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

Bruna Ribeiro Sued Karam

# Produção de biofilme na presença de agentes antimicrobianos e potencial de virulência para *Caenorhabditis elegans* de diferentes biótipos de *Staphylococcus haemolyticus* isolados de sangue

Rio de Janeiro
2018

Bruna Ribeiro Sued Karam

# Produção de biofilme na presença de agentes antimicrobianos e potencial de virulência para *Caenorhabditis elegans* de diferentes biótipos de *Staphylococcus haemolyticus* isolados de sangue

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

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

Rio de Janeiro

2018

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

K18 Karam, Bruna Ribeiro Sued.
Produção de biofilme na presença de agentes antimicrobianos e potencial de virulência para *Caenorhabditis elegans* de diferentes biótipos de *Staphylococcus haemolyticus* isolados de sangue / Bruna Ribeiro Sued Karam. – 2018.
90 f

Orientadora: Ana Luiza de Mattos Guaraldi.

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

1. Estafilococos - Teses. 2. Aderência bacteriana - Teses. 3. Biofilme - Teses. 4. Vancomicina – Teses. 5. *Staphylococcus haemolyticus*. I. Guaraldi, Ana Luiza de Mattos. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.98:579.862.1

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

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

_____ _____

Assinatura Data

Bruna Ribeiro Sued Karam

**Produção de biofilme na presença de agentes antimicrobianos e potencial de virulência para *Caenorhabditis elegans* de diferentes biótipos de *Staphylococcus haemolyticus* isolados de sangue**

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

Aprovada em 15 de junho de 2018.

Banca Examinadora:

_____

Prof.ª Dra. Ana Luíza de Mattos Guaraldi (Orientadora)

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

_____

Prof.ª Dra. Wânia Ferraz Pereira Manfro

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

_____

Prof.ª Dra. Paula Marcele Afonso Pereira Ribeiro

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

_____

Prof. Dr. Felipe Piedade Gonçalves Neves

Universidade Federal Fluminense

_____

Prof.ª Dra. Renata Garcia Costa

Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2018

## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais e ao meu marido por todo apoio, amor e por acreditarem em mim. Obrigada por tudo. Amo vocês.

## AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais Christina Sued e Moisés Sued, por todo amor, dedicação, por terem me incentivado, por serem meus exemplos e terem me transformado na pessoa que sou hoje. Por serem minha base e por nunca terem deixado que eu desistisse. Obrigada pelos abraços mais confortantes do mundo e pelo "colo de mãe e pai" que está sempre disponível. Obrigada por fazerem o possível e o impossível por mim, sempre!

Ao meu marido, Thiago Karam, por estar ao meu lado de uma forma incondicional. Por sempre me apoiar, pelas suas palavras, por nunca ter deixado que eu desistisse ou fraquejasse. Por sempre dizer que eu era capaz e por entender minhas ausências e minhas crises de choro. Por acreditar mais em mim, do que eu mesma sempre acreditei! Obrigada pelo seu amor altruísta e suas atitudes.

À orientadora, professora e "mãe" Drª Ana Luíza de Mattos Guaraldi, por ser um ser humano ímpar! Obrigada por me acolher como filha e por dividir comigo seu incrível conhecimento! Obrigada por ser essa pessoa fantástica, que sempre esteve ao meu lado, nos momentos mais difíceis dessa jornada. Obrigada por confiar em mim (mais uma vez), por todo incentivo, carinho, paciência e dedicação. Obrigada pelas broncas, puxadas de orelha, choros, cobranças, conselhos, colo de mãe, longas conversas e gargalhadas. Sem tudo isso e sem você, não teria chegado até aqui. Seu apoio incondicional foi essencial nessa jornada.

Ao Professor Dr. José Augusto Adler Pereira, que me abriu as portas durante a graduação e por sempre acreditar no meu potencial. Obrigada por ter me incentivado, por todos os conselhos e pelo apoio. Sou muito grata a tudo que o senhor sempre fez por mim.

Ao Professor Dr. Raphael Hirata Júnior, por toda ajuda nos momentos mais difíceis (principalmente os últimos). Obrigada pela ajuda, explicações (milhares e milhares), apoio, carinho e paciência para explicar cinco vezes a mesma coisa e olhar para mim e dizer: "não entendeu, né?" (risos)! Obrigada por tudo que o senhor sempre fez por mim e sempre faz por todos seus alunos e principalmente por nunca desistir de fazer as coisas darem certo. Sem você, provavelmente esse trabalho não teria sido concluído com tanta alegria e amor.

As professoras Drª Dália dos Prazeres Rodrigues e Drª Renata Garcia Costa, por terem aberto as portas do seu laboratório e nos recebido com tanto amor e alegria. Obrigada também ao Bruno, por todo o suporte e apoio.

A minha companheira diária e grande amiga, Drª Paula Afonso, por estar comigo em mais uma etapa da minha vida profissional. O que seria de mim, sem você? Obrigada pela sua amizade, pelo dia a dia, pelas viagens, loucuras, pelas crises de risos, pelos momentos de cumplicidade e pelos momentos de desespero nos quais você nunca me abandonou, nem deixou que eu desistisse. Obrigada principalmente por todo incentivo, apoio, carinho, broncas e por sempre estar ao meu lado. Pela paciência (não muita né?) de me aturar todo dia te perturbando, dizendo que nada dava certo (risos). Obrigada por ser meu exemplo não só no campo profissional, mas também na vida. Você foi uma das grandes responsáveis pelo meu amadurecimento profissional e pela minha mudança na postura profissional, além de me ensinar que a vida é muito mais do que achamos que é. Você foi essencial nessa "batalha". Obrigada por ter se tornado uma das melhores amigas que a vida me deu e por me entender apenas no olhar!

À amiga, Dra. Vanessa Binatti por ter me iniciado nessa vida fantástica! Obrigada por dividir comigo seu conhecimento e por ter tido a paciência de me ensinar tudo que sei hoje! Se estou hoje, fechando mais um ciclo, é graças também a você, que sempre esteve ao meu lado.

As minhas grandes amigas e companheiras de laboratório e de vida: Barbara Nogueira e Julianna Olivella por serem meu suporte e nunca medirem esforços para me ajudar. Obrigada também a amiga Renata Vasconcelos, que chegou no finalzinho, mas nem por isso é menos importante. Obrigada por sempre estarem do meu lado e por dividirem comigo, alegrias, preocupações, sorrisos, abraços, agonias, congressos, Outback's e gargalhadas. Obrigada pelo apoio incondicional, companheirismo, incentivo, carinho e preocupação. Ter vocês do lado, foi essencial para a conclusão desse ciclo. Afinal, sem vocês, nada disso teria (tanta) graça e (tanta) leveza.

A todos os amigos do Laboratório 3, em especial, Cíntia Santos, Yuri Faria, Mônica de Souza, Guilherme Goulart, Valmir Oliveira, Laís Vieira e Emanoela Araújo pela ajuda e apoio constantes e fundamentais na realização desse trabalho. Por sempre encontrarem 5 minutos para sairmos da rotina e darmos boas gargalhadas.

Aos professores da PGCM, representados pelo coordenador Professor Dr. Rogério Alves Rufino, por todo carinho e apoio. E a equipe da Coordenação da Secretária Acadêmica

do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas que sempre meu auxiliou em tudo que foi necessário, sem medir esforços.

Aos professores da DIMI, representado pela Professora Dra. Ana Claudia de Paula Rosa Ignácio, bem como seu corpo docente, funcionários e colegas, pelo carinho e constante apoio no desenvolvimento e concretização deste projeto.

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

Se for difícil, eu faço.

Se for impossível, me dê mais 5 minutos.

*Autor desconhecido*

## RESUMO

KARAM, Bruna Ribeiro Sued. *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. 90f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Os *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN) são encontrados na pele e mucosas de seres humanos e outros animais, já que algumas espécies são parte constituinte da microbiota normal destes mesmos sítios, e podem constituir um reservatório para SCN. *Staphylococcus haemolyticus* é a segunda espécie, dentre os SCN, mais isolada de hemoculturas humanas, sendo uma das que apresenta elevada resistência aos antimicrobianos. O presente estudo teve como objetivo principal, a identificação, a determinação dos perfis de resistência aos agentes antimicrobianos e análise de fatores de virulência em *S. haemolyticus* isoladas de sangue. A técnica de MALDI-TOF MS foi empregada na determinação da espécie e comparada com o método semi-automatizado VITEK 2. Os perfis de resistência aos antimicrobianos foram verificados através de disco-difusão e determinação da CIM (oxacilina, vancomicina, linezolida, moxifloxacina e teicoplanina). A capacidade de produção de biofilme foi investigada pelos testes do Ágar Vermelho do Congo e ensaios de aderência em superfícies abióticas (poliestireno e vidro) na presença e ausência dos antimicrobianos, além de PCR para os genes *ica*A, *atl*, *fbp* e *aap*. A influência de enzimas exógenas em biofilmes pré-formados foi realizada com o tratamento de Proteinase K e DNAse. Os ensaios de letalidade foram realizados utilizando nematódeos *Caenorhabditis elegans.* Os resultados demonstraram que 25% das amostras foram identificadas como *S. haemolyticus*. Todas as amostras foram multirresistentes, oxacilina-resistentes e vancomicina-sensíveis, 32% foram linezolida-resistentes, 88% moxifloxacina-resistente e 4% teicoplanina-resistente. A presença do gene *ica*A foi detectada em 60% das amostras, os genes *fbp* e *atl* em 96% das amostras e o gene *aap* foi detectado em 76%. Apesar da maioria das amostras ter apresentado capacidade de produzir *slime* e/ou biofilme tanto na ausência quanto na presença de antimicrobianos, não foi observada total correlação com a presença do gene *ica*A enfatizando a natureza multifatorial da produção de biofilme. O tratamento com Proteinase K e com DNAse reduziu a intensidade do biofilme formado em diferentes níveis para 72% e 60% das amostras respectivamente. Foram observados altos níveis (≤ 90%) de mortalidade de vermes em até 5 dias de infecção. Tanto os mecanismos de resistência aos antimicrobianos, como também a superação de barreiras protetoras, como biofilmes bacterianos, precisam ser considerados para o desenvolvimento de novas terapias antibacterianas. O aumento no número de casos de infecções e os aspectos multifatoriais que favorecem a patogenicidade de *S. haemolyticus* devem continuar sendo investigados, uma vez que, a disseminação de micro-organismos multirresistentes no ambiente hospitalar, têm se tornado um crescente desafio para a saúde pública.



Palavras-chave: *Staphylococcus haemolyticus*. Biofilme. *Caenorhabditis elegans*. Vancomicina. Multirresistência.

## ABSTRACT

KARAM, Bruna Ribeiro Sued. *Biofilm production in the presence of antimicrobial agents and virulence potential for Caenorhabditis elegans from different strains of Staphylococcus haemolyticus isolated from blood.* 2018. 90f. Tese. (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Coagulase-negative staphylococci (SCN) are found in the skin and mucous membranes of humans and other animals, since some species are a constituent part of the normal flora of these same sites, which may constitute a reservoir for SCN. *Staphyloccus haemolyticus* is the second most frequent species of human blood cultures, and is frequently associated with antibiotic resistance. The present study aimed the isolation, identification, the resistance profiles to antimicrobial agentes and analysis of virulence factors of *S. haemolyticus* isolates. MALDI-TOF MS was used in to identify the species. The antimicrobial resistance profiles were detrmined by the disk diffusion test and MIC determination (oxacillin, vancomycin, linezolid, moxifloxacin and teicoplanin). The capacity of the biofilm formation was investigated by testing the Congo Red agar and adhesion assays abiotic surfaces (glass and polystyrene) in the presence and absence of antimicrobial in addition to the PCR *ica*A, *fbp*, *atl* and *aap* genes. The influence of exogenous enzymes on preformed biofilms was performed with Proteinase K and DNAse treatment. The lethality assays were performed using nematodes *Caenorhabditis elegans*. The results demonstrated that 25% of the samples were identified as *S. haemolyticus*. All isolates were multidrug resistance, oxacillin-resistant and vancomycin-sensitive, 32% were linezolid-resistant, 88% were moxifloxacin-resistant and 4% were teicoplanin-resistant. The presence of the *ica*A gene was detected in 60% of the samples, the *fbp* and *atl* genes in 96% of the isolates and the *aap* gene was detected in 76%. Although most of the samples showed the ability to produce *slime* and/or biofilm both in the absence and presence of antimicrobials, no correlation was observed with the presence of the *ica*A gene emphasizing the multifactor nature of the biofilm production. Treatment with Proteinase K and DNAse reduced the intensity of the biofilm formed at different levels to 72% and 60% of the samples respectively. High levels (≤ 90%) of worm mortality were observed within 5 days of infection. Both specific antimicrobial resistance mechanisms, as well as the overcoming of protective barriers, such as bacterial biofilms, need to be considered for the development of new antibacterial therapies. The increase in the number of cases of infections and the multifactorial aspects that favor the pathogenicity of *S. haemolyticus* should continue to be investigated, since the dissemination of multiresistant microorganisms in the hospital environment has become a growing challenge for public health.



Keywords: *Staphylococcus haemolyticus*. Biofilm. *Caenorhabditis elegans*. Vancomycin. Antimicrobial multiresistence

## LISTA DE FIGURAS


Figura 1 – Representação ilustrativa da presença do gene *mecA*, codificando a PBP2a (PBP modificada), expressando a resistência ..... 29

Figura 2 – Representação ilustrativa das etapas da formação do biofilme por *Staphylococcus sp*. ..... 35

Figura 3 – Espécies de SCN (n=100) isoladas de hemoculturas de pacientes em diferentes setores do HUPE/UERJ e identificadas pela técnica do MALDI-TOF..... 48

Figura 4 – Perfil de resistência de amostras de *Staphylococcus haemolyticus* isoladas de hemoculturas - Concentração Inibitória Mínima (CIM) para oxacilina, vancomicina, linezolida, moxifloxacina e teicoplanina ..... 54

Figura 5 – Representação ilustrativa da capacidade de produção de matriz exopolimérica (*slime*) em meio Vermelho do Congo de amostras de *S. haemolyticus* multirresistente aos agentes antimicrobianos e produtoras de biofilme em superfícies abióticas (vidro e poliestireno). Amostras MDR-7: (A) *slime*-positiva (3386/*ica*A-negativa) que exibiu colônias de cor enegrecida e consistência seca e (B) *slime*-negativa (5604/*ica*A-positiva) apresentando colônias vermelhas .....

Figura 6 – Sobrevivência de *C. elegans* após cinco dias de infecção frente a cinco amostras de *S. haemolyticus* isoladas de sangue. Todas as amostras foram capazes de causar a morte de nematódeos em intensidades variadas e crescentes, em relação ao tempo de infecção. As amostras 3386/MDR-7 e 3754/MDR-1, apresentaram as maiores taxas de mortalidade (88,33% e 90%, respectivamente) ..... 58 66

## LISTA DE TABELAS


Tabela 1 – Ano e setores hospitalares das amostras de *Staphylococcus haemolyticus* isoladas de sangue ..... 49

Tabela 2 – Análise comparativa da eficácia do método semi-automatizado (VITEK 2) e o método molecular (MALDI-TOF) para identificação das amostras de SCN ..... 50

Tabela 3 – Perfis de resistência de amostras de *Staphylococcus haemolyticus* isoladas de sangue determinados para 14 agentes antimicrobianos pelos métodos de difusão em disco e/ou CIM ..... 52

Tabela 4 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) para oxacilina, vancomicina, linezolida, moxifloxacina e teicoplanina de amostras de *Staphylococcus haemolyticus* isoladas de sangue ..... 53

Tabela 5 – Detecção dos genes relacionados ao biofilme, *ica*A, *fbp*, *atl* e *aap* em amostras de *Staphylococcus haemolyticus* isolados de sangue ..... 55

Tabela 6 – Produção de *slime* no meio Vermelho do Congo por amostras de *Staphylococcus haemolyticus* isolados de sangue ..... 57

Tabela 7 – Produção de biofilme na superfície abiótica do vidro (hidrofílica/carga positiva) na ausência e na presença de doses sub-letais (¼ da CIM) de agentes antimicrobianos de amostras de *Staphylococcus haemolyticus* isolados de sangue ..... 60

Tabela 8 – Produção de biofilme em superfície abiótica de poliestireno (hidrofóbica/carga negativa) na ausência e na presença de doses sub-letais (¼ da CIM) de agentes antimicrobianos de amostras de *Staphylococcus haemolyticus* isolados de sangue ..... 62

Tabela 9 – Influência do tratamento com Proteinase K e DNAse em biofilmes formados em superfície abiótica de poliestireno (hidrofóbica/carga negativa) de amostras de *Staphylococcus haemolyticus* isolados de pacientes com infecções hematogênicas ..... 64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---|---|
| Aap | Proteína associada ao acúmulo |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| Atl | Autolisina de parede celular |
| Bap | Proteína associada ao biofilme |
| ºC | Graus Celsius |
| CDC | Centers for Disease Control and Prevention |
| CFO | Cefoxitina |
| CIM | Concentração inibitória mínima |
| CIP | Ciprofloxacina |
| CLI | Clindamicina |
| CRA | Ágar Vermelho do Congo |
| DIP | Doenças Infecciosas Parasitárias |
| DNAse | Desoxirribonuclease |
| ERI | Eritromicina |
| Embp | Extracellular matrix binding protein |
| EUA | Estados Unidos da América |
| Fbe | Proteína ligadora de fibrinogênio |
| GEN | Gentamicina |
| GehD | Lipase extracelular de ligação ao colágeno |
| HUPE | Hospital Universitário Pedro Ernesto |
| IRAS | Infecções relacionadas à assistência à saúde |
| LABAC | Laboratório de Bacteriologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto |
| LRSA | *Staphylococcus aureus* resistente a linezolida |
| LRSCN | *Staphylococcus* coagulase-negativa resistente a linezolida |
| LZD | Linezolida |
| MALDI-TOF MS | Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight – Mass Spectrometry |
| MDR | Multidrug resistant |
| MDS | Multidrug susceptible |
| MRSA | *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina |
| MRSH | *Staphylococcus haemolyticus* resistente a meticilina |

| | |
|---|---|
| MXF | Moxifloxacina |
| PBP2A | Penicillin-binding protein 2A |
| PEN | Penicilina G |
| PBS | Tampão salina fosfato |
| PCR | Polimerase chain reaction |
| PIA | Polissacharidae intercelular adhesin |
| PSA | Capsular polysaccharide adhesin |
| RIF | Rifampicina |
| SCC*mec* | Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* |
| SCN | *Staphylococcus* coagulase-negativa |
| SUT | Sulfazotrim |
| TEC | Teicoplanina |
| TSB | Trypticase soy broth |
| UCIPG | Unidade de Cuidados Intensivos do Plantão Geral |
| UERJ | Universidade do Estado do Rio de Janeiro |
| UTI | Unidade de terapia intensiva |
| VISA | Vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* |
| VRSA | Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* |

**SUMÁRIO**


| | | |
|---|---|---|
| | **INTRODUÇÃO** ..... | 16 |
| 1 | **REVISÃO DA LITERATURA** ..... | 17 |
| 1.1 | **O gênero *Staphylococcus*** ..... | 17 |
| 1.2 | ***Staphylococcus* coagulase-negativa (SCN)** ..... | 19 |
| 1.3 | ***Staphylococcus haemolyticus*** ..... | 21 |
| 1.4 | **IRAS e o ambiente hospitalar** ..... | 22 |
| 1.5 | **Resistência aos antimicrobianos** ..... | 24 |
| 1.5.1 | Resistência a oxacilina ..... | 27 |
| 1.5.2 | Resistência a vancomicina e teicoplanina ..... | 30 |
| 1.5.3 | Resistência a linezolida ..... | 32 |
| 1.5.4 | Resistencia a moxifloxacina ..... | 33 |
| 1.6 | **Biofilme** ..... | 33 |
| 1.7 | ***Caenorhabdtis elegans*** ..... | 37 |
| 1.8 | **Justificativa** ..... | 38 |
| 2 | **OBJETIVOS** ..... | 39 |
| 2.1 | **Objetivo geral** ..... | 39 |
| 2.2 | **Objetivos específicos** ..... | 39 |
| 3 | **MATERIAL E MÉTODOS** ..... | 40 |
| 3.1 | **Origem das amostras** ..... | 40 |
| 3.2 | **Identificação bacteriana por MALDI-TOF-MS (Ionização e dessorção a laser assistida por matriz - Tempo de Vôo - Espectrometria de massa, do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight – Mass Spectrometry*)** ..... | 40 |
| 3.3 | **Análise do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos** ..... | 41 |
| 3.4 | **Avaliação da produção de biofilme na ausência e na presença de antimicrobianos** ..... | 42 |
| 3.4.1 | Método de crescimento em Ágar Vermelho do Congo (CRA) ..... | 42 |
| 3.4.2 | Determinação do padrão de aderência ao vidro ..... | 43 |
| 3.4.3 | Avaliação da formação de biofilme em superfície de poliestireno ..... | 43 |
| 3.5 | **Influência de enzimas exógenas em biofilmes formados** ..... | 44 |

3.6 **Detecção dos genes *ica*A, *fbp*, *atl* e *app*** ..... 45
3.7 **Ensaio de letalidade ("slow killing assay") em superfície biótica de nematódeos *Caenorhabditis elegans*** ..... 47
4 **RESULTADOS** ..... 48
4.1 **Isolamento de *Staphylococcus haemolyticus* a partir de hemoculturas obtidas de pacientes atendidos em unidade hospitalar** ..... 48
4.2 **Identificação da espécie pela técnica de MALDI-TOF e análise comparativa com o método semi-automatizado VITEK 2** ..... 50
4.3 **Perfis de resistência aos antimicrobianos** ..... 51
4.4 **Genes relacionados com a produção de biofilme** ..... 54
4.5 **Produção de matrix extracelular (*slime*) em meio Ágar Vermelho do Congo na ausência e presença de antimicrobianos** ..... 55
4.6 **Produção de biofilme na superfície abiótica do vidro** ..... 58
4.7 **Produção de biofilme na superfície abiótica de poliestireno** ..... 61
4.8 **Influência de enzimas exógenas em biofilmes pré-formados em superfície de poliestireno** ..... 63
4.9 **Potencial de virulência de *S. haemolyticus* isoladas de sangue empregando *Caenorhabdtis elegans* como modelo de infecção** ..... 65
5 **DISCUSSÃO** ..... 67
**CONCLUSÕES** ..... 73
**REFERÊNCIAS** ..... 75
**ANEXO A** – Comitê de Ética ..... 89
**ANEXO B –** Produção Científica Durante o Período de Realização do Doutorado..... 90

## INTRODUÇÃO

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae*, compreendendo 52 espécies e 28 subespécies. São micro-organismos esféricos e de tamanho geralmente uniforme, que colonizam a pele e mucosas dos seres humanos e outros animais. Várias espécies vêm emergindo como patógenos oportunistas associados a surtos tanto em hospitais quanto na comunidade, além de estarem entre os micro-organismos mais frequentemente isolados no laboratório de Microbiologia Clínica.

Os *Staphylococcus* coagulase-negativo (SCN) são parte constituinte da microbiota humana e atualmente são reconhecidos como agentes etiológicos de uma série de processos infecciosos. São considerados patógenos potencialmente causadores de infecções no homem, principalmente aquelas relacionadas ao uso de dispositivos médicos. O tratamento destas infecções tem se tornado cada vez mais um desafio para a saúde pública, uma vez que a resistência aos antimicrobianos se tornou comum e além de ser um problema grave no tratamento e controle de infecções bacterianas.

*Staphylococcus haemolyticus* é a segunda espécie, dentre os SCN, mais isolada de hemoculturas humanas, além de ser um patógeno oportunista, que, entre os SCN, tem o mais alto nível de resistência múltipla aos antimicrobianos, limitando assim as opções disponíveis. É considerado um importante reservatório para genes de resistência que podem ser transmitidos para outras espécies através da transferência gênica que pode ocorrer no ambiente hospitalar.

Em todo o mundo, as infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) constituem um grave problema, contribuindo para o aumento da morbidade e mortalidade intra-hospitalar e gerando um custo elevado aos serviços de saúde.

A multirresistência dos micro-organismos é um fator crítico no aumento da letalidade por infecções hospitalares. A descoberta dos antimicrobianos foi um grande avanço na medicina humana, sendo importante na diminuição da mortalidade. Porém, o uso indiscriminado desses antimicrobianos fez com que surgisse a resistência bacteriana aos mesmos. O principal fator de virulência dos SCN é a sua capacidade de se aderir e formar biofilme em várias superfícies inertes e vivas. A formação do biofilme está sujeita a uma regulação complexa que é influenciada por uma série de fatores. É um dos principais fatores para infecção bacteriana persistente ou crônica e muitas vezes requer a remoção do dispositivo colonizado para o efetivo controle do processo infeccioso.

# 1 **REVISÃO DA LITERATURA**

## 1.1 **O gênero *Staphylococcus***

Os micro-organismos do gênero *Staphylococcus* foram inicialmente observados e cultivados por Pasteur, tendo sido isolados e descritos, pela primeira vez, em 1878, por Robert Koch. O nome é de origem grega e em 1880, foi adotado por Alexander Ogston. Porém, em 1884, foi Anton Julius F. Rosenbach, que ao obter colônias puras em seus estudos, fez a primeira descrição taxonômica, dividindo o gênero em duas espécies com base na presença de pigmento na colônia – *Staphylococcus pyogenes aureus* e *Staphylococcus pyogenes albus.* Rosenbach mostrou que estes micro-organismos eram responsáveis por infecções de feridas e furunculoses e que era um constituinte normal e natural da pele. Na era "pré-antibiótica", os *Staphylococcus* ficaram conhecidos como patógenos de difícil tratamento (KEIM, 2005; FELIX JUNIOR, 2007).

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae*, que corresponde a cocos Gram-positivos, de cerca de 0,5µm a 1,5µm de diâmetro que habitualmente se dispõem semelhantes a cachos de uva. São imóveis, na maioria das vezes aeróbios (estritos), não formam esporos, catalase positivos, geralmente oxidade negativa, reduzem nitrato a nitrito, suscetível a lisostafina, resistentes a 0,04U de bacitracina, fermentam a glicose com produção de ácido e sob influência de antimicrobianos (KONEMAN et al., 2008; BROOKS et al., 2009; PODKOWIK et al., 2013). O gênero é composto por 52 espécies e 28 subespécies (LPSN, 2017). Suas colônias podem apresentar diversas colorações, variando desde a coloração branca até a coloração laranja, quando cultivadas em meio sólido. São capazes de crescer em meios que contenham alta concentração de cloreto de sódio (halotolerantes) e a temperaturas que variam de 18ºC a 40ºC, sendo sua temperatura ótima, entre 30ºC a 37ºC (bactérias mesófilas). Representantes desse gênero geralmente têm uma relação benigna ou simbiótica com o hospedeiro, sendo encontrados na pele e em mucosas de humanos e de outros animais. Entretanto, podem se tornar um agente patogênico se ganharem entrada no tecido do hospedeiro através da violação do sistema cutâneo por um trauma como agulhas de inoculação e implantes de dispositivos médicos, bem como a imunossupressão do paciente (NEVES et al., 2007; BROOKS et al., 2009; KUMAR et al., 2018).

O gênero *Staphylococcus* pode ser divido em dois grupos com base na produção da enzima coagulase, que é capaz de converter fibrinogênio sanguíneo em fibrina, conferindo a bactéria a capacidade de coagular o plasma sanguíneo e assim se proteger do sistema inume do hospedeiro. Os *Staphylococcus* coagulase-positiva, são aqueles que produzem a enzima coagulase, sendo a espécie *Staphylococcus aureus* seu principal representante. Os *Staphylococcus* coagulase-negativa (SCN), não produzem a enzima coagulase e eram considerados comensais, já sendo reconhecidos como agentes causadores de diversas doenças humanas. Dentre os SCN, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus saprophyticus* são isolados com maior frequência de infecções humanas (KONEMAN et al, 2008; LOONEN, et al., 2011; PODKOWIK et al., 2013).

*Staphylococcus aureus* é encontrado na microbiota normal, principalmente da pele, podendo tornar-se patogênico em condições específicas, causando uma grande variedade de infecções, como: quadros de supuração, formação de abscessos, vários tipos de infecções piogênicas e até mesmo, sepse, apesar de também serem capazes de colonizar as superfícies cutâneo-mucosas, sem necessariamente causar infecção. *S. aureus* produz muitas proteínas extracelulares associadas às células do hospedeiro. Muitas toxinas citolíticas (hemolisinas) e enzimas (proteases, lipases, hialuronidases) se integram para causar lesão tecidual. Nenhum fator de virulência sozinho é responsável pela superação da resposta do hospedeiro, exceto no caso da toxina exfoliativa e da toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) em que o produto bacteriano é responsável primário pelos sinais da doença. O papel da coagulase na patogênese das doenças estafilocócicas é ainda, de certa forma, especulativo, mas acredita-se que essa enzima poderia levar à formação de uma camada de fibrina formando um abscesso, localizando assim a infecção e, provavelmente, protegendo o micro-organismo da fagocitose e da ação de drogas antimicrobianas (SANTOS et al., 2009; JIMÉNEZ et al., 2011; VIEIRA & VIERA, 2017).

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

## 1.2 *Staphylococcus* coagulase-negativa (SCN)

SCN são encontrados na pele e mucosas de seres humanos e outros animais, desde o primeiro dia de vida. Algumas espécies são parte constituinte da microbiota normal destes mesmos sítios, que podem constituir um reservatório para SCN (BROOKS et al., 2009; EHLERSSON et al., 2017). São responsáveis por doenças como: endocardites, osteomielites, infecções do trato urinário, entre outras. Em hospedeiros sadios, o potencial invasivo de SCN é muito baixo, mas são considerados micro-organismos oportunistas, pois são favorecidos em certas situações de comprometimento das defesas do hospedeiro, podendo produzir infecções graves. A imaturidade do sistema imunológico que consiste na deficiência de fagocitose e de opsonização por anticorpos e complemento, contribui para o agravamento das infecções estafilocócicas (TEIXEIRA, 2009; SENG et al., 2017).

No passado, os SCN eram considerados não patogênicos ou somente parte da microbiota normal da pele de seres humanos. Ultimamente, já são reconhecidos como agentes etiológicos de uma série de processos infecciosos, contaminando inclusive, equipamentos médicos e alimentos. O número de relatos de casos de infecções hospitalares causadas por SCN ultrapassou o número de casos por *S. aureus*, havendo também, evidências crescentes de infecções nas unidades de terapia intensiva neonatal (SOARES et al., 2008; KIM et al., 2018; PEREIRA, 2018). Após o emprego terapêutico dos primeiros antimicrobianos, as infecções estafilocócicas alastraram-se pelo mundo, aparecendo como grave problema de saúde pública (MAYHALL, 2004).

Os SCN estão se tornando um dos patógenos nosocomiais mais frequentes, possuindo um impacto substancial na saúde humana, particularmente com o aumento do uso de terapias imunossupressoras e a implantação de dispositivos médicos invasivos, que são essenciais na medicina moderna. Como são amplamente encontradas em pele, os SCN estão na vanguarda de fontes importantes de infecções endógenas (DORTET et al., 2017). A maioria das infecções por SCN ocorre como conseqüência do uso por longo prazo de dispositivos médicos, como o cateter venoso central, válvulas cardíacas artificiais e estimuladores de ritmo, pois estes funcionam como uma porta de entrada através da pele (EHLERSSON et al., 2017; KIM et al., 2018). Os SCN também desempenham um papel importante na transferência horizontal de genes para resistência antimicrobiana (MADSEN et al., 2018).

As infecções por SCN são difíceis de conter, já que essas bactérias produzem biofilmes nas superfícies de materiais e são resistentes a múltiplos antimicrobianos. A

formação de biofilmes aumenta sua resistência a antimicrobianos em cerca de 1000 vezes em relação a de bactérias planctônicas. Além do biofilme, SCN podem apresentar outros fatores de virulência, como hemolisinas, lipase, lectinase, DNAse, protease, entre outras (KIM et al., 2018).

A espécie de SCN mais frequentemente isolada é *S. epidermidis* que faz parte da microbiota epitelial e foi a primeira espécie a ser descrita como produtora de biofilme (ROGERS et al., 2008; CONTRETRAS et al., 2013). *S. epidermidis* é a espécie prevalente e persistente da pele e membranas mucosas, representando até 90% das amostras de estafilococos observadas nesses sítios e são reconhecidos como agentes de graves infecções nosocomiais e comunitárias (CONTRETRAS et al., 2013; SCHERR et al., 2014). Seu principal fator de virulência é a habilidade de formar biofilme em superfície de dispositivos hospitalares, estimando-se que 22% das infecções da corrente sanguínea detectadas em unidades de cuidados intensivos nos EUA são relacionadas à produção de biofilmes (CARVALHAIS et al., 2014; FRANÇA et al., 2014). A sua principal autolisina, a *atlE,* está envolvida na aderência à superfícies de poliestireno (LAZZAROTTO, 2010; SCHLAG et al., 2010).

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

Outras espécies de SCN também são importantes patógenos humanos, como por exemplo, *Staphylococcus lugdunensis,* que foi associado à endocardite de válvulas naturais e protéticas, celulite da pele, peritonite, osteomielite, infecções do trato urinário, dentre outras infecções. *S. lugdunensis* possui vários fatores de virulência, como por exemplo: adesinas, lipases, DNAse e hemolisinas (PEREIRA et al., 2012; SHIH-CHENG et al., 2017). *Staphylococcus hominis* é comumente encontrada nas amostras clínicas, geralmente isoladas da axila, pele dos braços, pernas e tronco dos seres humanos. Não costuma causar doenças no homem, porém está sendo cada vez mais reconhecida como oportunista e ocasionalmente causam infecção em pacientes com sistema imunológico comprometido (JIANG et al., 2012; SOROUSH et al., 2017).

Uma técnica de identificação bacteriana deve ser rápida, precisa e confiável. No entanto, os métodos fenotípicos convencionais para cocos gram-positivos são relativamente difíceis para uso em laboratórios de rotina, com testes bioquímicos que requerem mais de 72

horas para identificação em nível de espécies. Até recentemente, a identificação bacteriana dependia desses métodos fenotípicos convencionais, sistemas comerciais ou automatizados que não distinguiam a expressão variável de algumas espécies de *Staphylococcus*. A ténica de MALDI-TOF MS (Ionização e dessorção a laser assistida por matriz - Tempo de Vôo - Espectrometria de massa, do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight – Mass Spectrometry*) emergiu como uma rápida alternativa para identificação bacteriana, baseada na ionização de material de amostra co-cristalizado (proteína de células microbianas) por pulsos curtos de laser. Hoje, MALDI-TOF, é considerado um método confiável para identificação de espécies a partir de uma ampla gama de micro-organismos, incluindo SCN. Os íons são acelerados e seu tempo de vôo é medido em um tubo de vácuo, produzindo um espectro de massa bacteriana. Acontece então a comparação de espectros de massa de um micro-organismo desconhecido para os espectros conhecidos, armazenados em um banco de dados. O MALDI-TOF, quando implementada em laboratórios clínicos, tem sido relatada como eficiente, economicamente eficaz e rápida na identificação de micro-organismos. Possibilitando a identificação de uma ampla gama de espécies bacterianas e, sob condições laboratoriais de rotina, apresenta alta taxa de identificação precisa em nível de espécie. (PAIM et al., 2013;  KORNIENKO et al., 2016).

## 1.3 ***Staphylococcus haemolyticus***

*S. haemolyticus* faz parte da microbiota normal da pele e mucosa de humanos. É a segunda espécie, dentre os SCN, mais isolada de hemoculturas humanas (constituem 6% de todos os isolados a partir da corrente sanguínea), ficando atrás apenas de *S. epidermidis*. É um patógeno oportunista, que pode causar peritonite, otite, infecções do trato urinário e sepse. Tem, entre os SCN, o mais alto nível de resistência múltipla aos antimicrobianos, limitando assim as opções disponíveis (FREDHEIM et al., 2009; BAKTHAVATCHALAM et al., 2017; LUO, JAVED, DENEER, 2018; PEREIRA, 2018)

É conhecido por sua propensão para adquirir resistência a antimicrobianos, sendo geralmente, resistentes a antimicrobianos amplamente usados na clínica. Em cepas de *S. haemolyticus*, as taxas de resistência a oxacilina, podem atingir até 90%, sendo a maioria resistente a várias classes de antimicrobianos (BOUCHAMI et al., 2012; SILVA et al., 2013). Com isso, é necessário que, na maioria das vezes, o tratamento de infecções causadas por *S.*

*haemolyticus* seja impregado uso de antimicrobianos de última geração. Apesar da grande preocupação com o surgimento de cepas simultaneamente resistentes a teicoplanina e vancomicina, a base genética de resistência a glicopeptídeos em *S. haemolyticus*, assim como em qualquer outro SCN, ainda é largamente desconhecida (HOSSEINKHANI, EMANENI, VAN LEEUWEN, 2017; VIMBERG et al., 2018).

Sequências de inserção são elementos genéticos móveis que carreiam genes para sua própria mobilização. A inserção desses elementos no cromossomo pode causar alterações genômicas, ativando ou inativando genes. Com cerca de 82 elementos de inserção no seu genoma, *S. haemolyticus* possui alta plasticidade genômica, permitindo frequentes rearranjos e deleções de genes, facilitando, desta forma, a adaptação do micro-organismo ao ambiente, além da aquisição de genes de resistência a antimicrobianos e genes de virulência (BOUCHAMI et al., 2012; ROGERS et al., 2009). Segundo HOSSEINKHANI, EMANEINI e VAN LEEUWEN (2017) *S. haemolyticus* é considerado um importante reservatório para genes de resistência que podem ser transmitidos para outras espécies, como por exemplo, *S. aureus.*

Apesar dos mecanismos de patogenicidade do *S. haemolyticus* ainda serem pouco elucidados, acredita-se que sua habilidade de causar infecção está diretamente relacionada a sua capacidade de formar biofilme. Apesar disso, alguns estudos têm indicado que, as cepas, em maior parte, produzem biofilme *ica*-independente. 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. Além disso, tem sido observada, a disseminação geográfica dos clones de *S. haemolyticus* resistentes a meticilina (MRSH) (PEREIRA et al., 2014; PEREIRA, 2018).

## 1.4 **IRAS e o ambiente hospitalar**

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

As IRAS representam um problema de saúde no mundo, constituindo uma das principais causas de sofrimento, mortalidade, morbidade e de custos, uma vez que aumentam

as complicações e sequelas e exigem tratamentos que prolongam a estado do paciente no hospital. Hoje, como prioridade entre os epidemiologistas, está o controle dessas infecções (MASUNARI, TAVARES, 2006; MARQUES et al., 2011).

Antes da década de 1970, já eram publicados trabalhos relatando infecções por SCN (CUNHA et al., 2006). Hoje se sabe que bactérias do gênero *Staphylococcus* são frequentes agentes em infecções sistêmicas associadas com as infecções urinárias, infecções associadas a dispositivos permanentes, bacteremias em hospedeiros comprometidos, receptores de transplantes, endocardite, entre outras (ANTUNES et al., 2007).

Os patógenos de maior relevância em IRAS são os *Enterococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Candida* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp. As espécies de SCN mais comumente encontradas causando infecções em humanos são: *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, S. *hominis*, *S. lugdunensis*, *S. warneri* e *S. capitis* (GILL et al., 2005; ROSENTHAL et al., 2010; LOBO et al., 2010). O envolvimento de *Staphylococcus* spp. em IRAS está relacionado, principalmente, à capacidade de se aderirem e proliferarem na superfície de dispositivos médicos invasivos, com o cateteres, sondas, próteses, entre outros (ROMANELLI et al., 2013)

Segundo Mayhall (2004), infecções hospitalares causadas por SCN são mais prováveis de ocorrer entre pacientes portadores de neoplasias, especialmente aqueles submetidos à quimioterapia, que produz lesões nas superfícies mucosas. Quando o paciente começa a ter seu trato gastrintestinal colonizado por SCN, os micro-organismos podem em seguida penetrar na mucosa lesada e causar sepse ou infecções localizadas. Nos hospitais, as áreas de maior risco de infecções estafilocócicas graves são os berçários, as unidades de tratamento intensivo, o centro cirúrgico e as enfermarias de quimioterapia para tratamento do câncer (BROOKS et al., 2009). O risco de infecção é diretamente proporcional a gravidade da doença, as condições nutricionais do paciente, a natureza dos procedimentos diagnósticos e terapêuticos, assim como, o tempo de internação (VIANA et al., 2011; LARA et al., 2017).

O interesse médico nos SCN se deve, principalmente, ao aumento da taxa de infecções oportunistas e/ou associadas a dispositivos médicos, visto que o aumento no uso de biomateriais, predispõem a colonização e infecção por SCN (OTTO, 2004). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (2017), com o desenvolvimento de biomateriais para uso clínico e o aumento de sobrevida dos pacientes imunossuprimidos, *S. aureus* e SCN passaram a ser amplamente reconhecidos como responsáveis por grande parte das IRAS, tanto no Brasil, quanto em outros países da América Latina e dos demais continentes.

Nas últimas décadas, houve um grande aumento na resistência bacteriana entre os micro-organismos causadores de IRAS. A multirresistência dos micro-organismos ganhou um destaque especial por imporem um obstáculo ao tratamento antimicrobiano adequado e por isso, estão associadas a uma mortalidade maior quando comparamos com as infecções causadas por bactérias sensíveis. As principais consequências dessa multirresistência são: o aumento do tempo de permanência, o crescente sofrimento humano (como alterações psicológicas dos pacientes), além de aumentar o custo por episódio (utilização de antimicrobianos mais caros), devendo-se ressaltar o aumento do risco de morte. O impacto econômico que vem destas infecções deve estimular o desenvolvimento dos programas de qualidade na assistência hospitalar, além do controle do uso de antimicrobianos e consequentemente, o controle da resistência bacteriana (FERNANDES, 2004; LARA et al., 2017).

Em 1976, os programas de controle de IRAS foram organizados no Brasil, porém somente em 1983 o Governo Federal tornou obrigatória a implantação da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) (COUTO, PEDROSA, 2012; PEREIRA, 2018). Segundo LEISER, TOGNIM e BEDENDO (2007), no Brasil, apesar de não haver uma sistematização dos dados, acredita-se que, aproximadamente de 5 a 15% dos pacientes hospitalizados e de 25 a 35% dos pacientes admitidos em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) adquiriram algum tipo de IRAS. O problema das IRAS no Brasil cresce a cada dia mais, considerando que o custo do tratamento dos pacientes com infecções é três vezes maior do que pacientes sem infecção. Mesmo com a legislação vigente no país, os índices de IRAS permanecem altos e com um agravante, o fato das instituições públicas de saúde possuírem as maiores taxas de prevalência de IRAS no país (LARA et al., 2017). Segundo GALES et al (2009), dados do Brasil obtidos pelo programa SENTRY (2005-2008), na qual foram avaliadas quatro instituições de saúde brasileiras, indicaram que *S. aureus* e SCN foram os patógenos mais frequentemente isolados de infecções de corrente sanguínea, demonstrando assim a alta importância clinica desse gênero.

## 1.5 **Resistência aos antimicrobianos**

O homem sempre usou vários recursos, como vegetais, mel, sal, chumbo, entre outros, no combate a doenças infecciosas. As primeiras descrições sobre o uso de

substâncias que agiam como antimicrobianos datam de 3000 anos atrás. Os Sumércios usavam, para o tratamento de feridas, uma mistura de vinho, cerveja e zimbro. Os Chineses, de maneira empírica, utilizavam bolores para tratar tumores e feridas. E os Indianos, para curar disenterias, ingeriam certos “mofos” (PORTAL EDUCAÇÃO, 2013).

A descoberta dos antimicrobianos foi um grande avanço na medicina humana e também na aplicação terapêutica, sendo importante na diminuição da mortalidade. Desde a introdução do mais antigo antimicrobiano até o mais recente, nota-se que o equilíbrio vem sendo alterado pelo uso indiscriminado, fazendo com que surgisse a resistência bacteriana aos mesmos (MOTA et al., 2005; SILVEIRA et al., 2006; VIEIRA, VIEIRA, 2017). O aparecimento de resistência aos antimicrobianos foi, é, e provavelmente continuará a ser um dos grandes problemas da medicina, pois é causada pela mutação espontânea e recombinação de genes, que criam variabilidade genética. Outros fatores que favoreceram e continuam facorecendo o aparecimento da resistência são: indicação inadequada de antimicrobianos pelos médicos (para melhora rápida do paciente), interrupção do tratamento, venda de antimicrobianos sem prescrição médica e uso de antimicrobianos em rações animais como promotores de crescimento (TEIXEIRA, 2009). O rápido aparecimento e disseminação da multirresistência entre as bactérias aumentam a necessidade da identificação e controle dos patógenos envolvidos (MOTA et al., 2005).

O grande responsável pela disseminação da resistência bacteriana é o próprio homem. Os antimicrobianos estão entre os fármacos mais prescritos em hospitais, sendo que cerca de 25% a 35% dos pacientes hospitalizados recebem antimicrobianos, tanto para indicações terapêuticas como profiláticas, durante a internação. Porém, mais de 50% das vezes, os antimicrobianos são indicados sem necessidade, com imprecisão ou inadequação, tanto na via de administração, na dose e duração do tratamento, bem como, na opção terapêutica inadequada, facilitando o desenvolvimento de resistência bacteriana e, consequentemente, impedindo a ação de outros medicamentos. As aplicações dos antimicrobianos são definidas com base no conhecimento do micro-organismo e no tipo de atividade pretendida, se curativa ou profilática. A terapia curativa tem como finalidade a cura da doença estabelecida ou o combate de um agente infeccioso situado em um determinado local. O uso profilático é aceito quando se deseja prevenir uma infecção em situações da qual há risco elevado, obedecendo a critérios bem definidos de análise de benefício para a sua instalação (VIEIRA, VIEIRA, 2017; KUMAR et al., 2018).

Condutas como associações não embasadas na literatura, trocas frequentes de antimicrobianos, dose, posologia e tempo de tratamento inadequado são fatores que levam à

seleção de bactérias resistentes. A prescrição dos antimicrobianos deve ser feita de forma coerente, baseada em resultados laboratoriais e não somente em dados epidemiológicos de determinados agentes etiológicos responsáveis por certas infecções, como ocorre normalmente, o que leva a um consumo dispensável e excessivo, tornando propício o aumento da resistência, e, por conseguinte, levando a problemas no tratamento de doenças infecciosas (VIEIRA, VIEIRA, 2017).

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno, na maioria das vezes, de base genética, relacionado à existência de genes contidos no micro-organismo que codificam a expressão de diferentes estruturas e mecanismos bioquímicos que impedem a ação dos antimicrobianos (TERASAWA, 2006). A transferência bacteriana cromossômica ocorre geralmente entre bactérias da mesma espécie. Porém, a resistência bacteriana extracromossomial (resistência adquirida) é a que representa verdadeiramente o problema, já que esta pode ocorrer entre bactérias de diferentes espécies e essas bactérias se tornam resistentes a diversos antimicrobianos. Já alguns grupos bacterianos apresentam uma resistência natural a alguns tipos de antimicrobianos, o que chamamos de resistência intrínseca (SANTANA, 2006).

A resistência aos agentes antimicrobianos entre os *Staphylococcus* é um problema crescente, sendo a primeira cepa resistente constatada na década de 1940, logo após a introdução da penicilina. No final dos anos 1950, os *Staphylococcus* adquiriram resistência a praticamente todos os antimicrobianos disponíveis para o tratamento de infecções, tais como, a eritromicina, estreptomicina e tetraciclina. Para tratar as infecções estafilocócicas, surgiram então, as penicilinas semisintéticas antiestafilocócicas: a oxacilina em 1959 e a meticilina em 1960. A primeira cepa de *Staphylococcus* spp. resistente a oxacilina foi da espécie *S. aureus*, detectada na Europa em 1961 (TAVARES, 2009; KUMAR et al., 2018).

Um fenômeno relacionado com a resistência é a tolerância. Segundo BOURGEOIS et al (2007), a tolerância à antimicrobianos é um "tipo de resistência" em particular, na qual bactérias são capazes de sobreviver, porém não se multiplicar, na presença de uma dose normalmente letal de um dado antimicrobiano. A bactéria se mostra sensível à concentração inibitória mínima (CIM) do antimicrobiano, porém apresenta maior capacidade de sobreviver na presença do antimicrobiano, ou seja, não sofre a ação da concentração bactericida mínima habitual, e ainda pode permanecer viável no sítio da infecção. É necessário explorar os mecanismos de tolerância que ainda são desconhecidos.

Segundo BINATTI et al (2015), um aspecto de grande importância, se refere à questão da pressão seletiva no ambiente hospitalar que atua como crivo para supostas vantagens

microbianas que favorecem a persistência e circulação no ambiente hospitalar, sendo que a resistência é a maior garantia de persistência. Podemos reconhecer que condições iniciais de vantagem competitiva no ambiente dão margem à ocorrência de transferência/aquisição de genes, mais notadamente de resistência embora também possam estar associadas a patogenicidade.

### 1.5.1 Resistência a oxacilina

Para combater as infecções estafilocócicas, foram desenvolvidas as penicilinas antiestafilocócicas, como a meticilina e a oxacilina (classe dos β-lactâmicos). Foram introduzidas no ano de 1960, sendo a meticilina o primeiro antimicrobiano semissintético dessa classe, resistente a penicilases. A oxacilina possui vantagem reconhecida sobre a meticilina: estabilidade ácida, que permite absorção após a administração oral. Devido a pressão seletiva e abuso do uso de antimicrobianos, logo começaram a surgir *Staphylococcus* resistentes a meticilina (OLIVEIRA, 2007).

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

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

O gene *mec*A é um segmento de DNA que está localizado em uma ilha genômica conhecido como elemento *mec* ou cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*:

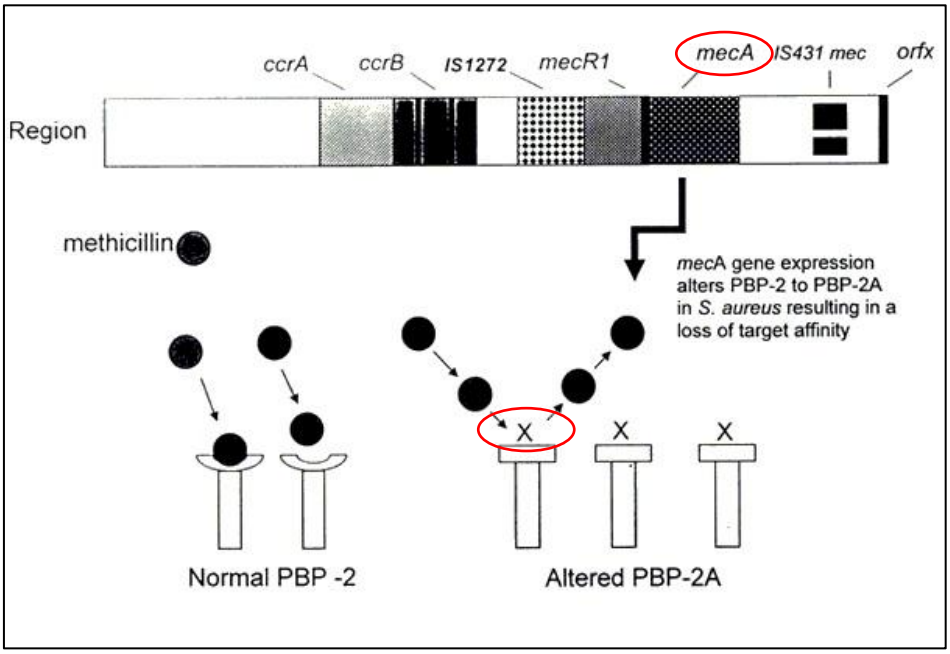
*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*). Este segmento de DNA, variando de 21-67 Kb, carreia o gene *mec*A e os genes *mecR1* e *mecI* que codificam o indutor MecR e a proteína repressora MecI, respectivamente (complexo gene *mec*). Esse elemento também carreia o complexo *ccr* (*ccrAB* ou *ccrC*), da classe de resolvases e invertases e são responsáveis pela integração e excisão do SCCmec, conferindo mobilidade ao SCC*mec*. Além do gene *mec*A, o SCC*mec* pode carrear outros genes de resistência a drogas, podendo ser definido como uma ilha de resistência a antimicrobianos. O mecanismo de transferência e a evolução de SCC*mec* ainda não foram elucidados, porém até o momento, estudos indicam que *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus xylosus* e *S. hominis*, carreiam genes que representam formas ancestrais de SCC*mec*. Os tipos de SCC*mec* são classificados de acordo com a combinação de dois elementos: complexo *mec* e o complexo *ccr*, resultando em diferentes tipos de SCC*mec*. As sequências, entre os complexos ou depois deles, foram classificadas como regiões "junkyard" ou região J (J1, J2 e J3) que contêm vários genes que não parecem ser úteis para a célula bacteriana, embora importantes exceções incluam os genes de resistência mediados por transposons ou plasmídeos para resistência aos antibióticos não β-lactâmicos e metais pesados. Segundo o IWG-SCC, são descritos onze tipos estruturais de SCC*mec* (tabela 1), para *S. aureus*, classificados de acordo com o tipo de complexo *ccr* e a classe do complexo do gene *mec*. Foi descrito, no estudo de Wu *et al* (2015), um décimo segundo tipo de *SCCmec* para *S. aureus* (ESPADINHA et al., 2013; WU et al., 2015; IWG-SCC, 2017; PEREIRA, 2018).

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

As cepas com resistência à meticilina ou à oxacilina, relacionadas com o gene *mec*A, apresentam resistência simultânea aos demais β-lactâmicos (cefalosporinas, cefamicinas, oxacefemas e carbapenêmicos) e geralmente se relacionam com multiresistência aos antimicrobianos não beta-lactâmicos, tais como aminoglicosídeos, macrolídeos, quinolonas e tetraciclina (KEIM, 2005; PEREIRA, 2018).

Entre os SCN, *S. haemolyticus* tem a maior tendência para desenvolver resistência a antimicrobianos β-lactâmicos (SZCZUKA et al., 2016). Um estudo realizado na Tunísia, no ano de 2011, com cepas de *S. haemolyticus* em pacientes neutropênicos demonstrou a prevalência do SCC*mec* tipo V em 28% das amostras (BOUCHAMI et al., 2011).

Figura 1 - Representação ilustrativa da presença do gene *mecA*, codificando a PBP2a (PBP modificada), expressando a resistência




Fonte: Adaptado de Rybak and LaPlante (2005).

| Quadro 1 – Tipos de Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*. | | |
|---|---|---|
| Tipos de SCC*mec* | Tipo de complexo *ccr* | Tipo de complexo *mec* |
| **I** | 1 | B |
| **II** | 2 | A |
| **III** | 3 | A |
| **IV** | 2 | B |
| **V** | 5 | C2 |
| **VI** | 4 | B |
| **VII** | 5 | C1 |
| **VIII** | 4 | A |
| **IX** | 1 | C2 |
| **X** | 7 | C1 |
| **XI** | 8 | 3 |
| Disponível em IWG-SCC, 2017 | | |

### 1.5.2 Resistência a vancomicina e a teicoplanina

Os glicopeptídeos (primeira geração – vancomicina e teicoplanina) estão sendo cada vez mais usados para tratar infecções por SCN, levando assim ao surgimento de cepas com susceptibilidade reduzida a eles (BAKTHAVATCHALAM et al., 2017).

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

A vancomicina é um glicopeptídeo complexo, com peso molecular de aproximadamente de 1.500 Da, que interrompe a síntese do peptídeoglicano da parede celular em bactérias Gram-positivas, assim como os antimicrobianos penicilínicos (MURRAY et al., 2009).

A resistência à vancomicina ocorre, pela inibição da síntese e acoplamento dos polímeros de peptideoglicano da parede celular das bactérias, pois forma um complexo com o precursor D-alanil-D-alanina, passando a sintetizar o dipeptídeo D-alanina-D-lactato, havendo uma interação eletrostática repulsiva, no lugar da ligação de hidrogênio. Esse precursor se encaixa na molécula da vancomicina, evitando, deste modo, sua ligação ao terminal do peptideoglicano, que é o alvo das enzimas transglicolases (não ocorrendo à transferência da fração básica para os locais de síntese de parede) e transpeptidase (onde há o bloqueio da remoção da D-alanina terminal – pela ação da enzima D-alanina-carboxipeptidase – e consequentemente, da formação das ligações cruzadas pela enzima transpeptidase), ou seja, ela inibe a incorporação de aminoácidos aos glicopeptídeos integrantes da parede celular das bactérias. Além disso, a vancomicina pode alterar não só a síntese de RNA como também a permeabilidade da membrana citoplasmática da bactéria. Esses múltiplos mecanismos de ação da vancomicina provavelmente contribuem para baixa frequência de desenvolvimento de resistência (SILVEIRA et al., 2006; VERMELHO et al., 2007; PASSON, 2009).

Quando houve o reconhecimento da vancomicina como um poderoso antimicrobiano, ocorreu um período de “calma” na batalha contra esses micro-organismos. Em 1988, apareceram as primeiras cepas resistentes a vancomicina (enterococos). Com isso, começou a

se pensar em como combater o avanço das infecções causadas por essas cepas e, também, de como prevenir o aparecimento das mesmas. O controle das infecções e a educação da população foram algumas medidas tomadas para conter a propagação dos micro-organismos (SILVEIRA et al., 2006). Em 1966, foi identificada no Japão, a primeira cepa de *S. aureus* com resistência intermediária (suceptibilidade reduzida) a vancomicina (VISA – "vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*"). Outros isolados de VISA foram relatados em vários países, inclusive no Brasil. Em junho de 2002, foi identificado no EUA, em Michigan, o primeiro caso de *S. aureus* resistente a vancomicina (VRSA – "vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*"), que possuía uma concentração inibitória mínima de 1024µg/ml , cerca de 1000 vezes a concentração inibitória mínima habitual da vancomicina para *S. aureus* (MIMICA, BEREZIN, 2006).

A teicoplanina é um glicopeptídeo semissintético, descoberto em 1978 e introduzido no mercado em 1991, no Reino Unido. Sua estrutura química consiste numa mistura de cinco componentes maiores que são designados A2-1, A2-2, A2-3, A2-4 e A2-5. É produzida a partir do actinomiceto *Actinoplanes teichomyceticus*. É semelhante à vancomicina, estruturalmente, em seu espectro de atividade e em características farmacocinéticas. É ativa contra uma ampla gama de patógenos Gram-positivos, incluindo *Staphylococcus* resistentes à meticilina (MRS). Por ter menor propensão a causar nefrotoxicidade e reações anafiláticas e, em termos de facilidade de administração e monitoramento, a teicoplanina tem vantagens sobre a vancomicina em termos de tolerabilidade, além de ter uma meia-vida de eliminação mais longa (30-180 horas), devido a sua alta taxa de ligação a proteínas plasmáticas (acima de 90%), permitindo assim, que os intervalos de dosagens sejam mais longos (FANOS, KACET, MOSCONI, 1997; SCHAISON, GRANINGER, BOUZA, 2000; ZHOU et al., 2018).

No geral, a teicoplanina chega a ser 4 vezes mais ativa do que a vancomicina em cepas sensíveis. No entanto, contra alguns SCN, especialmente, *S. haemolyticus*, a teicoplanina é menos ativa do que a vancomicina. Para essas cepas, a CIM da teicoplanina, mas não da vancomicina, é muito afetada pela composição do meio de cultura (BAKTHAVATCHALAM et al., 2017).

A teicoplanina é indicada no tratamento de infecções como: endocardite, septicemia, infecções osteoarticulares, infecções do trato respiratório inferior, infecções de pele e tecidos moles, infecções urinárias e peritonite associada à diálise peritoneal crônica ambulatorial. Também é indicada no tratamento de infecções em pacientes alérgicos às penicilinas ou cefalosporinas. A teicoplanina não apresenta resistência cruzada com outros antimicrobianos,

porém em enterococos, já se observou a resistência cruzada entre teicoplanina e vancomicina (SCHAISON, GRANINGER, BOUZA, 2000; ZHOU et al., 2018).

### 1.5.3 Resistência a linezolida

Com o aparecimento de agentes patogênicos multirresistentes, deu-se a necessidade do surgimento de novas drogas. Desde os anos 2000, a linezolida vem sendo amplamente usada. Não surpreendentemente, amostras resistentes foram posteriormente relatadas. A linezolida é uma oxazolidiona, com potente atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, incluindo *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), sendo geralmente empregada como antimicrobiano de último recurso para o tratamento de infecções por bactérias Gram-positivas (BUTIN et al., 2017).

Já em 2001, um ano após a linezolida ter sido aprovada para uso clínico, o primeiro caso de *S. aureus* resistente a linezolida (LRSA) foi relatado em um paciente americano que recebeu o antimicrobiano durante 1 mês, para o tratamento de uma peritonite associada a diálise. Desde então, vários casos foram relatados na América do Sul, Ásia, Europa e América do Norte. Por mais que a incidência de LRSA continue baixa, o que mais preocupa é o aumento dos relatos de SCN resistentes a linezolida (LRSCN), que já é 28 vezes maior do que o de LRSA (GU et al., 2013). Após vários anos de sua aprovação para uso clínico, a linezolida permanece extremamente ativa contra a maioria dos isolados clínicos tanto de *S. aureus*, quanto de SCN, sendo que apenas cerca de 2% de amostras resistentes foram relatadas por estudos de vigilância. Devido ao seu amplo espectro antimicrobiano em relação a bactérias gram-positivas, sua farmacocinética/farmacodinâmica e sua eficácia, a linezolida é vastamente usada em cuidados intensivos (DORTET et al., 2017).

A linezolida inibe a síntese de proteína bacteriana por ligação reversível e bloqueia o centro de peptidil-transferase ribossomal. Mesmo que a resistência a esse antimicrobiano seja rara, o mecanismo de resistência mais frenquentemente relatado é uma mutação do ponto G2576U no domínio V do gene 23S rRNA. Mutações nas proteínas ribossômicas L3 e L4 também foram relatadas como responsáveis pela resistência a linezolida. Além disso, ainda é descrito na literatura, como responsavel pela resistência a linezolida, a aquisição do gene *cfr*, que parece ser transmitido horizontalmente por conjugação (GU et al., 2013; VÊLOSO, CAMPELO, 2017).

### 1.5.4 Resistência a moxifloxacina

A moxifloxacina é um antimicrobiano pertencente a quarta geração das fluorquinolonas, que representam um grande avanço da antibioticoterapia, sendo uma das principais opções terapêuticas para varias infecções. Foi lançando primeiramente na Alemanha em 1991 e apresenta melhor potência antimicrobiana. Apresenta um amplo espectro antibacteriano, ou seja, age tanto em bactérias Gram-negativas quanto em bactérias Gram-positivas, particularmente contra bactérias comunitárias, incluindo os principais cocos Gram-positivos como, *Staphylococcus* (KING et al., 2000).

Acredita-se que a moxifloxacina atue inibindo as topoisomerase de DNA do tipo II (girases) e topoisomerase do tipo IV, que são necessárias para a síntese de mRNAs bacterianos (transcrição) e replicação do DNA, resultando na morte celular da bactéria. A moxifloxacina, como outras fluoroquinolonas, está associada a uma baixa taxa (1% a 3%) de elevação das enzimas séricas durante o tratamento. Essas anormalidades são geralmente leves, assintomáticas e transitórias, resolvendo-se mesmo com a continuação da terapia. A moxifloxacina geralmente é muito bem tolerada pelos pacientes com baixa incidência de eventos adversos (PUBCHEM, 2018).

## 1.6 **Biofilme**

O principal fator de virulência dos SCN é a sua capacidade de se aderir e formar biofilme em várias superfícies inertes e vivas. Os biofilmes são comunidades bacterianas heterogêneas existentes dentro de uma matriz composta por DNA bacteriano, proteínas e polissacarídeos e sua composição depende, muitas vezes, de fatores ambientais, como a disponibilidade de nutrientes e o estresse mecânico (SCHERR et al., 2014). O biofilme pode proteger as bactérias tanto das terapias antimicrobianas quanto dos anticorpos e outros mecanismos de defesa do hospedeiro, já que as bactérias formam macrocolônias, podendo levar a infecções persistentes ou crônicas, sendo necessário a remoção do disposivito colonizado para o efetivo controle do processo infeccioso (GAD et al., 2009; SCHERR et al., 2014; SOLIMAN et al., 2018). A formação do biofilme é dada em quatro etapas: adesão, agregação intercelular, maturação e dispersão a partir do biofilme maduro. A capacidade de

aderência é fundamental para a formação de biofilme, sendo responsável pela fixação celular em uma superfície. A adesão intercelular, responsável pela acumulação de bactérias em multicamadas, contribui para o crescimento populacional e para a proteção celular, o que dificulta a ação da atividade imunológica do hospedeiro e dos antimicrobianos (HERNÀNDEZ et al., 2010; LAVERTY et al., 2014).

Segundo, KOUIDHI et al (2010), a formação do biofilme (figura 2) está sujeita a uma regulação complexa que é influenciada por uma série de fatores ambientais. As espécies formadoras de biofilme produzem uma matriz exopolissacarídica (polissacarídeo extracelular) chamada de *slime*, que se acredita constituir uma fase inicial da formação do biofilme, sendo importante para a colonização (LIDUMA et al., 2012; GONZALEZ et al., 2017). A adesão inicial ocorre quando a bactéria se adere a superfície livre. É mediada por interações especificas e inespecíficas, podendo ocorrer em superfícies abióticas (superfície plástica de cateteres) ou em superfícies bióticas (tecidos e componentes da matriz extracelular humana). *In vivo* proteínas do hospedeiro como colágeno, fibrinogênio, fibronectina e vitronectina se depositam rapidamente sobre os dispositivos invasivos recobrindo a superfície destes após a inserção (BOWDEN et al., 2005; SENG et al., 2017). Em seguida, acontece a proliferação de células bacterianas, formando múltiplas camadas (fase de acúmulo). Nessa fase, está envolvida uma série de componentes macromoleculares, como exopolissacarídeos e proteínas (RICE et al., 2007). Após o estabelecimento da camada de *slime*, algumas células são capazes de escapar do biofilme podendo ser levadas a novos sítios, reiniciando o processo de colonização (TERASAWA, 2006). A importância do papel desempenhado pelo *slime* é reforçada pela associação frequente a uma menor susceptibilidade aos antimicrobianos e a dificuldade em erradicar infecções crônicas (ARSLAN, ÖZKARDES, 2007). A habilidade de expressar diferentes fenótipos e produzir *slime* garante aos SCN uma grande competência de colonizar diferentes ambientes (BERNARDI, 2007).

Figura 2 - Representação ilustrativa das etapas da formação do biofilme por *Staphylococcus sp*.

Fonte: Adaptado de Montana State University (2018).

Os genes que codificam as principais proteínas envolvidas na formação do biofilme fazem parte do *operon ica*ADBC que codifica a produção de adesina polissacarídica intercelular (“polysaccharide intercellular adhesin”, PIA), que faz a mediação entre a adesão intercelular de bactérias e a acumulação de multicamadas de biofilme e a adesina polissacarídica capsular (“Capsular polysaccharide adhesin”, PSA). A PSA é um composto de polímeros de alto peso molecular (28 kDa), que oferece proteção contra a resposta imune do hospedeiro, por meio formação da cápsula bacteriana que age como uma barreira à fagócitos, além de ser responsável pelo processo de fixação da bactéria à superfície, enquanto o *slime* está ligado ao processo de acumulação e maturação do biofilme na superfície (LAVERTY et al., 2014).

Cada gene (*ica*A, *ica*D, *ica*B e *ica*C) é responsável por fatores patogênicos e de virulência relevantes envolvidos na síntese da PIA. A transcrição do *operon ica*ADBC é regulada negativamente por um gene regulatório de uma sequência adjacente, o gene *ica*R. A evidência da importância do gene *ica*R foi estabelecida pela deleção do mesmo, havendo então, um aumento da produção de PIA. O gene *ica*A codifica uma proteína transmembranar que trabalha em conjunto com o gene *ica*D. A presença do gene *ica*C aumenta o comprimento de N-acetilglicosamina e permite a translocação do polissacarídeo através da membrana citoplasmática para a superfície da célula. A expressão dos genes *ica*A, *ica*D e *ica*C é um requisito necessário para a produção de PIA. A presença do gene *ica*B, é importante para catalisar a desacetilação da sequência poli-N-acetilglicosamina, aumentando a virulência e as

propriedades adesivas da PIA (TRABULSI, ALTERTHUM, 2005; LAVERTY et al., 2014; SENG et al., 2017).

Acredita-se que a produção do biofilme mediado pela PIA forneça vantagem seletiva na colonização dos dispositivos associados (WEISSER et al., 2010). A expressão do *operon ica*ADBC é controlada por uma complexa variedade de condições e fatores como: anaerobiose, alta temperatura, estresse, tensão de oxigênio, níveis de glicose e osmolaridade. Esses fatores também influenciam a produção do biofilme, se analisado fenotipicamente (HERNÀNDEZ et al., 2010). Sequências homólogas aos genes *ica*ADBC também foram encontrados em muitas bactérias patogênicas Gram-negativas, sendo a produção de PIA confirmada bioquimicamente e/ou imunologicamente em *Acinetobacter baumannii*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Bordetella* spp, *Burkholderia* spp, *Escherichia coli* e *Yersinia pestis* (GÖKÇEN et al., 2013). Independente de PIA, na formação de biofilme estão envolvidas, a proteína associada ao acúmulo (Aap) codificada pelo gene *aap* que exerce atividade de adesina intercelular responsável pelo acúmulo de biofilme e a proteína homóloga ao Bap (Bhp) que é sintetizada pelo gene *bhp* e é uma proteína ancorada na superfície da parede celular (PEREIRA, 2018).

O processo de fixação dos SCN é intensificado pela presença da autolisina Atl, codificada pelo gene *atl*, que se liga às proteínas do plasma, presentes em biomateriais implantados. Existem várias proteínas e autolisinas ligadas à superfície de *S. epidermidis* que são responsáveis pela ligação com o colágeno, a vitronectina, a fibronectina e fibrinogênio e outras proteínas presentes na matriz extracelular. Entre essas proteínas e autolisinas encontramos a lipase extracelular de ligação ao colágeno (GehD), a autolisina Aae, que possui uma atividade de ligação da vitronectina, a proteína Empb (“Extracellular matrix-binding protein”), codificada pelo gene *embp,* que está envolvida com ligação da fibronectina, e é necessária para a fixação primária e acúmulo de biofilme em superfícies recobertas com fibronectina. A interação com o fibrinogênio é facilitada por uma proteína ligadora de fibrinogênio (Fbe/SdrG), codificada pelo gene *fbp* (LAZZAROTTO, 2010; LAVERTY et al., 2014; LEMBRÉ et al., 2014).

O biofilme oferece várias vantagens aos micro-organismos, como acesso mais fácil a nutrientes, aumento de troca genética, proteção conta a resposta imune do hospedeiro, maior tolerância a agente antimicrobianos e adaptação a ambientes agressivos. A proteína associada ao biofilme (Bap) é uma proteína de alto peso molecular, ancorada na superfície da célula, que também está envolvida no processo de formação do biofilme, mas precisamente na adesão intracelular, além de auxiliar na formação da matrix em resposta a sinais ambientais. A

proteína de ligação à fibronectina (FnbA) desempenha um papel importante na fase de acúmulo do biofilme. Ela promove a formação do biofilme através de interações homofílicas ou através de ligações de proteínas receptoras localizadas na superfície de células adjacentes (DI MARTINO, 2016; SENG et al., 2017).

Em seu estudo, FREDHEIM et al (2009) investigaram a contribuição de proteínas, DNA e de polissacarídeos, na matrix do biofilme de 53 amostras de *S. haemolyticus*, utilizando proteinase K, DNAse I e metaperiodato de potássio ($NaIO_4$). Quando comparadas com uma amostra controle (*S. epidermidis*), apenas 38% das cepas de *S. haemolyticus* apresentaram desprendimento quando tratadas com $NaIO_4$. Ao serem tratadas com DNAse I, todas as cepas desprenderam-se, enquanto, com o tratamento com proteinase K, 98% das cepas desprenderam-se, mostrando assim, que apesar da PIA ser frequente nos biofilmes formados por SCN, a composição bioquímica principal do biofilme de *S. haemolyticus* é não-polisscarídica, mas proteica e contendo DNA.

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

## 1.7 ***Caenorhabditis elegans***

O nematóide de vida livre *Caenorhabditis elegans* tem aproximadamente 1 mm de comprimento, possui distribuição global, é comumente encontrado em frutas e caules podres e se alimenta de uma variedade de micro-organismos. É considerado um dos principais sistemas modelo por possuir um curto ciclo de vida, transparência, todo o genoma sequenciado e 60% dos genes homólogos a outros nematóides e organismos eucariotos, além do pequeno tamanho e fácil manutenção *in vitro.* Foi introduzido no ínicio dos anos 1970 como um modelo para o desenvolvimento neural e, mais tarde, foi desenvolvido como um sistema modelo para interações patógeno-hospedeiro, tanto em relação à imunidade inata quanto à caracterização de fatores de virulência microbiana (ANKENY, 2001; ANTUNES et al., 2016). *C. elegans* é utilizado rotineiramente para estudos por expressar três grupos de peptídeos antimicrobianos (AMPs): fatores antibacterianos (defensinas invertebradas),

caenóforos (proteínas semelhantes a saposina) e caenacinas (proteínas semelhantes a neuropeptídeos) (ZEHRBACH, .ROGERS, TARR, 2017). *C. elegans* tem sido usado em uma variedade de campos de pesquisa, como neurobiologia e biologia molecular. O progresso cientifico obtido pelo emprego do nematóide como modelo nessas áreas, estimulou seu uso em novos campos (DE SOUZA, PEREIRA, 2018).

## 1.8 **Justificativa**

Nas últimas décadas, os SCN passaram a ser reconhecidos como agentes etiológicos de processos infecciosos diversos. As infecções causadas pelos SCN permanecem um grande problema de Saúde Pública devido ao crescente aumento da resistência bacteriana aos diversos agentes antimicrobianos utilizados na prática clínica.

Em especial, para cepas de *S. haemolyticus*, que apresentam entre os SCN, o mais alto nível de resistência múltipla aos antimicrobianos, é necessário que, na maioria das vezes, o tratamento seja realizado através do uso de antimicrobianos de última geração (glicopeptídeos). Logo, os antimicrobianos do grupo dos glicopeptídios (vancomicina e teicoplanina) passaram a constituir uma das principais opções terapêuticas nas infecções estafilocócicas em ambiente hospitalar. A capacidade de invadir células e tecidos dos hospedeiros é um dos mais importantes fatores de virulência relacionadas a infecções persistentes. Os mecanismos de patogenicidade do *S. haemolyticus* ainda são pouco elucidados, porém, acredita-se que sua habilidade de causar infecção está diretamente relacionada a sua capacidade de formar biofilme.

Sendo assim, é necessário então, que se estabeleça a vigilância permanente tanto da patogenicidade quanto da resistência dos *S. haemolyticus* aos antimicrobianos em questão, além de ser imprescindível, medidas cuidadosas no controle de infecção para limitar a propagação de cepas multiresistentes dentro e fora das unidades de saúde.

# 2 **OBJETIVOS**

## 2.1 **Objetivo geral**

O presente estudo teve como objetivo geral a identificação, a determinação dos perfis de resistência aos agentes antimicrobianos e análise de fatores de virulência presentes em amostras *S. haemolyticus* isoladas de sangue.

## 2.2 **Objetivos específicos**

a) Identificação do patógeno a partir de hemoculturas obtidas de pacientes atendidos em unidade hospitalar;
b) Identificação da espécie pela técnica de MALDI-TOF;
c) Avaliação comparativa entre a ténica de MALDI-TOF e a técnina semi-automatizada VITEK 2;
d) Determinação dos perfis de resistência aos antimicrobianos através do teste de disco-difusão e determinação de CIM;
e) Avaliação das amostras invasivas, quanto a capacidade de formação de *slime* e de produção de biofilme em superfícies abióticas hidrofílica (vidro) e hidrofóbica (poliestireno);
f) Pesquisa da influência de doses sub-letais de agentes antimicrobianos na produção de *slime* e de biofilme;
g) Detecção da presença de genes relacionados com a produção de biofilme: *ica*A, *fbp*, *atl* e *aap;*
h) Avaliação da influência de enzimas exógenas (Proteinase K e DNAse I) na estrutura de biofilme formado por diferentes amostras;
i) Avaliação do potencial de virulência de amostras de diferentes perfis fenotípicos e genotípicos de *S. haemolyticus* isoladas de sangue utilizando *C. elegans* como modelo experimental de infecção.

# 3 **MATERIAL E MÉTODOS**

## 3.1 **Origem das amostras**

Foram analisadas 100 amostras de SCN previamente isoladas de hemoculturas de pacientes de diversos setores do hospital (HUPE/UERJ), nos anos de 2013 e 2014. As amostras foram isoladas e caracterizadas preliminarmente no Laboratório de Bacteriologia (LABAC) do HUPE/UERJ. Os micro-organismos foram mantidos estocados em solução de GC-Glicerol a 20% (Medium Base, Difco Labs, Detroit, MI, USA), mantendo-se os estoques a -20ºC (até o momento da realização dos testes).

## 3.2 **Identificação bacteriana por MALDI-TOF-MS (Ionização e dessorção a laser assistida por matriz - Tempo de Vôo - Espectrometria de massa, do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight – Mass Spectrometry*)**

As amostras foram isoladas e caracterizadas preliminarmente no Laboratório de Bacteriologia (LABAC) do HUPE/UERJ e confirmadas através da técnica de Ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF), segundo KORNIENKO et al (2016), com modificações. Os perfis de proteínas bacterianas obtidos foram comparados com um banco de dados de espectros de massa de referência bacteriana para identificação rápida no gênero, espécie e, em alguns casos, no nível da subespécie.

As amostras foram semeadas em Muller Hinton Agar e incubadas a 35 ºC por 24 h. Em seguida, as amostras foram tocadas com um auxílio de alça bacteriológica esterilizada e depositada na placa metálica (*Sample target*) fornecida pelo fabricante do equipamento MALDI-TOF Microflex LT (Bruker Daltonics) de modo a conter ao menos $10^5$ células microbianas em cada poço. A placa inoculada foi mantida em fluxo laminar até a completa secagem do material depositado. A cada poço da placa metálica foi inoculado 1 µl da matriz composta por ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA, Sigma; Saint Louis, MO, EUA) preparado em acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético 2,5% (Sigma; Saint Louis, MO, EUA). Após secagem da mistura e 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 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 **Análise do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos**

Foi realizado o método do disco para a determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, segundo CLSI (2016), utilizando os seguintes antimicrobianos: cefoxitina (FOX; 30µg), ciprofloxacina (CIP; 5µg), clindamicina (DA; 02µg), clorafenicol (CHL 30µg), eritromicina (E; 15µg), gentamicina (GEN; 10µg), penicilina G (PEN; 10µg), rifampicina (RIF; 05µg) e sulfazotrim (SXT; 25µg), moxifloxacina (MXF; 5µg) e linezolida (LZD; 30µg) (OXOID, Hants, UK). Foram consideradas como multirresistentes (MDR) as amostras resistentes a três ou mais classes diferentes de antimicrobianos.

Também foi realizado o teste de determinação de concentração inibitória mínima (CIM) para oxacilina, vancomicina, linezolida, moxifloxacina e teicoplanina em placas de microtitulação segundo normas estabelecidas pelo CLSI (2016). O preparo da técnica foi feita 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: Ci.Vi=Cf.Vf, onde Ci é a concentração inicial da solução; Vi é o volume inicial que vamos retirar da solução mãe para obter a concentração desejada; Cf é a concentração final da solução; Vf é o volume final do meio. Depois foram colocados na microplaca 50µl do inóculo e 50µl da solução mãe. A microplaca foi incubada por 24 horas a 35ºC ± 2ºC, e posteriormente foi realizada a leitura. O primeiro poço onde não houve turvação foi a determinação da CIM. O último poço foi a amostra controle, onde foi colocado apenas o inóculo, sem adição de antimicrobianos. Para oxacilina, as amostras que

apresentaram CIM ≤ 0,25µg/mL foram consideradas sensíveis, e as amostras que apresentaram CIM ≥ 0,5µg/mL, foram consideradas resistentes. Para vancomicina, as amostras que apresentaram CIM ≤ 4µg/mL foram consideradas sensíveis, as amostras que apresentaram CIM = 8µg/mL - ≥ 16µg/mL foram consideradas intermediárias e as amostras que apresentaram CIM ≥ 32µg/mL, foram consideradas resistentes. Para linezolida, as amostras que apresentaram CIM ≤ 4µg/mL foram consideradas sensíveis, e as amostras que apresentaram CIM ≥ 8µg/mL foram consideradas resistentes. Para moxifloxacina, as amostras que apresentaram CIM ≤ 0,5µg/mL foram consideradas sensíveis, as amostras que apresentaram CIM = 1µg/mL foram consideradas intermediárias e as amostras que apresentaram CIM ≥ 2µg/mL foram consideradas resistentes. E para teicoplanina, as amostras que apresentaram CIM ≤ 8µg/mL foram consideradas sensíveis, as amostras que apresentaram CIM = 16µg/mL foram consideradas intermediárias e as amostras que apresentaram CIM ≥ 32µg/mL, foram consideradas resistentes.

### 3.4 **Avaliação da produção de biofilme na ausência e na presença de antimicrobianos**

As amostras de *S. haemolyticus* foram semeados em Muller Hinton Ágar por 24 horas a 35ºC ±2ºC, e foram submetidos aos seguintes ensaios:

#### 3.4.1 Método de crescimento em Ágar Vermelho do Congo (CRA)

A expressão da produção de *slime* foi avaliada pelo método de crescimento em Àgar Vermelho do Congo (CRA) (CHAIEB et al., 2005; SUED et al., 2017), onde as amostras foram semeadas em placa, em forma de *spot*, em triplicata, e incubadas por 18-24 horas a 37ºC e, posteriormente, por 24 horas a temperatura ambiente (aproximadamente 30ºC). Como controle positivo para o teste, foi usada a amostra de *S. epidermidis* ATCC 35984. Colônias negras demonstram resultado positivo e colônias vermelhas ou rosa-avermelhadas negativo. Segundo KAISER et al (2010) e SUED et al., 2017, com modificações, as amostras foram semeadas em placa, em forma de *spot*, e em triplicata, contendo a concentração do antimicrobiano desejado, equivalente a ¼ da CIM (cada amostra possuía uma CIM, logo, cada

tubo continha ¼ da CIM equivalente a amostra em questão), foram incubados por 18-24 horas a 35$^{o}$C ± 2$^{o}$C, posteriormente, por 24 horas a temperatura ambiente (aproximadamente 30$^{o}$C), em aerobiose.

### 3.4.2 Determinação do padrão de aderência ao vidro

A técnica de ensaio de aderência ao vidro foi realizada segundo MATTOS-GUARALDI, FORMIGA (1991), onde alíquotas das suspensões bacterianas ($10^{8}$ bactérias/mL) foram inoculadas em tubos 13 x 100 mm contendo 5 ml de caldo tripticaseína de soja (TSB) e incubadas por 48h a 37ºC. A cada 48h, o meio foi retirado e uma nova partida foi acrescentada. Este procedimento foi repetido mais duas vezes. Por fim, as amostras foram classificadas com base nos seguintes padrões: I (+++) - bactérias aderidas nas laterais do tubo de vidro e na interface entre o meio de cultura e o ar – fortemente aderente; II (++) - bactérias aderidas nas laterais do tubo de vidro – moderadamente aderente; III (+) – bactérias formando um anel na interface entre o meio de cultura e o ar – fracamente aderente; e IV (-) ausência de bactérias aderidas – não aderente. Como controle positivo para o teste foi utilizado a amostra de *S. epidermidis* ATCC 35984. Na presença de antimicrobianos, foi realizada a mesma técnica, porém cada tubo continha 5 ml de TSB com a concentração do antimicrobiano desejado, equivalente a ¼ da CIM (cada amostra possuía uma CIM, logo, cada tubo continha ¼ da CIM equivalente a amostra em questão) (GOMES et al., 2013; SUED et al., 2017).

### 3.4.3 Avaliação da formação de biofilme em superfície de poliestireno

A produção de biofilme em placa de poliestireno foi avaliada quantitativamente através de uma modificação do método descrito previamente por STEPANOVIC et al (2000), em que as amostras foram suspensas em TSB até atingir uma turvação equivalente 0,5 McFarland e cultivadas a 37ºC por 24h. Uma alíquota de 200 µl de suspensão bacteriana em TSB foi dispensada em poço de uma placa de microtitulação de poliestireno de 96 poços. A placa foi incubada a 37ºC 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 em temperatura ambiente para secagem. Em seguida, 200 µl de cristal violeta a 0,2% foram colocados em cada poço por 5 minutos e a placa foi lavada exaustivamente com água destilada. Depois de 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 (+++), como descrito no quadro 2. Na presença de antimicrobianos, foi realizada a mesma técnica, porém as amostras foram semeadas em tubos contendo 3 ml de TSB com a concentração do antimicrobiano desejado, equivalente a ¼ da CIM (cada amostra possuía uma CIM, logo cada tubo continha ¼ da CIM equivalente a amostra em questão) (GOMES et al., 2013; SUED et al., 2017).

Quadro 2 – Critérios utilizados para classificação de acordo com a produção de biofilme

| **Critério** | **Classificação da amostra** |
|---|---|
| DO ≤ DOc | não aderentes (-) |
| DOc < DO ≥ 2xDOc | fracamente aderentes (+) |
| 2xDOC < DO ≥ 4xDOc | moderadamente aderentes (++) |
| DO > 4xDOc | fortemente aderentes (+++) |

DO – densidade óptica da amostra; DOc – densidade óptica do controle negativo

Fonte: Stepanovic *et al* (2000).

## 3.5 **Influência de enzimas exógenas em biofilmes formados**

O tratamento com enzimas exógenas: proteínase K e DNAse I, em biofilmes pré-formados foi realizado empregando metodologias previamente descritas por FRANK, PATEL (2007) e IZANO et al (2008), com algumas modificações.

Uma alíquota de 200 µl de suspensão bacteriana em TSB foi dispensada em poço de uma placa de microtitulação de poliestireno de 96 poços. A placa foi incubada a 37ºC por 24h e, em seguida, foram realizadas três lavagens com 200 µL de tampão PBS (Laborclin) pH 7,1 a 7,3 estéril que foi desprezado por inversão da placa com o objetivo de remoção de células planctônicas. Posteriormente, a microplaca foi incubada em estufa a 60ºC durante 1h para fixação do biofilme. Após a etapa de fixação, foram adicionados 100 µL, em triplicata, dos seguintes reagentes em seus respectivos poços: tampão PBS (Laborclin) pH 7,1 a 7,3 estéril (controle negativo da dispersão); Proteinase K (Invitrogen; Carlsbad, EUA) a 100 µg/ml em Tris-HCl (Invitrogen; Carlsbad, EUA) a 10 mM pH 7,5; e 50 µL em triplicata do seguinte reagente: DNAse I (Invitrogen; Carlsbad, EUA) a 100 µg/mL em solução de NaCl 150 mM (Proquimios) e $CaCl_2$ 1 mM (Macalé; Juiz de Fora, MG, Brasil). A placa foi incubada a 37 ºC por 2h. Em seguida, o conteúdo da placa foi desprezado por inversão da mesma e uma etapa de lavagem com 200 µL PBS (Laborclin) foi realizada. A placa foi mantida a temperatura ambiente por 24h para secagem. Em seguida, foi realizada uma etapa de coloração do biofilme com cristal violeta a 0,2% por 5 minutos. Após esse período a placa foi lavada exaustivamente com água destilada para a retirada do excesso de corante. A placa foi mantida invertida a temperatura ambiente por 10 min e depois de seca, foi adicionado aos poços 200 µl de ácido acético a 33%, a fim de eluir o corante. Em seguida, foi realizada uma leitura a 570 nm em espectrofotômetro. Um biofilme foi considerado majoritariamente proteico quando houve uma redução da absorbância encontrada frente ao tratamento com Proteinase K em relação ao valor encontrado quando o biofilme foi tratado com PBS e não houve redução ou a mesma foi inferior quando exposto aos demais reagentes. Este mesmo parâmetro foi utilizado para os demais reagentes.

### 3.6 **Detecção dos genes *ica*A, *fbp*, *atl* e *app***

Ensaios de detecção da presença dos genes *icaA*, ,*fbp, atl e aap* foram realizadas pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os oligonucleotídeos descritos no quadro 3.

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 [Sigma], 1mM

EDTA [Sigma], pH 7,8). Esta suspensão foi mantida à temperatura de ebulição, em torno 100ºC, 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 *ica*A foram realizadas segundo POTTER et al (2009). A amplificação foi realizada em termociclador (Eppendof 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 $MgCl_2$. A reação de amplificação realizada foi programada para desnaturação inicial de 92ºC por 3 min, seguido de 30 ciclos de 92ºC por 1 min, 52ºC por 1 min e 72ºC por 1 min, seguido de uma etapa final de extensão de 72ºC por 5 min.

Os ensaios de PCR para os genes *fbp* e *atl* foram realizadas segundo BARROS et al (2015). A amplificação foi realizada em termociclador (Eppendof 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 $MgCl_2$. A reação de amplificação realizada foi programado para desnaturação inicial de 92ºC por 3 min, seguido de 30 ciclos de 92ºC por 1 min, 52ºC por 1 min e 72ºC por 1 min, seguido de uma etapa final de extensão de 72ºC por 5 min.

O ensaio de PCR para os gene *aap* foi realizada segundo ARAÚJO et al (2006). A amplificação foi realizada em termociclador (Eppendof 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 $MgCl_2$. A reação de amplificação realizada foi programado para desnaturação inicial de 94ºC por 5 min, seguido de 30 ciclos de 94ºC por 30s, 55ºC por 1 min e 72ºC por 1 min, e uma etapa final de extensão de 72ºC 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 & Analisis System 120*).

Quadro 3 – Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nos ensaios de PCR

| **Gene** | **Sequência do Primer 5'→ 3'** | **Tamanho do Amplicon(bp)** | **Referência** |
|---|---|---|---|
| *icaA*F | CGA TGG GCT CAA GGT GG | 287pb | Potter *et al*, 2009 |
| *icaA*R | TTC TTT TCG TAG CGA CTG TC | | |
| | | | |
| *fbp*F | GGTGATACCATTTACCGCAC | 512pb | Barros *et al*, 2015 |
| *fbp*R | CGTGCATCGTAGTAGCGATC | | |
| | | | |
| *atl*F | TAACTCAACAATCGATGGCG | 446pb | Barros *et al*, 2015 |
| *atl*R | GTACCCCAAGGTGCTACTTG | | |
| | | | |
| *aap*F | CAACGAAGGCAGAAGAAGGA | 719pb | Araújo *et al*, 2006 |
| *aap*R | CATCCCCATCTTTCTTGCTG | | |

pb-pares de bases

## 3.7 **Ensaio de letalidade ("slow killing assay") em superfície biótica de nematódeos *Caenorhabditis elegans***

O nematóide *Caenorhabditis elegans* N2 foi utilizado nos ensaios como modelo experimental *in vivo* para análise de patogenicidade de amostras de *S. haemolyticus. C. elegans* N2 foram mantidos em placas contendo meio de crescimento para nematóide (NGM) por aproximadamente 3-5 dias a 20$^{o}$C, sendo utilizado a cepa de *Escherichia coli* OP50 como fonte de alimento, para que os nematódeos cheguem ao estágio larval L3.

Para os ensaios de infecção, 20 µL de suspensão bacteriana a partir de uma cultura de 24 h em TSB foram adicionados a placas de NGM. Após 24-48h, 20 vermes em estágio larval L4 foram transferidos para placas contendo as amostras testes e foram observados diariamente, por cinco dias seguidos. Os nematóides mortos foram contados diariamente e os nematóides vivos, foram passados para uma nova placa de NGM a cada 2 dias e incubados a 20ºC. Para cada amostra, aproximadamente 60 nematóides foram usados e os ensaios foram realizados ao menos em 3 placas. A análise estatística foi realizada com Prism 5.0 (GraphPad), com valores de P inferiores a 0,05 (ANTUNES et al., 2016).

# 4 **RESULTADOS**

## 4.1 **Identificação de *Staphylococcus haemolyticus* a partir de hemoculturas obtidas de pacientes atendidos em unidade hospitalar**

Conforme demonstrado na figura 3, no período de 2013-2014, foi isolado um total de 100 amostras de SCN de hemoculturas de pacientes atendidos no HUPE/UERJ. Além de *Staphylococcus haemolyticus* (n=25; 25%), os demais isolados clínicos foram identificados no nosso laboratório como: *Staphylococcus epidermidis* (n=38; 38%), *Staphylococcus capitis* (n=13; 13%), *Staphylococcus hominis* (n=08; 8%), *Staphylococcus lugdunensis* (n=05; 5%), *Staphylococcus saprophyticus* (n=04; 4%), *Staphylococcus warneri* (n=03; 3%), *Staphylococcus sciuri* (n=03; 3%) e *Staphylococcus aureus* (n=01; 1%).

Das 25 amostras de *S. haemolyticus* isoladas de hemoculturas, 12 amostras foram isoladas no ano de 2013 e 13 amostras foram isoladas no ano de 2014 (tabela 1). Os micro-organimos foram isolados de pacientes atendidos em diferentes setores hospitalares: 6 não informadas (NI), seis de UCIPG, quatro de CTI geral, três de enfermarias, três de dermatologia, um de cirurgia geral, um de DIP e um de pediatria.

Figura 3 - Espécies de SCN (n=100) isoladas de hemoculturas de pacientes em diferentes setores do HUPE/UERJ e identificadas pela técnica do MALDI-TOF

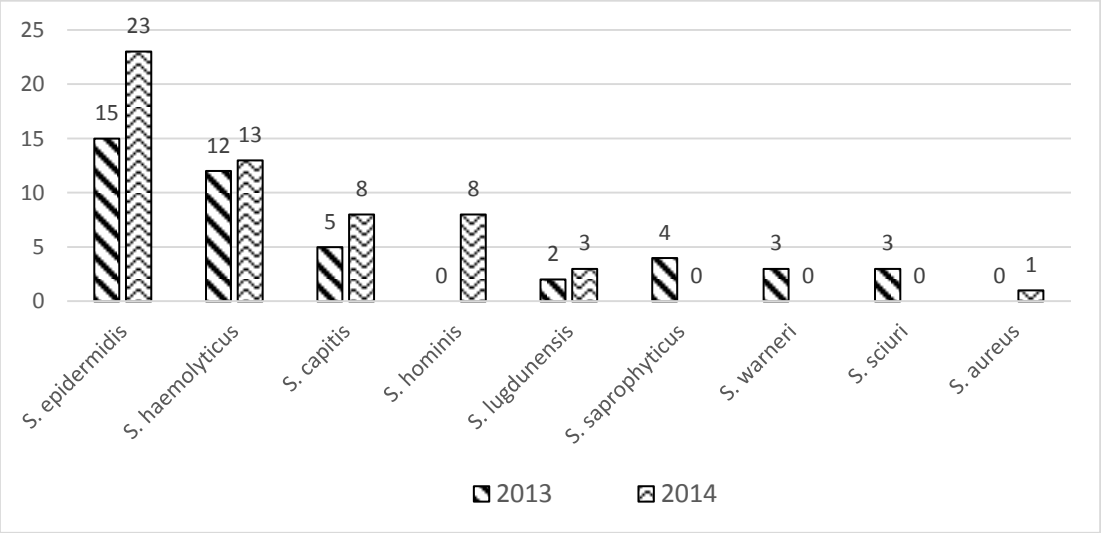


Tabela 1 – Ano e setores hospitalares das amostras de *Staphylococcus haemolyticus* isoladas de sangue

| Amostra | Ano | Setor hospitalar |
|---|---|---|
| 2933 | 2014 | NI |
| 3295 | 2014 | NI |
| 3307 | 2014 | NI |
| 3373 | 2014 | NI |
| 3424 | 2014 | NI |
| 3754 | 2014 | NI |
| 689 | 2013 | UCIPG |
| 6739 | 2013 | UCIPG |
| 3995 | 2013 | UCIPG |
| 8919 | 2014 | UCIPG |
| 9228 | 2014 | UCIPG |
| 33 | 2014 | UCIPG |
| 3614-2 | 2013 | CTI geral |
| 2970 | 2014 | CTI geral |
| 7932 | 2014 | CTI geral |
| 1818 | 2014 | CTI geral |
| 8461 | 2013 | Dermatologia |
| 5604 | 2013 | Dermatologia |
| 7758 | 2014 | Dermatologia |
| 9524 | 2013 | Enfermaria |
| 3386 | 2013 | Enfermaria |
| 3810 | 2013 | Enfermaria |
| 4315 | 2013 | Pediatria |
| 2738 | 2013 | DIP |
| 3386 | 2014 | Cirurgia geral |

NI-não informado; UCIPG-Unidade de Cuidados Intensivos do Plantão Geral; CTI-Centro de tratamento intensivo; DIP-Doenças Infecciosas e Parasitária

## 4.2 **Identificação da espécie pela técnica de MALDI-TOF e análise comparativa com o método semi-automatizado VITEK 2**

A análise comparativa da eficácia do método semi-automatizado (VITEK 2) empregado no LABAC e o método molecular (MALDI-TOF) empregado no nosso laboratório de pesquisa, para identificação das amostras de SCN demonstrou que o VITEK 2, identificou 19 amostras como *S. haemolyticus* (tabela 2).

Tabela 2 – Análise comparativa da eficácia do método semi-automatizado (VITEK 2) e o método molecular (MALDI-TOF) para identificação das amostras de SCN

| Amostra | VITEK-2 | MALDI-TOF |
|---|---|---|
| 689 | *Staphylococcus* sp. | *S. haemolyticus* |
| 3386 | *S. hominis* | *S. haemolyticus* |
| 4315 | *S. epidermidis* | *S. haemolyticus* |
| 2738 | *S. warneri* | *S. haemolyticus* |
| 7932 | SCN | *S. haemolyticus* |
| 3810 | SCN | *S. haemolyticus* |
| 2970 | SCN | *S. haemolyticus* |
| 9524 | *S. haemolyticus* | *S. haemolyticus* |
| 6739 | *S. haemolyticus* | *S. haemolyticus* |
| 3781 | *S. haemolyticus* | *S. haemolyticus* |
| 8461 | *S. haemolyticus* | *S. haemolyticus* |
| 3614-2 | *S. haemolyticus* | *S. haemolyticus* |
| 5604 | *S. haemolyticus* | *S. haemolyticus* |
| 3995 | *S. haemolyticus* | *S. haemolyticus* |
| 8919 | *S. haemolyticus* | *S. haemolyticus* |
| 9228 | *S. haemolyticus* | *S. haemolyticus* |
| 33 | *S. haemolyticus* | *S. haemolyticus* |
| 1818 | *S. haemolyticus* | *S. haemolyticus* |
| 2933 | *S. haemolyticus* | *S. haemolyticus* |
| 3295 | *S. haemolyticus* | *S. haemolyticus* |
| 3307 | *S. haemolyticus* | *S. haemolyticus* |
| 3373 | *S. haemolyticus* | *S. haemolyticus* |
| 3424 | *S. haemolyticus* | *S. haemolyticus* |
| 3754 | *S. haemolyticus* | *S. haemolyticus* |
| 7758 | *S. haemolyticus* | *S. haemolyticus* |

## 4.3 **Perfis de resistência aos antimicrobianos**

Os perfis de resistência expressos pelas 25 amostras de *S. haemolyticus* isoladas de hemoculturas foram apresentados na tabela 3. Todas as 25 amostras de *S. haemolyticus* foram oxacilina-resistentes e expressaram perfis MDR. Todas as amostras também foram resistentes a penicilina e eritromicina, além da oxacilina. Dentre os 14 antimicrobianos testados, todas as amostras apresentaram sensibilidade apenas para vancomicina. Não foram observadas amostras de *S. haemolyticus* isoladas de sangue, com perfis MDS (multidrug susceptible).

Os resultados demonstraram que 92% (n=23) das amostras foram resistentes a moxifloxacina, 88% (n=22) ciprofloxacina/gentamicina-resistentes, 88% (n=22) sulfazotrim-resistente, 84% (n=21) clindamicina-resistente, 80% (n=20) cefoxitina–resistente, 44% (n=11) clorafenicol-resistente, 32% (n=8) rifampicina-resistente.

As amostras de *S. haemolyticus* apresentaram 17 perfis MDR. Os perfis MDR-1 e MDR-2 apresentaram resistência ao maior número de agentes antimicrobianos testados (n=12). Enquanto o perfil MDR-17 foi resistente apenas a OXA, PEN, ERI e TEI e foi detectado apenas para amostra 9524, isolada de paciente atendido na enfermaria 11. Apesar da maioria das amostras expressar perfis MDR distintos, quatro amostras apresentaram o perfil MDR-7, isoladas de pacientes de diferentes setores hospitalares: CTI geral, Cirurgia geral, Dermatologia e Enfermaria 11. Dentre os antimicrobianos de última escolha no tratamento de infecções estafilocócicas, foram observadas 92% (n=23) amostras MDR de *S. haemolyticus* moxifloxacina-resistente, oito amostras linezolida-resistente e cinco amostras teicoplanina-resistente.

Nas tabelas 3 e 4 e figura 4, foram apresentadas as concentrações mínimas inibitórias dos antimicrobianos para 25 amostras testadas: oxacilina (>512-16µg/ml), vancomicina (4-0,5µg/ml), linezolida (32-0,5µg/ml), moxifloxacina (32-0,25µg/ml) e teicoplanina (32-4µg/ml). Resultados discrepantes obtidos pelo método de disco difusão e a CIM, ocorreram para 14 amostras (54%), sendo 32% (n=8) para linezolida, 20% (n=5) para teicoplanina e 12% (n=3) para moxifloxacina. Essas amostras apresentaram-se como sensíveis pelo método de disco difusão e resistentes ou intermediárias pela avaliação da CIM. Cinco (20%) amostras expressaram susceptibilidade reduzida para teicoplanina (9524/MDR-17, 8919/MDR-13, 33/MDR-6, 3373/MDR-6, 7758/MDR-2) e uma (4%) amostra para moxifloxacina (3295/MDR-16).

Tabela 3 – Perfis de resistência de amostras de *Staphylococcus haemolyticus* isoladas de sangue determinados para 14 agentes antimicrobianos pelos métodos de difusão em disco e/ou CIM

| Amostras | Setor hospitalar | Perfis de Resistência | |
|---|---|---|---|
| 7932 | CTI geral | OXA, PEN, ERI, CIP, CLI, SUT, GEN, CFO, MXF, CLO, RIF, LZD | MDR-1 |
| 3754 | NI | OXA, PEN, ERI, CIP, CLI, SUT, GEN, CFO, MXF, CLO, RIF, LZD | MDR-1 |
| 7758 | Dermatologia | OXA, PEN, ERI, CIP, CLI, SUT, GEN, CFO, MXF, CLO, RIF, TEI | MDR-2 |
| 3614-2 | CTI geral | OXA, PEN, ERI, CIP, CLI, SUT, GEN, CFO, MXF, CLO, LZD | MDR-3 |
| 6739 | UCIPG | OXA, PEN, ERI, CIP, CLI. SUT, GEN, CFO, MXF, CLO, LZD | MDR-3 |
| 9228 | UCIPG | OXA, PEN, ERI, CIP, CLI, SUT, GEN, CFO, MXF, CLO, RIF | MDR-4 |
| 689 | UCIPG | OXA, PEN, ERI, CIP, CLI, SUT, GEN, CFO, MXF, RIF, LZD | MDR-5 |
| 3373 | NIS | OXA, PEN, ERI, CIP, CLI, SUT, GEN, CFO, MXF, RIF, TEI | MDR-6 |
| 33 | UCIPG | OXA, PEN, ERI, CIP, CLI, SUT, GEN, CFO, MXF, RIF, TEI | MDR-6 |
| 1818 | CTI geral | OXA, PEN, ERI, CIP, CLI, SUT, GEN, CFO, MXF, CLO | MDR-7 |
| 3386 | Cirurgia geral | OXA, PEN, ERI, CIP, CLI, SUT, GEN, CFO, MXF, CLO | MDR-7 |
| 5604 | Dermatologia | OXA, PEN, ERI, CIP, CLI, SUT, GEN, CFO, MXF, CLO | MDR-7 |
| 3781 | Enf. 11 | OXA, PEN, ERI, CIP, CLI, SUT, GEN, CFO, MXF, CLO | MDR-7 |
| 3995 | UCIPG | OXA, PEN, ERI, CIP, CLI, SUT, GEN, CFO, MXF, RIF | MDR-8 |
| 2738 | DIP | OXA, PEN, ERI, CIP, CLI, SUT, GEN, CFO, MXF | MDR-9 |
| 4315 | Pediatria | OXA, PEN, ERI, CIP, CLI, SUT, GEN, MXF, CLO | MDR-10 |
| 8461 | Dermatologia | OXA, PEN, ERI, CIP, CLI, SUT, GEN, MXF, LZD | MDR-11 |
| 3424 | NI | OXA, PEN, ERI, CIP, CLI, GEN, CFO, MXF, LZD | MDR-11 |
| 2933 | NI | OXA, PEN, ERI, CIP, CLI, SUT, CFO, MXF | MDR-12 |
| 3810 | Enf. 14 | OXA, PEN, ERI, CIP, SUT, GEN, CFO, MXF | MDR-13 |
| 8919 | UCIPG | OXA, PEN, ERI, CIP, SUT, GEN, CFO, MXF | MDR-13 |
| 2970 | CTI geral | OXA, PEN, ERI, CIP, CLI, MXF | MDR-14 |
| 3307 | NI | OXA, PEN, ERI, CLI, TEI | MDR-15 |
| 3295 | NI | OXA, PEN, ERI, MXF, LZD | MDR-16 |
| 9524 | Enf. 11 | OXA, PEN, ERI, TEI | MDR-17 |

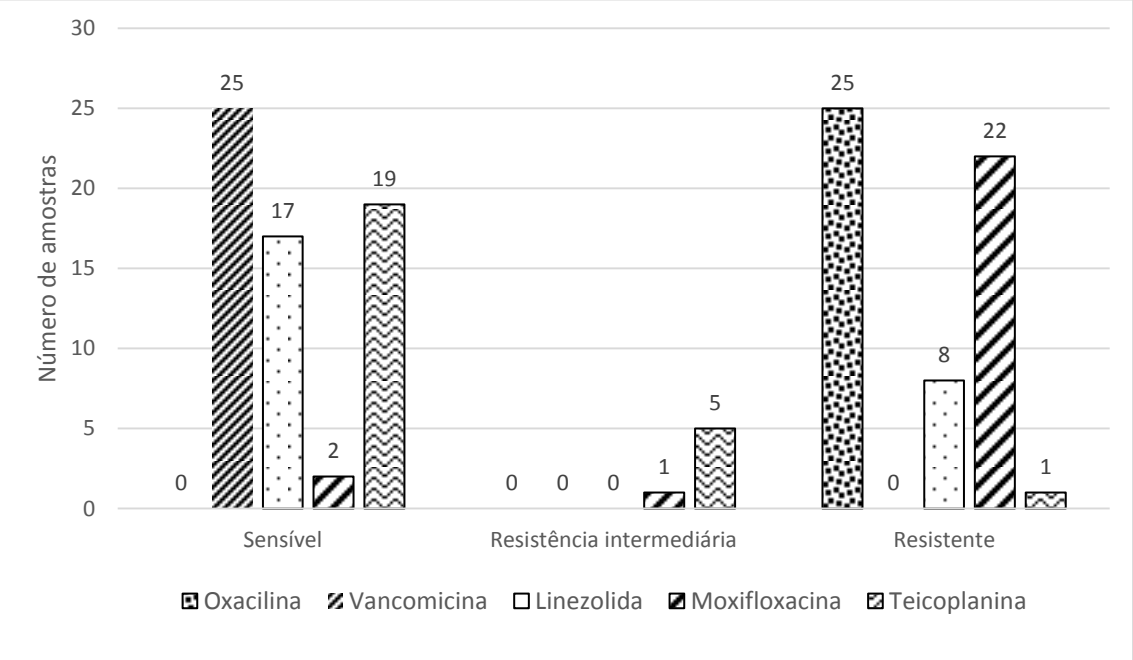
Agentes antimicrobianos testados: OXA-oxacilina; CFO-cefoxitina; GEN-gentamicina; CIP-ciprofloxacina; CLI-clindamicina; ERI-eritromicina; RIF-rifampicina; SUT- sulfazotrim; CLO-clorafenicol; PEN-penicilina; MXF-moxifloxacina e LZD-linezolida;
NI-não informado; UCIPG-Unidade de Cuidados Intensivos do Plantão Geral; DIP-Doenças Infecciosas e Parasitárias; MDR- multi-drug resistance; CIM-concentração inibitória mínima.
Todas as amostras foram sensíveis a vancomicina.
As amostras com resistência intermediária foram consideradas resistentes.

Tabela 4 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) para oxacilina, vancomicina, linezolida, moxifloxacina e teicoplanina de amostras de *Staphylococcus haemolyticus* isoladas de sangue

| Amostras | CIM (µg/ml) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | OXA | VA | LZD | MXF | TEI |
| 9524 | >512 (R) | 4 (S) | 4 (S) | 0,25 (S) | 16 (I) |
| 3386 | 256 (R) | 2 (S) | 4 (S) | 4 (R) | 8 (S) |
| 3810 | 256 (R) | 4 (S) | 2 (S) | 4 (R) | 8 (S) |
| 5604 | 512 (R) | 0,5 (S) | 2 (S) | 2 (R) | 8 (S) |
| 689 | >512 (R) | 2 (S) | 8 (R) | 4 (R) | 4 (S) |
| 6739 | 256 (R) | 1 (S) | 32 (R) | 8 (R) | 4 (S) |
| 3781 | 256 (R) | 4 (S) | 4 (S) | 8 (R) | 8 (S) |
| 8461 | 32 (R) | 2 (S) | 32 (R) | 16 (R) | 8 (S) |
| 3614-2 | 512 (R) | 4 (S) | 8 (R) | 16 (R) | 4 (S) |
| 4315 | 128 (R) | 4 (S) | 4 (S) | 8 (R) | 8 (S) |
| 3995 | 128 (R) | 4 (S) | 0,5 (S) | 4 (R) | 4 (S) |
| 2738 | 32 (R) | 2 (S) | 2 (S) | 4 (R) | 8 (S) |
| 7932 | 128 (R) | 2 (S) | 32 (R) | 4 (R) | 4 (S) |
| 8919 | 128 (R) | 1 (S) | 2 (S) | 4 (R) | 16 (I) |
| 9228 | 128 (R) | 0,5 (S) | 4 (S) | 4 (R) | 4 (S) |
| 33 | 64 (R) | 4 (S) | 4 (S) | 4 (R) | 16 (I) |
| 1818 | 128 (R) | 1 (S) | 4 (S) | 4 (R) | 8 (S) |
| 2933 | 32 (R) | 0,5 (S) | 4 (S) | 4 (R) | 8 (S) |
| 3295 | 16 (R) | 4 (S) | 8 (R) | 1 (I) | 4 (S) |
| 3307 | 32 (R) | 4 (S) | 2 (S) | 0,25 (S) | 32 (R) |
| 3373 | 512 (R) | 4 (S) | 4 (S) | 32 (R) | 16 (I) |
| 3424 | >512 (R) | 4 (S) | 8 (R) | 16 (R) | 8 (S) |
| 3754 | 512 (R) | 4 (S) | 16 (R) | 16 (R) | 8 (S) |
| 7758 | 32 (R) | 4 (S) | 4 (S) | 2 (R) | 16 (I) |
| 2970 | 32 (R) | 2 (S) | 2 (S) | 4 (R) | 4 (S) |

CIM-concentração inibitória mínima; OXA-oxacilina; VA-vancomicina; MXF-moxifloxacina; LZD-linezolida; TEI-teicoplanina; R-resistente; S-sensível; I-resistência intermediária

Figura 4 - Pefil de resistência de amostras de *Staphylococcus haemolyticus* isoladas de hemoculturas - Concentração Inibitória Mínima (CIM) para oxacilina, vancomicina, linezolida, moxifloxacina e teicoplanina




## 4.4 **Genes relacionados com a produção de biofilme**

Os dados obtidos pelos ensaios de PCR para detecção da presença de genes, *icaA*, *fbp*, *atl* e *aap*, relacionados com a produção de biofilme, foram apresentados na tabela 5. Das 25 amostras de *S. haemolyticus*, 13 (52%) foram positivas e uma (3424) foi negativa para todos os genes avaliados. Quanto a presença de cada gene, foram positivas: 15 (60%) amostras para o gene *icaA*, 24 (96%) amostras para os genes *fbp* e *atl* e 19 (76%) amostras para o gene *aap*. Apenas a amostra 3424, foi negativa para os genes *fbp* e *atl*. Amostras exibindo perfis de resistência idênticos, apresentaram diferenças quanto a presença dos genes relacionados com a produção de biofilme. Foram observadas amostras *icaA*-negativas (n=2) e *icaA*-positivas (n=2) pertencentes ao perfil MDR-7. O mesmo resultado foi observado para as duas amostras que expressavam o perfil MDR-3. As amostras do perfil MDR-1 apresentaram-se *ica*A-negativa (n=1) e *icaA* e *aap*-negativa (n=1) enquanto as amostras do perfil MDR-6 foram *icaA* e *aap*-negativa (n=1) e positiva para todos os genes avaliados (n=1). As amostras do perfil MDR-11 foram *aap*-negativa (n=1) e negativa para todos os genes testados (n=1).

Tabela 5 – Detecção dos genes relacionados ao biofilme, *ica*A, *fbp*, *atl* e *aap* em amostras de *Staphylococcus haemolyticus* isolados de sangue

| Amostras | PRA | *icaA* | *fbp* | *atl* | *Aap* |
|---|---|---|---|---|---|
| 9524 | MDR-17 | + | + | + | + |
| 689 | MDR-5 | + | + | + | + |
| 2738 | MDR-9 | + | + | + | + |
| 8919 | MDR-13 | + | + | + | + |
| 9228 | MDR-4 | + | + | + | + |
| 2933 | MDR-12 | + | + | + | + |
| 3373 | MDR-6 | + | + | + | + |
| 7758 | MDR-2 | + | + | + | + |
| 4315 | MDR-10 | + | + | + | + |
| 1818 | MDR-7 | + | + | + | + |
| 5604 | MDR-7 | + | + | + | + |
| 2970 | MDR-14 | + | + | + | + |
| 3307 | MDR-15 | + | + | + | + |
| 3614-2 | MDR-3 | + | + | + | + |
| 8461 | MDR-11 | + | + | + | - |
| 3386 | MDR-7 | - | + | + | + |
| 3781 | MDR-7 | - | + | + | + |
| 3810 | MDR-13 | - | + | + | + |
| 3754 | MDR-1 | - | + | + | + |
| 6739 | MDR-3 | - | + | + | + |
| 7932 | MDR-1 | - | + | + | - |
| 33 | MDR-6 | - | + | + | - |
| 3295 | MDR-16 | - | + | + | - |
| 3995 | MDR-8 | - | + | + | - |
| 3424 | MDR-11 | - | - | - | - |

PRA-perfil de resistência aos antimicrobianos; MDR-multi-drug resistance; (-), negativo; (+), positivo.

## 4.5 **Produção de matrix extracelular (*slime*) em meio Ágar Vermelho do Congo na ausência e presença de antimicrobianos**

A morfologia colonial de matriz extracelular (*slime*) do biofilme no meio de CRA esta ilustrada na figura 5. Amostras produtoras de matrix exopolimérica apresentaram colônias de cor enegrecida com consistência seca.

Os resultados da capacidade de produção de matriz extracelular (*slime*) no meio CRA de 25 amostras MDR isoladas de sangue de *S. haemolyticus* estão demonstrados na tabela 6**.** Neste estudo, foi possível observar a relação entre a produção de matriz extracelular com a

positividade do teste do CRA para a maioria (72%) das amostras testadas. A produção de matriz extracelular não foi observada para sete amostras (28%). Nos ensaios realizados na presença de doses sub-letais dos antimicrobianos, 72% (n=18) das amostras continuaram a produzir matriz extracelular na presença de oxacilina, vancomicina, linezolida, moxifloxacina e teicoplanina. Entretanto, sete amostras *slime* negativa passaram a apresentar matriz extracelular na presença de alguns antimicrobianos: linezolida (8%, n=2), moxifloxacina (16%, n=4) e teicoplanina (8%, n=2).

Não foi observada correlação entre a capacidade produção de *slime* e os perfis de resistência aos antimicrobianos apresentados pelas amostras (MDR-1 a 17). Incluindo as quatro amostras MDR-7: *slime*-negativa (5604) e s*lime*-positivas (1818, 3386, 3781) na ausência e presença de antimicrobianos, respectivamente.

A análise da correlação entre a capacidade de produção de matriz extracelular e da presença de genes relacionados com a produção de biofilme demonstraram que 40% (n=10) das amostras produtoras de *slime* na ausência e presença de todos os antimicrobianos, também apresentaram todos os genes testados: *ica*A, *fbp*, *atl* e *aap*. Entretanto, foram observadas duas amostras (5604, 2970) não produtoras de *slime*, tanto na ausência quanto na presença de antimicrobianos que apresentaram todos os quatro genes testados que auxiliam a produção de biofilme. Por outro lado, uma amostra produtora de *slime*, tanto na ausência quanto na presença de antimicrobianos, não apresentou nenhum dos quatro genes relacionados com a produção de biofilme.

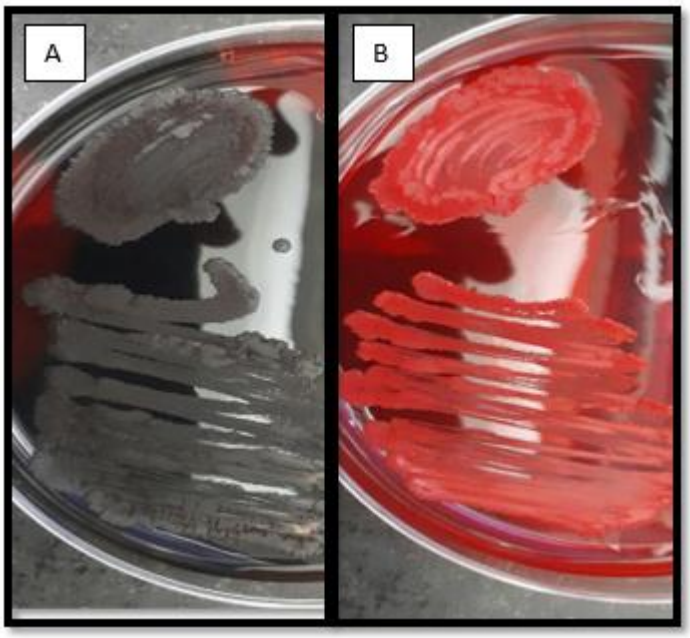
Dentre as 18 amostras de *S. haemolyticus* produtoras de *slime* na ausência e presença de todos os antimicrobianos, 100% foram *fbp* e *atl* positivas. Por outro lado, 44.45% (n=8) das amostras apresentaram-se desprovidas do gene *ica*A, incluindo três amostras que também foram *aap*-negativas. Das cinco amostras que passaram a produzir *slime* na presença de antimicrobianos (linezolida, moxifloxacina e/ou teicoplanina), todas foram *fbp* e *atl* positivas enquanto três foram positivas e duas negativas para o gene *ica*A. O gene *aap* foi detectado em três dessa cinco amostras: 3307, 3614-2 e 6739. A ausência de gene *aap* foi observada em uma amostra *ica*A-positiva (8461) e outra amostra *ica*A-negativa (3995).

Tabela 6 – Produção de *slime* no meio Vermelho do Congo por amostras de *Staphylococcus haemolyticus* isolados de sangue

| Amostras | Produção de *slime* no meio Vermelho do Congo | | | | | | Genes de biofilme | | | | PRA |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Controle | + ¼ da CIM Oxacilina | + ¼ da CIM Vancomicina | + ¼ da CIM Linezolida | + ¼ da CIM Moxifloxacina | + ¼ da CIM Teicoplanina | *icaA* | *fbp* | *atl* | *aap* | |
| 9524 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | MDR-17 |
| 689 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | MDR-5 |
| 2738 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | MDR-9 |
| 8919 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | MDR-13 |
| 9228 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | MDR-4 |
| 2933 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | MDR-12 |
| 3373 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | MDR-6 |
| 7758 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | MDR-2 |
| 4315 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | MDR-10 |
| 1818 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | MDR-7 |
| 3386 | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | MDR-7 |
| 3781 | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | MDR-7 |
| 3810 | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | MDR-13 |
| 3754 | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | MDR-1 |
| 7932 | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - | MDR-1 |
| 33 | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - | MDR-6 |
| 3295 | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - | MDR-16 |
| 3424 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | MDR-11 |
| 8461 | - | - | - | + | + | + | + | + | + | - | MDR-11 |
| 3307 | - | - | - | + | - | + | + | + | + | + | MDR-15 |
| 3614-2 | - | - | - | - | + | - | + | + | + | + | MDR-3 |
| 6739 | - | - | - | - | + | - | - | + | + | + | MDR-3 |
| 3995 | - | - | - | - | + | - | - | + | + | - | MDR-8 |
| 5604 | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | MDR-7 |
| 2970 | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | MDR-14 |

CIM-concentração inibitória mínima; PRA-perfil de resistência aos antimicrobianos; (+), positivo; (-), negativo.

Figura 5 - Representação ilustrativa da capacidade de produção de matriz exopolimérica (*slime*) em meio Vermelho do Congo de amostras de *S. haemolyticus* multirresistente aos agentes antimicrobianos e produtoras de biofilme em superfícies abióticas (vidro e poliestireno). Amostras MDR-7: (A) *slime*-positiva (3386/*ica*A-negativa) que exibiu colônias de cor enegrecida e consistência seca e (B) *slime*-negativa (5604/*ica*A-positiva) apresentando colônias vermelhas




## 4.6 **Produção de biofilme na superfície abiótica do vidro**

Os resultados da análise semi-quantitativa da capacidade da produção de biofilme na superfície hidrofílica do vidro de 25 amostras MDR isoladas de sangue de *S. haemolyticus*, estão demonstrados na tabela 7. A produção de biofilme foi observada para todas as amostras testadas, porém em intensidades variadas: 19 (76%) amostras apresentaram-se fortemente (+++) e seis (24%) fracamente (+) produtoras de biofilme.

Nos ensaios realizados na presença de doses sub-inibitórias dos antimicrobianos, 18 (72%) amostras apresentaram perfis idênticos tanto na ausência quanto na presença de oxacilina, vancomicina, linezolida, moxifloxacina e teicoplanina. Por outro lado, a presença de moxifloxacina influenciou a capacidade da produção de biofilme de sete (28%) amostras, enquanto a teicoplanina alterou esta habilidade de três (12%) amostras.

Na presença de moxifloxacina, cinco (20%) amostras fracamente produtoras de biofilme (perfil III +) passaram a expressar forte capacidade de formação de biofilme (perfil I +++). Três (12%) destas, apresentaram todos os genes testados: *ica*A, *fbp*, *atl* e *aap*, sendo duas *slime*-positivas e uma *slime*-negativa. Dentre duas amostras *slime*-negativas, foi observada a ausência de ambos os genes *ica*A e *aap* para a amostra 3995/MDR-8 (4%) e apenas do gene *ica*A para a amostra 6739/MDR-3 (4%). Adicionalmente, na presença de moxifloxacina, foi observada redução desta atividade para duas (8%) amostras fortemente produtoras de biofilme (perfil I +++), *slime*-positivas e providas de todos os genes relacionados com a produção de biofilme: 3373/MDR-6 (perfil II ++) e 9228/MDR-4 (perfil III +).

Na presença de doses sub-inibitórias de teicoplanina, todas as 25 amostras mantiveram-se capazes de produzir biofilme sendo a maioria em níveis idênticos ao controle. Apenas três amostras, mesmo apresentando os genes *ica*A, *fbp*, *atl* e *aap*, tiveram capacidade de produção alteradas. Aumento na produção de biofilme foi observado para as amostras 4315/MDR-10 e 3614-2/MDR-3, independente da capacidade de produção de *slime*.

Tabela 7 – Produção de biofilme na superfície abiótica do vidro (hidrofílica/carga positiva) na ausência e na presença de doses sub-letais (¼ da CIM) de agentes antimicrobianos de amostras de *Staphylococcus haemolyticus* isolados de sangue

| Amostras | PRA | Genes biofilme* | | *Slime* Meio Vermelho do Congo | Biofilme no Vidro | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | *ica*A | *aap* | | Controle | Oxa, Va ou Lzd | Moxifloxacina | Teicoplanina |
| 9524 | MDR-17 | + | + | + | I (+++) | I (+++) | I (+++) | I (+++) |
| 689 | MDR-5 | + | + | + | I (+++) | I (+++) | I (+++) | I (+++) |
| 8919 | MDR-13 | + | + | + | I (+++) | I (+++) | I (+++) | I (+++) |
| 1818 | MDR-7 | + | + | + | I (+++) | I (+++) | I (+++) | I (+++) |
| 2933 | MDR-12 | + | + | + | I (+++) | I (+++) | I (+++) | I (+++) |
| 7758 | MDR-2 | + | + | + | I (+++) | I (+++) | I (+++) | I (+++) |
| 5604 | MDR-7 | + | + | - | I (+++) | I (+++) | I (+++) | I (+++) |
| 3307 | MDR-15 | + | + | - | I (+++) | I (+++) | I (+++) | I (+++) |
| 2970 | MDR-14 | + | + | - | I (+++) | I (+++) | I (+++) | I (+++) |
| 3386 | MDR-7 | - | + | + | I (+++) | I (+++) | I (+++) | I (+++) |
| 3810 | MDR-13 | - | + | + | I (+++) | I (+++) | I (+++) | I (+++) |
| 3781 | MDR-7 | - | + | + | I (+++) | I (+++) | I (+++) | I (+++) |
| 7932 | MDR-1 | - | - | + | I (+++) | I (+++) | I (+++) | I (+++) |
| 33 | MDR-6 | - | - | + | I (+++) | I (+++) | I (+++) | I (+++) |
| 3295 | MDR-16 | - | - | + | I (+++) | I (+++) | I (+++) | I (+++) |
| 3424 | MDR-11 | - | - | + | I (+++) | I (+++) | I (+++) | I (+++) |
| 3754 | MDR-1 | - | + | + | I (+++) | I (+++) | I (+++) | I (+++) |
| 3373 | MDR-6 | + | + | + | I (+++) | I (+++) | II (++) | I (+++) |
| 9228 | MDR-4 | + | + | + | I (+++) | I (+++) | III (+) | III (+) |
| 4315 | MDR-10 | + | + | + | III (+) | III (+) | I (+++) | I (+++) |
| 3614-2 | MDR-3 | + | + | - | III (+) | III (+) | I (+++) | I (+++) |
| 2738 | MDR-9 | + | + | + | III (+) | III (+) | I (+++) | III (+) |
| 6739 | MDR-3 | - | + | - | III (+) | III (+) | I (+++) | III (+) |
| 3995 | MDR-8 | - | - | - | III (+) | III (+) | I (+++) | III (+) |
| 8461 | MDR-11 | + | - | - | III (+) | III (+) | III (+) | III (+) |

Para *slime*: (-), negativo; (+), positivo.
Oxa-oxacilina; Va-vancomicina; Lzd-linezolida.
Para aderência ao vidro; I (+++) - bactérias aderidas nas laterais do tubo de vidro e na interface entre o meio de cultura e o ar – fortemente aderente; II (++) - bactérias aderidas nas laterais do tubo de vidro – moderadamente aderente; III (+) – bactérias formando um anel na interface entre o meio de cultura e o ar – fracamente aderente; e IV (-) ausência de bactérias aderidas – não aderente.
*Todas as amostras foram *fbp* e *atl* positivas, exceto a amostra 3424.

## 4.7 **Produção de biofilme na superfície abiótica de poliestireno**

Os resultados da capacidade da produção de biofilme na superfície de poliestireno de 25 amostras MDR isoladas de sangue de *S. haemolyticus*, estão demonstrados na tabela 8.

As maioria das amostras amostras formaram biofilme nesse substrato de natureza hidrofóbica, porém em número e intensidades variadas: fortemente (n=6), moderadamente (n=10), fracamente (n=6) e não formadoras de biofilme (n=3). Dentre as amostras fortemente aderentes, todas apresentaram resultados positivos para *slime* e genes *aap*, *fbp* e *atl*. A maioria (n=5) também mostrou-se *ica*A-positiva. A amostra *ica*A-negativa 3386/MDR-7 foi capaz de produzir *slime* e biofilme em intensidade elevada (+++) tanto no vidro quanto no poliestireno. A amostra 2738/MDR-9 foi fracamente produtora de biofilme no vidro (III +) apesar de produzir *slime* e ser fortemente aderente ao poliestireno e apresentar todos os genes testados. Na presença de doses sub-inibitórias dos antimicrobianos testados, todas as seis amostras mantiveram-se capazes de produzir biofilme, sendo a maioria em níveis idênticos ao controle (+++), exceto na presença de linezolida (++) e teicoplanina (++).

Os resultados demonstraram que três amostras incapazes de produzir biofilme no poliestireno foram fracamente aderentes ao vidro (III +), independente da presença dos genes *ica*A e *aap* e da capacidade de produção de *slime*. Embora em intensidade fraca (+), após de 24h de incubação, passaram a formar biofilme no poliestireno na presença de linezolida, moxifloxacina ou teicoplanina.

A maioria (n=16) das amostras estudadas, foi moderadamente (n=10) ou fracamente (n=6) aderentes ao poliestireno não tendo sido observada correlação com a presença dos genes *ica*A e *aap*, capacidade de produção de *slime* e de aderência ao vidro. Na presença de doses sub-inibitórias dos antimicrobianos testados, todas as amostras mantiveram-se capazes de produzir biofilme, sendo a maioria em níveis idênticos ao controle (+++), inclusive oxacilina e vancomicina. O aumento na produção de biofilme foi observado na presença de linezolida (n=3), moxifloxacina (n=5) e teicoplanina (n=1).

Tabela 8 – Produção de biofilme em superfície abiótica de poliestireno (hidrofóbica/carga negativa) na ausência e na presença de doses sub-letais (¼ da CIM) de agentes antimicrobianos de amostras de *Staphylococcus haemolyticus* isolados de sangue

| Amostras | PRA | Genes biofilme* | | *Slime* Meio Vermelho do Congo | Biofilme no Vidro | Biofilme no Poliestireno | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | *ica*A | *aap* | | | Controle | Oxa ou Va | Linezolida | Moxifloxacina | Teicoplanina |
| 1818 | MDR-7 | + | + | + | I (+++) | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ |
| 9524 | MDR-17 | + | + | + | I (+++) | +++ | +++ | ++ | +++ | ++ |
| 3386 | MDR-7 | - | + | + | I (+++) | +++ | +++ | ++ | +++ | ++ |
| 689 | MDR-5 | + | + | + | I (+++) | +++ | +++ | ++ | +++ | ++ |
| 8919 | MDR-13 | + | + | + | I (+++) | +++ | +++ | ++ | +++ | ++ |
| 2738 | MDR-9 | + | + | + | III (+) | +++ | +++ | ++ | +++ | ++ |
| 2933 | MDR-12 | + | + | + | I (+++) | ++ | ++ | ++ | +++ | + |
| 6739 | MDR-3 | - | + | - | III (+) | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 7758 | MDR-2 | + | + | + | I (+++) | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 7932 | MDR-1 | - | - | + | I (+++) | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 3754 | MDR-1 | - | + | + | I (+++) | ++ | ++ | ++ | ++ | + |
| 3810 | MDR-13 | - | + | + | I (+++) | ++ | ++ | ++ | ++ | + |
| 5604 | MDR-7 | + | + | - | I (+++) | ++ | ++ | ++ | ++ | + |
| 3424 | MDR-11 | - | - | + | I (+++) | ++ | ++ | ++ | + | ++ |
| 2970 | MDR-14 | + | + | - | I (+++) | ++ | ++ | + | ++ | ++ |
| 3373 | MDR-6 | + | + | + | I (+++) | ++ | ++ | + | ++ | ++ |
| 3614-2 | MDR-3 | + | + | - | III (+) | + | + | ++ | ++ | + |
| 9228 | MDR-4 | + | + | + | I (+++) | + | + | ++ | ++ | + |
| 3307 | MDR-15 | + | + | - | I (+++) | + | + | ++ | + | ++ |
| 3781 | MDR-7 | - | + | + | I (+++) | + | + | + | ++ | + |
| 33 | MDR-6 | - | - | + | I (+++) | + | + | + | ++ | + |
| 3295 | MDR-16 | - | - | + | I (+++) | + | + | + | + | + |
| 8461 | MDR-11 | + | - | - | III (+) | - | - | + | + | + |
| 4315 | MDR-10 | + | + | + | III (+) | - | - | + | + | + |
| 3995 | MDR-8 | - | - | - | III (+) | - | - | + | + | + |

PRA-perfil de resistência aos antimicrobianos.
Para *slime*: (-), negativo; (+), positivo.
Oxa-oxacilina; Va-vancomicina
Para aderência ao vidro; I (+++) - bactérias aderidas nas laterais do tubo de vidro e na interface entre o meio de cultura e o ar - fortemente aderente; III (+) – bactérias formando um anel na interface entre o meio de cultura e o ar - fracamente aderente.
Para aderência ao poliestireno: (-), não aderente; (+), fracamente aderente; (++), moderadamente aderente; (+++), fortemente aderente.
*Todas as amostras foram *fbp* e *atl* positivas, exceto a amostra 3424.

## 4.8 **Influência de enzimas exógenas em biofilmes pré-formados em superfície de poliestireno**

Os dados do tratamento com Proteinase K e DNAse I de biofilme pré-formados de amostras de *S. haemolyticus* apresentando diferentes perfis fenotípicos e genotípicos foram descritos na tabela 9.

A maioria das amostras (n=19) mostrou-se fortemente produtora de biofilme na superfície hidrofílica do vidro e capaz de aderir ao poliestireno de natureza hidrofóbica em intensidades variadas: fortemente (n=5) e moderadamente/fracamente (n=14). Por outro lado, foram observadas seis amostras fracamente aderentes ao vidro, sendo 50% não produtora e 50% capaz de produzir biofilme no poliestireno em intensidades variadas, incluindo a amostra 2378/MDR-9 que foi fortemente (+++) aderente ao poliestireno.

Todas as amostras fortemente aderentes ao vidro e ao poliestireno também expressaram capacidade de produção de *slime* no meio Vermelho do Congo e apresentavam os genes codificadores de biofilme (*ica*A, *aap*, *fbp* e *atl*), exceto a amostra 3386 MDR-7 *ica*A-negativa. Para esse grupo de amostras, o tratamento com Proteinase K e com DNAse I reduziram a intensidade do biofilme formado em diferentes níveis. Quando comparada ao controle, os tratamentos enzimáticos não permitiram a detecção de biofilme em três amostras: proteinase K/DNAse I (n=2) e DNAse I (n=1). Os dados indicaram que a capacidade de produção de biofilme no vidro e no poliestireno não estão diretamente relacionados com a presença do gene *ica*A e que estruturas proteicas e DNA parecem contribuir para este processo de formas variadas.

O tratamento pela Proteinase K inibiu parcialmente ou totalmente a produção de biofilme no poliestireno das 23 amostras (92%) e as amostras 7932/MDR-1 e 8461/MDR-11 passaram a apresentar níveis mais elevados de biofilme. O mesmo foi observado para o tratamento com a DNAse I, no qual níveis mais elevados de biofilme foram detectados em seis amostras (2933/MDR-12; 5604/MDR-7; 7932/MDR-1; 3307/MDR-15; 3995/MDR-8 e 3995/MDR-8), enquanto níveis inalterados, quando comparados aos controles, foram observados em seis oportunidades tanto para amostras biofilme-positivas (n=5) (2933/MDR-12; 5604/MDR-7; 3295/MDR-16; 9228/MDR-4; 3614-2/MDR-3) quanto para amostras biofilme-negativa (n=1) (4315/MDR-10).

Tabela 9 – Influência do tratamento com Proteinase K e DNAse I em biofilmes formados em superfície abiótica de poliestireno (hidrofóbica/carga negativa) de amostras de *Staphylococcus haemolyticus* isolados de pacientes com infecções hematogênicas

| Amostras | PRA | Genes biofilme* | | *Slime* Meio Vermelho do Congo | Biofilme em superfícies abióticas | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | *ica*A | *aap* | | Vidro (hidrofílico) | Poliestireno (hidrofóbico) | | |
| | | | | | | Controle | PTN K | DNAse I |
| 3386 | MDR-7 | - | + | + | I (+++) | +++ | ++ | + |
| 9524 | MDR-17 | + | + | + | I (+++) | +++ | + | + |
| 8919 | MDR-13 | + | + | + | I (+++) | +++ | + | - |
| 1818 | MDR-7 | + | + | + | I (+++) | +++ | - | - |
| 689 | MDR-5 | + | + | + | I (+++) | +++ | - | - |
| 2933 | MDR-12 | + | + | + | I (+++) | ++ | + | ++ |
| 5604 | MDR-7 | + | + | - | I (+++) | ++ | + | ++ |
| 2970 | MDR-14 | + | + | - | I (+++) | ++ | + | + |
| 3810 | MDR-13 | - | + | + | I (+++) | ++ | + | + |
| 7758 | MDR-2 | + | + | + | I (+++) | ++ | - | - |
| 3373 | MDR-6 | + | + | + | I (+++) | ++ | - | - |
| 3424 | MDR-11 | - | - | + | I (+++) | ++ | - | - |
| 3754 | MDR-1 | - | + | + | I (+++) | ++ | - | - |
| 7932 | MDR-1 | - | - | + | I (+++) | + | ++ | ++ |
| 3307 | MDR-15 | + | + | - | I (+++) | + | + | ++ |
| 3295 | MDR-16 | - | - | + | I (+++) | + | + | + |
| 9228 | MDR-4 | + | + | + | I (+++) | + | + | - |
| 33 | MDR-6 | - | - | + | I (+++) | + | - | + |
| 3781 | MDR-7 | - | + | + | I (+++) | + | - | - |
| 2738 | MDR-9 | + | + | + | III (+) | +++ | + | + |
| 6739 | MDR-3 | - | + | - | III (+) | ++ | + | + |
| 3614-2 | MDR-3 | + | + | - | III (+) | + | - | + |
| 8461 | MDR-11 | + | - | - | III (+) | - | + | + |
| 3995 | MDR-8 | - | - | - | III (+) | - | - | + |
| 4315 | MDR-10 | + | + | + | III (+) | - | - | - |

PRA-perfil de resistência aos antimicrobianos.
Para *slime*: (-), negativo; (+), positivo.
PTN K-proteinase K.
Para aderência ao vidro; I (+++) - bactérias aderidas nas laterais do tubo de vidro e na interface entre o meio de cultura e o ar - fortemente aderente; III (+) – bactérias formando um anel na interface entre o meio de cultura e o ar - fracamente aderente.
Para aderência ao poliestireno: (-), não aderente; (+), fracamente aderente; (++), moderadamente aderente; (+++), fortemente aderente.
*Todas as amostras foram *fbp* e *atl* positivas, exceto a amostra 3424.

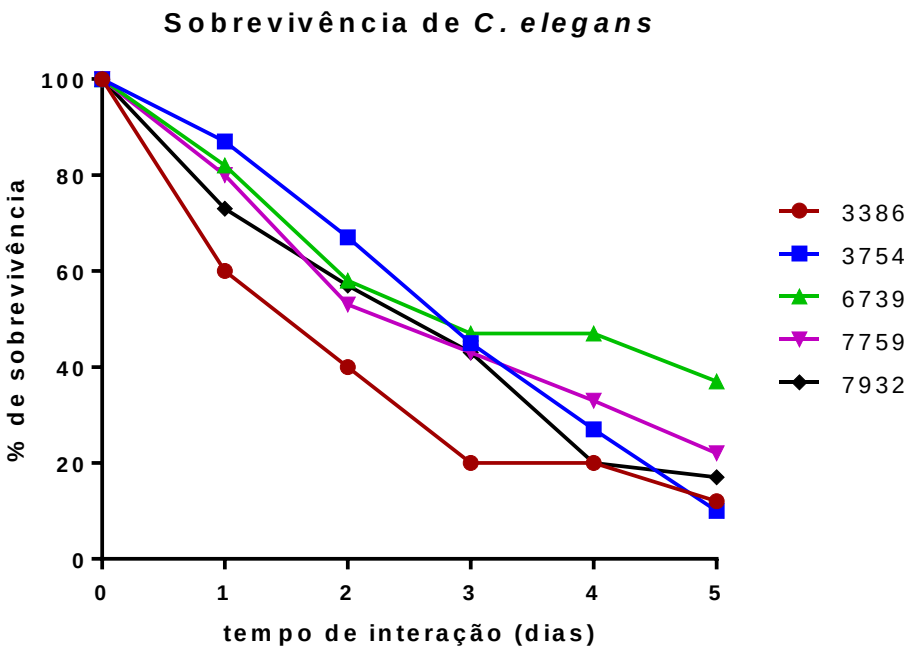
## 4.9 **Potencial de virulência de *S. haemolyticus* isoladas de sangue empregando *Caenorhabdtis elegans* como modelo de infecção**

Os resultados dos ensaios de infecção em *C. elegans* com amostras de *S. haemolyticus* isoladas de sangue estão apresentados na figura 6. Cinco amostras apresentando biotipos variados (tabela 8) foram submetidas ao processo de infecção de nematódeos: *ica*A-positiva 7758/MDR-2 e *ica*A-negativas 3386/MDR-7, 3754/MDR-1, 6739/MDR-3 e 7932/MDR-1. Até cinco dias pós infecção, todas as amostras foram capazes de causar a morte de nematódeos, porém em intensidades variadas e crescentes, em relação ao tempo de infecção. A mortalidade dos vermes passou a ser observada a partir do primeiro dia de infecção (13,33% a 40%). No quinto dia de infecção, os percentuais de mortalidade dos vermes variaram de 63,33% até 90%. Não foi observado 100% de mortalidade dos nematódeos para nenhuma das cinco amostras estudadas.

Os maiores níveis de mortalidade de vermes foram observados para as amostras 3386/MDR-7 (88,33%) e 3754/MDR-1 (90%). Para a amostra 3386 foram apresentadas as menores taxas de sobrevivência dos nematódeos a partir do primeiro dia de infecção. No quinto dia de infecção, o percentual mais elevado de sobrevivência dos vermes, foi observado para a amostra 6739/MDR-3 (36,67%) indicando, portanto, um menor potencial de virulência para *C. elegans* quando comparada as demais amostras de *S haemolyticus* testadas ($P < 0,05$).

A amostra (6739/MDR-3) que exibiu menor potencial de virulência para *C. elegans*, também mostrou-se fracamente produtora de biofilme no vidro, *slime* e *ica*A-negativas. As amostras (3754/MDR-1 > 3386/MDR-7 > 7932/MDR-1) que exibiram maiores potenciais de virulência para os nematódeos (>80%) também foram *ica*A-negativas, *slime*-positivas e fortemente aderentes ao vidro. Deste modo a patogenicidade de *S. haemolyticus* para *C. elegans* pareceu não se correlacionar com a presença do gene *ica*A uma vez que a amostra *ica*A e *slime*-positiva (7758/MDR-2) foi menos virulenta (78,33%) do que a maioria das amostras *ica*A-negativas.

Figura 6 - Sobrevivência de *C. elegans* após cinco dias de infecção frente a cinco amostras de *S. haemolyticus* isoladas de sangue. Todas as amostras foram capazes de causar a morte de nematódeos em intensidades variadas e crescentes, em relação ao tempo de infecção. As amostras 3386/MDR-7 e 3754/MDR-1, apresentaram as maiores taxas de mortalidade (88,33% e 90%, respectivamente)



# 5 **DISCUSSÃO**

Até a década de 1970, os SCN eram desprezados como meros contaminantes nos exames microbiológicos por serem considerados somente parte da microbiota normal da pele de seres humanos. Atualmente, já são reconhecidos como agentes etiológicos, em crescente incidência, causando doenças clinicamente significativas. *Staphylococcus* é considerado o agente etiológico mais frequente em casos de IRAS no Brasil e no mundo e sua versatilidade em adquirir genes de virulência e de resistência lhes confere inegável habilidade para desenvolver infecções de gravidades variáveis (SILVA et al., 2013; PEREIRA, 2018).

No presente estudo, foi documentado a presença de várias espécies de SCN frequentemente relacionadas às IRAS de pacientes internados em diversos setores do HUPE/UERJ. Realizada a confirmação das espécies pela técnica do MALDI-TOF, observou-se que das 100 amostras isoladas de sangue, 25% (25/100) foram identificadas como *S. haemolyticus.* Segundo diversos autores, *S. haemolyticus* tem sido responsável por 5-38% dos casos de infecções causadas por SCN além de serem uma importante causa de infecções da corrente sanguínea (TABE et al., 1998; RODRIGEZ et al., 2009; SILVA et al., 2013). Dubois et al (2010) observaram que 99,3% de suas amostras foram identificadas até o nível de espécie pela técnica de MALDI-TOF, além de sugerir que a ténica é melhor para identificação de cepas estafilocócicas que raramente são identificadas por métodos semi-automatizados ou métodos bioquímicos. Além disso, a preparação da amostra é mais fácil, existe uma economia de tempo e a aquisição dos resultados é mais rápida.

A dificuldade de identificação de *S. haemolyticus* pelo Sistema Vitek 2 foi previamente observada por outros autores (DE PAULIS et al., 2003; NUNES et al., 2007; PEREIRA, 2018). Nos últimos anos, o MALDI-TOF se tornou um método importante para identificação de bactérias. Esta abordagem baseia-se na comparação do espectro de massa de um micro-organismo desconhecido com os espectros conhecidos de micro-organismos armazenados em base de dados. Isso resultou em um acúmulo de um grande número de espectros de diferentes micro-organismos (KORNIENKO et al., 2016).

O fenômeno da resistência a antimicrobianos é conhecido a mais de 50 anos. Patógenos nosocomiais podem permanecer viáveis ou persistir em superfícies abióticas e bióticas por meses e, portanto, são fontes contínuas de transmissão em ambientes de saúde. A eliminação das fontes e transmissão dos patógenos nosocomiais continua sendo um desafio.

Os procedimentos de limpeza incompletos para equipamentos e quartos facilitam a transmissão de bactérias multirresistentes de um paciente para outro (PEREIRA, 2018).

Todas as amostras estudadas foram multirresistentes, permitindo identificar 17 perfis diferentes (MDR-1 até MDR-17). Na literatura, encontramos estudos nos quais foram observados dados que corroboram com os nossos. LI et al (2013) e SILVA et al (2013) observaram que 90% e 92,6%, respectivamente, de suas amostras foram multirresistentes. Entrentato, discordando dos nossos achados, MERTENS & GHEBREMEDHIN (2013) informaram que apenas 15,5% das suas amostras foram multirresistentes. A presença de várias amostras multirresistentes, particularmente de *S. haemolyticus*, pode estar favorecendo a transferência de genes de resistência no ambiente hospitalar.

O uso de antimicrobianos tem se tornado muito frequente e como consequência, cresce constantemente a resistência aos mesmos. Estamos frente a um grande desafio, a mais urgente racionalização do uso de antimicrobianos. A oxacilina é uma opção para o tratamento de infecções por SCN, contudo, a resistência a este antimicrobiano tem se tornado um grande problema nas últimas décadas (PAIVA et al., 2010). Nossos dados demonstraram que todas as amostras foram oxacilina-resistentes, sendo que 96% (24/25) apresentaram CIMs ≥ 32µg/ml. MARTINS et al (2013), observaram que 43,7% das suas amostras *S. haemolyticus* oxacilina-resistentes apresentaram CIMs ≥ 32µg/ml.

O surgimento de cepas de SCN com sensibilidade diminuída à vancomicina e teicoplanina tem sido descrito em instituições de saúde, podendo contribuir para o aumento da resistência a vários outros antimicrobianos. Já foi descrito na literatura uma prevalência muito elevada de genes que codificam resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos e aminoglicosídeos, bem como uma proporção significativa de isolados com CIMs de vancomicina próximas do ponto definido para a resistência (FREDHEIM et al., 2009).

Nossas amostras de *S. haemolyticus* apresentaram, na sua totalidade, sensibilidade a vancomicina, com 52% das amostras apresentando CIMs ≥ 4µg/ml. MARTINS et al (2013), observaram que 12,5% das suas amostras *S. haemolyticus* vancomicina-sensíveis apresentaram CIMs ≥ 4 µg/ml. Das 25 amostras de *S. haemolyticus*, apenas uma (4%) foi resistente e cinco (20%) apresentaram-se intermediárias a teicoplanina. KRISTOF et al (2011) observaram em seu estudo, uma incidência de 32% de sensibilidade reduzida a teicoplanina em cepas de *S. haemolyticus*.

RAJAN, PRAKASH E GOPAL (2017) observaram em seu estudo, na Índia, no período de 2013-2014, que as quatro amostras de *S. haemolyticus* estudadas eram

resistentes a linezolida com CIMs ≥ 256 µg/ml. Em nosso estudo, com amostras do mesmo período, apenas 32% foram linezolida-resistentes e apenas 12% das amostra apresentaram CIM ≥ 32 µg/ml. Corroborando nossos achados, CHAMON et al (2014) demonstraram que suas 10 amostras linezolida-resistentes não apresentaram CIM ≥ 16 µg/ml.

Já para moxifloxacina, 88% das amostras foram resistentes. Em discordância com nossos achados, PEDROSO et al (2018) descreveram que apenas 32% de suas amostras foram moxifloxacina-resistentes.

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

Foi demonstrado que o método do Ágar vermelho do Congo (CRA) tem baixo rigor na detecção da produção de *slime,* porém é mais barato e fácil de realizar, e seu critério de avaliação é baseado na análise visual da cor das colônias, que variam de vermelho para amostras não produtoras de *slime* e preto para amostras produtoras de *slime* (KAISER et al., 2013).

Observamos em nosso estudo que, foram positivas para a produção de *slime* 72% das amostras de *S. haemolyticus* tanto na ausência de antimicrobianos, quanto na presença de oxacilina ou vancomicina, 88% das amostras na presença de moxifloxacina e 80% das amostras e na presença de linezolida ou teicoplanina.

Corroborando nossos achados, SENG et al (2017) descreveram que 90,8% de suas amostram foram *slime*-positivas. Na presença de oxacilina ou vancomicina, SUED et al (2017), descreveram que 66,7% das amostras de *S. haemolyticus* foram positivas para a produção de *slime* e que não houve mudança de perfil na presença dos antimicrobianos, corroborando com nossos dados. E na presença de vancomicina, encontramos na literatura, o estudo de KAISER et al (2013), em que os autores descreveram que 57,1% de suas amostras de *S. epidermidis* produziram *slime* na presença de vancomicina.

Segundo KAISER et al (2013), estudos demonstram opiniões controversas a respeito da vancomicina. Alguns acreditam que a vancomicina não tem nenhum efeito

inibidor sobre a formação de biofilme e outros estudos acreditam que a presença de vancomicina com concentrações sub-CIM, ou mesmo em concentrações mais elevadas (8µg/ml), induz a formação de biofilme. Acreditamos então, que a presença de antimicrobianos no meio, pode agir como um fator de estresse, de duas formas distintas: induzindo o micro-organismo a produzir o *slime* para proteção (gerando uma diminuição da sensibilidade ao antimicrobiano) ou agindo como um inibidor de *slime*.

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

Observamos que a maioria (76%) das amostras de *S. haemolyticus*, aderiram fortemente ao vidro e que 24% aderiram fortemente ao poliestireno na ausência de antimicrobianos. PEREIRA et al (2014) observaram em seu estudo que 87% e 97% de suas amostras aderiram ao vidro e ao poliestireno, respectivamente e SENG et al (2017) descrevem que 26% de suas amostras adereriram fortemente ao poliestireno. Em desacordo com nossos achados, PINHEIRO et al (2016) observaram que apenas uma amostra de *S. haemolyticus* foi fortemente aderente ao poliestireno. Na presença de oxacilina e vancomicina, os perfis se mantiveram idênticos tanto na formação de biofilme no vidro quanto no poliestireno. SUED et al (2017) descreveram que para aderência ao vidro, 84% das amostras e  para o poliestireno 67% das amostras, apresentaram o mesmo perfil tanto na presença de oxacilina quanto na presença de vancomicina. Não há estudos na literatura a respeito da avaliação da produção de *slime*, aderência ao vidro ou produção de biofilme no poliestireno na presença de linezolida, moxifloxacina ou teicoplanina com amostras de *S. haemolyticus*.

Segundo HONG et al. (2016), a presença do gene *ica* pode explicar o papel dos vários mecanismos de adesão na patogênese da infecção. No entanto, alguns estudos não encontraram associação entre a detecção do gene *ica* e a formação de biofilmes. Além do *ica*, outros genes vêm sendo citados como importantes na produção de biofilme. Dentre esses genes incluem-se os genes *aap* e *atl*. Tais elementos genéticos parecem estar envolvidos no

acúmulo de biofilme sob superfícies de polímeros e na capacidade de ligação específica a estas superfícies, respectivamente. Além deles, o gene *fbp* responsável pela síntese da proteína ligadora de fibrinogênio parece ser um importante fator de virulência em infecções causadas por *Staphylococcus*, pois esta não se liga apenas ao fibrinogênio, mas também pode interferir com a agregação de plaquetas e a cascata do complemento dentro do hospedeiro.

A presença de genes *ica*A nem sempre foi associada à formação de biofilme *in vitro*. Nosso estudo demonstrou que apesar de 60% das amostras serem *ica*A-positivas, 32% não demonstrou associação da formação de biofilme com a presença do gene *ica*. PEREIRA (2018), informou que 32.2% das amostras de neonatos e 62,8% de adultos não associaram a presença do gene *ica* com a formação de biofilme *in vitro*.

Em nosso estudo, o gene *atl* e o gene *fbp* foram encontrados em 96% dos isolados de *S. haemolyticus* e 76% das amostras apresentaram o gene *aap*. Foram positivas para todos os genes, 52% das amostras e apenas uma (4%) foi negativa para todos os genes. KLINGENBERG et al (2005) verificaram em seus estudos que 17% das cepas não produtoras de biofilme analisadas apresentavam os genes *ica*, *atl* e *aap* sugerindo que outros fatores estariam também envolvidos na produção do biofilme. O gene *fbp* foi detectado em 5,66% das amostras no estudo de SERRAY et al (2016) e no estudo de PEREIRA (2018) este gene foi detectado em 87% das amostras neonatais e 97% das amostras de adultos. Os dados enfatizaram que a formação de biofilmes por algumas cepas de *S. haemolyticus* pode ser independente da presença do gene *ica*, onde uma compreensão mais profunda dos mecanismos de formação de biofilmes poderia melhorar as estratégias de controle dos mesmos.

O tratamento pela Proteinase K e DNAse I inibiu parcialmente ou totalmente a produção de biofilme no poliestireno de 92% e 60% de nossas amostras, respectivamente. A Proteinase K degrada proteínas e a DNAse I pode degradar o DNA extracelular, desestabilizando o biofilme. SHUKLA & RAO (2017), descreveram que a Proteinase K diminiu significativamente o crescimento do biofilme na maioria dos isolados de *S. aureus* e para duas amostras fracamente produtoras de biofilme, não houve inibição significativa da formação do bioilme na presença da Proteinase K. Tanto XU et al (2015) quanto TETZ & TETZ (2010), observaram que a exposição a DNAse I diminuiu significativamente a formação de biofilme de amostras de *S. aureus*.

*C. elegans* é um nematóide de vida livre, considerado um organismo modelo por possuir um curto ciclo de vida e ter todo o genoma sequenciado. Observamos que todas as amostras foram capazes de causar a morte *C. elegans*, porém em intensidades variadas, em

relação ao tempo de infecção. Corroborando nossos estudos, BEGUN et al (2007) e SIFRI et al (2003) descrevem que suas amostras de *S. epidermidis* e *S. aureus* respectivamente, foram capazes de matar os nematóides. Também em acordo com nossos achados, ANTUNES et al (2016), observaram que suas amostras de três espécies de *Corynebacterium* foram capazes de matar os vermes em intensidades variadas.

Segundo BINATTI et al (2015), um aspecto de grande importância se refere à questão da pressão seletiva no ambiente hospitalar que atua como crivo para essas supostas vantagens microbianas que favoreceriam a persistência e circulação no ambiente hospitalar, sendo que a resistência é a maior garantia de persistência. Podemos reconhecer que, condições iniciais de vantagem competitiva no ambiente deem margem à ocorrência de transferência/aquisição de genes, tanto de resistência quanto de patogenicidade.

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

Tanto os mecanismos específicos de resistência aos antimicrobianos, como também a superação de barreiras protetoras, como biofilmes bacterianos, precisam ser considerados para o desenvolvimento de novas terapias antibacterianas. O reconhecimento de *S. haemolyticus* como agentes patogênicos nosocomiais tem estimulado pesquisas envolvendo o desenvolvimento de métodos mais precisos para sua identificação e caracterização molecular, bem como o estudo de fatores de virulência e também o estabelecimento de critérios rigorosos para discriminar casos de infecção (De PAULIS et al., 2003; PEREIRA, 2018).

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitiriam as seguintes conclusões.

*S. haemolyticus* são encontrados como espécie predominantemente isolada de pacientes com infecções hematogênicas atendidos em diferentes setores de unidades hospitalares localizadas em regiões metropolitanas de países em desenvolvimento, incluindo Rio de Janeiro, Brasil. A técnica molecular de MALDI-TOF exibe maior eficácia na identificação da espécie *S. haemolyticus* do que o método semi-automatizado (VITEK-2), além da vantagem de fornecer uma identificação fidedigna e resultados rápidos, obtidos em apenas alguns minutos e utilizando uma pequena quantidade de inóculo.

Amostras de *S. haemolyticus* relacionadas com infecções hematogênicas são oxacilina-resistentes e expressam diferentes perfis MDR. As amostras isoladas de sangue expressam resistência a agentes antimicrobianos de última escolha empregados no tratamento de infecções estafilocócicas, incluindo: moxifloxacina, linezolida e teicoplanina. A presença de genes relacionados com a produção de biofilme - *icaA, aap, fbp* e *atl* - foi observada em amostras de *S. haemolyticus* relacionadas com infecções hematogênicas pertencentes a diferentes perfis MDR embora esses quadros clínicos também possam estar relacionados com amostras MDR de *S. haemolyticus* desprovidas desses genes. A correlação entre a presença desses genes, capacidade de produção de *slime*, formação de biofilme no vidro e no poliestireno pode não ocorrer em amostras *S. haemolyticus* MDR isoladas destas infecções.

Amostras de *S. haemolyticus* isoladas de infecções hematogênicas apresentam diversidade quanto a capacidade de formação de *slime* e produção de biofilme em superfícies abióticas hidrofílicas, como o vidro, e hidrofóbicas, como o poliestireno. Amostras *S. haemolyticus* MDR isoladas de infecções hematogênicas podem ser *icaA*-independentes e capazes de expressar capacidade de formação de *slime*, biofilme no vidro e/ou no poliestireno. Relação entre a produção de matriz extracelular com a positividade do teste do CRA foi observada em amostras de diferentes biótipos. Entretanto, a produção de matriz extracelular foi negativa em algumas oportunidades. Diversas amostras produziram matriz extracelular na presença de doses sub-inibitórias dos antimicrobianos oxacilina, vancomicina, linezolida, moxifloxacina e teicoplanina. A presença de moxifloxacina aumentou a capacidade da produção de biofilme de algumas amostras *slime*-positivas e uma *slime*-negativas apresentando genes *ica*A, *fbp*, *atl* e *aap*. Por outro lado, na presença de moxifloxacina, ocorreu redução desta atividade para algumas amostras fortemente produtoras de biofilme,

*slime*-positivas e providas de todos os genes relacionados com a produção de biofilme. Na presença de teicoplanina algumas amostras permanecem com a produção de biofilme inalteradas e outras apresentaram aumento na produção de biofilme, independente da capacidade de produção de *slime*.

O tratamento com enzimas exógenas proteinase K e DNAse aumentaram, reduziram, inibiram ou mantiveram inalteradas, as intensidades de biofilmes pré-formados em superfície de poliestireno. A capacidade de produção de biofilme no vidro e no poliestireno de amostras *S. haemolyticus* isoladas de infecções hematogênicas não estão diretamente relacionados com a presença do gene *ica*A e que estruturas proteicas e DNA parecem contribuir para este processo de formas variadas. Amostras de *S. haemolyticus* de diferentes perfis fenotípicos e genotípicos isoladas de infecções hematogênicas são capazes de causar a morte de nematódeos, porém em intensidades variadas e crescentes, em relação ao tempo de infecção. A patogenicidade de *S. haemolyticus* para *C. elegans* pareceu não correlacionar com o perfil de resistência aos agentes antimicrobianos, a presença do gene *ica*A, a produção de *slime* e de biofilme no poliestireno.

Deste modo, o aumento no número de casos de infecções e os aspectos multifatoriais que favorecem a patogenicidade de *S. haemolyticus* devem continuar sendo investigados, uma vez que, a disseminação de micro-organismos multirresistentes no ambiente hospitalar, têm se tornado um crescente desafio para a saúde pública.

## REFERÊNCIAS


ANKENY, R.A. The natural history of *Caenorhabditis elegans* research. *Nature Reviews Genetics*, v. 2, 2001.

ANTUNES, A.L.S.; PEREZ, L.R.R.; REITER, K.C.; SECHHI, C.; FREITAS, A.L.P. Detecção da produção de biofilme em *Staphylococcus* spp. por Ágar Congo Red. *Revista de Saúde da UCPEL*, v. 1, nº. 1, 2007.

ANTUNES, A.L.S.; BONFANTI, J.W.; PEREZ, L.R.R.; PINTO, C.C.F.; FREITAS, A.L.P.; MACEDO, A.J.; BARTH, A.L. High vancomycin resistance among biofilms produced by *Staphylococcus* species isolated from central venous catheters. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, v. 106, nº. 1, 2011.

ANTUNES, C.A.; CLARK, L.; WANUSKE, M.T.; OTT, L.; SIMPSON-LOUREDO, L.; DE LUNA, M.D.; HIRATA, R.JR.; MATTOS-GUARALDI, A.L.; HODGKIN, J.; BURKOBSKI, A. *Caenorhabditis elegans* star formation and negative chemotaxis induced by infection with *corynebacteria*. *Microbiology*, v. 162, nº. 1, p. 84-93, 2016.

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

ARAÚJO, L.G. Produção de biofilme, detecção dos genes *ica*AD, *atlE* e *aap* e resistência aos antimicrobianos em cepas de *Staphylococcus epidermidis* resistentes a meticilina (MRSE). Dissertação (Mestrado). Niterói, Rio de Janeiro, 2006.

ARSLAN, S.; ÖZKARDES, F. *Slime* production and antibiotic susceptibility is staphylococci isolated from clinical samples. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, nº. 1, p. 29-33, 2007.

BAKTHAVATCHALAM, Y.D.; SUDARSANAM, T.D.; BABU, P.; MUNUSWAMY, E.; SETHUVEL, D.P.M.; RAGUPATHI, N.K.D.; VEERARAGHAVAN, B. Methicillin susceptible teicoplanin resistant *Staphylococcus haemolyticus* from bloodstream infection: Novel mutation in teicoplanin resistant operon (*tcaRAB*). *Japanese Journal of Infectious Diseases*, v. 70, nº, 4, p.458-460, 2017.

BARROS, E.M.; LEMOS, M.; SOUTO-PADRÓN, T.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M. Phenotypic and genotypic characterization of biofilm formation in *Staphylococcus haemolyticus*. *Current Microbiology*, v. 70, nº. 6, p. 829-34, 2015.

BEGUN, J.; GIANI, J.M.; ROHDE, H.; MACKS, D.; CALDERWOOD, S.B.; AUSUBEL, F.M.; SIFRI, C.D. Staphylococcal biofilm exopolysaccharide protects against *Caenorhabditis elegans* Immune Defenses. *PLOS Pathogens*, v. 4, nº, 3, 2007.

BERNARDI, A.C.A.; PIZZOLITTO, E.L.; PIZZOLITTO, A.C. Detecção da produção de *slime* por estafilococos coagulase-negativa isolados de cateter venoso central. *Revista de Ciências Farmacêuticas: Básica e Aplicada*, v. 28, nº. 1, p. 57-66, 2007.

BINATTI, V.B.; PEREIRA, P. M. A.; RIBEIRO, B. S. P.; RIBEIRO DE CASTRO, E. A; PEREIRA, M. A.; BELLO, A.; LEÃO, R. S.; MARQUES, E. A.; PEREIRA, J.A. *In vitro* adherence of coagulase-negative *Staphylococcus* strains in catheters of different material composition. *International Journal of Microbiology Research*, v. 7, nº. 4, p. 671-675, 2015.

BOUCHAMI, O.; ACHOUR, W.; MEKNI, M.A.; ROLO, J.; BEN HASSEN, A. Antibiotic resistance and molecular characterization of clinical isolates of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci isolated from bacteremia patients in oncohematology. *Folia Microbiology*, v. 56, p.122–130, 2011.

BOUCHAMI, O.; BEM HASSEN, A.; DE LENCASTRE, H.; MIRAGAIA, M. High prevalence of mec complex C and ccrC independent of SCCmec type V in *Staphylococcus haemolyticus*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 31, n.º 4, p. 605-614, 2012.

BOURGEOIS, I.; PESTEL-CARON, M.; LEMELAND, J.F.; PONS, J.L.; CARON, F. Tolerance to the glycopeptides vancomycin and teicoplanin in coagulase-negative Staphylococci. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 51, nº. 2, 2007.

BOWDEN, M.G.; CHEN, W.; SINGVALL, J.; XU, Y.; PEACOCK, S.J.; VALTULINA, V.; SPEZIALE, P.; HOOK, M. Identification and preliminar characterization of cell-wall-anchored proteins of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology 151 (Pt5),* 2005.

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

BUTIN, M.; MARTINS-SIMÕES, P.; PICHON, B.; LEYSSENE, D.; BORDES-COUECOU, S.; MEUGNIER, H.; ROUARD, C.; LEMAITRE, N.; SCHRAMM, F.; KEARNS, A.; SPILIOPOULOU, I.; HYYRYLAINE, H.L.; DUMITRESCU, O.; VANDENESCH, F.; DUPIEUX, C.; LAURENT, F. Emergence and dissemination of a linezolida-resistant *Staphylococcus capitis* clone in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemoterapy*, v. 72, p. 1014-1020, 2017.

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

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC (2018). Disponível em: <www.cdc.gov/ncidod/healthDis.htl>. Acesso em: 14 fev. 2018.

CHAIEB, K.; MAHDOUNAI, K.; BAKHROUF, A. Detection of *ica*A and *ica*D loci by polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needles in a dialysis unit. *Journal of Hospital Infection***,** nº. 61, p. 225-230, 2005.

CHAMON, R.C.; IORIO, N.L.P.; CAVALCANTE, F.S.; TEODORO, C.R.S.; OLIVEIRA, A.P.C.; MAIA, F.; DOS SANTOS, K.R.N. Linezolid-resistant *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus hominis*: single and double mutations at the domain V of 23S rRNA among isolates from a Rio de Janeiro hospital. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 80, p.307–310, 2014.

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

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

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

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

CUNHA, M.L.R.S.; RUGOLO, L.M.S.S.; LOPES, C.A.M. Study of virulence factors in coagulase-negative staphylococci isolated from newborns. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101, nº. 6, p. 661-668, 2006.

DE PAULIS, A.N.; PREDARI, S.C.; CHAZARRETA, C.D.; SANTOIANNI, J.E. Five-test simple scheme for species-level identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, nº. 3, p. 1219-1224, 2003.

DE SOUZA, T.A.J & PEREIRA, T.C. *Caenorhabditis elegans* tolerates hyperaccelerations up to 400,000 x g. *Astrobiology*, published online, 2018.

DI MARTINO, P. Bap: a new type of funtional amyloid. *Trends in Microbiology*, v. 24, nº. 9, 2016.

DORTET, L.; GLASER, P.; KASSIS-CHIKHANIS, N.; GIRLICH, D.; ICHAI, P.; BOUDON, M.; SAMUEL, D.; CRETON, E.; INANCI, D. Long-lasting successful dissemination of resistance to oxazolidinones in MDR Staphylococcus epidermidis clinical isolates in a tertiary care hospital in France. *Journal of Antimicrobial Chemoterapy*, v. 73, nº. 1, p. 41-51, 2017.

DUBOIS, D.; LEYSSENE, D.; CHACORNAC, J.P.; KOSTRZEWA, M.; SCHMIT, P.O.; TALON, R.; BONNET, R.; DELMAS, J. Identification of a variety of *Staphylococcus* species by Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 48, nº. 3, 2009.

EHLERSSON, G.; HELLMARK, B.; SVARTSTROM, O.; STENMARK, B.; SODERQUIST, B. Phenotypic characterisation of coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures in newborn infants, with a special focus on *Staphylococcus capitis*. *Acta Paediatrica*, v. 10, p.1576-1582, 2017.

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

FANOS, V.; KACET, N.; MOSCONI, G. A review of teicoplanina in the treatment of serious neonatal infections. *Europen Journal of Pediatrics*, v. 156, nº. 6, p. 423-427, 1997.

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

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

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

FRANK, K.L & PATEL, R. Poly-N-acetylglucosamine is not a major component of the extracellular matrix in biofilms formed by icaADBC-positive *Staphylococcus lugdunensis* isolates. *Infection and Immunity*, v. 75, p. 4728-4742, 2007.

FREDHEIM, E.G.A.; KLINGENBERG, C.; ROHDE, H.; FRANKENBERGER, S.; GAUSTAD, P.; FLAEGSTAD, T.; SOLLID, J.E. Biofilm formation by *Staphylococcus haemolyticus*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 47, nº. 4, p. 1172-1180, 2009.

GAD, G.F.M.; EL-FEKY, M.; EL-REHEWY, M.S.; HASSAN, M.A.; ABOLELLA, H.; EL-BAKY, R.M.A. Detection of *ica*A, *ica*D genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. *Journal of Infection in Developing Coutries*, v. 3, nº. 5, 2009.

GALES, A. C.; SADER, H. S.; HOLGER, R.; FRANKENBERGER, S.; GAUSTARD, P.; FLAEGSTAD, T.; SOLLID, J. E. Biofilm formation by *Staphylococcus haemolyticus*. *Future Microbiology*, v. 47, nº. 4, p. 1172-1180, 2009.

GILL, S.R.; FOUTS, D.E.; ARCHER, R.G.L.; MONGODIN, E.F.; DEBOY, R.T.; RAVEL, J. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *Journal of Bacteriology*, v. 187, nº. 7, p. 2426-2448, 2005.

GÖKÇEN, A.; VILEINSKAS, A.; WIESNER, J. Methods to identify enzymes that degrade the main extracellular polysaccharide component of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Virulence*, v. 4, nº. 3, p. 260-270, 2013.

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

GONZALEZ, T.; MYERS, J. M.B.; HERR, A.B.; HERSHEY, G.K.K. Staphylococcal biofilms in atopic dermatites. *Current Allergy Asthma Reports*, v. 17, 2017.

GU, B.; KELESIDI, T.; TSIODRAS, S.; HINDLER, J.; HUMPHRIES, R.M. The emerging problem of linezolida-resistant *Staphylococcus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 68, p. 4-11, 2013.

HERNÀNDEZ, B.D.; SANTOS, F.S.; MIRANDA, B.L.; BEJARANO, L.P.; NOVALES, G.M. Production of icaADBC-enconded polysaccharide intercellular adhesion and therapeutic failure in pediatric patients with staphylococcal device-related infections. *BMC Infectious Diseases*, v. 10, nº. 68, 2010.

HONG, J.; KIM, J.; KIM, B.Y.; PARK, J.W.; RYU, J.G.; ROHA, E. Complete Genome Sequence of Biofilm-Forming Strain *Staphylococcus haemolyticus* S167. *Genome Announcements*, v. 4, 2016.

HOSSEINKHANI, F.; EMANEINI, M.; VAN LEEUWEN, W. High-quality genome sequence of the highly resistant bacterium *Staphylococcus haemolyticus*, isolated from a neonatal bloodstream infection. *Genome Announcements*, v. 5, nº. 29, 2017.

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

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

IZANO, E.A.; AMARANTE, M.A.; KHER, W.B.; KAPLAN, J.B. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Applied and Environmetal Microbiology*, v. 74, 2008.

JIANG, S.; ZHENG, B.; DING, W.; LV, L.; JI, J.; ZHANG, H.; XIAO, Y.; LI, L. Whole genome sequence of *Staphylococcus hominis*, an opportunistic pathogen. *Journal of Bacteriology*, v. 194, nº. 17, p. 4761-4762, 2012.

JIMÉNEZ, J.N.; OCAMPO, A.M. VANEGAS, J.M.; RODRÍGUEZ, E.A.; GARCÉS, C.G.; PATIÑO, L.A.; OSPINA, S.; CORREA, M.M. Characterisation of virulence genes in methicillin susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a paediatric population in a university hospital of Medellín, Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz***,** v. 106, nº. 8, p. 980-985, 2011.

KAISER, T.D.L.; PACHECO, F.C.; LIMA A.A.; PEREIRA, E.M.; DOS SANTOS, K.R.N.; NUNES, A.P.F. Avaliação de métodos comumente usados em laboratórios para a determinação de suscetibilidade à oxacilina entre amostras de *Staphylococcus* sp., isoladas de um hospital de Vitória, Estado do Espírito Santo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 43, nº. 3, p. 298-303, 2010.

KAISER, T.D.L.; PEREIRA, E.M.; DOS SANTOS, K.R.N.; MACIEL, E.L.N.; SCHUENK, R.P.; NUNES, A.P.F. Modification of the Congo red agar method to detect biofilm

production by *Staphylococcus epidermidis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, v. 75, p. 235-239, 2013.

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

KIM, J.; HONG, J.; LIM, J.A.; HEU, S.; ROH, E. Improved multiplex PCR primers for rapid identification of coagulase-negative staphylococci. *Archives Microbiology*, v. 200, p. 73-83, 2018.

KING, D.E.; MALONE, R.; LILLEY, S.H. New classification and update on the quinolone antibiotics. *American Family Physician*, v. 61, nº. 9, p.2741-2748, 2000.

KLINGENBERG, C.; AARAG, E.; RONNESTAD, A.; SOLLID. J.E.; ABRAHAMSEN, T.G.; KJELDSEN, G.; FLAEGSTAD, T. Coagulase-Negative staphylococcal sepsis in neonates: Association between antibiotic resistance, biofilm formation and the host inflammatory response. *The Pediatric Infections Diseases Journal*, v. 24, p. 817-822, 2005.

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

KORNIENKO, M.; ILINA, E.; LUBASOVSKAYA, L.; PRIPUTNEVICH, T.; FAVOLA, O.; SUKHIKH, G.; GOVORUN, V. Analysis of nosocomial *Staphylococcus haemolyticus* by MLST and MALDI-TOF mass spectrometry. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 39, p. 99-105, 2016.

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

KRISTOF, K.; KOCSIS, E.; SZABÓ, D.; CSER, V.; NAGY, K.; HERMANN, P.; ROZGONYI, F. Significance of methicillin-teicoplanin resistant *Staphylococcus haemolyticus* in bloodstream infections in patients of the Semmelweis University hospitals in Hungary. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 30, p. 691-699, 2011.

KUMAR, S.; JITENDRA; DAS, A.; MANE, P.; SANGWAN, J.; KURAMI, S. Isolation, identification and antibiograma of coagulase negative *Staphylococcus* (CoNS) isolated from various clinical samples at a tertiary teaching hospital, Jaipur, India. *International Journal of Current Microbiology and Apllied Sciences*, v.7, nº. 1, p.3048-3059, 2018.

LARA, F.L.O.; ANTUNES, A.V.; MENDES-RODRIGUES, C.; FELICE, I.O. Custos da antibioticoterapia em pacientes adultos com infecção hospitalar em uma unidade de terapia intensiva. *Revista Prevenção de Infecção e Saúde*, v. 3, nº. 4, p.8-14, 2017.

LAVERTY, G.; GORMAN, S.P.; GILMORE, B.F. Biomolecular mechanisms of staphylococcal biofilm formation. *Future Microbiology*, v. 8, nº. 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. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

LEISER, J. J.; TOGNIM, M. C. B.; BEDENDO, J. Infecções hospitalares em um centro de terapia intensiva de um hospital de ensino no norte do Paraná. *Ciência, Cuidado e Saúde*, v. 6, nº. 2, p. 181-186, 2007.

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

LI, Z.; XIAO, Z.; LI. Z; QIAO, Z.; ZHANG, Y.; XU, F. 116 cases of neonatal early-onset or late-onset sepsis: A single center retrospective analysis on pathogenic bacteria species distribution and antimicrobial susceptibility. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, v. 6, nº. 8, p. 693-699, 2013.

LIDUMA, I.; TRACEVSKA, T.; BERS, U.; ZILEVICA, A. Phenotypic and genetic analysis of biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Medicina Kaunas*, v. 48, nº. 6, p. 305-309, 2012.

LOBO, R.D.; LEVIN, A.S.; OLIVEIRA, M.S.; GOMES, L.M.; GOBARA, S.; PARK, M.; FIGUEIREDO, V.B.; DE VASCONCELOS SANTOS, E.; COSTA S.F. Evaluation of interventions to reduce catheter-associated bloodstream infection: continuous tailored education versus one basic lecture. *American Journal of Infection Control*, v. 38, nº. 6, p. 440-448, 2010.

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

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

LUO, Y.; JAVED, M.A.; DENEER, H. Comparative study on nutriente depletion-induced lipidome adaptations in *Staphylococcus haemolyticus* and *Stapylococcus epidermidis*. *Scientific Reports*, v. 8, nº. 2356, 2018.

MADSEN, A.M.; MOSLEHI-JENABIAN, S.; ISLAM, M.Z.; FRANKEL, M.; SPILAK, M.; FREDERIKSEN, M.W. Concentrations of *Staphylococcus* species in indoor air as associated with other bacteria, season, relative humidity, air change rate, and *Staphylococcus aureus* positive occupants. *Environmental Research*, v. 160, p. 282-291, 2018.

MARQUES, P.B.; FERREIRA, A.P.; CARNEIRO, F.M.C. Perfil bacteriano de cultura de ponta de cateter venoso central. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 2, nº.1, p. 53-58, 2011.

MARTINS, A.; RIBOLI, D.F.M.; CAMARGO, C.H.; PEREIRA, V.C.; SAMPAIO, R.A.; DA CUNHA, M.L.R.S. Antimicrobial resistance and persistence of *Staphylococcus epidermidis*

clones in a Brazilian university hospital. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 77, p. 164-168, 2013.

MASUNARI, A.; TAVARES, L.C. Síntese e determinação de atividade antimicrobiana de derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos frente a *Staphylococcus aureus* multirresistentes. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, nº. 3, 2006.

MATTOS-GUARALDI, A.L.; FORMIGA, L.C.D. Hemagglutination and adhesive properties of *Corynebacterium diphtheriea* in relation to biotype and source. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 23, nº. 1, 1991.

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

MERTENS, A.; GHEBREMEDHIN, B. Genetic determinants and biofilm formation of clinical *Staphylococcus epidermidis* isolates from blood cultures and indwelling devises. *European Journal of Microbiology and Immunology*, v. 3, nº. 2, p. 111-119, 2013.

MIMICA, M.J.; BEREZIN, E.N. *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina: um problema emergente. *Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo*, v. 51, nº. 2, 2006.

MIMICA, M.J.; MENDES, C.M.F. Diagnóstico laboratorial de resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 43, nº. 6, p. 399-406, 2007.

*MONTANA STATE UNIVERSITY*. Biofilm basics: section 1. Disponível em: <http://www.biofilm.montana.edu/biofilm-basics/what_are_biofilms.html>. Acesso em: 01.03.2018.

MOTA, R.A.; DE SILVA, K.P.C.; DE FREITAS, M.F.L.; DA SILVA, L.B.G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 42, nº. 6, p. 465-470, 2005.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. *Microbiologia Médica*. 6ºedição. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2009.

NEVES, M.C.; ROSSI JÚNIOR, O.D.; ALVES, E.C.C.; LEMOS, M.V.F. Detecção de genes de resistência antimicrobiana em cromossomos e plasmídeos de *Staphylococcus* spp. *Arquivos do Instituto Biológico***,** São Paulo, v. 74, nº. 3, 2007.

NUNES, A.P.F.; SCHUENK, R.P.; BASTOS, C.C.R.; MAGNANINI, M.M.F.; LONG, J.B.; IORIO, N.L.P.; DOS SANTOS, K.R.N. Heterogeneous resistance to vancomycin and teicoplanin among *Staphylococcus* spp. isolated from bacteremia. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v, 11, nº. 3, p.345-350, 2007.

OLIVEIRA, R.C. Resistência a oxacilina e a vancomicina em *Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase negativos de diferentes origens. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2007.

OTTO, M. Virulence factors of coagulase-negative staphylococci. *Frontiers Bioscience*, v. 9, p. 841-863, 2004.

PAIM, T.G.S.; REITER, K.C.; DE OLIVEIRA, C.F.; D'AZEVEDO, P.A. MALDI-TOF MS performance to identify gram-positive cocci clinical isolates in Porto Alegre/RS, Brazil. *Journal of Infection Control*, v. 2, nº. 2, 2013.

PAIVA, R.M.; MACHADO, A.B.M.P.; ZAVASCKI, A.P.; BARTH, A.L. Vancomycin MIC for methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* isolates: evaluation of the broth microdilution and etest methods. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 48, nº. 12, p. 4652-4654, 2010.

PARK, S.; KELLEY, K.A.; VINOGRADOW, E.; SOLINGA, R.; WEIDENMAIER, C.; MISAWA, Y.; LEE, J.C. Characterization of the structure and biological functions of a capsular polysaccharide produced by *Staphylococcus saprophyticus*. *Journal of Bacteriology*, v. 192, nº. 18, p. 4618-4626, 2010.

PASSON, M.H. Análise químico-farmacêutica de teicoplanina em pó liofilizado. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, São Paulo, 2009.

PEDROSO, S.H.S.P.; SANDES, S.H.C.; FILHO, R.A.T.; NUNES, A.C.; SERUFO, J.C.; FARIAS, L.M.; CARVALHO, M.A.R.; BOMFIM, M.R.Q.; SANTOS, S.G. Coagulase-negative staphylococci isolated from human bloodstream infections showed multidrug resistance profile. *Microbial Drug Resistance*, 2018.

PEREIRA, E.M.; TEIXEIRA, C.A.A.; ALVARENGA, A.L.M.; SHUENCK, R.P.; DE MARVAL M.G.; HOLANDINO, C.; GUARALDI, A.L.M; DOS SANTOS, K.R.N. A brazilian lineage of *Staphylococcus lugdunensis* presenting rough colony morphology may adhere to and invade lung epitelial cells. *Journal of Medical Microbiology*, v. 61, p. 463-469, 2012.

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

PEREIRA, P.M.A. Aspectos fenotípicos e genotípicos da formação de biofilme e interação com superfícies abióticas e bióticas no potencial de virulência de *Staphylococcus haemolyticus* relacionados com quadros de bacteremias. Tese de Doutorado. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

PINHEIRO, L.; BRITO, C.I.; OLIVEIRA, A.; PEREIRA, V.C.; CUNHA, M.L.R.S. S*taphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*: detection of biofilm genes and biofilm formation in blood culture isolates from patients in a Brazilian teaching hospital. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 86, p. 11-14, 2016.

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

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

POTTER, A.; CEOTTO, H.; GIAMBIAGI-DE-MARVAL, M.; DOS SANTOS, K.R.N.; NES, I.F.; BASTOS, M.C.F. The gene bap, involved in biofilm production, is present in *Staphylococcus* spp. strains from nosocomial infections. *The Journal of Microbiolgy*, v. 47, nº. 3, 2009.

POURMAND, M.R.; ABDOSSAMADI, Z.; SALARI, M.H.; HOSSEINI, M. *Slime* layer formation and the prevalence of *mecA* and *aap* genes in *Staphylococcus epidermidis* isolates**.** *The* Journal *of* Infection *in Developing* Countries, v. 5, nº. 1, p.034-040, 2011.

*PUBCHEM*. Moxiflocacin. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/moxifloxacin#section=Top>. Acesso em: 08/04/2018.

RAJAN, V.; PRAKASH, P.H.; GOPAL, S. Occurrence of linezolid-resistant *Staphylococcus haemolyticus* in two tertiary care hospitals in Mysuru, South India. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v. 8, p. 140–141, 2017.

RICE, K. C.; MANN, E. E.; ENDRES, J. L. WEISS, E. C.; CASSAT, J. E.; SMELTZER, M. S.; BAYLES, K. W. The cidA murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 104, p. 8113-8118, 2007.

RODRIGEZ-ARANDA, A.; DASKALAKI, M.; VILLAR, J.; SANZ, F.; OTERO, J.R.; CHAVES, F. Nosocomial spread of linezolid-resistant *Staphylococcus haemolyticus* infections in na intensive care unit. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v, 63, nº. 4, p 398-402, 2009.

ROGERS, K. L.; FEY, P. D.; RUPP, M. E. Coagulase-negative staphylococci infections. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 23, n.º 1, p. 73-98, 2009.

ROGERS, K.L.; RUPP, M.E.; FEY, P.D. The presence of *icaADBC* is detrimental to the colonization of human skin by *Staphylococcus epidermidis*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, nº. 19, 2008.

ROMANELLI, R.; ANCHIETA, L.; MOURÃO, M.; CAMPOS, F.; LOYOLA, F.; MOURAO, P.; ARMOND, G.; CLEMENTE, W.; BOUZADA, M. Risk factors and lethality of laboratory-confirmed bloodstream infection caused of non-skin contaminant pathogens in neonates. *Journal of Pediatrics*, v. 89, nº. 2, p.189-196, 2013.

ROSENTHAL, V. D.; MAKI, D. G.; JAMURILAT, S.; MEDEIROS, E. A.; TODI, S. K .; GOMEZ, D. Y.; LEBLEBICIOGLU, H.; KHADER, I. A.; NVALES, M. G. M.; BERBA, R.; WONG, F. M. R.; BARKAT, A. M.; PINO, O. R.; DUENAS, L. MITREV, Z.; BIJIE, H.; GURSKIS, V.; JANJ, S. S.; MAPP, T.; HIDALGO, R. F.; JABALLAH, N. B.; RAKA, L.; GIKAS, A.; AHMED, A.; THU, L. T. A.; SIRITT, M. E. G. & INICC MEMBERS. International nosocomial infection control consortium (INICC) report, data summary for

2003-2008, issued June 2009. *American Journal of Infection Control*, v. 38, nº. 3, p. 95-106, 2010.

RYBAK, M.J & LAPLANE, K.L. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A review. *Pharmacolotherapy*, v. 25, nº. 1, 2005.

RYDER, V.J.; CHOPRA, I.; O'NEILL, A. Increased mutability of Staphylococci in biofilms as a consequence of oxidative stress. *PLOS One*, v. 7, nº. 10, 2012.

SANTANA, V.C. O papel dos antibióticos na resistência bacteriana. *Revista Cesumar, v. 11*, nº. 1, p. 129-138, 2006.

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

SCHAISON, G.; GRANINGER, W.; BOUZA, E. Teicoplanin in the treatment of serious infection. *Journal of Chemotherapy*, v. 12 Suppl: 5, p. 26-33, 2000.

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

SCHITO, G.C. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 12, nº. 1, p. 3-8, 2006.

SCHLAG, M.; BISWAS, R.; KRISMER, B.; KOHLER, T.; ZOLL, S.; YU, W.; SCHWARZ, H.; PESCHEL, A.; GÖTZ, F. Role of staphylococcal wall teichoic acid in targeting the major autolysin Atl. *Molecular Microbiology*, v. 75, nº. 4, p. 864-873, 2010.

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

SENG, R.; KITTI, T.; THUMMEEPAK, R.; KONGTHAI, P.; LEUNGTONGKAM, U.; WANNALERDSAJUN, S.; SITTHISAK, S.. Biofilm formation of methicillin-resistant coagulase negative staphylococci (MR-CoNS) isolated from community and hospital environments. *Plos One*, agosto, 2017.

SERRAY, B.; OUFRID, S.; HANNAOUI, I.; BOURJILATE, F.; SORAA, N.; MLIJI, M.; SOBH, M.; HAMMOUMI, A.; TIMINOUNI, M.; EL AZHARI, M. Genes encoding adhesion factors and biofilm formation in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Morocco. *The Journal of Infection in Developing Countries*, v. 10, nº. 8, p. 863-886, 2016.

SHIH-CHENG, C.; MING-HSUN, L.; CHUN-FU, Y.; JUNG-FU, L.; CHENG-MAO, H.; JANG-JIH, L. Characterization of two novel variants of staphylococcal cassette chromosome mec elements in oxacillin-resistant *Staphylococcus lugdunensis. Journal of Antimicrobial Chemoterapy*, v. 72, n.º 12, p. 3258-3262, 2017.

SHUKLA, S.K & RAO, T.S. *Staphylococcus aureus* biofilm removal by targeting biofilm-associated extracellular proteins. *Indian Journal of Medical Research*, v. 146 (Suppl 1), 2017.

SIFRI, C.D.; BEGUN, J.; AUSUBEL, F.M.; CALDERWOOD, S.B. *Caenorhabditis elegans* as a model host for *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Infection and Immunity*, v. 71, nº. 4, p. 2208-2217, 2003.

SILVA, P.V.; CRUZ, R.S.; KEIM, L.S.; DE PAULA, G.R.; CARVALHO, B.T.F.; COELHO, L.R.; CARVALHO, M.C.S.; DA ROSA, J.M.C.; FIGUEIREDO, A.G.S.; TEIXEIRA, L.A. The antimicrobial susceptibility, biofilm formation and genotypic profiles of *Staphylococcus haemolyticus* from bloodstream infections. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz***,** v. 108, nº. 6, p. 812-816, 2013.

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

SOARES, L.C.; PEREIRA, I.A.; COELHO, S.M.O.; CUNHA, C.M.M.; OLIVEIRA, D.F.B.; MIRANDA, A.N.; SOUZA, M.M. S. Caracterização fenotípica da resistência a antimicrobianos e detecção do gene *mec*A em *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos isolados de amostras animais e humanas. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 38, nº. 5, p. 1346-1350, 2008.

SOLIMAN, C.; WALDUCK, A.K.; YURIE, W.; RICHARD, J.S.; CYWES-BENTLEY, C.; PIER, G.B.; RAMSLAND, P.A. Structural basis for antibody targeting of the broadly expressed microbial polysaccharide poly-*N*-acetyl glucosamine. *Journal of Biological Chemistry*, 2018.

SOROUSH, S.; JABALAMELI, F.; TAHERIKALANI, M.; ESLAMPOUR, M.A.; BEIGVERDI, R.; EMANEINI, M. Characterization of biofilm formation, antimicrobial resistance, and staphylococcal cassette chromosome *mec* analysis of methicillin resistant *Staphylococcus hominis* from blood cultures of children. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 50, n.º 3, p. 329-333, 2017.

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

SUED, B.P.R.; PEREIRA, P.M.A.; FARIA, Y.V.; RAMOS, J.N.; BINATTI, V.B.; DOS SANTOS, K.R.N.; SEABRA, S.H.; HIRATA, R. JR.; VIEIRA, V.V.; MATTOS-GUARALDI, A.L.; PEREIRA, J.A.A. Sphygmomanometers and thermometers as potential fomites of *Staphylococcus haemolyticus*: biofilm formation in the presence of antibiotics. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 1, nº. 8, 2017.

SZCZUKA, E.; KRAJEWSKA, M.; LIJEWSKA, D.; BOSACKA, K.; KAZNOWSKI, A. Diversity of staphylococcal cassette chromosome *mec* elements in nosocomial multiresistant *Staphylococcus haemolyticus* isolates**.** *Journal of Applied Genetics***,** Published online, 2016.

TABE, Y.; NAKAMURA, A.; OGURI, T.; IGARI, J. Molecular characterization of epidemic multiresistant *Staphylococcus haemolyticus* isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease***,**v. 32, nº. 3, p.177-183, 1998.

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

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

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

TETZ, V.V. & TETZ, G.V. Effect of extracellular DNA destruction by DNAse I on characteristics of forming biofilms. *DNA and Cell Biology*, v. 29, nº. 8, 2010.

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

VÊLOSO, D.D. & CAMPELO, V. Incidência de infecções bacterianas e o perfil antimicrobiano utilizado no tratamento dos pacientes de um hospital de ensino. *Revista Interdisciplinar Ciências e Saúde*, v. 4, nº. 2, 2017.

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

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

VIEIRA, P.N.; VIEIRA, S.L.V. Uso irracional e resistência a antimicrobianos em hospitais. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*, v. 21, nº. 3, p. 209-212, 2017.

VIMBERG, V.; CAVANAGH, J.P.; BENADA, O.; KOFROŇOVÁ, O.; HJERDE, E.; ZIEGLEROVÁ, L.; NOVOTNÁ, G.B. Teicoplanin resistance in *Staphylococcus haemolyticus* is associated with mutations in histidine kinases VraS and WalK. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 90, p. 233-240, 2018.

XU, Q.; SUN, F.; FENG, W.; LIU, X.; LIU Y. Effect of DNAse I on biofilm formation of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Southern Medical University Nan fang yi ke da xue*, v. 35, nº. 9, 2015.

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

WU, Z.; LI, F.; LIU, D.; XUE, H.; ZHAO, X. Novel type XII Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* harboring a new Cassette Chromosome Recombinase, CcrC2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 59,nº. 12, 2015.

ZEHRBACH, A.M.D.; ROGERS, A.R.; TARR, E.K. An Investigation of the Potential Antifungal Properties of CNC-2 in *Caenorhabditis elegans. Journal of Nematology*, v. 49, nº. 4, p.472–476, 2017.

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

ZHOU, L.; GAO, Y.; CAO, W.; LIU, J.; GUAN, H.; ZHANG, H.; SHI, Y.; LV, W.; CHENG, L. Retrospective analysis of relationships among the dose regimen, trough concentration, efficacy, and safety of teicoplanina in chinese patients with moderate-severe gram-positive infections**.** *Infection and Drug Resitance*, v. 11, p. 29-36, 2018.

**ANEXO A -** Comitê de Ética

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

Rio de Janeiro, 21 de maio de 2010

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

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

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

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

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

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

Prof. Wille Oigman
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa

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

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

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

2. Nogueira BA, Olivella JGB, Sued-Karam BR, Pereira PMA, Vasconcelos RS, Oliveira VWA, Fracalanzza, SEL, Ignácio, ACPR, Hirata R Jr. Mattos-Guaraldi, AL. Environmetal exposure and risk assessment of pandrug-resistance gram-negative pathogens in river water at Rio de Janeiro metropolitan area, Brazil. (Submetido para publicação – Water Research), 2018.

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

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

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