofilme em superfícies abióticas, *slime* no meio Vermelho do Congo e da presença de genes relacionados com as propriedades adesivas e a formação de biofilme de amostras de *Staphylococcus haemolyticus* isoladas de hemoculturas (Continua)

Amostras	Biofilme em superfície		Genes				Produção de <i>slime</i>
	Vidro	Poliestireno	<i>icaA</i>	<i>aap</i>	<i>atl</i>	<i>fbp</i>	
SH-48A, SH-60A, SH-71A, SH-58A	I (+++)	(+++)	+	+	+	+	+
SH-66A	I (+++)	(+++)	-	+	+	+	+
SH-61A, SH-65A, SH-69A	I (+++)	(++)	+	+	+	+	+
SH-35N, SH-62A, SH-55A	I (+++)	(++)	+	+	+	+	-
SH-10N	I (+++)	(++)	+	-	+	-	+
SH-43N, SH-22A, SH-68A, SH-52A	I (+++)	(++)	-	+	+	+	+
SH-41N, SH-42N	I (+++)	(++)	-	+	+	+	-
SH-14N, SH-18A, SH-28A	I (+++)	(++)	-	-	+	+	+
SH-33N, SH-47N	I (+++)	(++)	-	-	+	+	-
SH-67A	I (+++)	(++)	-	-	-	-	+
SH-37A, SH-72A	I (+++)	(+)	+	+	+	+	+
SH-64A	I (+++)	(+)	+	+	+	+	-
SH-25A	I (+++)	(+)	+	-	+	+	+
SH-20A	I (+++)	(+)	+	-	+	+	-
SH-51A	I (+++)	(+)	-	+	+	+	+
SH-59A, SH-63A, SH-70A	I (+++)	(+)	-	-	+	+	+
SH-26A	I (+++)	(-)	+	+	+	+	+
SH-16A, SH-19A, SH-23A	I (+++)	(-)	+	+	+	+	-
SH-24A	I (+++)	(-)	-	-	+	+	+
SH-17A	I (+++)	(-)	-	-	+	+	-
SH-34N	I (+++)	(-)	-	-	+	-	-
SH-27A	II (++)	(++)	+	+	+	+	+
SH-21A	II (++)	(++)	-	-	+	+	-
SH-36A	II (++)	(+)	+	-	+	+	+
SH-29A	II (++)	(+)	-	+	+	+	+
SH-15A	II (++)	(+)	-	-	+	+	+
SH-49A	III (+)	(+++)	+	+	+	+	+
SH-01N, SH-2, SH-03N, SH-04N, SH-05N, SH-06N, SH-08N	III (+)	(++)	+	+	+	+	+
SH-07N	III (+)	(++)	+	+	+	+	-

Tabela 7– Heterogeneidade na produção de biofilme em superfícies abióticas, *slime* no meio Vermelho do Congo e da presença de genes relacionados com as propriedades adesivas e a formação de biofilme de amostras de *Staphylococcus haemolyticus* isoladas de hemoculturas (Conclusão)

Amostra	Biofilme em superfície de		Genes				Produção de <i>slime</i>
	Vidro	Poliestireno	<i>icaA</i>	<i>aap</i>	<i>atl</i>	<i>fbp</i>	
SH-11N, SH-12N, SH-30N, SH-38N, SH-39N, SH-40N	III (+)	(++)	+	-	+	+	+
SH-09N	III (+)	(++)	+	-	+	+	-
SH-56A	III (+)	(++)	-	+	+	+	-
SH-13N, SH-45N, SH-46N	III (+)	(++)	-	-	+	+	+
SH-50A	III (+)	(+)	+	+	+	+	-
SH-54A	III (+)	(-)	+	+	+	+	+
SH-57A	III (+)	(-)	+	-	+	+	-
SH-53A	III (+)	(-)	-	-	+	+	-
SH-31N	IV (-)	(++)	+	-	+	+	-
SH-32N	IV (-)	(++)	-	-	+	+	+
SH-44N	IV (-)	(++)	-	-	+	+	-

Legenda: Aderência ao vidro - bactérias aderidas nas laterais do tubo de vidro e na interface entre o meio de cultura e o ar [fortemente aderente/I (+++)]; bactérias aderidas nas laterais do tubo de vidro [moderadamente aderente /II (++)]; bactérias formando um anel na interface entre o meio de cultura e o ar [fracamente aderente/III (+)]; ausência de bactérias aderidas [não aderente/IV (-)]. Ensaios de aderência ao poliestireno - não aderente (-); fracamente aderente (+); moderadamente aderente (++); fortemente aderente (+++). Detecção de genes e produção de *slime* no meio Vermelho do Congo - negativo (-); positivo (+).

Fonte: O autor, 2022.

4.5 Análise quantitativa e estrutural de biofilme do *S. haemolyticus* em pericárdio bovino

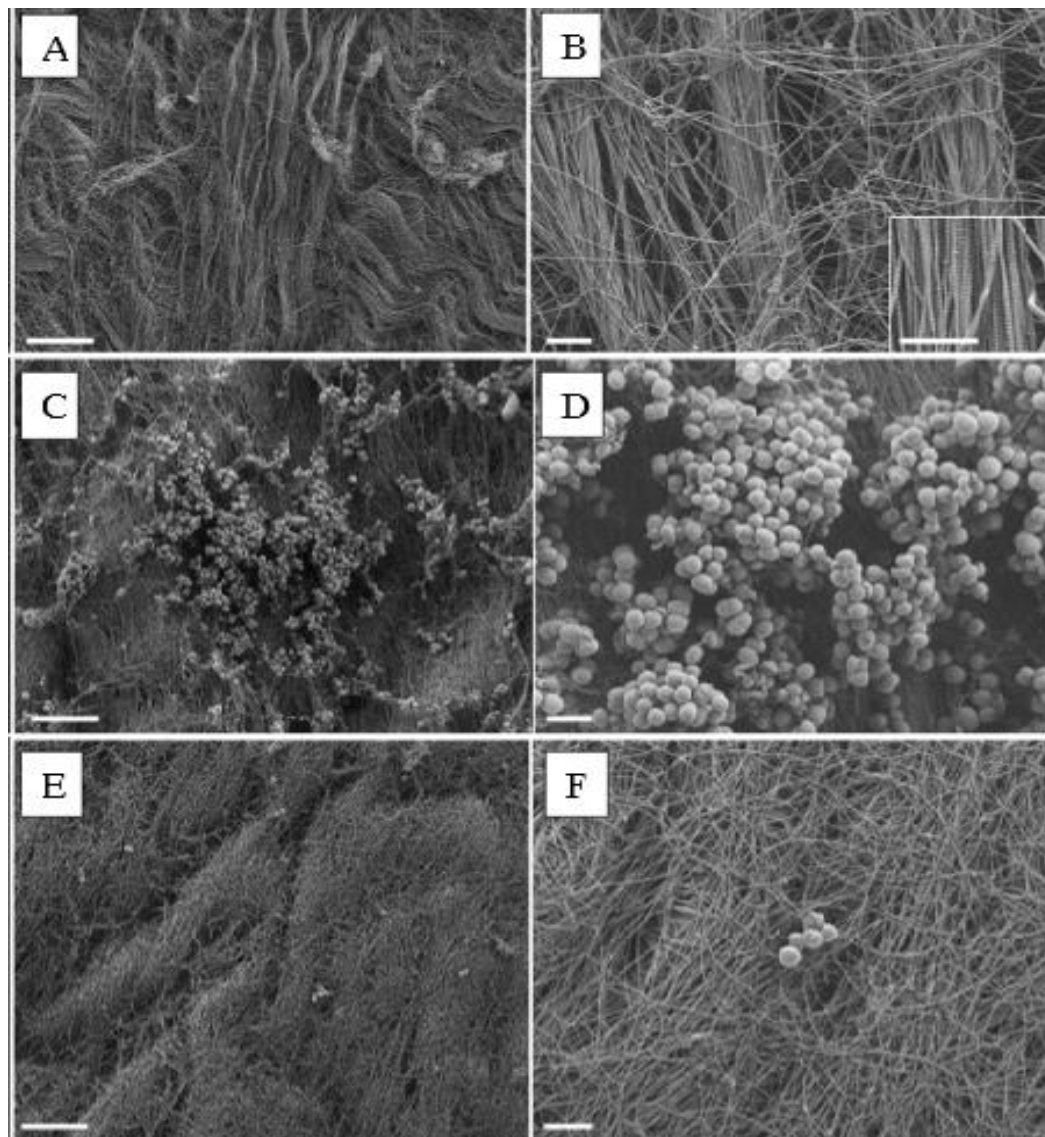
Amostras de *S. haemolyticus* isoladas de hemoculturas de neonato e de adulto foram capazes de produzir biofilme na superfície de bioimplantes (*patches*) de pericárdio bovino. Diferentes intensidades de biofilme maduro (24h) foram produzidas pelas amostras de *S. haemolyticus* nos bioimplantes de pericárdio bovino. A cepa SH-09N ($8,3 \times 10^8$ UFC/ml) isolada de neonato apresentou maior capacidade de produção de biofilme do que a cepa SH-68A ($6,7 \times 10^8$ UFC/ml) isolada de adulto.

As análises demonstradas por MEV da produção de biofilme após 24 horas de cultivo na superfície interna de bioimplantes (*patches*) de pericárdio bovino realizados com duas amostras de *S. haemolyticus* isoladas de hemoculturas foram apresentados na Figura 3. As amostras analisadas apresentaram de células bacterianas sésseis, autoagregativas e capazes de aderir às fibras de colágenos localizados na superfície e mais internamente no biomaterial. A amostra *S. haemolyticus* SH-09N isolada de hemocultura de neonato foi capaz de interagir com as fibras de colágeno, disseminar pelo biomaterial e formar biofilme após 24 horas na membrana de pericárdio bovino. Agregados de formas sésseis das células bacterianas foram observados aderidos nas fibras de colágeno, incluindo canais que funcionam de sistema de troca de nutrientes, oxigênio e água (*hollow voids*) presentes em biofilmes maduros. A amostra *S. haemolyticus* SH-68A isolada de hemocultura de adulto apresentou menor número de células bacterianas isoladas ou agrupadas em pequenos grumos aderidas ao longo das fibras de colágeno.

Os biofilmes formados nas fibras de colágeno de membranas de pericárdio bovino pelas duas amostras de *S. haemolyticus* (SH-09N e SH-68A) não produziram matriz extracelular no biomaterial.

Interessantemente, a amostra *S. haemolyticus* SH-09N isolada de neonato, MDR, oxacilina-resistente e gene *mecA*-positiva, também apresentou os genes de aderência *icaA*, *atl* e *fbp*, mas não o gene *aap* que codifica a proteína associada ao acúmulo, além de não produzir *slime* em ágar vermelho do Congo. Entretanto, expressou intensa habilidade de produção de biofilmes nas superfícies abióticas (poliestireno e vidro) e no biomaterial testado (pericárdio bovino). A amostra *S. haemolyticus* MDR SH-68A isolada de adulto, oxacilina-resistente e gene *mecA*-negativa, apresentou os genes *aap*, *atl* e *fbp*, mas não o gene *icaA*, produziu *slime* no ágar vermelho do Congo, expressou intensa habilidade de produção de biofilmes nas superfícies abióticas (poliestireno e vidro), porém produziu biofilme em menor intensidade no pericárdio bovino.

Figura 3 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície interna de membrana (*patch*) do pericárdio bovino interagindo com amostras MDR de *Staphylococcus haemolyticus*



Legenda: A, B – Controle negativo (superfície estéril do biomaterial): demonstrando a disposição das fibras de colágeno na membrana de pericárdio bovino; C, D – *S. haemolyticus* (cepa SH-09N) isolada de hemocultura de neonato formando um biofilme estruturado na superfície do pericárdio bovino; E, F – *S. haemolyticus* (cepa SH-68A) isolada de hemocultura de adulto formando colônias separadas.

Fonte: O autor, 2022.

5 DISCUSSÃO

Staphylococcus spp. são considerados os agentes etiológicos mais frequentes em casos de IRAS no Brasil e no mundo. A sua versatilidade em adquirir genes de virulência e de resistência lhes confere notória habilidade para desenvolver diferentes quadros infecciosos (ELTWISY et al. 2022).

SCNs são considerados micro-organismos comensais da pele, que podem colonizar diferentes regiões do corpo ao longo da vida. Sendo as espécies: *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* as mais frequentemente isoladas e associadas a infecções graves (ELTWISY et al., 2022; PEREIRA-RIBEIRO et al., 2022; SUED-KARAM, PEREIRA-RIBEIRO, 2022).

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

S. haemolyticus é relatado como o segundo SCNs mais frequentemente relacionado a infecções nosocomiais, especialmente em infecções hematogênicas, sendo considerado um patógeno emergente (AHMED, 2019; ARGEMI et al. 2019; PANDA, SINGH, 2018; PEREIRA et al. 2014; PEREIRA-RIBEIRO et al. 2019). A caracterização genômica de cepas de *S. haemolyticus* resistentes à oxacilina isoladas de unidades hospitalares no Brasil demonstram uma grande diversidade genética e a disseminação de algumas cepas entre os hospitais (NUNES et al., 2007). Segundo diversos autores, *S. haemolyticus* tem sido responsáveis por 5-38% dos casos de infecções causadas por SCNs (BARROS et al., 2015; PEREIRA-RIBEIRO et al, 2019; RODRIGEZ-ARANDA et al., 2009).

Até pouco tempo atrás, muitos laboratórios clínicos não realizavam a identificação dos SCNs até a categoria de espécie, porém, devido ao crescente envolvimento com bacteremias, especialmente em neonatos, indivíduos imunocomprometidos e pacientes com a utilização de cateteres e próteses, essa conduta foi alterada. Sendo o MALDI-TOF um método importante para identificação de bactérias, esta abordagem baseia-se na comparação do espectro de massa de um micro-organismo desconhecido com os espectros conhecidos de micro-organismos armazenados em base de dados (KORNIENKO et al., 2016; PEREIRA-RIBEIRO et al., 2019). Em nosso estudo, observamos a eficácia do método MALDI-TOF MS para identificação de *S. haemolyticus* em comparação ao mPCR.

S. haemolyticus é um importante agente etiológico de infecções adquiridas em ambiente hospitalar, especialmente em UTI adulto e neonatal (PEREIRA-RIBEIRO et al., 2022). Ao decorrer dos anos, vem aumentando o relato de infecções nosocomiais relacionadas à *S. haemolyticus* com perfil de multirresistência, principalmente associados à bacteremias (ELTWISY et al., 2022). Segundo nossos dados, 69 cepas (n=72) estudadas apresentaram um perfil de multirresistência aos antimicrobianos.

A oxacilina é um antimicrobiano comumente utilizado para o tratamento de infecções por estafilococos produtores de penicilinases. Segundo CLSI 2021, a resistência a metilicina para *Staphylococcus* spp. pode ser analisada através do perfil de sensibilidade a oxacilina pelo teste de CIM. O estudo demonstrou que 67 das 72 amostras apresentaram um perfil de resistência à oxacilina e 5 amostras sensíveis apresentaram resistência à cefoxitina, o que também é um indicativo da presença de resistência à metilicina.

A resistência à metilicina em *Staphylococcus* spp. é bem conhecida e está associada, na maioria das vezes, com a expressão de uma proteína ligadora de penicilina modificada, PBP2a, que é codificada pelo gene *mecA*. Apesar das altas frequências de *S. haemolyticus* multirresistentes, não se sabe se o mecanismo preferencial de disseminação de resistência à metilicina nesta espécie é através da transferência horizontal de SCC*mec* ou a disseminação de clones de *S. haemolyticus*, pois o papel desta espécie na evolução do SCC*mec* é desconhecido (BARROS et al., 2015; CZEKAJ, CISZEWSKI, SZEWCZYK, 2015; ELTWISY, 2022; MANOHARAN et al., 2020; PEREIRA et al., 2014; PEREIRA-RIBEIRO et al., 2019; SUED et al., 2017; SZCZUKA, 2016). Contudo, a detecção do gene *mecA* foi observada em 59% dos isolados que apresentaram resistência à oxacilina, sugerindo que o mecanismo de resistência expresso pelas amostras estudadas não está associado totalmente ao gene e sugere também que esse mecanismo seria frequente dentre os clones oriundos dessa unidade hospitalar.

Terapias com agentes antimicrobianos em infecções relacionadas à MRSH são limitadas. Visto a plasticidade gênica dessa espécie e a capacidade de adquirir genes de outras espécies, o uso de vancomicina e daptomicina não é considerado boa opção terapêutica, devido aos mecanismos de resistência serem frequentemente encontrados em outros gêneros no ambiente hospitalar, o que pode acelerar o processo de captação e formação de cepas de *S. haemolyticus* mais resistentes, logo, novas classes de antimicrobianos como a linezolida podem ser uma alternativa para tratamentos futuros (AHMED et al., 2019; BRYCE, DOOCEY, HANDY, 2021).

No Brasil o uso da vancomicina é comum como terapia alternativa (BRYCE, DOOCEY, HANDY, 2021), onde o tratamento prévio com meticilina não reduz o quadro de bacteremia do paciente. Neste estudo, 5 amostras (SH-01N, SH-17A, SH-19A, SH-23A e SH-24A) apresentaram um perfil de intermediário à vancomicina.

Em contrapartida, a linezolida apresentou um perfil de resistência em 38,8% das cepas analisadas. A resistência à linezolida já foi reportada em cepas dessa espécie, associada à presença e expressão do gene *cfr*, mesmo sendo considerada uma classe nova de antimicrobiano, pouco utilizado em terapias convencionais, mecanismos de resistência a ela já podem estar disseminados nos ambientes nosocomiais, o que pode agravar ainda mais as perspectivas futuras para novas terapias antimicrobianas em cepas MDR (MATLANI et al., 2016; VIJAYAN et al., 2019).

Os perfis de resistência à ciprofloxacina, cloranfenicol, clindamicina, eritromicina, cefoxitina, gentamicina, moxifloxacina, rifampicina e teicoplanina apresentaram distribuição variada, sendo o moxifloxacina o antimicrobiano que apresentou mais de 95% das cepas resistentes. A presença da resistência em diferentes classes de antimicrobianos pode ser reflexo do uso indiscriminado desses medicamentos no ambiente hospitalar (PEREIRA-RIBEIRO et al., 2022). Apesar do perfil de multirresistência está cada vez mais frequente nas amostras de *S. haemolyticus* isoladas de ambiente nosocomial, um dos determinantes fatores de virulência desta espécie é a capacidade de colonizar e formar biofilmes em diferentes superfícies abióticas, principalmente em dispositivos médicos, como cateteres e próteses (ELTWISY et al., 2022; OLIVEIRA et al., 2022; PEREIRA-RIBEIRO et al., 2022).

Nos últimos anos, *S. haemolyticus* emergiu como um importante patógeno nosocomial, especialmente em pacientes imunocomprometidos, devido à facilidade na incorporação de diferentes genes de resistência aos antimicrobianos, favorecidos pelo meio de biofilme na troca de material genético. Este fator de virulência tem sido considerado um dos riscos mais significativos para os pacientes. A dificuldade de um tratamento clínico para infecções associadas a biofilmes tem consequências diretas e indiretas (hospitalização mais longa, custo de antimicrobianos e medicamentos complementares e procedimentos de diagnóstico) sobre o desfecho e qualidade de vida do paciente (PEREIRA-RIBEIRO et al., 2022).

A formação de biofilme é descrita como um processo multifatorial e de várias etapas com, ou sem, a produção de substâncias poliméricas extracelulares (CROES et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2021; SILVA-SANTANA et al., 2021). A capacidade de formação de biofilme em superfícies abióticas e bióticas pode atuar como um fator de virulência

significativo que também contribui para a resposta a condições nocivas e ambientais, incluindo exposição a agentes antimicrobianos e/ou resposta imune do hospedeiro. Vários estudos têm investigado comunidades de superfície e mecanismos de resistência do biofilme, visto que, a formação de biofilme tem sido relacionada ao aumento da expressão de resistência a antimicrobianos por isolados clínicos, devido à aquisição de resistência adicional às condições ambientais (MARTINS, DALL'AGNOL, 2016; PEREIRA-RIBEIRO et al., 2019; SILVA-SANTANA, 2021).

Superfícies abióticas contendo partículas de vidro e poliestireno são inúmeras, ainda mais em dispositivos médicos, como próteses e materiais utilizados em procedimentos cirúrgicos (ARONSON, HENEGHAN, FERNER, 2020). A capacidade de cepas de *S. haemolyticus* colonizar superfícies abióticas de natureza vítrea e polimérica tornam esse micro-organismo ainda mais relevante, quando são relacionados a potenciais patógenos envolvidos em infecções nosocomiais (PEREIRA-RIBEIRO et al., 2022). A literatura demonstra a capacidade de produção de biofilme por cepas de *S. haemolyticus* em superfícies vítreas, com ou sem a presença de antimicrobianos no meio de cultura estudado (KARAM, 2018; PEREIRA-RIBEIRO et al., 2019; SUED et al., 2017), indicando a capacidade de aderência e formação de biofilme em superfícies diversas por esse patógeno. Quando analisado quanto à capacidade de formação de biofilme em vidro, mais de 50% das amostras estudadas, isoladas de hemoculturas de neonatos e adultos, apresentaram intensa formação de biofilme, com bactérias aderidas nas laterais do tubo de vidro de ensaio e na interface entre o meio de cultura e o ar, corroborando com dados publicados na literatura.

Polímeros são compostos empregados formadores de dispositivos como cateteres e sondas profundas, presentes em ambiente hospitalar, ou em alguns tipos de tratamentos, como na quimioterapia. A capacidade de aderência, colonização e formação de biofilme em superfícies dessa natureza, tornam o micro-organismo mais patogênico (PEREIRA, 2012). Das cepas analisadas, apenas as amostras SH-48A, SH-49A, SH-58A, SH-60A, SH-66A e SH-71A foram fortemente aderentes a superfície de poliestireno, sendo a maioria das amostras (59,7%) moderadamente aderente a esta superfície. Em diferentes casos, as infecções relacionadas à presença de biofilme em dispositivos médicos muitas vezes só podem ser tratadas com a remoção do dispositivo, aumentando assim o trauma para o paciente e o custo do tratamento (ELTWISY et al., 2022). Mesmo não apresentando um percentual elevado de amostras altamente aderentes, o monitoramento e cuidado preventivo a colonização por *S. haemolyticus* devem ser preconizados.

A avaliação da produção de *slime* em meio Ágar vermelho do Congo (CRA), através de técnicas laboratoriais, é um método auxiliar, capaz de detectar a produção de *slime*, cápsula de natureza polissacarídica, através da análise visual da coloração das colônias que cresceram no meio de cultura. Sendo, a observação de colônias vermelhas para cepas não produtoras de *slime* (negativas) e enegrecidas para cepas produtoras de *slime* (positivas) (KAISER et al., 2013). Diferentes trabalhos demonstram a capacidade dos SCNs de produzir substância extracelular de origem polissacarídica em superfícies bióticas e abióticas, influenciando no comportamento e colonização das cepas sobre essas superfícies e na interação com o ambiente externo, incluindo a resistência aos antimicrobianos (MARTINI et al., 2016; PEREIRA-RIBEIRO et al., 2022; SILVA-SANTANA et al. 2021; VUONG, OTTO, 2002). Das 72 amostras analisadas, 49 demonstraram resposta positiva à produção de *slime*, apresentando uma grande variabilidade de perfis de formação de biofilme sobre as superfícies de vidro e poliestireno, sugerindo que a produção pode não estar diretamente relacionada com a habilidade de aderirem e formar biofilme nas superfícies hidrofílica do vidro e hidrofóbica de poliestireno, uma vez que amostras *slime*-negativas (ex: SH-35N, SH-55A, SH-62A) produziram biofilmes em ambos os substratos abióticos.

Estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que diferentes clones de *S. haemolyticus* isolados de hemocultura de neonatos e adultos com infecção de corrente sanguínea relacionada a cateter expressaram a capacidade de formação de biofilme independente da presença do gene *icaA*. A capacidade de formação de biofilme em superfícies abióticas por cepas de *S. haemolyticus* não foi inibida na presença de diferentes agentes antimicrobianos, como vancomicina, linezolida, oxacilina, moxifloxacina, rifampicina, teicoplanina e tigeciclina (PEREIRA-RIBEIRO et al., 2019; SUED et al., 2017).

Sendo a aderência bacteriana a uma superfície a primeira etapa para a formação do biofilme, a investigação dos tipos e quantidades de proteínas ligadas a essa atividade torna-se de importância para o estudo da capacidade de colonização e patogenicidade microbiana. Nos *Staphylococcus* spp. essas proteínas são associadas à presença de genes como o *atl*, *fbp*, esses genes codificam proteínas de autolisinas e proteína ligadora de fibrinogênio, respectivamente, que expressas na superfície bacteriana favorecem a ligação em superfícies de matrizes bióticas e abióticas, presentes em instrumentos e dispositivos médicos e em células do hospedeiro (ELTWISY et al., 2020; LAVERTY, GORMAN, GILMORE, 2014; LAZZAROTTO, 2010; LEMBRE, VENDRELY, DI MARTINO, 2014).

Em *Staphylococcus* spp. a capacidade de formação do biofilme está associada a presença do *operon icaADBC*, que codificam as principais proteínas envolvidas na mediação

entre a aderência intercelular de bactérias e a acumulação de multicamadas de biofilme e a adesina polissacarídica capsular, que oferece proteção contra a resposta imune do hospedeiro, além de ser responsável pelo processo de fixação da bactéria à superfície (LAVERTY, GORMAN, GILMORE, 2014; WEISSER et al., 2010). Dos 72 isolados estudados, o gene *icaA* foi detectado em 58,3% das amostras, sendo que a capacidade de formação de biofilme em superfícies como o vidro e poliestireno tiveram resultados variados, indiferente da presença do gene, o que pode sugerir a existência de outra via de formação de biofilme nas superfícies que não esteja ligado diretamente ao *operon*.

Os genes *atl* e *fbp* foram encontrados simultaneamente em quase todas as amostras estudadas, com exceção das amostras SH-10N e SH-34N que não foram detectados o gene *fbp*, apenas o *atl*, e a amostra SH-67A não apresentou os genes *atl* e *fbp*. As proteínas de matriz expressas pela tradução desses genes estão correlacionadas a regiões de colonização típica dessa espécie que seria a pele e mucosas, que apresentam grande quantidade de colágeno. Também pode ser considerado que dispositivos médicos ou biomateriais envolvidos por componentes de matriz proteica possam ser colonizados por *S. haemolyticus*.

Durante as últimas décadas, o setor de biomateriais cresceu em desenvolvimento e disponibilidade. O impacto na melhoria da qualidade de vida é inegável e sua contribuição futura deve ser numericamente maior. A membrana de pericárdio bovino tem sido amplamente utilizada em procedimentos cirúrgicos variados, incluindo cirurgia cardiovascular e torácica, lesão iatrogênica da traqueia, aumento de ligamentos e tendões, implantes de próteses penianas e prolapso de órgãos pélvicos e regeneração óssea guiada em implantodontia (PIRES et al., 1997; COSTA, 2009; COSTA, SILVA, ANDRADE, 2016; SUED-KARAM et al., 2022).

A baixa taxa de infecções ligadas à membrana de pericárdio bovino foi relatada anteriormente. Os autores sugeriram que os biomateriais de pericárdio bovino podem ser resistentes à infecção e, conseqüentemente, considerados apropriados para serem usados em pacientes infectados (COSTA, SILVA, ANDRADE, 2016). No entanto, a infecção é sempre um problema preocupante quando se trata de implantação de materiais artificiais. Diferentes patógenos possuem a capacidade de interagir, colonizando e formando biofilme sobre este material, dentre eles o *S. haemolyticus* que apresenta diferentes genes associados a colonização de superfícies bióticas, como o gene *fbp* (SUED-KARAM et al., 2022).

Ambas as cepas MDR de *S. haemolyticus* (SH-09N e SH-68A) apresentaram capacidade de interagir com o biomaterial analisado e formação de biofilme. Curiosamente, a cepa SH-09N expressou maiores propriedades adesivas, microcolônias de autoagregação e

capacidade de formação de biofilme. A presença destes achados, associada à alta letalidade de suas infecções relacionadas a dispositivos médicos, como próteses e cateteres, torna esta espécie um patógeno emergente e de constante monitoramento, principalmente em ambientes hospitalares.

Contudo, tanto os mecanismos específicos de resistência aos antimicrobianos, como os mecanismos envolvidos na formação dos biofilmes, precisam ser considerados para o desenvolvimento de novas terapias antibacterianas. O reconhecimento de *S. haemolyticus* como agente patogênico nosocomial deve estimular pesquisas envolvendo o desenvolvimento de métodos mais precisos para sua identificação e caracterização molecular, bem como o estudo de seus fatores de virulência.

CONCLUSÕES

A partir da pesquisa desenvolvida concluiu-se que:

- a) a identificação de todas as amostras de *S. haemolyticus* pelo método de MALDI-TOF MS, com scores $\geq 1,700$, previamente isoladas e mantidas na coleção de cultura, apresentou uma boa eficácia na identificação dessa espécie, quando comparadas com o método molecular de mPRC, oferecendo a vantagem de fornecer uma identificação fidedigna e resultados rápidos;
- b) não foi possível a detecção fenotípica da resistência à oxacilina em algumas amostras que apresentaram gene *mecA* negativas, uma possível explicação seria a hiperprodução de beta-lactamase ou alteração em genes que codificam outras proteínas de ligação à penicilina;
- c) diversos perfis de resistência (MDR) foram observados dentre as amostras de *S. haemolyticus* isoladas de hemocultura, sendo a maioria resistente à oxacilina e à moxifloxacina. Apenas três amostras foram classificadas como não-MDR;
- d) resistência intermediária à vancomicina foi detectada em algumas amostras de *S. haemolyticus* isoladas de hemoculturas de adultos e neonatos expressando diferentes perfis MDR;
- e) os dados indicaram diversidade na capacidade de produção de biofilme de *S. haemolyticus* e o envolvimento de outros fatores bacterianos e/ou ambientais que participam na expressão de *slime* e de produção de biofilme por esses patógenos, independentes dos perfis de resistência aos antimicrobianos;
- f) as amostras de *S. haemolyticus* isoladas de hemocultura apresentaram heterogeneidade na produção de biofilme em superfícies abióticas do vidro e do poliestireno. Algumas amostras foram capazes de aderir fortemente e produzir biofilme em ambos os substratos hidrofílico (vidro) e hidrofóbico (poliestireno) enquanto outras não produziram biofilme no vidro e/ou no poliestireno;
- g) a produção de *slime* no meio Vermelho do Congo foi observada para algumas (69,4%) amostras de *S. haemolyticus*, sendo detectadas amostras

slime-negativas apresentando os genes *atl*, *fbp*, *aap* e *icaA* e uma amostra *slime*-positiva com ausência desses genes relacionados a aderência, biofilme e virulência;

- h) embora a maioria das amostras tenha expressado habilidade de aderir e formar biofilmes nas superfícies do vidro e do poliestireno, essas amostras utilizaram mecanismos multifatoriais e não diretamente relacionados com a presença dos genes *icaA*, *aap*, *atl* e *fbp* e/ou produção de *slime* no meio vermelho do Congo;
- i) *S. haemolyticus* isolados de hemoculturas apresentam diversidade quanto a capacidade de formação de *slime* e diferentes níveis de intensidade na aderência e produção de biofilme em superfícies abióticas hidrofílica (vidro) e hidrofóbica (poliestireno). Essas amostras podem ser *ica*-independentes além de formarem biofilme independente dos perfis de resistência aos antimicrobianos;
- j) amostras de *S. haemolyticus* isoladas de hemoculturas de neonato e de adulto foram capazes de aderir as fibras de colágeno e produzir biofilme na superfície de bioimplantes (*patches*) de pericárdio bovino em diferentes intensidades, ressaltando a importância de estudos futuros a fim de minimizar o risco de colonização microbiana, evitando uma possível contaminação e infecção durante os procedimentos cirúrgicos em pacientes;
- k) a capacidade de produzir biofilme e a notória multirresistência aos agentes antimicrobianos, incluindo os β -lactâmicos e glicopeptídeos, favorece *S. haemolyticus* como potencial causador de infecções de sítios cirúrgicos.

Os dados relacionados a capacidade de aderência e de formação de biofilmes em substratos abióticos e bióticos, incluindo, dispositivos médicos invasivos produzidos por biomateriais, como membrana de pericárdio bovino, enfatizam a natureza multifatorial desses mecanismos, além de não ser possível correlacionar a resistência e a aderência em diversas superfícies das amostras testadas de *S. haemolyticus*. Deste modo, a continuidade da pesquisa de aspectos multifatoriais da virulência de *S. haemolyticus*, bem como seus fatores de resistência, produção de biofilme em outras superfícies de interesse médico são informações relevantes para um entendimento mais específico na disseminação e resistência dessa espécie.

REFERÊNCIAS

- AHMED, A. et al. Catheter related recurrent blood stream infection caused by linezolid-resistant, methicillin resistant *Staphylococcus haemolyticus*; an emerging super bug. *J. Pak. Med. Assoc.*, v. 69, n. 2, p. 261-263, 2019.
- ALMEIDA, L. M.; MAMIZUKA, E. M. *Staphylococcus epidermidis* e outras espécies de estafilococos coagulase-negativos. São Paulo: Atheneu, 2015. Separata de: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. São Paulo: Atheneu, 2015.
- AL-TAMIMI, M. et al. Methicillin and vancomycin resistance in coagulase-negative *Staphylococci* isolated from the nostrils of hospitalized patients. *J. infect. Dev. Ctries.*, v. 14, n. 1, p. 28-35, 2020.
- ARAÚJO, L. G. *Produção de biofilme, detecção dos genes icaAD, atlE e aap e resistência aos antimicrobianos em cepas de Staphylococcus epidermidis resistentes a meticilina (MRSE)*. 2006. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Clínica Médica) - Faculdade Medicina, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2006.
- ARGEMI, X. et al. Coagulase-negative *Staphylococci* pathogenomic. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 20, n. 5, p. 1215, 2019.
- ARONSON, J. K.; HENEGHAN, C.; FERNER, R. E. Medical devices: definition, classification, and regulatory implications. *Drug Saf.*, v. 43, n. 2, p. 83-93, 2020.
- ASANTE, J. et al. Review of clinically and epidemiologically relevant coagulase-negative *staphylococci* in Africa. *Microb. Drug. Resist.*, v. 26, n. 8, p. 951-970, 2020.
- BAKTHAVATCHALAM, Y. D. et al. Methicillin susceptible teicoplanin resistant *Staphylococcus haemolyticus* from bloodstream infection: Novel mutation in teicoplanin resistant operon (*tcaRAB*). *Jpn. J. Infect. Dis.*, v. 70, n. 4, p.458-460, 2017.
- BARROS, E. M. et al. Phenotypic and genotypic characterization of biofilm formation in *Staphylococcus haemolyticus*. *Curr Microbiol.*, v. 70, n. 6, p. 829-834, 2015.
- BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. Coagulase-negative *Staphylococci*. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 27, n. 4, p. 870-926, 2014.
- BOUCHAMI, S. et al. Molecular epidemiology resistant to methicillin *Staphylococcus hominis* (MRSHo): Low clonality and reservoirs of SCCmec structural elements. *PLoS ONE*, v. 6, n. 7, e21940, 2011. DOI:10.1371/journal.pone.0021940
- BRYCE, A. N.; DOOCEY, R.; HANDY, R. *Staphylococcus haemolyticus* meningitis and bacteremia in an allogenic stem cell transplant patient. *IDCase*, v. 26, e01259, 2021. DOI: 10.1016/j.idcr.2021.e01259

CHAIEB, K.; MAHDOUNAI, K.; BAKHROUF, A. Detection of *icaA* and *icaD* loci by polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needles in a dialysis unit. *J. Hosp. Infect.*, v. 61, n. 3, p. 225-230, 2005.

CHANG, M. R. et al. Surveillance of pediatric infections in a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.*, v. 7, n. 2, p. 149-160, 2003.

CHAVES, F. et al. Nosocomial spread of a *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* strain causing sepsis in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, n. 9, p. 4877-4879, 2005.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 31st ed. CLSI supplemente M100. USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2021.

COSTA, C. B. *Anatomohistopatologia de implantes de pericárdio bovino conservados em diferentes concentrações de glutaraldeído em parede abdominal de camundongos*. 2009. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2009.

COSTA, C. B.; SILVA, M. F. A.; ANDRADE, G. B. Aspectos patológicos do implante de pericárdio bovino tratado pelo glutaraldeído e pela glicerina em parede abdominal de camunongu. *Acta Sci. Veter.*, v. 44, n. 1383, p.1-7, 2016.

CROES S. et al. *Staphylococcus aureus* biofilm formation at the physiologic glucose concentration depends on the *S. aureus* lineage. *BMC Microbiol.*, v. 9, n.229, p. 1-7, 2009.

CZEKAJ, T.; CISZEWSKI, M.; SZEWCZYK, E. *Staphylococcus haemolyticus* – an emerging threat in the twilight of the antibiotic age. *Microbiol. (Reading)*, v. 161, n. 11, p. 2061-2068, 2015.

ELTWISY, H. O. et al. Pathogenesis of *Staphylococcus haemolyticus* on primary human skin fibroblast cell. *Virulence*, v. 11, n. 1, p. 1142-1157, 2020.

ELTWISY, H. O. et al. Clinical infections, antibiotic resistance, and pathogenesis of *Staphylococcus haemolyticus*. *Microorganisms*, v. 10, n. 1130, p.1-17, 2022.

EUZÉBIO, D. M. et al. Perfil epidemiológico das infecções relacionadas à assistência à saúde em Unidades de Terapia Intensivas no período de 2019 a 2020. *Res., Soc. Dev.*, v. 10, n. 17, e2101724926, 2021. DOI:10.33448/rsd-v10i17.24926

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

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

FREEMAN, J. et al. Birth weight and length of stay as determinants of nosocomial coagulase-negative staphylococcal bacteremia in neonatal intensive care unit populations: potential for confounding. *Am. J. Epidemiol.*, v. 137, n. 6, p. 1130-1140, 1990.

GUPTA, V. et al. Linezolid resistance in *Staphylococcus haemolyticus* - case series and review of literature. *Infect. Disord. Drug Targets.*, v. 20, n. 5, p. 713-717, 2020.

HEILMANN, C.; ZIEBUHR, W.; BECKER, K. Are coagulase-negative staphylococci virulent? *Clin. Microbiol. Infect.*, v. 25, n. 9, p. 1071-1080, 2019.

HERNÁNDEZ, B. D. et al. Production of *icaADBC*-encoded polysaccharide intercellular adhesion and therapeutic failure in pediatric patients with staphylococcal device-related infections. *BMC Infect. Dis.*, v. 10, n. 68, p. 1-6, 2010.

HONG, J. et al. Complete genome sequence of biofilm-forming strain *Staphylococcus haemolyticus* S167. *Genome Announc.*, v. 4, n. 3, e00567-16, 2016. DOI: 10.1128/genomeA.00567-16

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

JIMÉNEZ, J. N. et al. Characterisation of virulence genes in methicillin susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a paediatric population in a university hospital of Medellín, Colombia. *Mem. Ins. Oswaldo Cruz*, v. 106, n. 8, p. 980-985, 2011.

KAISER, T. D. L. et al. Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 75, n. 3, p. 235-239, 2013.

KARAM, B. R. S. *Produção de biofilme na presença de agentes antimicrobianos e potencial de virulência para Caenorhabditis elegans de diferentes biótipos de Staphylococcus haemolyticus isolados de sangue*. 2018. 90 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

KEIM, L. S. *Mapeamento dos estafilococos coagulase negativo no Hospital Universitário Antônio Pedro da Universidade Federal Fluminense no período de 1988 a 2002*. 2005. 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2005.

KIM, J. et al. Improved multiplex PCR primers for rapid identification of coagulase-negative staphylococci. *Arch. Microbiol.*, v. 200, n. 1, p. 73-83, 2018

KLOOS, W. E.; BANNERMAN, T. L. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 7, n. 1, p. 117-140, 1994.

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

KRISTOF, K. et al. Significance of methicillin-teicoplanin resistant *Staphylococcus haemolyticus* in bloodstream infections in patients of the Semmelweis University hospitals in Hungary. *Eur. J. Clin. I. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 30, n. 5, p. 691-699, 2011.

KRZYMINSKA, S. et al. Virulence and the presence of aminoglycoside resistance genes of *Staphylococcus haemolyticus* strains isolated from clinical specimens. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 107, n. 7, p. 857-868, 2015.

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

LAZZAROTTO, C. *Formação de biofilme de Staphylococcus epidermidis isolado de cateter venoso central através de métodos fenotípicos e genotípicos*. 2010. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

LEE, E. Y. What is hidradenitis suppurative? *Can. Fam. Physician.*, v. 63, n. 2, p. 114-120, 2017.

LEMBRE, P.; VENDRELY, C.; DI MARTINO, P. Identification of an amyloidogenic peptide from the bap protein of *Staphylococcus epidermidis*. *Protein Pept. Lett.*, v. 21, n. 1, p. 75-79, 2014.

LOBO, R.D. et al. Evaluation of interventions to reduce catheter-associated bloodstream infection: continuous tailored education versus one basic lecture. *Am. J. Infect. Control*, v. 38, n. 6, p. 440-448, 2010.

LOONEN, A. J. M. et al. Acceleration of the direct identification of *Staphylococcus aureus* versus coagulase-negative staphylococci from blood culture material: a comparison of six bacterial DNA extraction methods. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 30, n. 3, p. 337-342, 2011.

LPSN. Taxinomia de Pesquisa: *Staphylococcus* Disponível em: <https://lpsn.dsmz.de/search?word=staphylococcus>. Acesso em: 10 dez 2022.

MANOHARAN, A. et al. The effect of N-acetylcysteine in a combined antibiofilm treatment against antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. antimicrob. Chemother.*, v. 75, n. 7, .p 1787-1798, 2020.

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

MARTINI, R. et al. Investigation of biofilm formation in coagulase-negative staphylococci isolated from platelet concentrate bags. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v. 58, n. 1, p.1-7, 2016.

MARTINS, F. Z.; DALL'AGNOL, C. M. Centro cirúrgico: desafios e estratégias do enfermeiro nas atividades gerenciais. *Rev. Gaúcha Enferm.*, v. 37, n. 4, e56945, 2016. DOI:10.1590/1983-1447.2016.04.56945

MATLANI, M. et al. Linzolid-resistant mucoid *Staphylococcus haemolyticus* from a tertiary-care centre in Delhi. *New Microbes New Infect.*, v. 11, p. 57-58, 2016. DOI: 10.1016/j.nmni.2016.02.010

MATTOS-GUARALDI, A. L.; FORMIGA, L. C. Relationship of biotype and source to the hemagglutination and adhesive properties of *C. diphtheriae*. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 24, n. 4, p. 399-406, 1991.

MORAES, M. N. et al. Mecanismo de adesão bacteriana os biomateriais. *Rev. Med. Minas Gerais*, v. 23, n. 1, p. 99-104, 2013.

MORES, C. R. Investigation of plasmids among clinical *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus haemolyticus* isolates from Egypt. *Front. Microbiol.*, v. 12, e659116, 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2021.659116

NATSIS, N. E.; COHEN, P. R. Coagulase-negative staphylococcus skin and soft tissue infections. *Am. J. Clin. Dermatol.*, v. 19, n. 5, p. 671-677, 2018.

NOGUEIRA, P. S. F. et al. Perfil da infecção hospitalar em um hospital universitário. *Rev. Enferm. UERJ*, v. 17, n. 1, p. 96-101, 2009.

NUNES, A. P. F. et al. Heterogeneous resistance to vancomycin and teicoplanin among *Staphylococcus* spp. isolated from bacteremia. *Braz. J. Infect. Dis.*, v. 11, n. 3, p. 345-350, 2007.

OCAL, D. N. et al. In vitro effect of vancomycin and daptomycin on biofilm formation of coagulase-negative *staphylococci* strains. *Mikrobiol Bul.*, v. 51, n. 3, p. 220-235, 2017.

OLIVEIRA, A. et al. Staphylococcal biofilm on the surface of catheter: electron microscopy evaluation of the inhibition of biofilm growth by RNAIII inhibiting peptide. *Antibiotics (Basel)*, v. 10, n. 7, p. 879, 2021. DOI: 10.3390/antibiotics10070879

PAIM, T. G. S. et al. MALDI-TOF MS performance to identify gram-positive cocci clinical isolates in Porto Alegre/RS, Brazil. *J. Infect. Control.*, n. 2, v. 2, p. 112-16, 2013.

PAIN, M. et al. Comparative genomic analysis of *Staphylococcus haemolyticus* reveals key to hospital adaptation and pathogenicity. *Front. Microbiol.*, v. 10, e2096, 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02096.

PANDA, S.; SINGH, D. V. Biofilme formation by ica-negative ocular isolates of *staphylococcus haemolyticus*. *Front. Microbiol.*, v. 9, e2687, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02687

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

PAVONEZE, M. C.; FORTALEZA, C. M. C. B. Infecções relacionadas à assistência à saúde: desafios para a saúde pública no Brasil. *Rev. Saúde Pública.*, v. 48, n. 6, p. 995-1001, 2014.

PEREIRA, M. S. et al. A infecção hospitalar e suas implicações para o cuidar da enfermagem. *Texto Contexto Enferm.*, v. 14, n. 2, 250-257, 2005.

PEREIRA, P. M. A. *Ocorrência e caracterização de Estafilococos coagulase negativos isolados de recém-nascidos com bacteremias em unidade de terapia intensiva neonatal no HUPE-UERJ*. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

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

PEREIRA-RIBEIRO, P. M. et al. Influence of antibiotics on biofilm formation by different clones of nosocomial Staphylococcus haemolyticus. *Future Microbiol.*, v. 14, p. 789-799, 2019.

PEREIRA-RIBEIRO, P.M. A. et al. Biofilm formation, multi-drug resistance and clinical infections of Staphylococcus haemolyticus: a brief review. *Res., Soc. and Dev.*, v. 11, n. 1, e228111133605, 2022. DOI:10.33448/rsd-v11i1.33605

PIRES, A. C. et al. Pericárdio bovino utilizado como remendo no Sistema cardiovascular. *Braz. J. Cardiovasc. Surg.*, v. 12, n. 2, p. 176-187, 1997.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, A. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. *Quim. Nova*, v. 38, n. 7, p. 957-971, 2015.

PISO, D. Y. T.; RESTAN, W. A. Z.; BARRETO, M. Y. P. Implantes de membranas biológicas em cirurgia reconstrutivas veterinária: aspectos básicos y métodos de conservación. *Rev. Med. Vet.*, n. 31, p. 105-120, 2016.

PODKOWIK, M. et al. Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 163, n. 1, p. 34-40, 2013.

POTTER, A. et al. The gene bap, involved in biofilm production, is present in Staphylococcus spp. strains from nosocomial infections. *J. Microbiol.*, v. 47, n. 3, p. 319-326, 2009.

PROCOP G. W. et al. *Diagnóstico Microbiológico*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

RAJAN, V.; PRAKASH, P. H.; GOPAL, S. Occurrence of linezolid-resistant Staphylococcus haemolyticus in two tertiary care hospitals in Mysuru, South India. *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, v. 8, p. 140-141, 2017. DOI:10.1016/j.jgar.2016.12.005

RODRIGUEZ-ARANDA, A. et al. Nosocomial spread of linezolid-resistant Staphylococcus haemolyticus infections in an alternative care unit. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 63, n. 4, p. 398-402, 2009.

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

RUPP, M. E. et al. Effect of a second-generation venous catheter impregnated with chlorhexidine and silver sulfadiazine on central catheter-related infections: A randomized, controlled trial. *Ann. Intern. Med.*, v. 143, n. 8, p. 570-580, 2005.

SANTANA, G. S. et al. Biofilme formado por *Staphylococcus aureus*: causa alarmante de infecções nosocomiais. Separata: *Ciência da Saúde: Ensino, Formação e Pesquisa*. Campina Grande: Ampila, 2021.

SCHILCHER, K.; HORSWILL, A. R. 2020. Staphylococcal biofilm development: structure, regulation, and treatment strategies. *Microbiol Mol Biol Rev.*, v. 84, n. 3, e00026-19, 2020. DOI: 10.1128/MMBR.00026-19.

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

SCHUENCK, R. P. et al. Multiplex PCR assay to identify methicillin resistance of *Staphylococcus haemolyticus*. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, v. 52, n. 3, p. 431-435, 2008.

SCHULTHESS, B. et al. Identification of gram-positive cocci by use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: comparison of different preparation methods and implementation of a practical algorithm for routine diagnostics. *J. Clin. Microbiol.*, v. 51, n. 6, p. 1834-1840, 2013.

SILVA-SANTANA, G. et al. *Staphylococcus aureus* biofilm: an opportunistic pathogen with multidrug resistance. *Rev. in Med. Microbiol.*, v. 32, n. 1, p. 12-21, 2021.

SILVA SANTOS, O. C. S. et al. Reliable identification of clinically prevalent species and subspecies of staphylococci by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis analysis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 64, n. 1, p. 1-5, 2009.

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

SUED-KARAM, B. R. et al. Biofilm formation in bovine pericardium biomaterial by multi-drug resistant *Staphylococcus haemolyticus* nosocomial blood isolates. *Ijsrm Human*, v. 21, n. 1, p. 12-32, 2022.

SUED-KARAM, B. R.; PEREIRA-RIBEIRO, P. M. A. *Staphylococcus warneri*: brief literature review. *Braz. J. Health Rev.*, v. 5, n. 2, p. 4525-4531, 2022.

SZCZUKA, E.; GRABSKA, K.; KAZNOWSKI, A. In vitro activity of rifampicin combined with daptomycin or tigecycline on *Staphylococcus haemolyticus* biofilms. *Curr. Microbiol.*, v. 71, n. 2, p. 184-189, 2015.

SZCZUKA, E. et al. Diversity of *Staphylococcus* cassette chromosome mec elements in nosocomial multiresistant *Staphylococcus haemolyticus* isolates. *J. Appl. Genet.*, v. 57, n. 4, p. 543-547, 2016.

TAVARES, W. Resistência Bacteriana. São Paulo: Editora Atheneu, 2014. Separata: *Antibióticos e Quimioterápicos para o Clínico*. São Paulo: Atheneu, 2014.

TRENTIN, D. S.; GIODANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. *Rev. Liberato*, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.

UEHARA, Y. Current status of staphylococcus cassette chromosome mec (SCCme). *Antibiotics (Basel)*, v. 11, n. 86, p.1-12, 2022.

VIJAYAN, P. et al. Device-associated meningitis by linezolid-resistant Staphylococcus haemolyticus in vancomycin-hypersensitive patient. *J. Neurosci. Rural Pract.*, v. 10, n. 4, p. 718-720, 2019.

VUONG, C.; OTTO, M. Staphylococcus epidermidis infections. *Microbes Infect.*, v. 4, n. 4, p. 481-489, 2002.

WACHESK, C. C. *Avaliação da biocompatibilidade in vitro e in vivo de superfícies recobertas por filmes de carbono tipo-diamante contendo nanopartículas de TiO₂ para aplicações biomédicas*. 2016. Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) - Universidade do Vale do Paraíba, São Paulo, 2016.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Medical devices. c2023. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/medical-devices#tab=tab_1. Acesso em: 20 dez 2022.

ANEXO A – Artigo 1: *Staphylococcus aureus* biofilms: an opportunistic pathogen with multidrug resistance (artigo publicado)

***Staphylococcus aureus* biofilms: an opportunistic pathogen with multidrug resistance**

**Giorgio Silva-Santana^{a,d}, Guilherme Goulart Cabral-Oliveira^{b,d},
Dryelle Rodrigues Oliveira^{c,d}, Barbara Araújo Nogueira^{c,d},
Paula Marcele Afonso Pereira-Ribeiro^{c,d}
and Ana Luíza Mattos-Guaraldi^{a,b,c,d}**

Studies related to bacterial biofilm formation are extremely relevant because of their constant association with several human diseases. The organization of this sessile microbial community provides protection against opsonization and phagocytosis. It is responsible for hampering not only the immune system performance against infections but also antimicrobial activity. *Staphylococcus aureus* is part of healthy human microbiota including skin and nasal vestibule. However, many strains have become opportunistic pathogens because of the ability of biofilm formation in implants and medical devices by using them as route of access to bloodstream. *S. aureus*' ability of biofilm formation is widely known and it has been responsible for several infections, such as endocarditis, bacteremia and sepsis. Several factors contribute to biofilm formation including expression of specific genes and interaction between proteins involved in adhesion to substrate. This work aims to explore the main aspects related to biofilm formation by *S. aureus*, using tools as data index bases from the scientific literature: Google Scholar, LILACS, MEDLINE (PubMed), SciELO, Scopus and Book/ eBook, between July 2018 and February 2019, in English, Spanish and Portuguese. This review aims to provide a better understanding of biofilm formation and its impact on host health.

Copyright © 2020 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

Reviews in Medical Microbiology 2021, **32**:12–21

Keywords: biofilm, opportunistic pathogen, *Staphylococcus aureus*, virulence

ANEXO B – Artigo 2: Biofilm-Producing Ability of *Staphylococcus* spp. Multidrug-Resistance isolated from Hospitalized Patients with Osteomyelitis (artigo publicado)


IJSRM
 INTERNATIONAL JOURNAL OF SCIENCE AND RESEARCH METHODOLOGY
An Official Publication of Human Journals


Human Journals
 Research Article
 February 2022 Vol.:20, Issue:4
 © All rights are reserved by Paula Marcelle Afonso Pereira-Ribeiro et al.

Biofilm-Producing Ability of *Staphylococcus* Spp. Multidrug-Resistance Isolated from Hospitalized Patients with Osteomyelitis


IJSRM
INTERNATIONAL JOURNAL OF SCIENCE AND RESEARCH METHODOLOGY
An Official Publication of Human Journals

Paula Marcelle Afonso Pereira-Ribeiro^{*,1}, Guilherme Goulart Cabral-Oliveira², Julianna Giordano Botelho Olivella³, Felipe Caldas Ribeiro², Barbara Aradjo Nogueira^{3,4}, Bruna Ribeiro Sued-Karam^{3,4}, Ana Luiza Mattos-Guaraldi^{1,2}

¹Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Medical Sciences Faculty, Rio de Janeiro State University (DMIP/FCM/UERJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
²Department of Microbiology, Universidade Federal do Rio de Janeiro (CCS/UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
³Hospital Infection Research Laboratory, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil;
⁴Laboratory of Bacterial Technology, Rio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil;

Submitted: 22 January 2022
Accepted: 27 January 2022
Published: 28 February 2022




HUMAN JOURNALS
www.ijssrm.humanjournals.com

Keywords: Biofilm; *Staphylococcus*; Osteomyelitis; Oxacillin; Vancomycin.

ABSTRACT

Osteomyelitis is an inflammatory bone disease that is caused by a microorganism and leads to progressive bone destruction and loss. *Staphylococcal* infections are a global concern, due to the resistance mechanisms developed by these bacteria to evade the host immune system and antibiotic treatment difficult. In addition to the ability of *staphylococci*, biofilm formation is described as a multifactorial associated with infection. The aim was to evaluate the epidemiological and microbiological aspects from patients hospitalized with osteomyelitis infections as well as the influence of antibiotics on biofilm formation by different strains of multidrug-resistance *Staphylococcus* spp. The identification was performed by the MALDI-TOF method. Assays for Disc Diffusion and MIC; biofilm formation on polystyrene in the presence of antibiotics and PCR assays to detect *mecA* and *icaA* genes were analyzed. Strains were identified as *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. uersneri*, and *S. capitis*. All strains were oxacillin-resistant and all *S. epidermidis* strains were vancomycin-intermediate. The strains were able to produce biofilm on the polystyrene surface at different levels independent of the presence of the *icaA* and *mecA* genes and antibiotics. The increase in the number of cases of infections and the multifactorial aspects that favor the pathogenicity of *Staphylococcus* spp. should continue to be investigated, since the spread in the hospital environment has become a growing public health challenge.

ANEXO C – Artigo 3: Biofilm Formation in Bovine Pericardium Biomaterial by Multi-Drug Resistant *Staphylococcus haemolyticus* Nosocomial Blood Isolates (artigo publicado)


IJSRM
 INTERNATIONAL JOURNAL OF SCIENCE AND RESEARCH METHODOLOGY
An Official Publication of Human Journals


Human Journals
Research Article
 March 2022 Vol.:21, Issue:1
 © All rights are reserved by Bruna Ribeiro Sued-Karam et al.

Biofilm Formation in Bovine Pericardium Biomaterial by Multi-Drug Resistant *Staphylococcus haemolyticus* Nosocomial Blood Isolates


IJSRM
INTERNATIONAL JOURNAL OF SCIENCE AND RESEARCH METHODOLOGY
An Official Publication of Human Journals


Bruna Ribeiro Sued-Karam^{1,2}, Paula Marcelle Afonso Pereira-Ribeiro^{1,2}, Renata da Silva Vasconcelos^{1,2}, Guilherme Goulart Cabral-Oliveira^{1,2}, Felipe Caldas Ribeiro^{1,2}, Julianna Giordano Botelho Olivella^{1,2}, Barbara Araújo Nogueira^{1,2}, Sérgio Eduardo Longo Fracalanza¹, Louisy Sanches dos Santos^{1,2}, Eduardo José Lopes-Torres², Ana Luiza Mattos-Guaraldi^{1,2,3}

¹Laboratory of Diphtheria and Corynebacteriosis of Clinical Relevance (LDCIC/FCM/UERJ);

²Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Medical Sciences Faculty, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

³Department of Microbiology, Universidade Federal do Rio de Janeiro (CCS/UFRRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Submitted: 21 February 2022
Accepted: 26 February 2022
Published: 30 March 2022




HUMAN JOURNALS
www.ijssrm.humanjournals.com

Keywords: Bovine pericardium patches, biomaterials, *Staphylococcus haemolyticus*, biofilm, virulence

ABSTRACT

Bovine pericardium a cellular material (BPAM), composed of decellularized collagen fibers, has been used in varied surgical procedures. Biomaterial-associated infections by human pathogens, during clinical procedures, are of significant medical concern. Biofilm formation by human pathogens has been increasingly described as a multifactorial and multistep process associated with infection of implanted medical devices. This study aimed to investigate the ability of biofilm formation on bovine pericardium patches (BPP), and the influence of virulence features of multi-drug resistance- MDR *Staphylococcus haemolyticus* blood isolates from neonate and adult hospitalized patients. The influence of phenotypic and genotypic virulence features in the ability of biofilm formation on BPP and abiotic surfaces were analyzed. Collagen-binding properties and ability of biofilm formation favored colonization, viability, and persistence in BPAM by *S. haemolyticus* strains. A higher adhesive activity, autoaggregation microcolonies, and ability of biofilm formation on BPP, independent of slime production were expressed by the invasive strain from neonate patients. The genes *atl* and *fliP* were detected for both *S. haemolyticus* strains with adhesive properties to collagen type I fibers and biofilm formation on BPAM. BPAM-biofilm producer *S. haemolyticus* strains also expressed the ability of biofilm production in the presence of Oxacillin, Vancomycin, and Linezolid antimicrobial agents, as shown on glass and polystyrene surfaces. Data indicate the involvement of multiple selective activities of virulence mechanism of varied nosocomial pathogens in contamination, persistence, and dissemination from biomaterials, through the bloodstream and tissues during human infections, such as MDR *S. haemolyticus* strains.

Significance and Impact of Study: This work emphasized the possibility of contamination of BPP by human pathogens and the persistent infection following surgery of patients involving exposure to antimicrobial agents, including the ability of biofilm formation by *S. haemolyticus* on surfaces abiotic and biotic (BPAM).

ANEXO D – Artigo 4: Biofilm formation, multidrug-resistance and clinical infections of *Staphylococcus haemolyticus*: A brief review (artigo publicado)

Research, Society and Development, v. 11, n. 11, e228111133605, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <https://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i11.33605>

Biofilm formation, multidrug-resistance and clinical infections of *Staphylococcus haemolyticus*: A brief review

Formação de biofilme, multirresistência e infecções clínicas de *Staphylococcus haemolyticus*: Uma breve revisão

Formación de biopelículas, resistencia a múltiples fármacos e infecciones clínicas de *Staphylococcus haemolyticus*: Una breve revisión

Received: 08/01/2022 | Reviewed: 08/09/2022 | Accepted: 08/11/2022 | Published: 08/23/2022

Paula Marcelle Afonso Pereira-Ribeiro¹

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-4864-9553>

Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: paulafonso.bio@gmail.com

Guilherme Goulart Cabral-Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9762-4669>

Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: guilhermegoulart7@gmail.com

Julianna Giordano Botelho Olivella

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2823-9990>

Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: juliavoll@hotmail.com

Isabelle Christine de Moraes Matta

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4418-4900>

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: isabellozmattam@yahoo.com.br

Felipe Caldas Ribeiro

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6012-1603>

Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: defelipe2005@gmail.com

Barbara Araújo Nogueira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6027-4404>

Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: babynogueira@hotmail.com

Leuihy Sanchez dos Santos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5345-6395>

Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: leuihy.sanchesrj@gmail.com

Bruna Ribeiro Sued-Karam

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5887-6827>

Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: brunasued8@gmail.com

Ana Luiza Mattos-Guaraldi

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2522-0416>

Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: aguaraldi@gmail.com

Abstract

Coagulase-negative staphylococci (CoNS) have been associated with a range of human health issues such as medical device-related infection, localized skin infection, or direct infection, are recognized as comprising the main part of human normal microbiota and associated with severe and intensive infections, causing infections in humans, especially immunocompromised patients and neonates. *S. haemolyticus* is, after *Staphylococcus epidermidis*, the second most frequently isolated CoNS from clinical cases, notably from blood infections, including sepsis. The most important factor might be the ability to acquire multiresistance against available antimicrobial agents, even glycopeptides. It is widespread in hospitals and among medical staff, resulting in being an emerging microbe causing nosocomial infections. This review discuss aspects of *S. haemolyticus* bloodstream infections associated, virulence factors, and the ability of biofilms formation on medical devices surfaces. The great adaptability and the ability to

^{1,2} PMA Pereira-Ribeiro and GG Cabral-Oliveira contributed equally for the first authorship in this manuscript.

*Corresponding author: Dr. Paula Marcelle Afonso Pereira Ribeiro, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Av. 28 de Setembro, 87 - Fundos, 7º andar, Vila Isabel, RJ, Brazil, CEP 20.551-030. Fax number: +55 21 2868-6376; E-mail: paulafonso.bio@gmail.com.