

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Curso de Ciências Biológicas-Bacharelado



Trabalho de Conclusão de Curso

**Determinação do perfil de sensibilidade e avaliação da formação de biofilme
em *Staphylococcus* spp. isolados de amostras clínicas de um hospital de
ensino em Pelotas, RS, Brasil**

Kamila Furtado da Cunha

Pelotas, 2017

Kamila Furtado da Cunha

Determinação do perfil de sensibilidade e avaliação da formação de biofilme em *Staphylococcus* spp. isolados de amostras clínicas de um hospital de ensino em Pelotas, RS, Brasil

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gladis Aver Ribeiro

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Daiane Drawanz Hartwig

Pelotas, 2017

Kamila Furtado da Cunha

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C972d Cunha, Kamila Furtado da

Determinação do perfil de sensibilidade e avaliação da formação de biofilme em *Staphylococcus* spp. isolados de amostras clínicas de um hospital de ensino em Pelotas, RS, Brasil / Kamila Furtado da Cunha ; Gladis Aver Ribeiro, orientadora ; Daiane Drawanz Hartwig, coorientadora. — Pelotas, 2017.

67 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) — Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Biofilme. 2. mecA. 3. Mrsa. 4. *Staphylococcus*. 5. VISA. I. Ribeiro, Gladis Aver, orient. II. Hartwig, Daiane Drawanz, coorient. III. Título.

CDD : 579.353

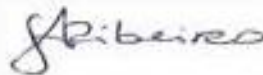
Determinação do perfil de sensibilidade e avaliação da formação de biofilme em *Staphylococcus* spp. isolados de amostras clínicas de um hospital de ensino em Pelotas, RS, Brasil

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

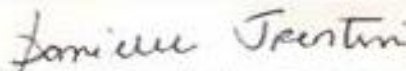
Data da defesa:

13 de fevereiro de 2017.

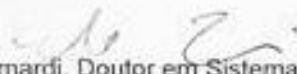
Banca examinadora:



Profª Drª. Gladis Aver Ribeiro (Orientadora), Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.



Profª Drª. Danielle da Silva Trentin, Doutora em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



Prof. Dr. Eduardo Bernardi, Doutor em Sistemas de Produção Agrícola pela Universidade Federal de Pelotas.

Agradecimentos

A minha mãe Ana Maria e avó Anna, por seu apoio incondicional, amor e compreensão, sem os quais eu não chegaria até aqui. Muito obrigado por sempre acreditarem em mim e por todo incentivo, e principalmente por nunca me deixarem desistir nos momentos difíceis, isso foi fundamental no caminho que trilhei até agora. Não é apenas uma conquista minha, e sim nossa, devo isso a vocês, assim como minha eterna gratidão e meu amor. Aos demais familiares, obrigado pela torcida, em especial a minha dinda Maria do Carmo, por ser minha fã número um.

A professora Gladis por disponibilizar seu tempo e paciência, me proporcionando à oportunidade ímpar de trabalhar com ela. Precisaria de 10.509 obrigados para agradecer todos os ensinamentos, incentivos e conselhos durante esses anos, além de sua amizade e carinho. Profa. muito obrigado por tudo, sem sua ajuda nada disso seria possível. Quando crescer quero ser como a senhora!

A minha co-orientadora, Daiane, pela ajuda, disponibilidade, ensinamentos e paciência em meus momentos de desespero, assim como sua orientada de doutorado, Suélen.

Ao laboratório de Análises Clínicas do Hospital Escola da Universidade Federal de Pelotas por ceder os isolados utilizados no trabalho, em especial a Nara Moura, pois sem seu auxílio não seria possível à realização desse trabalho.

Ao laboratório de Bacteriologia por ter sido minha segunda casa nesses três anos e meio de estágio, e que além de ser um ambiente de muito aprendizado me proporcionou conhecer pessoas incríveis que eu levarei para o resto da vida, em

especial Suzane Olachea Allend, Cristiane Meyer e Marcelle Garcia. Aos dos técnicos do departamento, obrigado por todos os materiais emprestados na hora do aperto, assim como dona Elza sempre com um bom dia/boa tarde bem humorado.

Aos colegas de laboratório, principalmente aos que estiveram presente nesse último ano e foram importantes durante a realização desse trabalho. Muito obrigado pela ajuda, paciência e risadas Daniela Rodrigues, Angelita Milech e Matheus Henrique. Principalmente Priscila Voigt, por todo carinho e doçura, por sempre me dizer que tudo ia dar certo e por torcer por mim. Vocês tornaram essa jornada mais leve e divertida, obrigado por fazerem parte disso.

Aos colegas que a Biologia me proporcionou, principalmente os amigos que ganhei e pude compartilhar os cinco melhores anos da minha vida. O peso da graduação se tornou mais leve e divertido com vocês, em especial Giovanna, Renata, Juliana, Pedro, Tatiele e principalmente, a Júlia, pela parceria e cumplicidade que desenvolvemos durante o curso e que com certeza levarei para a vida.

Aos bons professores, com os quais que tive a oportunidade de conviver durante esses cinco anos de graduação, vocês serviram de exemplo e inspiração, me fazendo perceber o quão importante e linda é a profissão de um Biólogo e professor.

As boas e velhas amigas, Elisângela Silva e Bruna Gonçalves por sempre estarem ao meu lado, torcendo pelo meu sucesso e me incentivando, assim como tendo paciência nos momentos em que não pude estar presente fisicamente. Muito obrigado por fazerem parte da minha história.

Ao Patrick Veber, meu amor e amigo, pela paciência nos momentos em que me ausentei, pelo amor, carinho e principalmente por alegrar meus dias mais cinzas quando tudo parecia dar errado. Obrigado por ser uma das pessoas fundamentais durante esses anos e até mesmo por me desafiar a sempre s melhor.

Resumo

CUNHA, Kamila Furtado. **Determinação do perfil de sensibilidade e avaliação da formação de biofilme em *Staphylococcus* spp. isolados de amostras clínicas em um hospital de ensino em Pelotas, RS, Brasil.** 2017. 67f. Trabalho de Conclusão de Curso- Graduação em Ciências Biológicas Bacharelado, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Bactérias do gênero *Staphylococcus* fazem parte da microbiota da pele e membranas mucosas em seres humanos, sendo patógenos oportunistas, causando desde simples infecções de pele até doenças sistêmicas. Atualmente, os estafilococos multirresistentes são um dos principais agentes causadores de infecções nosocomiais. Dentre eles, *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), apresenta resistência a todos β -lactâmicos, devido a expressão do gene *mecA*, sendo presente também em alta frequência em isolados de *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN), representando um dos maiores problemas em saúde pública, devido as alternativas terapêuticas que podem ser utilizados contra esses micro-organismos serem reduzidas. Desta forma, o objetivo deste estudo foi determinar o perfil de sensibilidade aos antibacterianos e verificar a presença do gene *mecA* em isolados clínicos de *Staphylococcus* spp. obtidos de pacientes internados em um hospital de ensino na cidade de Pelotas, e também avaliar sua capacidade de formação de biofilme *in vitro*. Os isolados foram submetidos à confirmação bioquímica, e tiveram seu perfil de sensibilidade avaliado através do antibiograma. Buscou-se também a presença do gene *mecA*, através da técnica de PCR, e os mesmos foram avaliados quanto a capacidade de formação de biofilme *in vitro*. Foram analisados 23 isolados, onde 16 foram confirmados como SCN e 7 como *S. aureus*. Quanto ao perfil de sensibilidade, foi observado que apenas 4,3% dos isolados foram sensíveis a todos antibacterianos testados. Dentre os isolados avaliados 8,6% foram resistentes a vancomicina, 26,1% a gentamicina, 47,8% a cefoxitina, 73,9% a eritromicina e 78,2% a oxacilina (ORSA). Observou-se um importante perfil de sensibilidade intermediária a vancomicina (VISA), ocorrendo em 40% dos SCN. O gene *mecA* foi observado em 60,1% dos isolados, sendo presente em 71,4% e 56,2% dos isolados de *S. aureus* e SCN, respectivamente. Resultados como esses, demonstram a importância do uso incorreto das práticas terapêuticas, principalmente no ambiente hospitalar, visto que esta pode acelerar o processo de resistência bacteriana. A capacidade de formação de biofilme foi observada em todos os isolados, os quais foram classificados como fortes formadores, com exceção de dois

isolados de SCN. Verificou-se que as concentrações de glicose de 0,50%, 0,75% e 1% potencializaram a formação de biofilme, sendo resultados preocupantes visto que em indivíduos com hiperglicemia pode haver uma potencialização da formação do mesmo. Ressalta-se que dentre os isolados moderados formadores de biofilme o gene *mecA* foi amplificado em 43,5% e, em 56,5% dos fortes formadores. Esse estudo demonstrou a importância do uso racional de antibacterianos no ambiente hospitalar uma vez que podem acelerar o processo de resistência bacteriana, bem como a necessidade de intensificar os cuidados com assepsia e desinfecção, visto que esses podem minimizar a disseminação de cepas multirresistentes nesses ambientes.

Palavras-chave: biofilme; *mecA*; MRSA; *Staphylococcus* spp.; VISA.

Abstract

CUNHA, Kamila Furtado. **Determination of sensibility profile and avaluation biofilm formation in *Staphylococcus* spp. Isolated from clinical samples in a teaching hospital in Pelotas, RS, Brazil.** 2017. 67p. Monograph- Graduation in Biological Sciences Bachelor. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Bacteria from genus *Staphylococcus* are part of the microbiota of the skin and mucous membranes in humans, being opportunistic pathogens, ranging from simple skin infections to systemic diseases. Among them, *S. aureus* resistant to methicillin (MRSA), is resistant to all β -lactams, due to the expression of the *mecA* gene. It is also present in high frequency in *Staphylococcus* coagulase negative (SCN) isolates, representing one of the major problems in public health, because of the therapeutic alternatives that can be used against these microorganisms to be reduced. The objective of this study was to determine the sensitivity profile to antibacterial and to verify the presence of *mecA* gene in clinical isolates of *Staphylococcus* spp. obtained from patients hospitalized in a teaching hospital in Pelotas, and also to evaluate their ability to form biofilms *in vitro*. The isolates were submitted to biochemical confirmation and had their sensitivity profile evaluated through the antibiogram. The presence of the *mecA* gene was also sought through the PCR technique, and they were evaluated for *in vitro* biofilm formation capacity. Twenty-three isolates were analyzed, where 16 were confirmed as SCN and 7 as *S. aureus*. About the sensitivity profile, it was observed that only 4,3% of the isolates were sensitive to all tested antibacterials. Among the isolates evaluated, 8,6% were resistant to vancomycin, 26,1% to gentamicin, 47,8% to ceftiofex, 73,9% to erythromycin and 78,2% to oxacillin (ORSA). There was an important intermediate sensitivity profile of vancomycin (VISA), occurring in 40% of SCN. The *mecA* gene was observed in 60,1% of the isolates, being present in 71,4% and 56,2% of the isolates of *S. aureus*

and SCN, respectively. Results such as these demonstrate the importance of incorrect use of therapeutic practices, especially in the hospital environment, since this may accelerate the bacterial resistance process. The biofilm formation capacity was observed in all the isolates, which were classified as strong formants, with the exception of two SCN isolates. It was verified that the glucose concentrations of 0.50%, 0.75% and 1% potentiated the formation of biofilm, being troubling results since in individuals with hyperglycemia there may be a potentiation of the formation of the same. It should be noted that among the moderate biofilm forming isolates the *mecA* gene was amplified in 43.5% and in 56.5% of the strong formers. This study demonstrated the importance of the rational use of antibacterials in the hospital environment, since they can accelerate the bacterial resistance process, as well as the need to intensify care with asepsis and disinfection, as these can minimize the spread of multiresistant strains in these environments.

Key-words: biofilm; *mecA*; MRSA; *Staphylococcus* spp.; VISA

Lista de Figuras

Figura 1	Perfil de sensibilidade a antibacterianos de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa de isolados clínicos obtidos de um hospital de ensino em Pelotas	35
Figura 2	Perfil de sensibilidade a antibacterianos de <i>Staphylococcus aureus</i> de isolados clínicos obtidos de um hospital de ensino em Pelotas.....	37
Figura 3	Amplificação do gene <i>mecA</i> em alguns isolados clínicos de <i>Staphylococcus</i> spp. oriundos de um hospital de ensino em Pelotas.....	43
Figura 4	Avaliação da capacidade de formação de biofilme <i>in vitro</i> em isolados clínicos de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados em um hospital de ensino em Pelotas submetidos a diferentes concentrações de glicose	44
Figura 5	Médias das densidades ópticas (DO) dos biofilmes formados por <i>Staphylococcus</i> spp. oriundos de um hospital de ensino em Pelotas frente a diferentes concentrações de glicose.....	45
Figura 6	Médias das densidade ópticas (DO) de crescimento dos isolados clínicos de <i>Staphylococcus</i> spp. oriundos de um hospital de ensino em Pelotas frente a diferentes concentrações de glicose.....	47

Lista de Tabelas

Tabela 1	Diâmetro dos halos de inibição para <i>Staphylococcus</i> spp. conforme indicado pelo <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> (2012).....	30
Tabela 2	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do gene <i>mecA</i>	31
Tabela 3	Perfil de sensibilidade de isolados clínicos formadores de biofilme de <i>Staphylococcus</i> spp. oriundos de um hospital de ensino em Pelotas.....	48

Lista de abreviaturas e siglas

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain and Hearth Infusion</i>
CA-MRSA	<i>Community associated- methicilin resistance S. aureus</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
EDTA	Etilenodiamino Tetra-acético
EPS	Exopolissacarídeo
DO	Densidade Óptica
<i>mecA F</i>	<i>mecA forward</i>
<i>mecA R</i>	<i>mecA reverse</i>
MH	Muller Hinton
MRSA	<i>Methicillin resistant Staphylococcus aureus</i>
MRSE	<i>Methicillin resistant Staphylococcus epidermidis</i>
MRS	<i>Methicillin resistant Staphylococcus spp.</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
ORSA	<i>Oxacilin resistance S. aureus</i>
pb	Pares de bases
PBP	Proteína Ligadora de Penicilina
PBP2a	Proteína Ligadora de Penicilina alterada
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PVL	<i>Paton Valentin Leucodin</i>
SCC <i>mec</i>	<i>Staphylococcal Cassete Chromossome mec</i>
SCN	<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>
TBE	Tampão Tris-Borato
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
VRS	<i>Vancomicin resistant Staphylococcus spp.</i>
VISA	<i>Vancomicin intermediate Staphylococcus aureus</i>

Sumário

1	Introdução	17
1.1	Objetivos	18
1.1.1	Objetivo Geral	18
1.1.2	Objetivos Específicos.....	18
2	Revisão de Literatura.....	19
2.1	Gênero <i>Staphylococcus</i>.....	19
2.1.2	<i>Staphylococcus aureus</i>.....	20
2.2.2	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa	21
2.3	Infecções hospitalares causadas por <i>Staphylococcus</i> spp.....	22
2.4	Biofilmes.....	24
2.5	Resistencia a antibacterianos.....	25
2.5.1	Resistência à β-lactâmicos	26
3	Materiais e Métodos	27
3.1	Isolados bacterianos	27
3.2	Identificação bioquímica	27
3.3	Perfil de sensibilidade aos antibacterianos	29
3.4	Identificação do gene <i>mecA</i>.....	30
3.5	Avaliação da capacidade de formação de biofilme.....	31
4	Resultados e Discussão.....	33

4.1	Confirmação bioquímica.....	33
4.2	Perfil de sensibilidade.....	33
4.3	Detecção do gene <i>mecA</i> e prevalência de MRS.....	40
4.4	Capacidade de formação de biofilme	43
5	Conclusão	50
	Referências.....	51

1 Introdução

O gênero *Staphylococcus* possui cerca de 40 espécies, as quais são caracterizadas por serem cocos Gram positivos, imóveis, anaeróbios facultativos, crescendo entre 18-40°C. Fazem parte da microbiota da pele e membranas mucosas em todos os animais. Essas bactérias são conhecidas por serem importantes patógenos oportunistas, podendo causar desde simples infecções de pele até sistêmicas (MURRAY, 2009). As espécies mais frequentemente associadas a infecções em humanos são *Staphylococcus aureus* e algumas espécies de *Staphylococcus coagulase negativa*.

Staphylococcus aureus é caracterizado por ser um importante patógeno associado à colonização assintomática em humanos, sendo agente comum de uma série de doenças, dentre elas: intoxicações alimentares e infecções como pneumonias, bacteremias e urinárias. Essa espécie pode fazer parte da microbiota humana, colonizando cerca de 20-40% da população, principalmente nas vias aéreas superiores (MURRAY, 2009). Possui a capacidade de se adaptar a diferentes ambientes, possibilitando a colonização do homem e de ambientes ao seu redor, formando reservatórios aptos para colonizar outros indivíduos, sendo a principal espécie de importância médica do gênero (LEITE, 2008).

Os *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN) eram considerados como bactérias não virulentas, representando pouco risco em ambientes hospitalares. Entretanto, há alguns anos, devido a sua capacidade de causar variados tipos de infecções, ser resistente a vários antibacterianos e apresentar capacidade de formar biofilmes, os

tornaram importantes agentes de infecções hospitalares (von EIFF, PETERS e HELLMANN, 2002; FRIGATTO et al., 2005; COIA et al., 2006; NUNES et al., 2006; HIGUCHI et al., 2007; OLIVEIRA, 2007; COSTERTON, MONTANARO e ARCIOLA, 2005; MONSEN, KARLSSON e WISTROM, 2009; MURRAY, 2009).

O biofilme bacteriano é considerado como um aglomerado de células aderidas fortemente a uma superfície, sendo este um importante fator de virulência, uma vez que pode favorecer a permanência do micro-organismo no ambiente por mais tempo, podendo ser formado em superfícies inertes, como materiais médicos invasivos. Recentemente foi descrito que o biofilme formado por *S. aureus* é resistente à ação do sistema imune, particularmente dos macrófagos (HENRIQUES, VASCONCELOS e NUNO 2013). Alguns estudos indicam que bactérias associadas a biofilmes são de 100 a 1000 vezes menos susceptíveis a substâncias antibacterianas quando comparadas com células na forma plactônica, ou seja, células livres não aderidas (SAGINUR et al., 2006; DAVIES, 2003).

Os *Staphylococcus* spp. multirresistentes são um dos principais agentes causadores de infecções nosocomiais, e isto vem trazendo preocupações aos profissionais de saúde, pois as alternativas terapêuticas que podem ser utilizadas contra eles são reduzidas (MARRA et al, 2011). Dentre os *Staphylococcus* spp. multirresistentes, os *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) se destacam por apresentarem resistência aos antibacterianos β -lactâmicos, como penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos, devido à expressão de um receptor de baixa afinidade a estes antibacterianos, sendo seu mecanismo de ação baseado na ligação à enzimas bacterianas constitutivas, impedindo seu correto funcionamento (RODRIGUES, 2011). O principal mecanismo de resistência em *Staphylococcus* spp. à meticilina está relacionada à expressão do gene *mecA* que codifica para as proteínas ligantes de penicilina (PBPS) com baixa afinidade aos antibióticos β -lactâmicos (CORREAL et al., 2013).

As infecções causadas por bactérias multirresistentes estão associadas a elevadas taxas de morbidade e mortalidade, além de um maior gasto financeiro quando comparadas a outras infecções, já que há um aumento no tempo de hospitalização e necessidade de isolamento dos pacientes, além de cuidados médicos adicionais. O grande impacto de cepas de MRSA e também de SCN sobre morbidade, mortalidade e custos, vêm sendo amplamente documentado nos

Estados Unidos e em países da Europa (ARCHER, 1998). No Brasil há registros sobre surtos, colonização de pacientes e da equipe (enfermeiros, técnicos de enfermagem, funcionários da limpeza e médicos) (LEITE, 2008).

A grande transmissibilidade de bactérias do gênero *Staphylococcus*, seu potencial patogênico, possibilidade de resistência a vários antibacterianos, formação de biofilmes e uma porcentagem considerável da população ser portadora assintomática de *S. aureus*, são fatores que tornam estas bactérias de interesse clínico por causarem facilmente infecções e complicações decorrentes destas (LEITE, 2008). Assim, se faz necessária a obtenção de dados visando gerar mais informações sobre esses micro-organismos nesses ambientes.

1. 1 Objetivos

1.1. 1 Geral

O objetivo geral do presente estudo foi determinar o perfil de sensibilidade a antibacterianos de isolados clínicos de *Staphylococcus* spp. oriundos de amostras de pacientes internados em um hospital de ensino na cidade de Pelotas, assim como avaliar sua capacidade de formação de biofilme.

1.1.2 Específicos

Como objetivos específicos o trabalho visou:

- Confirmar *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativa oriundos de amostras clínicas através de provas bioquímicas;
- Avaliar o perfil de sensibilidade dos isolados clínicos confirmados bioquimicamente frente a diferentes antibacterianos;
- Caracterizar geneticamente os isolados de *Staphylococcus* spp. como resistentes à meticilina (MRS) através da pesquisa do gene *mecA*;
- Determinar a prevalência de MRS entre os isolados estudados;
- Verificar a capacidade de formação de biofilme nos isolados clínicos.

2 Revisão de literatura

2.1 Gênero *Staphylococcus*

Os estafilococos pertencem à família Micrococcaceae, o gênero é dividido em dois grandes grupos baseados na capacidade de coagular o plasma sanguíneo através da enzima coagulase, sendo eles: os *Staphylococcus* coagulase positiva, tendo como seu principal representante o *S. aureus*, e os *Staphylococcus* coagulase negativa (SNC), como *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, dentre outras espécies (BASTOS, COUTINHO e COELHO, 2010; KONEMAN et al., 2001).

Essas bactérias compõem a microbiota da pele e mucosa de humanos e outros animais, entretanto podem se comportar como patógenos causando infecções oportunistas, através de diferentes mecanismos que auxiliam a invasão do hospedeiro e também evasão do sistema imune. São considerados como um problema crescente nos ambientes hospitalares sendo os principais agentes de infecções (KLUYTMANS, BELKUM e VERBRUGH, 2009). Dentre as espécies patogênicas, *S. aureus* se destaca devido aos seus fatores de virulência e resistência a diversos antibacterianos, além de sua fácil disseminação. Os SCN vêm apresentando também um importante perfil de resistência e alta incidência em ambientes hospitalares, sendo associados a infecções causadas por dispositivos médicos invasivos (OLIVEIRA et al., 2007).

Vários estudos demonstram a alta incidência de bactérias desse gênero no ambiente hospitalar. Oliveira (2013) verificou a presença de bactérias em jalecos de

profissionais de saúde em um hospital universitário, sendo o gênero *Staphylococcus* predominante entre os isolados. Resultados semelhantes foram encontrados por Borretti et al. (2014), avaliando brinquedos de uma unidade pediátrica em um hospital, onde foi observado que 87% das amostras apresentavam-se contaminadas por *Staphylococcus* spp., sendo 29% de *S. aureus* e 71% de SCN, ambos apresentando resistência a penicilina, oxacilina e clindamicina, entretanto, sensíveis à vancomicina.

2.1.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus coloniza principalmente as vias aéreas superiores e a pele, sendo encontrado em 20-40% da população. A patogênese de *S. aureus* se inicia com a colonização do indivíduo, consequência da adesão bacteriana aos tecidos através de suas variadas proteínas de superfície. Após a fixação, utilizam meios para escapar do sistema imune, como por exemplo, formação de biofilmes, dificultando a atuação de células do sistema imune e ação de antimicrobianos. Quando as circunstâncias são favoráveis, ocorre à invasão tecidual, e para que seja bem sucedida depende dos mecanismos dependentes das proteínas de superfície, como a cápsula antifagocitária e proteína A (capazes de inibir a opsonização e fagocitose) (CORREAL et al., 2013).

Os fatores de virulência de *S. aureus* são os responsáveis pelos sintomas e gravidade das infecções causadas por esse micro-organismo, dentre eles podem ser citados, os componentes de superfície, como moléculas de adesão, peptidoglicano, produção de cápsula e proteína A, os quais possibilitam a evasão do sistema imunológico do hospedeiro; enterotoxinas (tipo A ao E) e enzimas extracelulares, como catalases, nucleases, β -lactamases, hialuronidasas, hemolisinas, lípases e fibrinolisinases, facilitando a disseminação nos tecidos (FINCH, 2002).

No trabalho de Faria (2009), foi comparada a presença de *S. aureus* em crianças saudáveis e internas na pediatria em um hospital, onde a presença dessa bactéria foi de 49,2% nas crianças saudáveis (sem contato prévio com ambiente hospitalar) e 36% em crianças internas. Silva et al. (2012), relataram a prevalência de 25, 8% desse micro-organismo, através de coletas da cavidade nasal e das mãos de 151 profissionais da saúde em um hospital de ensino.

Superfícies inertes e equipamentos de uso comum podem servir como reservatórios para esses micro-organismos, servindo como fonte de futuras contaminações. Ferreira et al. (2010), analisando colchões “caixa de ovo” em um hospital, observou que aproximadamente 50% dos colchões avaliados, apresentaram-se contaminados por *S. aureus*. Oie, Hosokawa e Kamiya (2002) analisando maçanetas de quartos de pacientes internados, observaram a presença de MRSA em 19% dos quartos dos pacientes que estavam infectados por essa cepa, e também em 7% dos quartos de pacientes não infectados. French et al. (2004) demonstraram que MRSA foi encontrado antes da limpeza em 59% de maçanetas e 33% de torneiras, além de outras superfícies comumente manipuladas pelos profissionais da saúde, como painel de controle da cama, interruptores de luz e elevadores de transporte de pacientes.

2.2.2 *Staphylococcus coagulase negativa*

Durante vários anos os SCN foram considerados como contaminantes inofensivos e pouco virulentos, entretanto, atualmente, vêm surgindo como importantes patógenos em ambientes hospitalares, principalmente por causarem infecções persistentes após cirurgia de implantes e uso de dispositivos médicos como catéteres intravenosos, sendo responsáveis por 50% dessas infecções e também por ser a maior causa de bacteremia adquirida no ambiente hospitalar (BERNARDI, PIZZOLITTO e PIZZOLITTO, 2007; PINHEIRO, 2014).

Em vários casos, esses micro-organismos podem ser identificados em amostras de sangue, indicando quadro clínico de sepse. Souza et. al (2014) avaliaram 2.210 amostras de hemocultura de pacientes de uma Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) em Goiânia, sendo 170 amostras positivas, onde os SCN foram os micro-organismos prevalentes (23,5%), seguido de *S. aureus* (21,15%) e outras bactérias Gram negativas. Resultados semelhantes também foram encontrados por Falagas et al. (2006), onde os SCN estavam presentes em 52,5% das amostras avaliadas. Alves et al. (2012) analisaram amostras de sangue, e observaram que os SCN foram os mais frequentes, seguidos por *S. aureus* e *Pseudomonas* spp.

A espécie mais frequente de SCN no ambiente hospitalar é o *S. epidermidis*, sendo o causador de 40-90% das infecções associadas a dispositivos médicos. Em

um estudo retrospectivo realizado por Santos, Saavedra e Ferreira (2014), foram avaliados indivíduos admitidos no Hospital da Prelada para cirurgia ortopédica, para colocação ou revisão de próteses, sendo observado que mais de 50% dos agentes causadores de infecções pós-operatórias foram SNC, e destes 30% foram identificados como *S. epidermidis*. Nesse mesmo hospital, no ano de 2011, observou-se a incidência de 5,48% de *S. epidermidis*, e de 6,2% de *S. aureus*.

2.3 Infecções hospitalares causadas por *Staphylococcus* spp.

Em ambientes hospitalares a transmissão de patógenos se dá principalmente pelo ar e contato direto. Nesse contexto, os funcionários são considerados como potenciais portadores assintomáticos, onde suas mãos são as principais vias de transmissão cruzada de micro-organismos, podendo colaborar para sua dispersão (CRUZ, 2011; LEITE, 2008). Além das mãos dos profissionais de saúde, os objetos também são considerados como importantes fontes de contaminação, como demonstrado em um estudo por Boyce et al. (1997), onde cinco (42%) de 12 enfermeiras contaminaram-se com MRSA enquanto realizavam procedimentos que não requeriam contato direto com o paciente mas envolvia manipular objetos nos quartos de pacientes. Semelhante ao estudo realizado por Renner e Carvalho (2013), avaliando a presença de micro-organismos em superfícies de objetos em uma UTI, sendo observada a prevalência de *S. epidermidis* (42%), seguido de *S. aureus* (37%).

Estudos demonstram que a lavagem das mãos reduz as chances de transmissão de patógenos, até mesmo de micro-organismos multirresistentes, como o realizado por Vilarinho et al. (2015). Esses autores identificaram uma diferença significativa na presença de *S. aureus* dentre outros patógenos nas mãos dos trabalhadores de uma UTI, reduzindo para 1%. Entretanto, mesmo se tratando de uma medida simples para prevenção da disseminação de doenças, observa-se certa resistência a aquisição desse hábito antes e após o cuidado de cada paciente por parte dos profissionais da saúde (PITTE et al., 2000).

No estudo realizado por Rezende et al. (2012) avaliando a adesão dos profissionais de enfermagem aos equipamentos de proteção individual (EPI) e higienização das mãos, foi observado que em 40,9% dos casos não foi realizada a

higienização das mãos antes e após procedimentos rotineiros, como vacinações e curativos. Custódio et al. (2009) observaram a presença de *S. aureus* em 40% dos profissionais da saúde em um hospital particular em Goiânia, sendo que desses isolados, 70% apresentaram-se resistentes à oxacilina (β -Lactâmico).

Acredita-se que as infecções nosocomiais são as maiores causas de mortalidade e morbidade em Unidades de Tratamento Intensivo (UTI), especialmente nas neonatais. De acordo com o estudo realizado por Brito et al. (2010), através de vigilância durante quatro anos, foi observado que dos 1.443 pacientes atendidos, 209 desenvolveram infecção hospitalar, onde os principais agente etiológicos foram os SNC (36,5%) e *S. aureus* (23,6%), os quais apresentaram resistência a oxacilina em 81,8% e 25,3% dos isolados, respectivamente.

As infecções nosocomiais no Brasil, entre 2007 e 2010, representaram 40% da taxa de mortalidade causadas por esse tipo de infecção, sendo próximo da taxa encontrada no Rio Grande do Sul em 2003, a qual foi de 45% (MARRA et al., 2011; LISBOA et al., 2007). Muitas das infecções em ambientes hospitalares podem ser atribuídas à capacidade dos micro-organismos formarem biofilmes, sendo difíceis de erradicar, transformando-se em fontes para infecções recorrentes.

Segundo Evangelista e Oliveira (2015) no Brasil, entre o período de 2007 a 2014, a maioria dos casos de infecções nosocomiais causadas por MRSA foram registrados principalmente nas regiões Sul e Sudeste do país, ocorrendo em todas as faixas etárias. Na maioria dos casos houve uma infecção inicial na pele ou tecidos com traumas locais, evoluindo para um quadro clínico mais grave como sepse e pneumonia, onde o período de internação desses pacientes foi estendido. Na literatura, há registros de que cepas de MRSA são capazes de sobreviver por um período de até 30 dias em objetos comumente utilizados em hospitais (CRUZ et al., 2011; LEITE, 2008).

As infecções relacionadas à assistência a saúde são consideradas problemas de saúde pública, levando a necessidade de que se desenvolvam ações preventivas e de controle, onde se visa reduzir a morbidade, mortalidade e proporcionar melhorias na qualidade dos serviços prestados aos usuários (GIROTI e GARANHANI, 2015; MARRA et al., 2011). O conhecimento dos profissionais e futuros profissionais da saúde a cerca da transmissão de micro-organismos se torna

um elemento essencial para prevenção e controle destes, principalmente dos multirresistentes. Assim, a compreensão e conscientização de ser um potencial disseminador são fundamentais para a adoção de medidas cotidianas necessárias para interromper a transmissão desses agentes, em ambientes de assistência à saúde (SILVA et al., 2010).

2.4 Biofilmes

Os biofilmes bacterianos são aglomerados de células fortemente aderidas a superfícies, sejam elas inertes ou não, envolvidas por uma matriz de polímeros orgânicos. Formam uma estrutura porosa que permite a troca de substâncias nutritivas entre as células, tornando possível a resistência das mesmas ao ambiente (COSTERTON, MONTANARO e ARCIOLA, 2005).

Pesquisas sobre biofilmes se tornaram mais consistentes nas últimas quatro décadas, entretanto formação de biofilmes é um processo complexo segundo Trentin, Giordani e Macedo (2013), pois envolve a interação entre a bactéria, a superfície onde será formado o biofilme e também o microambiente em que se encontram. Considera-se que o desenvolvimento de biofilmes seja um processo que ocorra em quatro etapas: inicialmente há a adesão das células bacterianas a um substrato, após isso as células começam a se agregar, formando múltiplas camadas, havendo então a maturação do biofilme e a etapa seguinte é caracterizada pelo desprendimento de algumas células para que se inicie um novo ciclo (COSTERTON, MONTANARO e ARCIOLA, 2005; HALL-STOODLEY e STOODLEY, 2005).

Os biofilmes dificultam a ação de substâncias antimicrobianas, além disso, podem facilitar a transferência de genes de resistência através da troca de material genético mediada por plasmídeos, devido à proximidade entre as células bacterianas, onde estes podem codificar para genes de resistência a diversos agentes antimicrobianos (MADSEN et al., 2012; DAVIES, 2003). Algumas pesquisas indicam que a estirpe mais frequente no Brasil de MRSA, em experimentos *in vitro*, possui uma maior capacidade de formar biofilmes quando comparados com outras estirpes que não fazem parte do complexo clonal causador de surtos de infecções (AMARAL et al., 2005).

O sucesso dos SCN como agentes de infecções nosocomiais é atribuído a sua capacidade de formar biofilmes, sendo esse seu principal fator de virulência

(ROLO, LENCASTRE e MIRAGAIA, 2012). No estudo realizado por Bernardi, Pizzolitto e Pizzolitto (2007) foram avaliados 27 isolados clínicos de SCN provenientes de cateter venoso central, sendo observada a capacidade de formação de biofilme em 81,4% dos isolados.

2.5 Resistência a antibacterianos

A resistência a substâncias antimicrobianas por parte dos micro-organismos pode ser dada através de mutações no material genético, ou pela troca deste através de plasmídeos, onde uma bactéria doadora transmite genes de resistência para bactérias receptoras. Ambos os processos podem proporcionar vantagens seletivas para o micro-organismo, produzindo mecanismos de resistência (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER 2009). Coelho et al. (2007) através do seu estudo avaliando isolados de humanos e animais, afirmam possibilidade de transferência horizontal de genes de resistência nas diferentes espécies de *Staphylococcus* spp. e entre distintas espécies hospedeiras.

Existem quatro principais mecanismos de resistência bacteriana, sendo eles: alteração da permeabilidade celular, sendo dada através de uma modificação nas porinas, as quais são proteínas responsáveis por estabelecer canais específicos para passagem de substâncias para o espaço periplasmático. Alteração do sítio de ação do antibacteriano, onde o local alvo de ação do fármaco é alterado, impedindo o seu efeito inibitório ou bactericida. Bomba de efluxo, na qual ocorre o efluxo ativo do fármaco para o meio extracelular. E o mecanismo mais frequente e importante é dado pela alteração enzimática das substâncias antibacterianas, sendo mediadas por enzimas (ANVISA, 2008).

O aumento na incidência de micro-organismos resistentes a um ou mais antibacterianos representam um desafio para hospitais devido à falta de opções terapêuticas que podem ser utilizadas e também por estas serem economicamente mais caras. Dentre estes, podem ser citados *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, e também *S. aureus*, considerado como uma das bactérias mais importantes, pois está envolvido em 50% dos casos de infecções hospitalares (BOUCHER et al., 2009).

Segundo Pinheiro (2014) o sucesso dos SCN nas últimas décadas como agente causador de infecções nosocomiais se dá principalmente pela seleção de

cepas resistentes a antibacterianos devido ao uso indiscriminado destes. Rosa et al. (2009) avaliando 100 isolados de SCN, oriundos da saliva de profissionais de enfermagem saudáveis, observaram resistência à oxacilina e à cefaxotina em 32% dos isolados e à mupirocina em 84,4%.

2.5.1 Resistência à β -lactâmicos

Quando o uso de penicilina teve início, na década de 40, *S. aureus* era sensível a esse medicamento, mas após 10 anos de uso, cerca de 90% dos isolados das amostras demonstravam resistência ao fármaco, devido à produção de penicilinases (STEWART e HOLT, 1963). Nos anos 60 surgiu o tratamento com meticilina, fármaco análogo a oxacilina semi-sintética resistente a ação da β -lactamase, entretanto, alguns anos depois foi registrado o primeiro surto nosocomial por MRSA (RODRIGUES, 2011).

Cepas MRSA apresentam resistência aos antibacterianos β -lactâmicos, como penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos. Estes antibacterianos atuam na parede celular, se ligando a enzimas bacterianas constitutivas que participam da síntese de parede celular, sendo chamadas proteínas ligadoras de penicilina (*Penicillin-Binding Protein* - PBP) (McCULLOCH, 2006).

Desde a década de 90 são feitos relatos de infecções por MRSA em indivíduos saudáveis sem contato prévio com o ambiente hospitalar. Desde então, cepas MRSA associadas a comunidade (*community-associated MRSA* - CA-MRSA) são observados em todo mundo. Se diferem dos MRSA de origem nosocomial por apresentarem maior virulência devido a presença de diferentes toxinas, resistência a outros antibacterianos, e principalmente pela produção de Leucocidina de Pantón Valentin (PVL), a qual é responsável por causar graves infecções de pele e pneumonia necrosante em jovens (SANTOS et al., 2007; SILVA, 2015).

Algumas espécies de SCN também são capazes de acumular determinantes de resistência a antibacterianos, como cepas MRSE (*methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis*), sendo também atribuída a expressão do gene *mecA*, da mesma forma que em cepas de MRSA (MIRAGAIA et al. , 2002; WISPLINGHOFF et al. , 2003; STEVENS et al. , 2005). A resistência de SCN aos β -lactâmicos vem crescendo exponencialmente no Brasil e no mundo desde a década de 60. Nessa

época a resistência a meticilina era de 10% em cepas de *S. epidermidis*, ao fim dos anos 70, esse valor passou a ser de quase 50%. Em 1990 a resistência a oxacilina atingiu quase 70% das cepas de SCN, chegando a 82,5% em 2012 (ENRIGTH et al., 2002; ROCA, 2013; SANTOS, 2015).

Cepas de MRS sintetizam a PBP2a, sendo uma variante da PBP, que possui baixa afinidade pelos β -lactâmicos (ITO et al., 2003). O gene *mecA* é o responsável por codificar a proteína PBP2a, que, juntamente com seus genes reguladores, *mecI* (repressor) e *mecRI* (transdutor de sinal), se encontram no elemento genético móvel, cassete cromossômico estafilocócico *mec* (*SSCmec*) (ENRIGTH et al., 2002; ROCA, 2013).

Atualmente são reconhecidos onze diferentes tipos de *SCCmec* em MRS mundialmente diferindo-se no número de genes e arquitetura gênica. Os tipos I, IV, V, VI e VII carregam apenas o gene *mecA*, entretanto os tipos II e III carregam genes determinantes para resistência a metais pesados e outros antibacterianos como macrolídeos, lincosaminas, estreptograminas, aminoglicosídeos e tetraciclina (HIRAMATSU, CUI e KURODA, 2001; McCULLOCH, 2006; SANTOS, 2015; SHORE et al., 2011). Os tipos I, II e III são relacionados com isolados de origem hospitalar e os tipos IV, V, VI e VII com isolados de origem comunitária (DEURENBERG e STOBBERING, 2008; KATAYAMA, TERUYO e HIRAMATSU, 2001). Considera-se ainda que os tipos IV ao XI são associados com uma menor resistência aos antibióticos β -lactâmicos do que os tipos I, II e III (CORREAL et al., 2013).

Apesar das características de cepas MRSA serem atribuídas ao gene *mecA*, recentemente foi descrito um gene homólogo divergente a esse, denominado *mecC*, também localizado no *SCCmec*, sendo primeiramente identificado em isolados de mastite bovina na Inglaterra, e posteriormente observado em isolados clínicos humanos na Dinamarca e Escócia. A grande problemática desses isolados é dada pela dificuldade no diagnóstico laboratorial, pois cepas que possuem *mecC* demonstram-se negativas para amplificação do gene *mecA*, porém apresentam também o genótipo de multirresistência, entretanto, demonstrando uma maior sensibilidade a oxacilina (GARCIA-ALVÁRES et al., 2011; PATERSON, HARRISON e HOLMES, 2014).

3. Material e Métodos

3.1 Isolados bacterianos

Os isolados foram cedidos pelo Laboratório Análises Clínicas do Hospital Escola da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil. As culturas suspeitas de *Staphylococcus* spp. foram transportadas em caixas térmicas até o Laboratório de Bacteriologia, do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, do Instituto de Biologia, da Universidade Federal de Pelotas para análises subsequentes.

3.2 Identificação bioquímica

Para identificação de *Staphylococcus* spp., foi utilizada a metodologia descrita por Koneman et al. . (2001, p. 564) com modificações. Primeiramente, as amostras foram esgotadas em meio seletivo indicador Ágar Manitol (Acumedia ®) e posteriormente incubadas por 24h a 36°C. Após a incubação, as colônias manitol positivas (características de *S. aureus*) e negativas (características de SCN) foram semeadas em Ágar *Brain and Heart Infusion* (Himedia ®) inclinado e posteriormente foi realizada a coloração de Gram e provas bioquímicas posteriormente.

Para o teste de catalase foi coletada uma colônia suspeita com auxílio da alça bacteriológica, a qual foi colocada em contato com uma gota Peróxido de Hidrogênio

3% em lâmina de microscopia, onde foi observada a formação de bolhas como reação positiva, sendo resultado característico do gênero *Staphylococcus*.

Para o teste de coagulase livre (em tubo), foi adicionada uma pequena quantidade do inóculo bacteriano, em um tubo de ensaio contendo 0,5 mL de plasma de coelho EDTA, seguido de incubação por 4h a 36°C. Após o período de incubação foi verificado a presença de coágulo através da inclinação do tubo a 90° na vertical, indicando reação positiva, como esperado para *S. aureus*. Caso o teste fosse negativo, a suspensão foi mantida em temperatura ambiente por 18h, para leitura final do teste.

Para o teste de DNase foi feita a inoculação de cultura recente (24h) no meio Ágar DNase Test (Acumedia ®), e este foi incubado por 24h a 36°C. Após a incubação, foi adicionado HCl 1N em toda placa para observação da formação de um halo transparente ao redor das colônias DNase positivas (precipitação do DNA hidrolisado). Colônias de *S. aureus* apresentam resultado positivo e as de SCN, resultado negativo (sem formação de halo).

Para *S. aureus* foi utilizado ainda o teste de termonuclease, sendo ele também realizado em meio Ágar DNase Test (Acumedia ®). O ágar foi cortado com um perfurador estéril para obtenção de cavidades de 3mm de diâmetro. As cavidades foram preenchidas com a cultura recente (24h) semeada em caldo BHI, previamente fervida durante 15min., e após isso foi adicionada ao meio DNase, sendo incubada a 36°C por 4h. Cepas de *S. aureus* formam uma zona rosada ao redor da cavidade que contém a suspensão aquecida, diferentemente de SCN.

3.3 Perfil de sensibilidade aos antibacterianos

Os testes para verificar o perfil de sensibilidade e identificação de cepas resistentes a metilina foram realizados de acordo com a Técnica de Difusão segundo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). Para isso foi preparado um inóculo bacteriano de acordo com a escala 0,5 de Mac Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC. mL⁻¹), a partir do qual, foi feita a semeadura com auxílio de *swab* estéril em placas contendo Ágar Muller Hinton (Himedia ®). Após, os discos de antibacterianos foram adicionados com auxílio de pinças estéreis, de forma equidistante nas placas semeadas, sendo incubadas 24h a 36°C. Após o período de

incubação, o halo formado ao redor dos discos de antibióticos foi medido com auxílio de uma régua milimetrada, e os resultados obtidos foram comparados à tabela padrão a fim de determinar o grau de sensibilidade que a bactéria apresentou frente às drogas testadas (CLSI, 2012).

Os antibacterianos utilizados neste ensaio foram cefaxitina (30µg), gentamicina (10µg), eritromicina (15µg), vancomicina (30µg) e oxacilina (1µg). Foram utilizadas ainda as cepas de *S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 35984 como controles. Os pontos de corte utilizados para o diâmetro do halo de inibição foram de acordo com os descritos pelo CLSI (2012), sendo representados na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1: Diâmetro dos halos de inibição para *Staphylococcus* spp. conforme indicado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2012).

Antibacteriano	<i>Staphylococcus aureus</i>			SCN		
	Diâmetro em mm			Diâmetro em mm		
	S	I	R	S	I	R
Vancomicina (30µg)	≥12	-	-	≥12	-	-
Cefoxitina (30µg)	≥ 22	-	≤ 21	≥ 25	-	≤ 24
Gentamicina (10µg)	≥ 15	13–14	≤ 12	≥ 15	13–14	≤ 12
Eritromicina (15µg)	≥ 23	14–22	≤ 13	≥ 23	14–22	≤ 13
Oxacilina (1µg)	≥ 13	≥ 13	11-12	≥ 13	≥ 13	11-12

R: Resistente; I: Intermediário; S: Sensível; SCN: *Staphylococcus coagulase negativa*

3.4 Identificação do gene *mecA*

A caracterização genotípica dos isolados foi realizada através da amplificação por PCR do gene *mecA*, responsável pela resistência aos β- Lactâmicos. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores selecionados estão descritas na Tabela 2.

A amplificação do fragmento foi realizada a partir de cinco colônias homogeneizadas em 100µL de água ultrapura (ELLINGTON et al., 2007, com modificações). A amplificação do gene *mecA* foi realizada de acordo com Oliveira e Lencastre (2002). Foi utilizado o termociclador Gencycler- GEN - 96, com a seguinte ciclagem padronizada: desnaturação inicial a 94°C por 4min, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 47°C por 30s, extensão a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 4 min. Foi utilizado como controle positivo um

controle interno, selecionado dentre os isolados avaliados. Os produtos das ampliações foram verificados através de eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X.

Tabela 2- Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do gene *mecA*.

Gene	Sequência (5'-3')	Tamanho amplificado (pares de base)	Referência
<i>mecA</i> F	CAT CCT ATG ATA GCT TGG TC	342	Oliveira e Lencastre (2002)
<i>mecA</i> R	CTA AAT CAT AGC CAT GAC CG		

3.5 Avaliação da capacidade de formação de biofilme

Para os testes da avaliação da capacidade de formação de biofilme *in vitro* foram utilizadas placas de microtitulação de poliestireno com 96 cavidades, permitindo quatro repetições para cada condição testada. (STEPANOVIC, 2001).

Para isso os isolados de *Staphylococcus* spp. foram repicados em ágar BHI e incubados a 37°C, por 16-18 h. A partir desse cultivo foi preparado um inóculo de acordo com a Escala 0,5 de Mac Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL⁻¹). Após a preparação das suspensões bacterianas, 20µL desta foi transferida para as microplacas, junto com alíquotas de 180µL de Caldo *Triple Soy Broth* (TSB) (Acumedia ®) suplementado com as seguintes concentrações de glicose: 0%, 0,25%; 0,50%; 0,75% e 1%. Foi utilizado também o caldo TSB sem suplemento de glicose, como controle de esterilidade do meio. O controle positivo utilizado foi utilizado o isolado no meio sem suplementação de glicose. As microplacas foram incubadas por 24h à 37°C e, após este período, os conteúdos dos poços foram descartados e estes lavados três vezes com solução de NaCl 0,9% estéril. Em seguida foi retirado o excesso de solução das microplacas e adicionados 200µL de metanol, mantidos durante 20min. para a fixação do biofilme. As microplacas foram secas por 16-18h em temperatura ambiente, e então adicionados 200µL de solução Cristal Violeta 0,15% durante 15 minutos à temperatura ambiente, para corar os poços. Os poços foram lavados posteriormente com água Milli-Q e levemente secos à temperatura

ambiente com auxílio de papel absorvente, para a adição de 200 μ L de etanol 95% por 30min.

A densidade óptica (DO) dos biofilmes bacterianos aderidos e corados foi lida com o auxílio de um aparelho de espectrofotometria POLARIS EE (Celer Biotecnologia S.A.), com comprimento de onda de 540 nm. A DO₆₃₀ das amostras foi determinada na hora zero (DO₆₃₀ 0h) e nas 24 horas (DO₆₃₀ 24h) de incubação para acompanhar o crescimento bacteriano.

A classificação das amostras quanto à capacidade de formar biofilme foi feita com relação à densidade óptica do controle negativo (DOc). Os biofilmes receberam a classificação de: não produtor de biofilme ($DO \leq DOc$), fraco ($DOc < DO \leq 2xDOc$), moderado ($2xDOc < DO \leq 4xDOc$) e forte ($DO \geq 4xDOc$) (CHRISTENSEN et al., 1985). Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados obtidos foram analisados no programa GraphPad Prisma 7.01 através de ANOVA e Teste T com nível de significância $p < 0,05$.

4 Resultados e Discussão

4.1 Confirmação bioquímica

Foram analisadas vinte e três amostras suspeitas de *Staphylococcus* spp. cedidas pelo Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Escola da UFPel do período de agosto de 2015 à maio de 2016. Destas, dezesseis (69,6%) foram confirmadas como SCN através do teste de coagulase e sete (30,4%) como *S. aureus* através do teste de coagulase e demais provas bioquímicas.

4.2 Perfil de sensibilidade

Quanto ao perfil de sensibilidade dos isolados, observou-se um importante perfil de resistência dos mesmos frente aos antibacterianos testados, onde 8,6% dos deles demonstraram-se resistentes à vancomicina, 26,1% a gentamicina, 47,8% a cefoxitina, 73,9% a eritromicina e 78,2% a oxacilina. Verificou-se que 8,6% dos isolados não apresentaram sensibilidade a nenhum dos antibacterianos testados. Cerca de 43,4% demonstraram-se multirresistentes, ou seja, apresentaram resistência a três ou mais antibacterianos de diferentes classes.

É importante ressaltar que apenas 4,3% dos isolados demonstraram sensibilidade a todos antibacterianos testados, e dentre eles, vancomicina, gentamicina e cefoxitina foram os mais eficientes quando comparados aos demais,

onde 65,2%, 60,8% e 43,4% dos isolados foram sensíveis. Os antibacterianos que apresentaram menor ação frente aos isolados foram oxacilina e eritromicina, onde apenas 21% dos isolados clínicos avaliados foram sensíveis.

Vários estudos como o realizado por Kobaysashi, Sodayama e Vieira (2009) relatam uma alta frequência de resistência a oxacilina em isolados clínicos de *Staphylococcus* spp. obtidos em um hospital de Goiânia. Esses autores descrevem que 68,5% apresentaram resistência a oxacilina. Resultados como esse sugerem que o uso incorreto das práticas terapêuticas pelos profissionais da saúde, principalmente no ambiente hospitalar, pode acelerar o processo de resistência a substâncias antibacterianas (RIBEIRO e CORTINA, 2016).

Em *Staphylococcus* spp., a resistência a oxacilina pode ser observada de duas formas, a primeira delas é a resistência clássica determinada pela expressão do gene *mecA*, conferindo baixa afinidade a este antibacteriano e outros β -lactâmicos. A segunda é a resistência intermediária ou *borderline*, a qual pode ocorrer devido a modificações nas PBP's ou pela hiperprodução de β -lactamases (SOUSA et al., 2011). No Brasil a frequência de infecções relacionadas à assistência em saúde causadas por MRSA e *S. aureus* resistente à oxacilina (ORSA) variam entre 40-80%, principalmente em UTI (BRITES, SILVA e SAMPAIO-SÁ, 2006).

Ressalta-se que no presente estudo, dois isolados (8%), apresentaram um perfil de resistência a vancomicina (VRS – *resistant-vancomycin Staphylococcus* spp.), sendo um *S. aureus* e outro SCN. Breve et al.(2015) obtiveram um resultado semelhante a esse, pois dentre os isolados de *Staphylococcus* spp. avaliados quanto a sensibilidade a vancomicina, apenas um demonstrou-se resistente. Resultados como esses, apesar de apresentarem uma baixa frequência quanto à resistência à vancomicina são também preocupantes, visto que antibacterianos dessa classe são considerados como última alternativa no tratamento de infecções por *Staphylococcus* spp. multirresistentes.

O perfil de sensibilidade dos isolados de SCN estão representados na Figura 1, onde nota-se que a maioria apresentou resistência a oxacilina e eritromicina (81,2% e 62,5%, respectivamente). Os mesmos demonstraram sensibilidade à vancomicina e gentamicina em 56,2% e 43,7% para cefoxitina. No entanto, observa-se que 12,5% não demonstraram sensibilidade a nenhum dos antibacterianos testados, e apenas 6,2% foram sensíveis a todos.

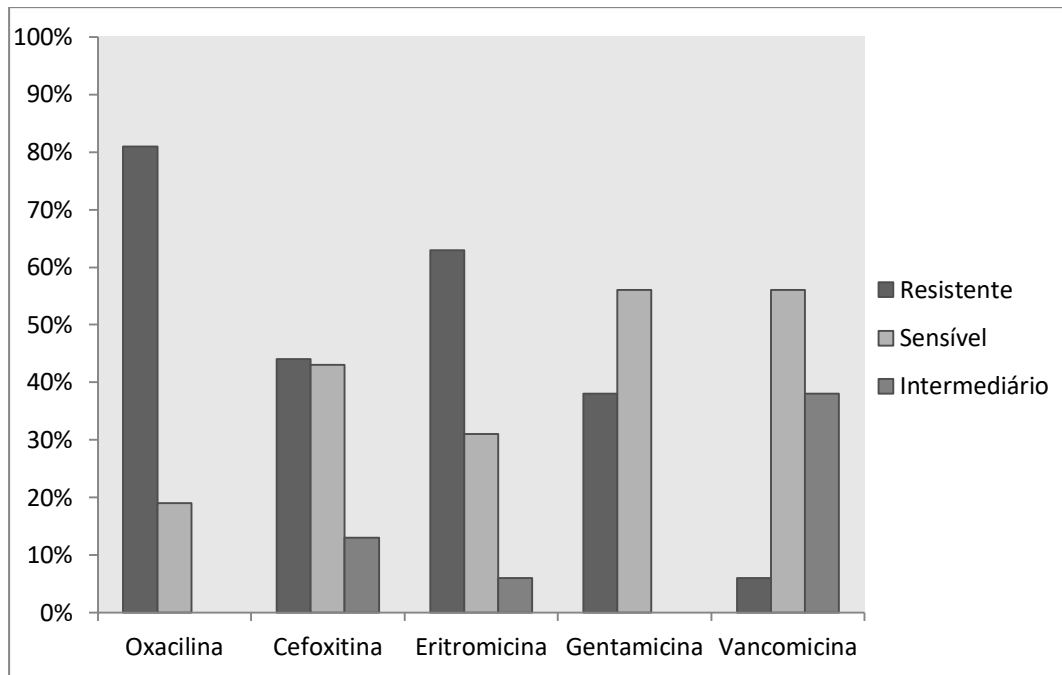


Figura 1 - Perfil de sensibilidade a antibacterianos de *Staphylococcus coagulase negativa* de isolados clínicos obtidos de um hospital de ensino em Pelotas.

Os SCN de origem nosocomial vêm apresentando taxas preocupantes de resistência a antibacterianos, principalmente frente à oxacilina (JAFJE et al., 2000). Esse fato tem sido observado há algum tempo e em alguns estudos como o de Loureiro et al. (2002), que trabalhando com isolados clínicos de uma UTI, observou que para SCN e *S. aureus* houve resistência em 59% e 93% dos isolados testados frente a oxacilina, 35% e 67% frente a eritromicina, respectivamente, entretanto todos apresentaram-se sensíveis a vancomicina. Resultados semelhantes foram obtidos por Asrlan e Ozkardes (2007), onde constataram que 75% de seus isolados de *S. aureus* e 62% de SCN apresentaram resistência a oxacilina. Esses dados são semelhantes aos obtidos no presente estudo, visto que 81% dos isolados de SCN também demonstraram resistência a esse antibacteriano. Diferentemente dos resultados obtidos por Rosa et al. (2009) onde apenas 32% de seus isolados de SCN demonstraram-se resistentes a oxacilina e cefoxitina, entretanto, todos também foram sensíveis a vancomicina.

Na pesquisa realizada por Theisen (2010), foi observado que 86,7% dos isolados *S. epidermidis* oriundos de cateteres venosos foram resistentes a Eritromicina. Em contrapartida, Coelho et al. (2007) relatam que 38,9% dos isolados

de *Staphylococcus* spp. oriundos de amostras de pacientes com quadro clínico de infecção, foram resistentes a oxacilina, sendo semelhante ao encontrado por Brito et al. (2010), os quais observaram que 25,3% dos isolados clínicos de SCN oriundos de amostras biológicas apresentaram-se resistentes a oxacilina.

Silva et al. (2013), trabalhando com isolados de SCN obtidos de uma UTI neonatal, observaram que 73% dos isolados estudados foram resistentes a oxacilina, 87% a eritromicina e 78% a gentamicina, porém todos foram sensíveis a vancomicina. Oliveira (2014) também relata índices de resistência consideravelmente altos à eritromicina e gentamicina, variando entre 63 a 100%, quando testados contra espécies de SCN, similar ao encontrado por Silva (2014), onde 73%, 62% e 85% de seus isolados de *S. epidermidis* foram resistentes à eritromicina, gentamicina e oxacilina, respectivamente. Oliveira (2014) trabalhando com SCN oriundos de amostras biológicas, observaram que 100% dos isolados de *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* e *S. haemolyticus* foram resistentes a oxacilina. Sendo os resultados desses autores semelhantes aos obtidos no presente estudo.

De acordo com os resultados obtidos foi verificado um perfil de sensibilidade intermediária à vancomicina, sendo observado em 38% dos isolados de SCN. O principal mecanismo responsável pela sensibilidade intermediária a esse antibacteriano é o espessamento da parede celular, devido à produção exagerada de peptidoglicano, impedindo a ação do antibacteriano. O aumento na incidência de cepas com sensibilidade intermediária a vancomicina se dá principalmente pelo uso indiscriminado desse antibacteriano e por falhas no tratamento, como concentração sérica alterada do fármaco durante o tratamento e também uso prolongado do mesmo (PINHEIRO, 2014; OLIVEIRA et al., 2001).

A sensibilidade reduzida aos glicopeptídeos é observada desde a década de 1990, sendo relatados casos ao redor do mundo de cepas de *S. aureus* com sensibilidade intermediária a vancomicina (VISA), assim como em isolados de SCN. No Brasil foram notificados sete casos de infecções causadas por *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA), ocorrendo entre 2002 e 2006, e em 2014 foi relatado o primeiro caso envolvendo óbito (SIEVERT, et al., 2008; HOWDEN et al., 2010).

Silva et al. (2013) relatam que os SCN são os principais agentes bacterianos associados as infecções relacionadas a assistência em saúde, estando presente em 30 a 60% das culturas obtidas em hospitais. Além de serem uns dos principais agentes, também apresentam genes de resistência podendo transferi-los a outros patógenos no ambiente hospitalar (SIERADZKI et al., 1999).

Quanto aos isolados de *S. aureus* foi verificado que 100% destes foram resistentes a eritromicina, 71,4% a oxacilina e 57,1% a cefoxitina. Destaca-se que apenas 28,5% e 42,8% apresentaram sensibilidade a oxacilina e cefoxitina, respectivamente, como o indicado na figura 2. A sensibilidade a vancomicina foi observada em 85,7% dos isolados.

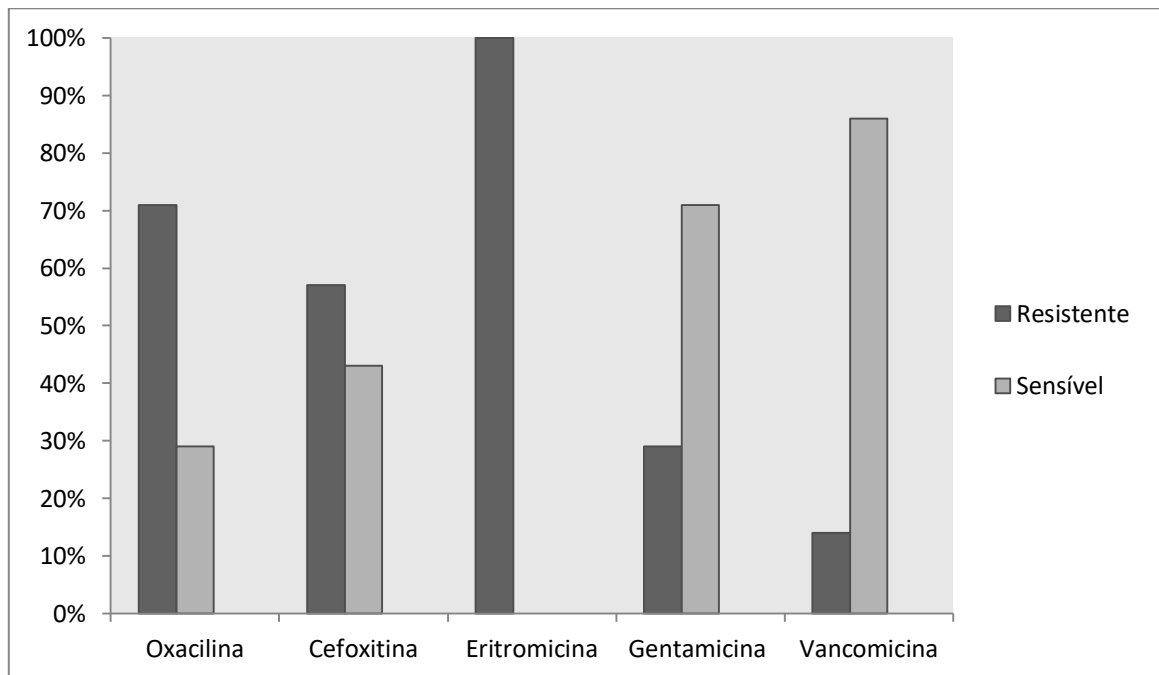


Figura 2 - Perfil de sensibilidade a antibacterianos de *Staphylococcus aureus* de isolados clínicos obtidos de hospital de ensino em Pelotas.

Além das altas taxas de resistência a oxacilina, algumas pesquisas estudos uma alta taxa de resistência a outros antibacterianos, assim como o verificado no presente trabalho e no estudo realizado por Sousa et al. (2011), onde esses autores, avaliando isolados clínicos de *S. aureus*, verificaram que 94% dos isolados demonstraram-se resistentes a oxacilina e 89% a cefoxitina, além disso, os isolados demonstram taxas de resistência a eritromicina (79%) e gentamicina (76%), entretanto, 100% demonstraram-se sensíveis a vancomicina.

Rodrigues (2011) verificou que 73,9% de seus isolados clínicos de *S. aureus* apresentaram resistência a oxacilina e 75,1% a cefoxitina, porém todos demonstraram-se sensíveis a vancomicina. Diferente dos resultados obtidos no presente trabalho, Garcez (2011) trabalhando com isolados clínicos de *S. aureus* oriundos de material biológico de pacientes internados em UTI, observou que 41,7% de isolados foram resistentes a eritromicina e cefoxitina, e apenas 25% destes demonstraram resistência à gentamicina. Andrade, Caseiro e Gagliani (2014), verificaram que 65,4% de seus isolados de *S. aureus* demonstraram resistência ao mesmo antibacteriano. Entretanto Goulart et al. (2015), avaliando isolados de *S. aureus* obtidos a partir de *swab* nasal de pacientes internados, relatam que somente 42% apresentaram-se resistentes a esse antibacteriano.

Os resultados obtidos demonstram que 71,4% dos isolados estudados demonstraram resistência a oxacilina, sendo este um β -lactâmico. Sua ação é dada pela interação com as Proteínas Ligadoras de Penicilina (PBP), inibindo a ligação cruzada entre as cadeias de peptidoglicano, impedindo a formação correta da parede celular. A resistência a esse grupo é dada principalmente pela alteração no sítio de ação, o que ocorre devido a expressão do gene *mecA*, alteração nas PBP's ou pela produção de enzimas que hidrolisam o anel β -lactâmico (β -lactamases), inativando o fármaco (GUIMARÃES, MOMESSO e PUPO, 2010; MOTA et al., 2010; REYNOLDS e BROWN, 1985).

De acordo com os resultados obtidos, apenas 15% dos isolados estudados apresentarem resistência a vancomicina, sendo este um resultado significativo, visto que os antibacterianos da classe dos glicopeptídeos, são considerados como últimas opções no tratamento de infecções causadas por MRSA e cepas multirresistentes de *Enterococcus* spp.. Acredita-se que a sensibilidade intermediária à vancomicina em *Staphylococcus* spp. se dê pelo espessamento da parede celular, impedindo a ação do mesmo na célula bacteriana. Os primeiros registros de cepas com sensibilidade intermediária aos glicopeptídeos foram feitos em 1996 no Japão, entretanto, somente em 2002 foi feito o primeiro registro de VRSA, o qual teve sua resistência atribuída a expressão do gene *vanA*, transferido de *Enterococcus faecalis* (MOTA et al., 2010; OLIVEIRA, et al., 2014; PILLAI et al., 2009).

Os aminoglicosídeos, como a gentamicina, são caracterizados por atuarem no ribossoma bacteriano, ligando-se à subunidade 30S, impedindo a síntese

proteica de forma semelhante aos macrolídeos. Dentre eles, a eritromicina foi o primeiro a ser introduzido no mercado, entretanto, em um ano já havia registros de cepas de *Staphylococcus* spp. resistentes. No presente estudo detectou-se que mais de 50% dos isolados avaliados foram resistentes a esse antibacteriano, acredita-se que a resistência a esses antibacterianos se dá principalmente por bomba de efluxo, mas também pode ocorrer alteração no sítio de ação do antibacteriano (BAPTISTA, 2013; PEREIRA, 2014; ROBERTS et al., 1999).

Correal et al. (2013) relatam que a resistência em nível global de *S. aureus* foi de 38% a oxacilina, 39% a eritromicina e 14% a gentamicina, sendo esses índices diferentes dos resultados obtidos no presente trabalho, visto que a resistência a eritromicina foi observada em 100% dos isolados de *S. aureus*, 27% a gentamicina e 71% a oxacilina. Quanto aos SCN, em alguns estudos, os índices de resistência a metilicina chegam a 80%. Outros estudos afirmam que a taxa de resistência aos antibacterianos dos SCN chega a 73% no Canadá e Europa, 74% nos Estados Unidos e 77% na América Latina e Japão (SADER et al., 2004; MACHADO, 2007).

Em uma revisão bibliográfica realizada por Almeida e Farias (2014) foi observado que os patógenos mais frequentes em casos de infecções nosocomiais no Brasil de 2000 a 2012, foram MRSA, SCN e *S. aureus*, com 878, 801 e 342 casos, respectivamente. No Brasil os índices de infecções causadas por cepas de MRSA associadas a assistência em saúde variam entre 40 a 80% (PEREIRA, 2014).

Alguns estudos como o realizado por Mombach et al. (2007), demonstram que *S. aureus* foi o responsável por 48,7% de infecções em três diferentes hospitais de Porto Alegre, e destes 41,3% eram MRSA. Um levantamento realizado em Pelotas sobre o uso de antimicrobianos dos anos de 1999 a 2000 revela que os antimicrobianos mais utilizados no município foram as penicilinas (40%), sulfas (16%), tetraciclina (7,5%), cefalosporinas (6,1%), macrolídeos (5,8%) dentre outros. Nota-se que os antibacterianos β -lactâmicos foram os mais utilizados, no entanto, há escassez de dados mais recentes para o município (BERQUÓ et al., 2004).

4.3 Detecção do gene *mecA* e prevalência de MRS

Observou-se que dos vinte e três isolados analisados quanto a presença do gene *mecA*, 60,8% tiveram a sequência do oligonucleotídeo amplificada (Figura 3). Analisando individualmente os isolados de *S. aureus* e SCN, nota-se a presença do gene em 71,4% e 56,2%, respectivamente. Dentre as amostras que apresentaram o genótipo de MRS, 18,1% apresentaram-se resistentes à vancomicina, 72,7% a oxacilina, 63,3% a cefoxitina, 27,2% a gentamicina e 72,7% a eritromicina.

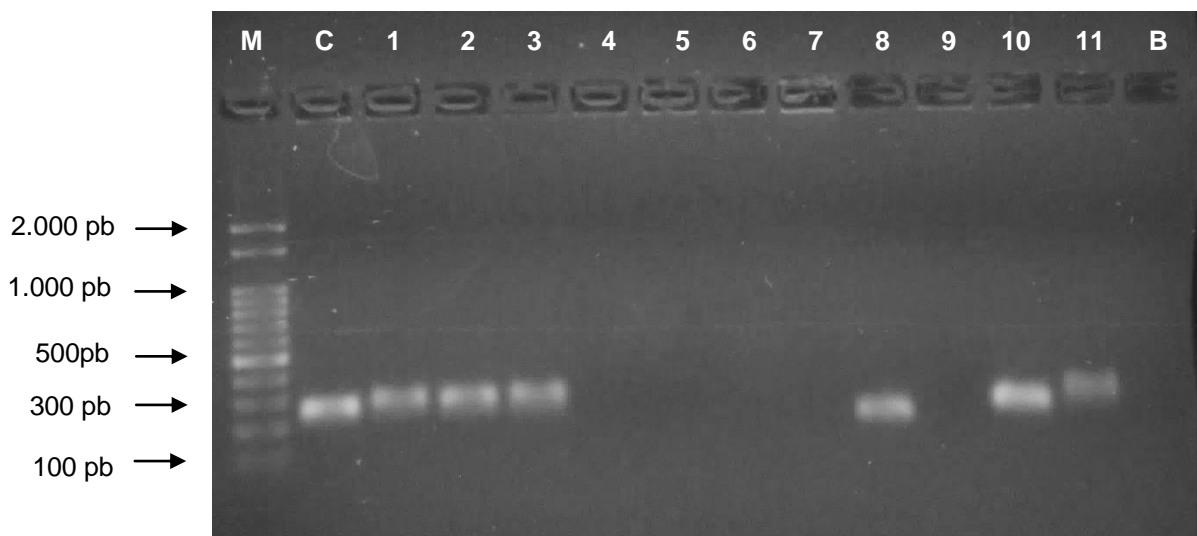


Figura 3: Amplificação do gene *mecA* de alguns isolados clínicos de *Staphylococcus* spp. de um hospital de ensino em Pelotas ; M: marcador Ladder 100pb; C: controle positivo interno; 1 - 5: isolados clínicos de *S.aureus*; 6 - 11: isolados clínicos de SCN; B: controle negativo.

A prevalência de MRS dentre os isolados avaliados no presente estudo, obtida após a pesquisa do gene *mecA* foi 60,8%, em relação a obtida através do teste de antibiograma, a qual foi de 43,4%. Diferente do encontrado no trabalho de Rodrigues (2011), onde através do teste de difusão em disco foi observado que 75,1% de seus isolados clínicos de *S. aureus* eram MRSA, e através da avaliação genotípica, 75,8% de seus isolados possuíam o gene *mecA*.

O teste de difusão em disco para verificar resistência à oxacilina é amplamente utilizado na rotina laboratorial devido seu baixo custo e praticidade, entretanto não é o método mais indicado, pois o uso de cefoxitina em ensaio de difusão em disco para identificar resistência a oxacilina (β - lactâmicos) é mais eficiente pois possibilita uma melhor expressão do produto do gene *mecA*, a

proteína PBP2a (BROEKEMA et al., 2009; CLSI, 2015). Entretanto, a técnica de PCR é a mais eficiente na detecção do gene *mecA*, responsável pelo principal mecanismo de resistência a oxacilina e outros β -lactâmicos em *Staphylococcus* spp., sendo considerado o método padrão ouro para avaliação qualitativa de resistência a oxacilina (CHAMBERS, 1997; MIMICA e MENDES, 2007; BROEKEMA et al., 2009).

No presente trabalho notou-se que 28,5% dos isolados que tiveram sinal positivo para a amplificação do gene *mecA*, não demonstraram resistência a oxacilina. No teste de difusão em disco, observou-se que 34,7% dos isolados estudados demonstraram resistência a oxacilina, entretanto não tiveram o gene amplificado. Os isolados que apresentaram o fenótipo de resistência a oxacilina, mas não possuem o gene *mecA*, levam a crer que a resistência a esse antibacteriano e também a outros β -lactâmicos possa estar ocorrendo por algum outro mecanismo, como os citados anteriormente, ou ainda que os mesmos possuam o gene *mecC*, visto que esse gene possibilita um fenótipo de resistência diferente dos demonstrados por isolados positivos para *mecA*.

De acordo com a nova normativa estabelecida pela CLSI (2015), atualmente, a detecção de cepas MRS através da técnica de difusão em disco deve ser feita utilizando o antibacteriano cefoxitina, pois o mesmo permite uma maior exatidão quando comparado ao disco de oxacilina. Entretanto, dos isolados avaliados no presente estudo que tiveram o gene *mecA* amplificado, 50% destes demonstraram-se resistentes a cefoxitina, enquanto que 71,4% dos que apresentaram sinal positivo para o gene demonstraram-se resistentes a oxacilina.

Cepas de MRS podem demonstrar-se sensíveis aos β -lactâmicos *in vitro*, mas o uso destes *in vivo* não é eficaz (CLSI, 2015). Ressalta-se que o fenótipo de sensibilidade a oxacilina pode gerar resultados falsos positivos na detecção de resistência a esse fármaco, visto que esses isolados podem possuir o *mecA*, onde a prescrição de β -lactâmicos poderia selecionar as linhagens de MRS, levando a falhas no tratamento e se tornando um importante problema, principalmente em ambiente hospitalar (FINAN et al., 2002; HOSOSAKA et al., 2007).

Deve-se ressaltar que dentre os isolados avaliados no presente trabalho, o único que demonstrou-se sensível a todos antibacterianos testados no antibiograma teve o gene amplificado na PCR. Entretanto, toda população bacteriana

heterogeneamente resistente, não expressa necessariamente sua resistência fenotipicamente, porém esse fenômeno ainda não é bem elucidado. Acredita-se que o fato possa ocorrer devido a deficiência que algum componente químico ou alguma modificação na síntese da parede celular. Além disso, Marty et al. (1987) relatam que a expressão fenotípica do gene *mecA* é afetada por vários fatores ambientais como pH, temperatura e osmolaridade (MARANAN et al., 1997; CHAMBER, 1992; SUZUKI et al., 1993).

Várias pesquisas indicam uma alta frequência desse gene em isolados clínicos de *Staphylococcus* spp., como no estudo realizado por Rosa et al. (2009) onde é relatado que 75% dos isolados de SCN resistentes a oxacilina tiveram o gene *mecA* detectado através de PCR. Rigatti et al. (2010) relata uma taxa expressiva desse gene em isolados de SCN obtidos de amostras de pacientes com bacteremia, sendo esta de 90%, além de apresentarem altas taxas de resistência a eritromicina e gentamicina (85% e 62%). Almeida et al. (2012) descreveram uma alta incidência de amostras de MRSA, cerca de 75% de seus isolados, destes, todos foram resistentes a cefoxitina e 98% a oxacilina, entretanto, todas amostras confirmadas como MRSA através da detecção do gene *mecA* apresentaram-se sensíveis a vancomicina. Oliveira (2013) estudando 96 isolados clínicos de amostras biológicas, observou que 46 isolados de *S. aureus* e 50 de SCN tiveram o gene *mecA* amplificado. Pinheiro (2014), trabalhando com isolados de hemoculturas de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, verificou a presença do gene *mecA* em 92,9% e 100% de suas amostras, respectivamente.

No estudo realizado por Rabelo (2012), trabalhando com isolados bacterianos de pacientes e profissionais de saúde, foi amplificado de 36 isolados de *Staphylococcus* spp. o gene *mecA*. Nos pacientes foram isolados nove cepas de *Staphylococcus* spp., dos quais, quatro eram *S. aureus* e cinco de SCN. Quanto aos profissionais de saúde, foram isolados 27 cepas, onde 25 eram SCN e duas *S. aureus*, demonstrando assim que os profissionais da saúde podem funcionar como importantes disseminadores de micro-organismos resistentes no ambiente hospitalar.

Em contrapartida, alguns autores relatam uma menor incidência de MRS/MRSA, como o estudo feito por Coelho et al. (2007), onde observaram que quase 50% de seus isolados resistentes a oxacilina possuíam o gene *mecA*. Reiter

(2009) verificou que o gene *mecA* foi encontrado em 40,5% de isolados clínicos de *S. aureus*, oriundos de pacientes internos em um hospital no RS. Breves et al. (2015) relataram que 30,6% dos isolados de *Staphylococcus* spp, oriundos materiais de uso médico, o gene *mecA* foi detectado, destes 20,4% eram *S. aureus* e 10,2% eram SCN.

Entretanto, nota-se que mais da metade dos isolados avaliados no presente estudo apresentam o gene de multirresistência, sendo um resultado preocupante visto que os MRS são agentes causadores de infecções de difícil tratamento, podendo se apresentar como resistentes a diferentes classes de antibacterianos, reduzindo as opções terapêuticas que poderiam ser utilizadas contra esses agentes. Assim, é importante ressaltar que o uso indiscriminado de substâncias antimicrobianas, principalmente nos ambientes hospitalar favorece o surgimento de cepas multirresistentes. Devido a isso, o seu uso racional e apropriado proporciona a oportunidade de uma maior eficiência no tratamento de infecções quando necessário (ANVISA, 2007).

4.4 Capacidade de formação de biofilme

Os isolados de *Staphylococcus* spp. foram submetidos a ensaio de formação de biofilme e agrupados qualitativamente como não formador ou formador de biofilme (fraco, moderado e forte). Esta classificação é baseada na medida da densidade óptica (DO) do controle negativo. Para este, foi obtida uma DO de 0,110. Para classificação seguiram os parâmetros a seguir: não formador de biofilme (DO<0,110), fraco (DO 0,111 a 0,220), moderado (DO 0,223 a 0,440) e forte formador (DO>0,441).

A capacidade de formação de biofilme foi observada em todos os isolados, como demonstrado na Figura 4. Destes, 91,3% apresentaram-se como fortes formadores e 8,7% demonstraram-se moderados formadores nas diferentes concentrações de glicose testadas no meio de cultura e também sem suplementação da mesma. Estima-se que 80% das infecções no ambiente hospitalar ocorram devido aos biofilmes, e dessas até 70% estão associados ao uso de dispositivos médicos. Além disso, infecções associadas à biofilmes são resistentes a ação do sistema imune do hospedeiro e principalmente a agentes antimicrobianos (WENZEL, 2007; STEWART, 2002).

Além de proporcionar a persistência de células viáveis no ambiente por mais tempo, os biofilmes, segundo estudos realizados com *S.aureus* por Savage, Chopra e O'Neill (2013), aumentam significativamente a frequência de transferência de material genético, promovendo a propagação de genes de resistência a diferentes antibacterianos, tal processo é potencializado pela proximidade entre as células, sendo que a matriz do biofilme parece estabilizar os contatos entre as células vizinhas.

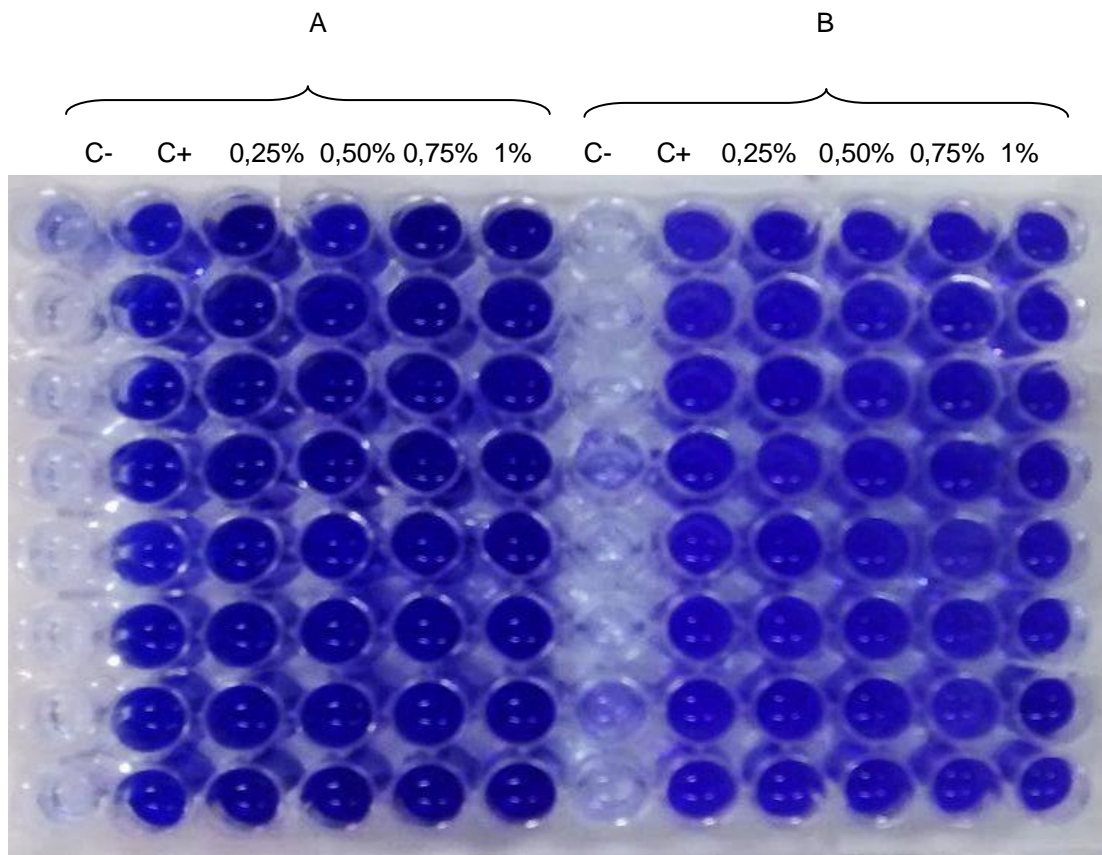


Figura 4: Avaliação da capacidade de formação de biofilme *in vitro* em isolados clínicos de *Staphylococcus* spp. isolados em um hospital de ensino em Pelotas em diferentes concentrações de glicose; C-: controle negativo; C+: controle positivo; A: isolado forte formador de biofilme; B isolado moderado formador de biofilme

No estudo realizado por Lazzarotto (2010), foi verificado que 64% de seus isolados de *S. epidermidis* oriundos de cateteres venosos apresentaram capacidade de formação de biofilme, entretanto a maioria demonstrou fraca e moderada capacidade. Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com os de Peixoto et al. (2015), os quais observaram que todos seus isolados de *Staphylococcus* spp. foram fortes formadores de biofilme.

Notou-se que grande parte dos isolados de *S. aureus* foram fortes formadores, com exceção de um dos isolados, o qual foi moderado formador de biofilme apenas no meio de cultura sem suplementação de glicose. Em contrapartida, no trabalho realizado por Carvalho et. al. (2014), dos 74 isolados clínicos de *S. aureus* apenas três demonstraram capacidade de formação de biofilme *in vitro*. Resultados semelhantes foram obtidos por Oliveira (2014), avaliando a capacidade de formação de biofilme em 200 isolados clínicos de *Staphylococcus* spp., destes apenas 24 demonstram capacidade de formar biofilme *in vitro*.

Observou-se que apenas 12,5% dos isolados de SCN foram moderados formadores de biofilme, os demais 87,5% apresentaram-se como fortes formadores. Resultados semelhantes a esse foram obtidos por Silva (2014), dos quais 20% de seus isolados clínicos de *S. epidermidis* foram moderados formadores de biofilme e 56% fortes formadores, e diferentemente do obtido no presente trabalho, 24% de seus isolados foram fracos formadores.

Através do Teste T e ANOVA, foi observado que as diferentes concentrações de glicose apresentaram diferença significativa na formação do biofilme bacteriano. As concentrações de 0,50%, 0,75% e 1%, potencializaram a formação de biofilme dos isolados. Entretanto, o meio sem suplementação e com 0,25% de glicose não influenciou a formação de biofilme, não apresentando diferença significativa (Figura 5).

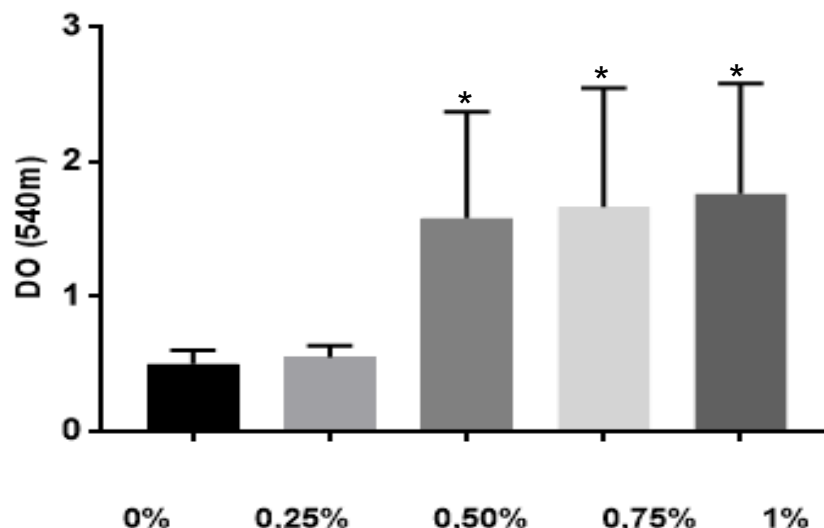


Figura 5: Médias das densidades ópticas (DO) dos biofilmes formados por *Staphylococcus* spp. oriundos de um hospital de ensino em Pelotas frente a diferentes concentrações de glicose

Alguns estudos avaliam a formação de biofilme com suplementação de glicose, como o realizado por O'Neil et al. (2007), trabalhando com isolados clínicos de MRSA e MSSA. Nesse trabalho foi observado que no meio de cultura sem glicose, apenas 8% dos isolados de MRSA e 18% de MSSA, foram capazes de formar biofilme. Entretanto, quando o meio foi suplementado com 1% de glicose, a formação de biofilme aumentou significativamente para 74% e 84%, respectivamente, diferentemente dos resultados obtidos no presente estudo, visto que todos isolados foram formadores de biofilme em todas concentrações avaliadas. Agarwal e Jain (2013) relatam dados similares aos de O'Neil et al. (2007) quanto as concentrações de glicose. Também foi observado um aumento significativo na produção de biofilme em seus isolados clínicos de *Staphylococcus* spp., onde estes passaram a ser formadores de biofilme quando o meio foi suplementado com glicose.

A formação de biofilme *in vitro* por *Staphylococcus* spp. em resposta a diferentes suplementações de glicose é bastante documentada por vários autores, visto que sua importância clínica é dada principalmente pelos mesmos estarem relacionados a infecções associadas a uso de dispositivos médicos invasivos e pós operatório. Acredita-se que a hiperglicemia junto a falhas no sistema imune possa favorecer a formação de biofilmes, assim como desempenhar um aumento na taxa de infecção, principalmente em pacientes com diabetes *mellitus* visto que estes são mais propensos a infecções (WALDROP et al., 2014). Alguns estudos demonstram que a espécie mais frequentemente isolada em indivíduos diabéticos com infecções nos membros inferiores é o *S. aureus*, conforme relatado por Carvalho et al. (2004), e dentre os isolados 11,5% foram identificadas como ORSA.

Quanto ao crescimento bacteriano, observou-se que as suplementações de glicose quando comparadas com o controle negativo, não apresentaram diferenças significativas, não potencializando o crescimento dos isolados nas diferentes concentrações ($p < 0,05$) (Figura 6).

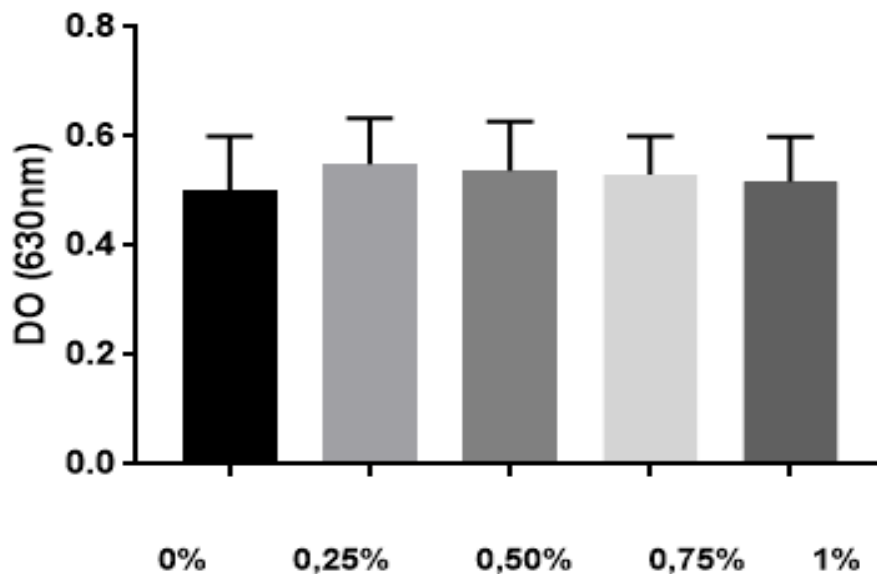


Figura 6: Médias das densidades ópticas (DO) de crescimento dos isolados clínicos de *Staphylococcus* spp. oriundos de um hospital de ensino em Pelotas frente a diferentes concentrações de glicose

Com relação à produção de biofilme e ao perfil de sensibilidade aos antibacterianos testados (Tabela 3) nota-se que todos isolados moderados formadores demonstraram sensibilidade intermediária à vancomicina e apresentaram-se resistentes a gentamicina e eritromicina, e destes apenas um teve o gene *mecA* amplificado. Quanto à oxacilina e cefoxitina, 50% dos isolados foram resistentes frente a esses antibacterianos.

Observou-se que dentre os isolados fortes formadores de biofilme, mais de 75% demonstraram-se sensíveis a vancomicina, entretanto 19,1% e 4,8% apresentaram perfil de sensibilidade intermediária e resistente, respectivamente. Constatou-se um importante perfil de resistência dos isolados frente à oxacilina e eritromicina, entretanto também nota-se que mais de 75% destes foram sensíveis a gentamicina e vancomicina. Quanto a presença do gene *mecA*, o mesmo foi observado em 56,5% dos isolados fortes formadores de biofilme.

Dentre os isolados avaliados no presente trabalho, que apresentaram o genótipo de MRS, apenas um destes foi classificado como moderado formador de biofilme. Acredita-se que possa existir uma correlação entre a sensibilidade a meticilina (e outros β -lactâmicos) e a regulação de formação de biofilme em isolados clínicos de *S. aureus* através do gene *ica*, o qual é o responsável pela formação dos biofilmes *ica*-dependente em *Staphylococcus* spp., como demonstrado por O'Neil et al. (2007), onde seus isolados de MSSA demonstraram maior capacidade de

formação de biofilme em diferentes condições quando comparados aos de MRSA (FITZPATRICK, HUMPHREYS e O'GARA, 2005).

Tabela 3: Perfil de sensibilidade de isolados clínicos formadores de biofilme de *Staphylococcus* spp. oriundos de um hospital de ensino em Pelotas.

Antibacteriano	Moderado Formador (n=2)			Forte Formador (n=19)		
	S	I	R	S	I	R
Vancomicina	-	100%	-	76,1%	19,1%	4,8%
Cefoxitina	50%	-	50%	42,8%	9,8%	47,6%
Gentamicina	-	-	100%	76,1%	4,8%	19,1%
Eritromicina	-	-	100%	23,8%	4,8%	71,4%
Oxacilina	50%	-	50%	19,1%	-	80,9%

R: Resistente; I: Intermediário; S: Sensível.

Resultados semelhantes aos obtidos também foram observados por Rito (2008), onde 83,7% de isolados clínicos de MRSA e 52,4% de MRSE foram formadores de biofilme, e destes 90% demonstraram resistência a eritromicina. Bernardi, Pizzolitto e Pizzolitto (2009) verificaram que 59,2% dos isolados de *S. epidermidis*, oriundos de cateteres venosos de uma UTI foram resistentes a gentamicina, 81,4% a eritromicina, 88,9% a penicilina e 70,4% oxacilina, sendo todos eles fortes produtores de biofilme, corroborando ao encontrado no presente estudo. De acordo com alguns autores, os biofilmes limitam a ação de substâncias antimicrobianas no interior de sua matriz e também facilitam a expressão de genes de resistência, assim como sua transferência (HENRIQUES, VASCONCELOS e CERCA, 2013).

Oliveira (2014) avaliando 200 isolados de *Staphylococcus* spp. oriundos de hemoculturas e infecções do trato urinário, verificou que apenas 24,5% dos isolados apresentaram capacidade de formação de biofilme *in vitro*. O mesmo autor relata que 69,4% dos isolados formadores de biofilme foram resistentes a oxacilina, 40,8% a eritromicina e 36,7% a gentamicina, porém todas demonstraram-se sensíveis a vancomicina, semelhante aos resultados referentes ao perfil de sensibilidade obtido em nosso estudo. Silva (2014) também comparando o perfil de resistência de seus isolados clínicos de *S. epidermidis* observou que das amostras produtoras de biofilme, 80%, 68% e 92% demonstraram-se resistentes eritromicina, gentamicina e oxacilina, entretanto todas foram sensíveis à vancomicina.

Alguns autores como Stewart (2002) indicam que os mecanismos relacionados à resistência dos biofilmes a antibacterianos são diferentes dos responsáveis pela resistência em células na forma planctônica frente aos mesmos agentes. Devido a isso, acredita-se que a baixa sensibilidade a esses agentes pelos biofilmes ocorra devido a fatores como: baixa penetração dos fármacos, podendo ocorrer devido ao exopolissacarídeo (EPS) funcionar como uma barreira física aos agentes antibacterianos; diferentes fases de crescimento das células, visto que as células da base do biofilme apresentam crescimento mais lento, o que pode conferir resistência aos fármacos; possibilidade de transferência de genes de resistência entre as células bacterianas (DAVIES, 2003; MADSEN et al., 2012; TRENTIN, GIORDANI e MACEDO, 2013).

5. Conclusão

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, foi possível verificar variabilidade no perfil de sensibilidade dos isolados clínicos de *Staphylococcus* spp. frente aos antibacterianos avaliados. Observou-se que 78% demonstraram resistência frente à oxacilina e 74% a eritromicina, apenas 4% apresentaram-se sensíveis a todos os fármacos testados. Além disso, 60% dos isolados avaliados tiveram a presença do gene *mecA*. Deve-se ressaltar que todos os isolados avaliados foram formadores de biofilme *in vitro*, sendo seu desenvolvimento potencializado por diferentes concentrações de glicose.

Referências

ALMEIDA, Z. G.; FARIAS, L. R. Investigação epidemiológica das principais infecções nosocomiais no Brasil e identificação dos patógenos responsáveis: uma revisão bibliográfica. **Revista Brasileira de Pesquisa em Ciências da Saúde**. v.1, n.2, p.49-53, 2014.

ALMEIDA, L. C.; PIMENTA-RODRIGUES, M. V.; MORIS, D. V., FORTALEZA, C. M. C. B.; CUNHA, M. L. R. S. C. Avaliação fenotípica e genotípica do perfil de resistência de amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de culturas clínicas e de vigilância de um hospital de ensino brasileiro. **Colloquium Vitae**, v.4, n.2, p.68-78, 2012.

ALVES, L. N. S.; OLIVEIRA, C. R.; SILVA, L. A. P.; GERVÁSIO, S. M. D.; ALVES, S. R.; SGAVIOLLI, G. M. Hemoculturas: estudo da prevalência dos microrganismos e o perfil de sensibilidade dos antibióticos utilizados em Unidade de Terapia Intensiva. **Journal of Health Science Institute**. São Paulo. n.30, v.1, p. 44-47, 2012

AGARWAL, A.; JAIN, A. Glucose & sodium chloride induced biofilm production & ica operon in clinical isolates of staphylococci. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 138, p. 262–266, 2013.

AMARAL, M. M.; COELHO, L. R.; FLORES, R. P.; SOUZA, R. R.; SILVA, M. C. C.; TEIXEIRA, L. A.; FERREIRA, B. T. C.; FIGUEIREDO, A. M. The predominant variant of the Brazilian epidemic clonal complex of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has an enhanced ability to produce biofilm and to adhere to and invade airway epithelial cells. **Clinical Infectious Diseases**, Rio de Janeiro, n. 5, p. 801-810, 2005.

ANDRADE, E. R.; CASEIRO, M. M.; GAGLIANI, L. H. Estudo da prevalência bacteriana e resistência aos antimicrobianos isolados de materiais biológicos em hospital, no município de Santos/SP- Brasil. **Revista UNILUS Ensino e Pesquisa**, v.12, n.27, p.88, 2014.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Investigação e controle de bactérias multirresistentes. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/servicos/saude/controle/reniss/manual%20controle_bacterias.pdf Acesso em: 17 set. 2016.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Uso racional de antimicrobianos e a resistência microbiana. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo1/res_principais2.htm Acesso em: 17 set. 2016.

ARCHER, G. L.; *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. **Clinical Infectious Diseases**, Virginia, n. 26, p. 1179- 1181, 1998.

BAPTISTA, M. G. F. M. **Mecanismos de resistência aos antibióticos**. 2013. 51f. Tese (Mestre em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde- Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, 2013.

BASTOS, M.D.C.D.F.; COUTINHO, B.G.; COELHO, M.L.V. Lysostaphin: a Staphylococcal bacteriolysin with potential clinical applications. **Pharmaceuticals**, Suíça, v.3, n.4, p.1139–1161, 2010.

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**. Araraquara. n. 1, v.28, p. 57-66, 2007.

BERQUÓ, L. S.; BARROS, A. J. D.; LIMA, R. C.; BERTOLDI, A. D. Utilização de antimicrobianos em uma população urbana. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 2, p. 239-246, 2004.

BORETTI, V. S.; CORRÊA, R. N.; SANTOS, S. S. F.; LEÃO, M. V. P.; SILVA, C. R. G. Perfil de sensibilidade de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. isolados de brinquedos de brinquedoteca de um hospital de ensino. **Revista Paulista de Pediatria** Taubaté. n. 32, v.3, p. 151-156, 2014.

BOUCHER, H.W.; TALBOT, G. H.; BRADLEY, J. S. Bad bug, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, n. 48, p. 1-12, 2009.

BOYCE, J. M.; POTTER, B. G.; CHENEVERT, C.; KING, T.; Environmental contamination due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: possible infection control implications. **Infection Control Hospital Epidemiology**. n. 18, v. 9, p. 622-627, 1997.

BRITES, C.; SILVA, N.; SAMPAIO-SÁ, M. Temporal evolution of prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a tertiary hospital in Bahia, Brazil: a nine year evaluation study. **Brazil Journal of Infectious Diseases**. v.59, n.3, p. 172-179, 2006.

BRITO, D. V. D.; BRITO, C. S.; RESENDE, D. S.; Ó, J. M.; ABDALLAH, V. O. S.; FILHO, P. P. G. Nosocomial infections in a Brazil neonatal intensive care unit: a 4- year surveillance study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Uberlândia, v. 43, n. 6, p. 633-637, 2010.

BREVES, A.; MIRANDA, C. A. C.; FLORES, C.; FILIPPIS, I.; CLEMENTINO, M. M. Methicillin-and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in health care workers and medical devices. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial**. Rio de Janeiro, v.51, n.3, p.143-152, 2015.

BROKEMA, N. M.; VAN, T. T.; MONSON, T. A.; MARSHALL, S. A.; WARSHAUER, D. M. Comparison of cefoxitin and oxacillin disk diffusion methods for detection of *mecA* mediated resistance in *Staphylococcus aureus* in a large-scale study. **Journal of Microbiology**, v. 47, n.1, p. 217-219, 2009.

CARVALHO, C. B. M.; NETO, R. M.; ARAGÃO, L. P.; OLIVEIRA, M. M.; NOGUEIRA, M. B.; FORTI, A. C. Pé diabético: análise bacteriológica de 141 casos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. v.48, n.3, p. 398-405, 2004.

CARVALHO, F. A.; HORNER, R.; RODRIGUES, M. A.; DAMER, J. R. S.; WAGNER, T. F. Avaliação da produção de biofilme em *Staphylococcus aureus* em hospital terciário. In: **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, Santa Maria, v.6, n.2, 2014.

CHAMBERS, H. F. Methicillin resistance in Staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clinical Microbiology**, v.10, n.1, p.789-791, 1997.

COELHO, S. M. O.; MORAES, R. A. M.; SOARES, L. C.; PEREIRA, I. A.; GOMES, L. P.; SOUZA, M. M. S. Mapeamento do perfil de resistência e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius* oxacilina resistentes isolados de espécies humanas e animais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 1, p. 195-200, 2007.

COIA, J. E.; DUCKWORTH, G. J.; EDWARDS, D. I.; FARRINGTON, M.; FRY, C. HUMPHERYS, H.; MALLAGHAN C.; TUCKER, D. R. Control Nurses Association Guidelines for the control and prevention of methicillin-resistant *Staphylococcus*

aureus (MRSA) in healthcare facilities. **Journal of Hospital Infection**. n. 63, v.1, p.21-44, 2006.

CORREAL, J. D. C.; MARQUES, E. A.; GUILHERME, W. L.; LEÃO, R. S.; DAMASCO, P. V. Infecções por *Staphylococcus aureus*: mudança do perfil epidemiológico no Hospital Universitário Pedro Ernesto. **Revista HUPE**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 3, p. 31-46, 2013.

COSTERTON, J. W.; MONTANARO, L.; ARCIOLA, C. R. Biofilm in implant infections: its production and regulation. **The International Journal of artificial organs**. n. 11, v. 28, p. 1062- 1068, 2005.

CUSTÓDIO, J.; ALVES, J. F.; SILVA, F. M.; DOLINGER, E. J. O. V.; SANTO, J. G. S.; BRITO, D. V. D. Avaliação microbiológica das mãos de profissionas da saúde de um hospital particular de Itumbiara, Goiás. **Revista Ciência Médica**, Goiás, v. 18, n. 1, p. 7-11, 2009.

CHRISTENSEN, G. D.; SIMPSON, W. A.; YOUNGER, J. J.; BADDOUR, L. M.; BARRET, F. F.; MELTON, D. M.; BEACHEY, E. H. Adherence of Coagulase-Negative Staphylococci to Plastic Tissue Culture Plates: a Quantitative Model for the Adherence of Staphylococci to Medical Devices. **Journal of Clinical Microbiology Tennessee**. v. 22, n. 6, p. 996-1006, 1985.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2012). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, fiveteenth informational supplement, document M2-A7**. Wayne, PA, USA, v.23, n.1, 2012.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2015). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, fiveteenth informational supplement, document M100**. Wayne, PA, USA, v.25, n.1, 2015.

CRUZ, E. D. A.; PIMENTA, F. C.; HAYASHIDA, M.; EIDT, M.; GIR, E. Detecção de *Staphylococcus aureus* na boca de trabalhadores da limpeza hospitalar. **Revista Latino Americana de Enfermagem**, Paraná, v. 19. n. 1. p. 1-7, 2011.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antimicrobial agents. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 114-122, 2003.

DEURENBERG, R.H., STOBRRERING, E.E. The evolution of *Staphylococcus aureus*. **Infection Genetics and Evolution**. v. 8, p. 747-763, 2008.

ELLINGTON, M. J.; KISTLER, J.; LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 59, n.1, p. 321-322, 2005.

ENRIGHT, M. C.; ROBINSON, D.; RANDLE, G.; FEIL, E. J.; GRUNDMANN, H.; SPRATT, B. G. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Harvard Medical School** [of] Harvard University. v. 99, n. 11, p. 75587-75592, 2002.

EVANGELISTA, S. S.; OLIVEIRA, A. C. *Staphylococcus aureus* metilino resistente adquirido na comunidade: um problema mundial. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Belo Horizonte, n. 68, v. 1, p. 136- 143, 2015.

FALAGAS, M. E.; KASIAKOU, S.; NIKITA, D.; MORFOU, P.; GEORGOULIAS, G.; RAFAILIDIS, P. I. Secular trends of antimicrobial resistance of blood isolates in a newly founded Greek hospital. **BMC infectious diseases**. Dunant. n.6, p. 99, 2006.

FARIA, I. S.; UENO, M. Estudo comparativo da colonização por *Staphylococcus aureus* em crianças saudáveis e crianças de uma unidade pediátrica de um hospital universitário. **Revista Biociências**, Taubaté, v. 15, n.1, p. 34-38, 2009.

FERREIRA, A. M.; ANDRADE, D.; ALMEIDA, M. T. G.; CUNHA, C. K.; RIGOTTI, M. A. Colchões do tipo caixa de ovo: um reservatório de *Staphylococcus aureus* resistência à metilina? **Revista Escola de Enfermagem** [de] Universidade de São Paulo, v. 45, n.1, p. 161-166, 2010.

FINCH, R. Gram-positive infections: lessons and novel solutions. **Clinical Microbiology and Infection**, Nottingham, v. 12, n. 8, p. 3-8, 2005.

FINAN, J. E.; ROSATO, A. E.; DICKINSON, T. M.; KO, D.; ARCHER, G. L. Conversion of oxacillin-resistant staphylococci from heterotypic to homotypic resistance expression. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v.46, p.24-20, 2002.

FITPATRICK, F.; HUMPHREYES, H.; O'GARA, J. P. Evidence for *icaADBC*-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**. v.43, p. 1973-1976, 2005.

FRENCH, G. L.; SHANNON, K. P.; ADAMS, N. M.; WATLING, D.; PARKS, M. J. Tackling contamination of the hospital environment by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a comparison between conventional terminal cleaning and hydrogen peroxide vapour decontamination. **Journal of Hospital Infection**. n. 57, v.1, p. 31-37, 2004.

FRIGATTO, E. A.; MACHADO, A. M.; PIGNATARI, A. C.; GALES, A. A. Is the cefoxitin disk test reliable enough to detect oxacillin resistance in coagulase negative staphylococci? **Journal of Clinical Microbiology**. n. 23, v.1, p. 2028-2029, 2005.

GARCEZ, P. T. L. **Estudo da ocorrência e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de profissionais de saúde na unidade de terapia intensiva de hospital público de Rio Branco-AC**. 2011. 103f. Dissertação (Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) – Instituto de Ciências Biológicas- Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

GARCÍA-ÁLVAREZ, L.; HOLDEN, M. T. G.; LINDSAY, H.; WEBB, C. R.; BROWN, D. F. J.; CURRAN, M. D.; WALPOLE, E.; BROOKS, K.; PICKARD, D. J.; TEALE, C.; PARKHILL, J.; BENTLEY, S. D.; EDWARDS, G. F.; GIRVAN, K. E.; KEARNS, A. M.; PICHON, B.; HILL, R. L. R.; LARSEN, A. R.; SKOV, R. L.; PEACOCK, S. J.; MASKELL, D. J.; HOLMES, M. A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. **Infectious Diseases**. v.11, p. 595-603, 2011.

GIROTI, S. K. O.; GARANHANI, M. L. Infecções relacionadas à assistência à saúde na formação do enfermeiro. **Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste**, Londrina, v. 16, n. 1, p. 64- 71, 2015.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Revista Química Nova**. v.33, n.3, p. 667-679, 2010.

HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. **Trends in Microbiology**. v. 13, n. 1, p. 7-10, 2005.

HENRIQUES, A.; VASCONCELOS, C.; NUNO, C. A importância do biofilmes nas infecções nosocomiais – O estado da arte. **Arquivos de Medicina**, Braga, v. 27, n. 1, p. 27-36, 2013.

HIRAMATSU, K., CUI, L., KURODA, M., ITO, T. The emergence and evolution of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 486-493, 2001.

HIGUCHI, W.; ISOBE, H.; IWAO, Y.; DOHMAE, S.; SAITO, K.; TAKANO, T.; OTSUDA, T.; BARANOVISH, T.; ENDO, C.; SUZUKI, N.; TOMIYAMA, Y.; YAMAMOTO, T. Extensive multidrug resistance of coagulase- negative staphylococci medical students. **Journal of Infection and Chemotherapy**. n.13, v. 1, p. 63-66, 2007.

HOSOSAKA, Y.; H. HANAK; H. ENDO; Y. SUZUK; Z. NAGASAWA; Y. OTSUKA; T. NAKAE; K. SUNAKAWA. Characterization of oxacillin-susceptible mecA-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. **Journal of Infectology Chemotherapy**. v. 13, p. 79-86, 2007.

HOWDEN, B. P.; DAVIES, J. K.; JOHNSON, P. D. R.; STINEAR, T. P.; GRAYSON, M. L. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 99–139, 2010.

ITO, T.; OKUMA, K.; MA, X. X.; YUZAWA, H.; HIRAMATSU, K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. **Drug Resistance Updates**, Tokyo, v. 6, n.1, p. 41-52, 2003.

JAFFE, R. I.; LANE, J. D.; ALBURY, S. V.; NIEMEYER, D. M. Rapid extraction from and direct identification of Clinical samples of Methicillin-resistant *Staphylococci* using the PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. v.38, n.9, p.3407-3412, 2000.

KATAYAMA, Y., TERUYO, I., HIRAMATSU, K. Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical *Staphylococcal* strains: role of IS431-mediated *mecl* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 45, p. 1955-1963, 2001.

KOBAYASHI, C. C. B. A.; SODOYAMA, G.; VIEIRA, J. D. G. Determinação da resistência antimicrobiana associada em isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* em um hospital public de Goiânia, Estado de Góias. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**. v. 42, n.4, p.404-410, 2009.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, Paul C.; JUNIOR, W. C. W. **Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido**. 5.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 564p.

KLUYTMANS, J.; van BELKUM, A.; VERBRUGH, H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms and associated risks. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, p. 505-520, 1997.

LEITE, Gustavo Balduino. **Análise de portadores assintomáticos de *Staphylococcus aureus* no hospital universitário de Brasília**. 2008. 102f. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular)- Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

LISBOA, T.; FARIA, M.; HOHER, A.; BORGES, L. A. A.; GÓMEZ J.; SCHIFELBAIN, L.; DIAS, F. D.; LISBOA, J.; FRIEDMAN. Prevalência de infecção nosocomial em Unidade de Terapia Intensiva do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 19, p. 414-420, 2007.

LOUREIRO, M. M.; MORAES, B. A.; QUADRA, M. R. R.; PINHEIRO, G. S.; ASENSI, M. D. Study of multi-drug resistant microorganisms isolated from blood cultures of hospitalized newborns in Rio de Janeiro City, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.33, p.73-78, 2002.

MACHADO, A. B. M. P. **Resistência à meticilina mediada pelo gene *mecA* nos *Staphylococcus spp.* coagulase negativa**. 2007. 162f. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciências Médicas)- Faculdade de Medicina- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

MADSEN, J. S.; BURMOLLE, M.; HANSEN, L. H.; SORENSEN, S. J. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. **Immunology and Medical Microbiology**, Copenhagen, v. 65, n.2, p. 183- 195, 2012.

MARANAN, M. C.; MOREIRA, B.; BOYLE-VAVRA, S.; DAUM, R. S. Antimicrobial resistance in Staphylococci: epidemiology, molecular mechanisms and clinical relevance. **Infectious Disease Clinics of North America**. v.11, p. 813-849, 1997.

MARRA, A. R.; CAMARGO, L. F. A.; PIGNATARI, A. C. C.; SUKIENNIK, T.; BEHAR, P. R. P.; MEDEIROS, E. A. S.; RIBEIRO, J.; GIRÃO, E.; CORREA, L.; GUERRA, C.; BRITES, C.; PEREIRA, C. A. P.; CARNEIRO, I.; REIS, M.; SOUZA, M. A.; TRANCHESI, R.; BARATA, C. U.; EDMOND, M. B. Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Hospitals: Analysis of 2, 563 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Journal of Clinical Microbiology**, São Paulo, v. 49, n. 5, p. 1866-1871, 2011.

MARTY, V.; MADIRAJU, V. S.; BRUNNER, D. P.; WILKINSON, B. J. Effects of temperature, NaCl and methicillin on penicillin-binding proteins, growth, peptidoglycan

synthesis and autolysis in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v.31, n.1, p.1727-1733, 1987.

McCULLOCH, John Anthony. **Avaliação da funcionalidade do locus *accessory gene regulator (agr)* em cepas de *Staphylococcus aureus* brasileiras com suscetibilidade reduzida aos glicopeptídeos**. 2006. 108f. Dissertação (Doutorado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

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

MIRAGAIA, M.; COUTO, I.; PEREIRA, S.; KRISTINSON, K.; WESTH, H.; JARLOV, J. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones: evidence of geographic dissemination. **Journal of Clinical Microbiology**. v.40, n. 2, p. 430-438, 2002.

MOMBACH, A. B. P. M.; REITER, K. C.; PAIVA, R. M.; BARTH, A. L. Distribution of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) types I, II, III and IV in coagulase-negative staphylococci from patients attending a tertiary hospital in southern Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v.56, p. 1328-1333, 2007.

MONSEN, T.; KARLSSON, C.; WISTRÖM, J. Spread of clones of multidrug-resistant coagulase-negative staphylococci within a university hospital. **Infection Control and Hospital Epidemiology**. n. 26, v.1, p. 76- 80, 2005.

MOTA, L. M.; VILAR, F. C.; DIAS, L. B. A.; NUNES, T. F.; MORIGUTI, J. C. Uso racional de antimicrobianos. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 43, n. 2, p. 162-172, 2010.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michel A. *Staphylococcus* e Cocos Gram Positivos Relacionados. In: **Microbiologia Médica**. 6° ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 935- 1005.

NUNES, A. P.; TEIXEIRA, L. M.; LORIO, N. L.; BASTOS, C. C.; FONSECA, L. S.; SOUTO-PADRON, T.; SANTOS, K. R. Heterogeneous resistance to vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus warneri* clinical strains: characterisation of glycopeptide susceptibility profiles and cell wall thickening. **International Journal of Antimicrobial Agents**. n.4, v. 27, p. 307-315, 2006.

OIE, S.; HOSOKAWA, I.; KAMIYA, A. Contamination of roomdoor handles by methicillin-sensitive/methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Hospital Infection** n. 51, n. 2, p. 140-143, 2002.

OLIVEIRA, A. **Biofilme estafilocócico: prevenção, detecção da produção e determinação do perfil de resistência a antimicrobianos**. 144f. 2014. Tese (Doutor em Biologia de Parasitas e Microrganismos) – Instituto de Biociências- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2014.

OLIVEIRA, A. D. D.; AZEVEDO, P. A.; SOUZA, L. B.; VIANA-NIERO, C.; FRANCISCO, W.; LOTTENBERG, G.; MARTINO, M. D. V.; HOFLING-LIMA, A. L. Laboratory detection for methicillin resistance in coagulase negative *Staphylococcus* isolated from ophthalmic infection. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**. n. 70, v. 4, p. 667-675, 2007.

OLIVEIRA, C. F.; MOREY, A. T.; GARBIN, R. P. B.; PERUGINI, M. R. E.; YAMAUCHI, L. M.; OGATTA, S. F. Y. Emergência de *Staphylococcus* resistentes aos antimicrobianos: um desafio contínuo. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. Salvador, v.13, n.2, p.242-247, 2014.

OLIVEIRA, D.C.; LENCASTRE, H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial and Agents Chemotherapy**, New York, v. 46, n. 7, p. 2155-216, 2002.

OLIVEIRA, G. A.; OKADA, S. S.; GUENTA, R. S.; MAMIZUKA, E. M. Avaliação da tolerância à vancomicina em 395 cepas hospitalares de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina. **Jornal Brasileiro de Patologia**. Rio de Janeiro, v.37, n.4, p. 239-246, 2001.

OLIVEIRA, W. M; **Avaliação da patogenicidade e do mecanismo de resistência à meticilina em amostras de *Staphylococcus* spp**. 2013, 99f. Tese (Doutor em Ciências Biológicas) - Pós Graduação em Ciências Biológicas- Universidade Federal de Pernambuco, 2013.

O'NEIL, E. ; POZZI, C.; HOUSTON, P.; SMYTH, D.; HUMPHEREYS, H.; ROBINSON, D. A.; O'GARA, J. P. Association between methicillin susceptibility and biofilm

regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. **Journal of Clinical Microbiology**. v.45, p.1379-1388, 2007.

REITER, K. C. **Distribuição dos SCCmec tipos I, II, III e IV em *Staphylococcus aureus* meticilina- resistente isolados de pacientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, 2009. 100f. Dissertação (Mestre em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

PATERSON, G. K.; HARRISON, E. M.; HOLMES, M. A. The emergence of *mecC* methicillin- resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, v.22, n.1, p. 42-47, 2014.

PEIXOTO, M. M. R.; GRESSLER, L. T.; SUTILI, F. J.; COSTA, M. M.; VARGAS, A. C. Ação dos desinfetantes sobre a adesão e biofilme consolidado de *Staphylococcus* spp. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Santa Maria, v.35, n.2, p.105-109, 2015.

PEREIRA, J. N. P. **Caracterização fenotípica e molecular da resistência aos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B de isolados clínicos de *Staphylococcus* spp.** 2014. 88f. Tese (Mestre em Ciências da Saúde) Pós Graduação em Medicina Tropical- Universidade Federal de Pernambuco, 2014.

PILLAI, S. K.; WENNERSTEN, C.; VENKATARAMAN, L.; ELIOPOULOS, G. M.; MOELLERING, R. C.; KARCHMER, A. W. Development of reduced Vancomycin susceptibility in Methicillin –susceptible *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v.49, n.48, p. 1169-1174, 2009.

PINHEIRO, L. ***Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus*: detecção de genes codificadores de biofilmes, toxinas, resistência a antimicrobianos e tipagem clonal em isolados de hemoculturas.** 2014, 26f. Dissertação (Mestre em Biologia Geral e Aplicada)- Instituto de Biociências de Botucatu- Universidade Estadual Paulista, 2014.

RABELO, M. A. **Estudo epidemiológico, genético e de susceptibilidade em *Staphylococcus* spp. de amostras de pacientes e profissionais de saúde de hospital universitário de Pernambuco.** 2012. 108. Dissertação (Mestre em Medicina Tropical) – Centro de Ciências da Saúde- Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2012.

RENNER, J. D. R.; CARVALHO, E. D. Microrganismos isolados de superfícies da UTI adulta em um hospital do Vale do Rio Pardo-RS. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**. Santa Cruz do Sul, v. 3, n.2, p. 40-44, 2013.

REYNOLDS, P. E.; BROWN, D. F. Penicillin-binding proteins of beta-lactam-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. Effect of growth conditions. **FEBS Lett**, Heidelberg, v. 192, n. 1, p. 28-32, 1985.

REZENDE, K. C. A. D.; TIPPLE, A. F. V.; SIQUEIRA, K. M.; ALVES, S. B.; SALGADO, T. A.; PEREIRA, M. S. Adesão à higienização das mãos e ao uso de equipamentos de proteção pessoal por profissionais de enfermagem na atenção básica em saúde. **Ciência, Cuidado e Saúde**, Goiânia, v.2, n. 11, p. 343-351, 2012.

PITTE, D. M. D.; HOUGONNET, M. D.; HARBATH, S.; MOUJUGA, M. D. P.; SAUVAN, V.; TOUVENAEU, R. N.; PERMEGER, M. D. Effectiveness of a hospital-wide programme to improve compliance with hand hygiene. **The Lancet**, Geneva, n. 923, v. 356, p. 1307-1312, 2000.

RIBEIRO, M.; CORTINA, M. A. As principais bactérias de importância clínica e os mecanismos de resistência no contexto das Infecções Relacionadas a Assistência a Saúde (IRAS). **Revista Científica UMC**, Mogi das Cruzes. v.1, n.1, 2016.

RIGATTI, F.; TIZOTTI, M. K.; HORNER, R.; DOMINGUES, V. O.; MARTINI, R.; MAYER, L. E.; KHUN, F. T.; FRANÇA, C. A.; COSTA, M. M. Bacteremias por *Staphylococcus coagulase negativos* (SCN) oxacilina resistentes em um hospital escola na cidade de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberlândia, v.43, n. 6, p. 686-690, 2010.

RITO, P. N. **Caracterização de cepas de *Staphylococcus* resistentes à meticilina quanto a produção de biofilme, resistência a antimicrobianos e realização do perfil e da tipificação clonal**. 2008. 84f. Dissertação (Mestre em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde- Fundação Oswaldo Cruz, 2008.

ROCA, D. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina asociado a la comunidad: aspectos epidemiológicos y moleculares. **Anales de la Facultad de Medicina**, Peru, v. 74, n. 1, p. 5762, 2013.

ROBINSON, D.; ENRIGHT, M. A. C. Evolutionary models of the emergence of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. **American Society for Microbiology**, v. 47, n. 12, 2003.

ROBERTS, M. C.; SUTCLIFFE, J. COURVALIN, P. JENSEN, L. B.; ROOD, J.; SEPPALA, H. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. **Antimicrobio Agents Chemotherapy**. v. 43, p. 2823-2830, 1999.

ROCA, D. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina asociado a la comunidad: aspectos epidemiológicos y moleculares. **Anales de la Facultad de Medicina**, Peru, v. 74, n. 1, p. 57-62, 2013.

RODRIGUES, Marcus Vinicius Pimenta. **Epidemiologia molecular e fatores de risco para a aquisição de clones endêmicas de *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (MRSA) em um hospital de ensino**. 2011. 117f. Dissertação (Doutorado em Doenças Tropicais)- Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Botucatu, 2011.

ROLO, J.; LENCASTRE, H.; MIRAGAIA, M. Strategies of adaptation of *Staphylococcus epidermidis* to hospital and community: amplification and diversification os SCCmec. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.6, n.67, p. 1333-1341, 2012.

ROSA, J. O.; MOURA, J. P.; PALOS, M. A. P.; GIR, E.; REIS, C.; KIPNIS, A.; CANINI, S. R. M. S.; RODRIGUES, F. B.; PIMENTA, F. C. Detecção do gene *mecA* em estafilococos coagulase negative resistentes à oxacilina isolados da saliva de profissionais da enfermagem. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 42, n. 4, p. 398-403, 2009.

SADER, H. S.; STREIT, J. M.; FRITSCHKE, T. R.; JONES, R. N. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated from European medical centers: results of the Daptomycin Surveillance Programme (2002-2004). **Clinical Microbiology Infectology**, v.12, n.9, p. 844-852, 2004.

SAGINUR, R.; DENIS, M. ST.; FERRIS, W.; AARON, S. D.; CHAN, F.; LEE, C.; RAMOTAR, K. Multiple combination bactericidal testing os Staphylococcal biofilms form implant-associated infections. **Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Canadá, v. 50 n. 1, p. 55-61, 2006.

SANTOS, A.; SAAVEDRA, J.; FERREIRA, H. Análise retrospectiva de infecções em doentes submetidos a colocação de prótese do joelho e da anca do Hospital da Prelada. **RPDI**. Porto, v.2, n.10, 70-79, 2014.

SANTOS, Laís Sevilha. **Staphylococcus aureus resistente à metilina adquirido na comunidade (CA-MRSA)**. 2015. 19f. Trabalho de Conclusão de curso (Graduação em Biomedicina)- Faculdade de Ciências da Educação e Saúde- Centro Universitário de Brasília, Brasília, 2015.

SAVAGE, V. ; CHOPERA, I.; O'NEILL, A. J. *Staphylococcus aureus* biofilms promote horizontal transfer of antibiotic resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.57, n. 4, p. 1968-1970, 2013.

SIERADZKI, K.; ROBERTS, R. B.; SERUR, D.; HARGRAVE, J.; TOMASZ, A. Heterogenously vancomycin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain causing recurrent peritonitis in a dialysis patient during vancomycin therapy. **Journal of Clinical Microbiology**. v.37,n.1, p.39-44, 1999.

SILVA, A. M.; CARVALHO, M. J.; CANINI, S. R. M. S.; CRUZ, E. D. A.; SIMÕES, C. L. A. P.; GIR, E. *Staphylococcus aureus* resistente à metilina: conhecimento e fatores associados à adesão da equipe de enfermagem às medidas preventivas. **Revista Latino Americana de Enfermagem**, São Paulo, v. 18. n. 3. p.50 -56, 2010.

SILVA, A. R. A.; SIMÕES, M. L. C. L.; WENERCK, L. S. TEIXEIRA, C. H. Infecções relacionadas à assistência à saúde por *Staphylococcus* coagulase negativa em unidade de terapia intensiva neonatal. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 25, n.3, p. 239-244, 2013.

SILVA, E. C. B. F.; SAMICO, T. M.; CARDOSO, R. R.; RABELO, M. A.; NETO, A. M. B.; MELO, F. L.; LOPES, A. C. S.; ACA, I. S.; MACIEL, M. A. V. Colonização pelo *Staphylococcus aureus* em profissionais de enfermagem de um hospital escola em Pernambuco. **Revista Escola de Enfermagem [de] Universidade de São Paulo**, v. 46, n.1, p. 128-132, 2012.

SILVA, G. S. F. **Produção de biofilme em amostras clínicas de *S. epidermidis*: influência de concentrações subinibitórias de antissépticos (Etanol e Clorexidina) e associação com potenciais marcadores de virulência**. 2014. 156f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Instituto de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

SILVA, N. R. S. **Análise da ocorrência do gene da betalactamase em isolados clínicos de *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina procedentes de Hospital Universitário da Cidade do Recife-PE.** 2015, 100f. Dissertação (Mestre em Medicina Tropical)- Centro de Ciências da Saúde- Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

SHORE, A. C.; DEASY, E. C.; SLICKERS, P.; BRENNAN, G.; O'CONNEL, B.; MONECKE, S. Detection of staphylococcal cassette chromosome mec type XI carrying highly divergent mecA, mecI, mecR1, blaZ, and ccr genes in humans clinical isolates of clonal complex 130 methicillin- resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents Chemother**, Dublin, n. 55, v. 8, p. 3765- 3773, 2011.

SIEVERT, D. M.; RUDRIK, J. T.; MCDONALD, L. C.; WILKINS, M. J.; HAGEMAN, J. C. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002-2006. **Clinical infectious diseases**, v. 46, n. 5, p. 668–674, 2008.

SOUSA, L. U.; MIELKE, T. P.; HORNER, R.; RODRIGUES, M. A.; SANTOS, S. O.; MARTINI, R.; SALLA, A. Avaliação de metodologias para a detecção de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e análise do perfil de sensibilidade frente aos antimicrobianos em um hospital terciário. **Saúde**. Santa Maria, v.37, n.1, p.23-30, 2011

SOUZA, M. A.; MEDEIROS, N. M.; CARNEIRO, J. R.; CARDOSO, A. M. Hemoculturas positivas de pacientes da unidade de terapia intensiva de um hospital escolar de Goiânia, entre 2010 e 2013. **Revista Estudos**. Goiânia, n.3, v.41, p. 627-635, 2014.

SOUSA, M. A.; SANCHES, I. S.; FERRO, M. L.; VAZ, M. J.; SARAIVA, Z.; TENDEIRO, T.; SERRA, J.; LENCASTRE, H. Intercontinental Spread of a Multidrug- Resistant Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* clone. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 9, p. 2590- 2596, 1998.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; VLAHOVIC, M. S. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Jornal of microbiology Methods**, v. 40, n.2, p. 175-179, 2001.

STEVENS, D.; BISNO, A.; CHAMBERS, H.; EVERETT, E.; DELLINGER, P.; GOLDSTEIN, E. Practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft-tissue infections. **Clinical Infectious Diseases**. v. 41, n.1, p. 1373-1406, 2005.

STEWART, G. T.; HOLT, R. J. Evolution of natural resistance to the newer penicillins. **British Medical Journal**, Toronto, v. 1, n. 5326, p. 308 – 311, 1963.

SUZUKI, E.; KUWAHARA-ARAI, K.; RICHARDSON, J. F.; HIRAMTSU, K. Distribution of *mec* regulator genes in methicillin-resistant *Staphylococcus* clinical strains. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v.37, p.1219-1226, 1993.

STEWART, P. K. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. **International of Medical Microbiology**. v.87, p.107-113, 2002.

THEISEN, J. **Susceptibilidade de *Staphylococcus epidermidis* à vancomicina, rifampicina, azitromicina e eritromicina**. 2010. 28f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia)- Faculdade de Farmácia- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v.14, n. 22, p. 113-128, 2013.

VILARINHO, L. M.; VILARINHO, M. L. C. M.; SILVA, F. L.; GUIMARAES, M. S. O.; LEAL, A. C. A. M. Isolamento de *Staphylococcus aureus* em mãos de profissionais de Unidade de Terapia Intensiva. **Revista Prevenção de Infecções e Saúde**, Lagoa Alegre, v.1, n.1, p. 10- 18, 2015.

von EIFF; C; PETERS, G.; HELLMANN, C. Pathogenesis of infection due to coagulase- negative staphylococci. **Infection Diseases**. n. 2, v. 11, p. 677-685, 2002.

WALDROP, R.; McLARREN, A.; CALABRA, F.; McLEMORE, R. Biofilm growth has a threshold response to glucose in vitro. **Clinical Orthopaedics and Related Research**. v. 472, n. 11, p. 3305-3310, 2014.

WENZEL, R. P. Health care-associated infections: major issues in the early years of 21st century. **Clinical Infectious Disease**, v.45, p.85-88, 2007.

WISPLINGHOFF, H.; ROSATO, A.; ENRIGHT, M.; NOTO, M.; CRAIG, W.; ARCHER, G. Related clones containing SCCmec type IV predominate among clinically significant

Staphylococcus epidermidis isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 47, n. 11, p. 3574-3579, 2003.