



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

ARMANDO MONTEIRO BEZERRA NETO

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA, MOLECULAR E ESTRUTURAL DE *Staphylococcus*
spp. COM SUSCEPTIBILIDADE REDUZIDA E RESISTENTE À VANCOMICINA
ORIUNDOS DE PROFISSIONAIS DE SAÚDE E DE PACIENTES ONCOLÓGICOS**

RECIFE/PE
2018

ARMANDO MONTEIRO BEZERRA NETO

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA, MOLECULAR E ESTRUTURAL DE *Staphylococcus* spp. COM SUSCEPTIBILIDADE REDUZIDA E RESISTENTE À VANCOMICINA ORIUNDOS DE PROFISSIONAIS DE SAÚDE E DE PACIENTES ONCOLÓGICOS

Tese de doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical.

Área de concentração: Medicina Tropical

Orientador: Prof^ª. Dr^ª.: Maria Amélia Vieira Maciel
Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª.: Nilma Cintra Leal

**RECIFE/PE
2018**

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

B574a Bezerra Neto, Armando Monteiro.
Análise microbiológica, molecular e estrutural de *Staphylococcus spp.* com susceptibilidade reduzida e resistente à vancomicina oriundos de profissionais de saúde e de pacientes oncológicos / Armando Monteiro Bezerra Neto. – 2018.
128 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Maria Amélia Vieira Maciel.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2018.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Staphylococcus. 2. Profissionais de saúde. 3. Biofilme. 4. Vancomicina. 5. Saúde Pública. I. Maciel, Maria Amélia Vieira (Orientadora). II. Título.

616.988

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2019-008)

ARMANDO MONTEIRO BEZERRA NETO

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA, MOLECULAR E ESTRUTURAL DE *Staphylococcus* spp. COM SUSCEPTIBILIDADE REDUZIDA E RESISTENTE À VANCOMICINA ORIUNDOS DE PROFISSIONAIS DE SAÚDE E DE PACIENTES ONCOLÓGICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical.

Aprovado em: 05/02/2018.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^ª. Dr^ª. Maria Amélia Vieira Maciel (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^ª. Dr^ª. Ana Beatriz Sotero Siqueira (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^ª. Dr^ª. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^ª. Dr^ª. Isabella Macário Ferro Cavalcanti (Examinadora Externa)
Centro Acadêmico de Vitória (CAV/UFPE)

Prof^ª. Dr^ª. Marcelle Aquino Rabelo (Examinadora Externa)
Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO-PE)

Dedico esse meu trabalho de Doutorado a toda minha família que sempre apoiou-me, e hoje, estão vendo me conquistar mais essa etapa em minha vida profissional e acadêmica. Aos meus amigos, uns de longa data e outros que encontrei durante minha vida acadêmica, pessoas tão queridas quanto meus familiares e que igualmente me apoiaram, preocupando-se e dispondo-se a ajudar dentro de suas possibilidades.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela sua intensa presença em minha vida, dando-me a sustentação necessária para nunca desistir de meus objetivos e sempre renovar em mim meu desejo de fazer o meu melhor a cada dia.

À minha mãe, Marisa, pelo amor, carinho e apoio, meu maior exemplo de profissional dedicado e comprometido a alcançar o melhor em suas atividades, através da dedicação e incansável devoção as suas conquistas, pela insistência em conseguir sempre mais, em mostrar que sacrifícios são necessários quando se deseja algo de todo o coração,

Ao meu pai, Dagoberto, pela sua devoção a família, por me mostrar que diante de todas as adversidades a família é sempre um porto seguro. Pelo amor incondicional e desmedido. Agradeço a ele pelo senso de honradez e cumprimento de nossas obrigações.

Aos meus irmãos, Vanessa e Paulo, meus companheiros de jornada terrena, presentes de Deus!!!! Pela amizade, descontração, compreensão e amor que espero sempre contar e precisar.

À minha amiga, colega de mestrado e irmã científica, Marcelle Aquino Rabelo, pela amizade e companhia durante todo o tempo que passamos juntos no laboratório como alunos de Iniciação Científica, mestrandos e alguns anos de doutorado, pela disponibilidade em prestar-me ajuda, trocando conhecimentos e experiências sempre que pedia seu auxílio.

Aos colegas de grupo de pesquisa, Jailton, Jussyêgles e Valdemir, pela amizade, apoio, auxílio e preocupação. Pessoas que foram fundamentais para o desenvolvimento da pesquisa e aquisição dos resultados, ajudando a melhorar as metodologias utilizada, compreensão dos resultados e elaboração da presente tese de doutorado.

À professora Maria Amélia Vieira Maciel, minha mãe científica, uma pessoa maravilhosa que entrou e permaneceu por 10 anos em minha vida, escolhendo-me dentro de tantos outros candidatos para ser seu aluno de Iniciação Científica, juntamente com Marcelle. Pela orientação, amizade, preocupação, atenção, paciência e confiança depositados em mim.

À professora Nilma Cintra Leal, pela amizade, tranquilidade, auxílio e colaboração dada através de idéias e soluções para o andamento do projeto e auxílio para a realização do estudo, cedendo-me um pouco de seu conhecimento e atenção.

Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular, Elizabeth, Alexssandra e Elza, que durante todo o desenvolvimento da pesquisa e obtenção dos resultados, me ajudaram prestando-me suporte emocional.

À Ivaldo Rodrigues Araújo, pela amizade, companheirismo mais que fundamental. Por caminhar comigo durante toda a trajetória do doutorado, dividindo comigo todas as preocupações e soluções para os problemas enfrentados ao longo desses quatro anos, e por todo auxílio na parte elaborativa, da tese e artigos.

À todos os meus amigos que sempre me apoiaram em minhas investidas profissionais, pelo apoio que me fornecem na busca de meus sonhos e na credibilidade em minhas capacidades.

Ao CNPq, à CAPES e à FACEPE pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível a realização e conclusão do doutorado.

Aos funcionários técnicos administrativos do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical pelos auxílios e solução de dúvidas que sugeriram durante toda a realização do doutorado.

Aos profissionais do laboratório de microbiologia do Hospital do Cancer de Pernambuco, que tiveram um papel fundamental para aquisição do material biológico necessários para a pesquisa.

“Mesmo as noites totalmente sem estrelas podem anunciar a aurora de uma grande realização.”
(King, 1964)

RESUMO

Staphylococcus spp. multidroga-resistentes é um dos microorganismos mais prevalentes em infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), em especial, em portadores assintomáticos. A utilização da vancomicina como opção terapêutica nessas infecções propicia a redução da susceptibilidade à vancomicina. O objetivo do estudo foi analisar o perfil de susceptibilidade à vancomicina de *Staphylococcus* spp. provenientes de pacientes oncológicos e da microbiota de profissionais de saúde, avaliar a capacidade de produção de biofilme em isolados clínicos e análise estrutural dos isolados de profissionais. Foram estudados 102 isolados oriundos de nasofaringe de profissionais de saúde e 56 isolados de diversas amostras clínicas de pacientes oncológicos. Todos isolados foram submetidos ao teste de susceptibilidade à vancomicina através da técnica de ágar suplementado com 6 µg/ml de vancomicina (BHIV6) e determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC). No BHIV6, observou-se o crescimento de dez isolados oriundos de pacientes oncológicos, oito *S. aureus* e dois CoNS. Nos isolados da microbiota de profissionais de saúde, cresceram 19, 7 *S. aureus* e 12 CoNS. Através da microdiluição em caldo para determinação da MIC, nos isolados dos pacientes, dois isolados de *S. aureus* foram resistentes MIC \geq 16 µg/µl, e nos isolados oriundos de profissionais de saúde, dois isolados de *S. aureus* apresentaram MIC \geq 16µg/mL e três CoNS com MIC \geq 32µg/mL sendo todos resistentes. Em relação à pesquisa do gene *vanA*, dos cinco isolados com MICs resistentes proveniente dos profissionais, apenas um isolado (*S. epidermidis*) transportou o gene *vanA*. Não foi observado o gene *vanA* nos isolados clínicos. Nos isolados oriundos de pacientes, analisou-se a capacidade de produção de biofilme, utilizando as técnicas de produção de exopolissacarídeo em ágar Vermelho Congo (AVC) e ensaio da produção de biofilme. Observou-se 41(73%) positivos em ambas as metodologias. Na formação de biofilme em presença de vancomicina, 15 isolados se enquadraram como não aderentes (13 *S. aureus* e 2 CoNS), 29 como fracamente aderente (24 *S. aureus* e 5 CoNS), cinco moderadamente aderentes (4 *S. aureus* e 1 CoNS) e cinco fortemente aderentes (todos *S. aureus*). Cruzando os resultados obtidos por essa técnica com os resultados da técnica (AVC), observou-se que 39 (70%) dos isolados positivos em ambas as técnicas. Comparando a produção do biofilme com e sem vancomicina, obteve-se uma boa concordância entre as técnicas. Nos isolados clínicos produtores de biofilme, 39,3% (22/56) eram portadores do gene *icaAD* (19 *S. aureus* e 3 CoNS), entre estes, dois isolados de *S. aureus* apresentaram resistência à vancomicina. Nenhum isolados CoNS que carregava o gene *icaAD* e capacidade de produzir biofilme, apresentou

resistência à vancomicina. Os isolados provenientes de profissionais de saúde resistentes à vancomicina foram analisados através do MET, e apresentaram espessamento de parede celular, além de outras alterações estruturais. Os dados obtidos no estudo com isolados clínicos de pacientes oncológicos sugerem uma seleção apropriada da utilização de antimicrobianos. Em relação aos isolados provenientes de profissionais de saúde, um isolado albergava o gene *vanA*, e os demais apresentaram espessamento de parede celular, além de outras alterações estruturais celulares que sugerem outros mecanismos de resistência à vancomicina.

Palavras-chave: *Staphylococcus*. Profissionais de saúde. Biofilme. Vancomicina. Saúde Pública.

ABSTRACT

Staphylococcus spp. multidrug-resistant is one of the most prevalent microorganisms in health care associated infections (HAI), in particular in asymptomatic carriers. The use of vancomycin as a therapeutic option in these infections promotes the reduction of susceptibility to vancomycin. The aim of the study was to analyze the profile of susceptibility to vancomycin *Staphylococcus* spp. from oncology patients and from the microbiota of health professionals, to evaluate the capacity of biofilm production in clinical isolates and structural analysis of the isolates of professionals. 102 isolates from the nasopharynx of health professionals and 56 isolates from different clinical samples of cancer patients were studied. All isolates were submitted to the vancomycin susceptibility test using the agar technique supplemented with 6 µg/mL vancomycin (BHIV6) and Minimum Inhibitory Concentration (MIC). In the BHIV6, the growth of ten isolates from cancer patients, eight *S. aureus* and two CoNS were observed. In the microbiota isolates of health professionals, there were 19, 7 *S. aureus* and 12 CoNS. Through broth microdilution for determination of MIC in patient isolates, two isolates of *S. aureus* were resistant to MIC ≥ 16 µg/mL, and in the isolates from health professionals, two isolates of *S. aureus* had MIC ≥ 16 µg/mL and three CoNS with MIC ≥ 32 µg/mL, all of them resistant. Regarding the *vanA* gene, of the five isolates with resistant MICs from the professionals, only one isolate (*S. epidermidis*) carried the *vanA* gene. The *vanA* gene was not observed in clinical isolates. In the isolates from patients, the biofilm production capacity was analyzed, using the techniques of exopolysaccharide production in Red Congo agar (RCA) and biofilm production assay. There were 41 (73%) positive results in both methodologies. In the biofilm formation in the presence of vancomycin, 15 isolates were classified as non-adherent (13 *S. aureus* and 2 CoNS), 29 as weakly adherent (24 *S. aureus* and 5 CoNS), five moderately adherent (4 *S. aureus* and 1 CoNS) and five strongly adherent (all *S. aureus*). Crossing the results obtained by this technique with the results of the RCA technique, it was observed that 39 (70%) of the positive isolates in both techniques. Comparing the biofilm production with and without vancomycin, a good agreement between the techniques was obtained. In biofilm-producing clinical isolates, 39.3% (22/56) were carriers of the *icaAD* gene (19 *S. aureus* and 3 CoNS), among which two *S. aureus* isolates showed resistance to vancomycin. None of the isolated CoNS that carried the *icaAD* gene and the ability to produce biofilm presented resistance to vancomycin. Isolates from health professionals resistant to vancomycin were analyzed through MET, and showed cell wall thickening, as well as other structural alterations. The data obtained in the study with clinical isolates of cancer patients suggest an appropriate

selection of antimicrobial use. In relation to the isolates from health professionals, one isolate had the *vanA* gene and the others had cell-wall thickening, as well as other cellular structural alterations that suggest other mechanisms of resistance to vancomycin.

Keywords: *Staphylococcus*. Healthcare workers. Biofilm. Vancomycin. Public health.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mecanismos de resistência do microrganismo à ação dos glicopeptídeos.....	39
Figura 2 – Placas de Agar-Sangue de Carneiro com amostra de <i>Staphylococcus spp.</i> Semeada	43
Figura 3 – Coloração de Gram (cocos em cacho Gram-positivos).....	43
Figura 4 – Teste da catalase.....	44
Figura 5 – Teste da coagulase.....	44
Figura 6 – Meio do manitol salgado semeado com <i>S. aureus</i>	45
Figura 7 – Placa de ELISA com 96 poços onde é realizado a microdiluição em caldo.....	46
Figura 8 – Demonstração esquemática da técnica de Extração de DNA total	49
Figura 9 – Demonstração esquemática da técnica de PCR	50

Artigo 1

Figura 1 – Teste da produção do exopolissacarídeo (slime) através do Ágar vermelho Congo	65
--	----

Artigo 2

Figura 1 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão	82
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Primers utilizados para a pesquisa molecular por PCR.....50

Artigo 1

Tabela 1 – Distribuição dos isolados de *Staphylococcus* sp. oriundos de pacientes oncológicos do Hospital do Câncer de Pernambuco entre as amostras clínicas obtidas no período de junho/12 a Outubro/16.61

Tabela 2 – Relação entre resistência à vancomicina e a capacidade de produzir biofilme em pacientes oncológicos o Hospital do Câncer de Pernambuco no período de Junho/12 a Outubro/1662

Tabela 3 – Relação entre pesquisa do gene *ica AD* e a capacidade de produzir biofilme em pacientes oncológicos o hospital do Câncer de Pernambuco no período de Junho/12 a Outubro/1663

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AaP	Proteína Associada a Acúmulo, do inglês Accumulation Associated Protein
agr	Gene Acessório Regulador, do inglês Accessory Gene Regulator
ATCC	Coleção de Cultura Tipo Americana, do inglês American Type Culture Collection
AVC	Ágar Vermelho Congo
BaP	Proteína Associada ao Biofilme, do inglês Biofilm Associated Protein
BHIA	Ágar Infusão de Cérebro e Coração, do inglês Brain-Heart Infusion Agar
BHIB	Caldo Infusão de Cérebro e Coração, do inglês Brain-Heart Infusion Broth
BHIV-3	Ágar suplementado com 3 µg/mL de vancomicina, do inglês Brain-Heart Infusion Agar supplemented with 3 µg/mL of vancomycin
BHIV-6	Ágar suplementado com 6 µg/mL de vancomicina, do inglês Brain-Heart Infusion Agar supplemented with 6 µg/mL of vancomycin
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CLSI	Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial, do inglês Clinical and Laboratory Standards Institute
CN	Controle Negativo
CoNS	<i>Staphylococcus</i> coagulase Negativo, do inglês Coagulase Negative Staphylococci
CVC	Cateter Venoso Central
DNA	Ácido Desoxirribonucléico, do inglês Deoxyribonucleic Acid
DNAe	Ácido Desoxirribonucléico Extracelular, do inglês Extracellular Deoxyribonucleic Acid
DNase	Enzima Desoxirribonuclease, do inglês Deoxyribonuclease Enzyme
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados, do inglês Deoxyribonucleotide Phosphate
DOc	Densidade Ótica do Controle
DOi	Densidade Ótica do Isolado
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético do inglês Ethylenediamine tetracetic acid
EPS	Exopolissacarídeo
ET	Toxina Esfoliativa, do inglês Esfoliative Toxins

GISA	<i>Staphylococcus aureus</i> com resistência Intermediária aos Glicopeptídeos, do inglês Glycopeptide Intermediate <i>S. aureus</i>
GRSE	<i>Staphylococcus epidermidis</i> Resistente aos Glicopeptídeos, do inglês Glycopeptide Resistant <i>S. epidermidis</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HCl	Ácido Clorídrico
h-VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> vancomicina intermediário heterogêneo, do inglês Heterogeneous Vancomycin-intermediate <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>ica</i>	gene do Cluster de adesão intercelular, do inglês intercellular adhesion <i>gene</i> cluster
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
LBBM	Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular
LPSN	Lista de nomes Procarióticos com Status em Nomenclatura
KCl	Cloreto de Potássio
MDR	Multidroga Resistência, do inglês Multidrug Resistance
MDRO	Organismo Multidroga Resistente, do inglês Multidrug Resistant Organism
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MIC	Concentração Inibitória Mínima, do inglês Minimum Inhibitory Concentration
MHA	Ágar Mueller Hinton, do inglês Mueller Hinton Agar
MRCoNS	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo meticilina resistente, do inglês Methicillin-resistant coagulase-negative <i>Staphylococci</i>
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente, do inglês Methicillin-resistant <i>S. aureus</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pureza Analítica
PBP	Proteína ligadora de Penicilina, do inglês Penicillin-Binding Protein
PCR	Reação em cadeia de Polimerase, do Inglês Polymerase Chain Reaction
PIA	Polissacarídeo de Adesão Intercelular, do inglês Polysaccharide Intercellular Adhesion
PNAG	Polímero N-acetil Glicosamina

PVL	Leucocidina de Panton Valentine, do inglês Panton–Valentine leukocidin
QS	Quorum Sensing
rpm	Rotações por minuto
SARSV	<i>Staphylococcus aureus</i> com susceptibilidade reduzida à vancomicina, do inglês <i>S. aureus</i> with reduced susceptibility to vancomycin
SDS	Dodecil sulfato de sódio, do inglês Sodium Dodecyl Sulfate
SE	Enterotoxina estafilocócica, do inglês Staphylococcal Enterotoxin
SpA	Proteína A estafilocócica, do inglês Staphylococcal Protein A
STE	Solução composta por Tris-HCl, SDS e EDTA
TBE	Solução composta de Tris-HCl, ácido Bórico e EDTA
TE	Solução composta por Tris-HCl e EDTA
TSB	Caldo de Soja Trypticaseína, do inglês Tryptic Soy Broth
TSST	Toxina da Síndrome do Choque Tóxico, do inglês Toxic <i>Shock</i> Syndrome Toxin
TSST-1	Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico, do inglês Toxic <i>Shock</i> Syndrome Toxin-1
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> com resistência intermediária à vancomicina, do inglês Vancomycin Intermediate-Resistant <i>S. aureus</i>
VRE	Enterococcus resistente à vancomicina, do inglês Vancomycin Resistant Enterococci
VRS	<i>Staphylococcus</i> spp. vancomicina resistente, do inglês Vancomycin Resistant Staphylococci
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> vancomicina resistente, do inglês Vancomycin Resistant <i>S. aureus</i>
VT-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> metilina resistente tolerante à vancomicina, do inglês Vancomycin Tolerant Methicillin-Resistant <i>S. aureus</i>
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônias por mililitro
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UV	Luz Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO BIBLIOGRAFICA	21
2.1	Características Gerais do gênero <i>Staphylococcus spp.</i>	21
2.2	Colonização e patogenicidade do <i>Staphylococcus spp.</i>	22
2.3	Virulência do <i>Staphylococcus spp.</i>	24
2.4	Biofilme	26
2.4.1	Métodos para a detecção da produção do biofilme.....	29
2.5.1	Adesão ao tubo de borossilicato	29
2.5.2	Produção do exopolissacarídeo em meio Agar Vermelho Congo.....	30
2.5.3	Produção de biofilme em placa de poliestireno.....	30
2.5.4	Pesquisa do gene ica	31
2.6	Resistência a agentes antimicrobianos	31
2.7	Glicopeptídeos	34
2.8	Mecanismos de resistência à vancomicina	37
2.9	Métodos de detecção da resistência à vancomicina	39
3	OBJETIVOS	41
3.1	Objetivo Geral	41
3.2	Objetivos Específicos	41
4	METODOLOGIA	42
4.1	Desenho do estudo	42
4.2	Isolados de <i>Staphylococcus spp.</i>	42
4.3	Re-identificação dos <i>Staphylococcus spp.</i>	42
4.4	Análise do perfil de susceptibilidade à vancomicina	45
4.5	Análise fenotípica da produção de exopolissacarídeos	46
4.6	Ensaio da produção de biofilme	45
4.7	Ensaio da produção de Biofilme na presença de vancomicina	47
4.8	Análise da escala de concordância dos testes fenotípicos	47
4.9	Extração de DNA total	48
4.10	Reação em cadeia de polimerase (PCR)	49
4.11	Microscopia eletrônica de transmissão	51
5	RESULTADOS	52

5.1	Artigo 1 - Detecção Fenotípica e Genética da produção de biofilmes em <i>Staphylococcus spp.</i> com susceptibilidade reduzida à vancomicina de pacientes oncológicos.....	52
5.2	Artigo 2 - Alterações Ultraestruturais de <i>Staphylococcus spp.</i> resistentes e sensíveis à vancomicina provenientes de profissionais de saúde.....	65
6	CONCLUSÕES.....	83
	REFERÊNCIAS	84
	APÊNDICE A - PHENOTYPIC AND GENETIC DETECTION OF BIOFILM PRODUCTION IN <i>Staphylococcus spp.</i> WITH REDUCED SUSCEPTIBILITY TO VANCOMYCIN FROM CANCER PATIENTS	95
	APÊNDICE B - ULTRASTRUCTURAL CHANGES OF <i>Staphylococcus spp.</i> RESISTANT AND SENSITIVE TO VANCOMYCIN FROM HEALTH PROFESSIONALS.....	110

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos do gênero *Staphylococcus* estão entre os principais agentes causadores de infecção comunitária e hospitalar em todo o mundo (GOUD et al, 2011; RABELO et al, 2013). As infecções bacterianas associadas à assistência saúde estão tornando-se mais frequentes e nos países em desenvolvimento devido aos recursos financeiros limitados, estas infecções são consideradas problemas de saúde pública (MURNI et al 2015).

Staphylococcus aureus é um importante microrganismo patogênico que causa uma variedade de doenças que variam de infecções leves de pele a doenças invasivas e sistêmicas, como endocardite, osteomielite, pneumonia e infecções da corrente sanguínea, com significativa morbidade e mortalidade (GALBUSERA et al, 2011; ZEMBOWER, 2014; TONG et al, 2015).

Os estafilococos coagulase-negativos, em especial, *Staphylococcus epidermidis*, são os principais microrganismos patogênicos nosocomiais de uma variedade de infecções relacionadas ao uso de dispositivos médicos (cateteres, sondas, drenos e próteses) em seres humanos (CREMNITER et al, 2010).

O tratamento das infecções por *Staphylococcus* spp. tornou-se mais complicado com a emergência cepas resistentes à meticilina (MRSA/MRCoNS). Tornando difícil o tratamento das infecções causadas por esses microrganismos que, em muito casos, tornou os glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina) uma alternativa terapêutica (SIEVERT et al, 2008; SORIANO et al., 2008; REHM et al, 2010; CÁZARES-DOMÍNGUEZ et al., 2015). O uso constante da vancomicina promove o aumento da pressão seletiva, ocasionando o aparecimento de cepas MRSA tolerante (VT-MRSA) e com resistência à vancomicina (GOMES, WARD e LAPLANTE, 2015; KOH et al., 2016).

A incidência de cepas de *S. aureus* de com reduzida susceptibilidade e resistente à vancomicina (VRSA) vem aumentando em várias partes do mundo (TIWARI & SEN, 2006). Isolados de *Staphylococcus aureus* e principalmente os estafilococos coagulase-negativos (CoNS) resistentes à meticilina e com reduzida susceptibilidade aos glicopeptídeos foram relatados no Japão, Estados Unidos, Europa e Ásia desde o final da década de 80 (HOWDEN et al., 2010).

No Brasil, cepas estafilocócicas com susceptibilidade reduzida a glicopeptídeos foram relatadas em hospitais em São Paulo e Rio de Janeiro há uma década (MELO et al., 2005) e, recentemente, *S. aureus* contendo genes *vanA* e *vanB* também foram descritos no Brasil (ROSSI et al., 2014; BREVES et al., 2015).

Os mecanismos de resistência à vancomicina em *S. aureus* podem ser relacionados a elementos genéticos, transposon *Tn1546*, que foi adquirido a partir de *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina (SIEVERT et al, 2008; AZIMIAN et al, 2012). Outros mecanismos de resistência à vancomicina incluem alterações na parede celular, resultando em reorganização e espessamento da mesma, e devido a estas modificações na parede celular a penetração da vancomicina fica reduzida, inibindo a ligação ao precursor de ácido N-acetil-murâmico, o alvo citoplasmático. Além disso, hVISA e VISA podem representar estado evolutivo bacteriano favorecendo a persistência no meio ambiente (HOWDEN et al 2010).

O surgimento de bactérias multidroga-resistentes (MDR) prejudica a assistência médica em hospitais, particularmente para pacientes admitidos nas unidades de terapia intensiva (UTI). Nestas unidades o uso extensivo de antimicrobianos impõe uma pressão seletiva e favorece o surgimento do MDR (CORNEJO-JUÁREZ et al., 2014). Dados relacionados às taxas de morbidade e mortalidade em infecções com microrganismos patogênicos bacterianos resistentes aos antimicrobianos demonstram que a terapêutica destas infecções é um desafio mundial (Akova 2016).

O risco de infecção é aumentado devido às doenças subjacentes ou condições do paciente, imunidade diminuída e exposição a dispositivos invasivos múltiplos (ventilação mecânica, cateteres de veia central (CVC) e cateteres do trato urinário) (CORNEJO-JUÁREZ et al., 2014). Estudos epidemiológicos analisando a microbiota de profissionais de saúde, realizados em diferentes superfícies bióticas (mãos, nasofaringe) descrevem a ocorrência de *S. aureus* e CoNS com resistência à diferentes antimicrobianos (RABELO et al 2014, MAHMOUD et al. 2015, VISALACHY et al, 2016, WIDERSTRÖM et al 2016). Por outro lado, Han e cols, 2015, demonstraram que *Staphylococcus* spp. que constituem a microbiota de pacientes colonizam o ambiente hospitalar, propiciando a circulação de bactérias multidroga resistente (MDR).

O tratamento de infecções estafilocócicas tem se tornado um grande desafio para a comunidade médica, pois além do grande potencial de virulência, como a capacidade de formar biofilmes, as opções de antimicrobianos têm sido reduzidas a partir do surgimento da resistência à penicilina, à meticilina e, mais recentemente, à vancomicina. Nesse contexto, conhecer as características fenotípicas-moleculares e estruturais de *Staphylococcus* spp. com reduzida susceptibilidade à vancomicina é necessário para entender e controlar a sua disseminação, como também auxiliar na antibioticoterapia desse microrganismo multirresistente.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Características Gerais do gênero *Staphylococcus spp.*

O termo *Staphylococcus* origina-se do grego, *staphylé*, e significa cacho de uvas, por causa do arranjo microscópico característico em agrupamentos. São membros da família Staphylococcaceae (EUZÉBY, 2015), juntamente com os gêneros *Planococcus*, *Micrococcus* e *Stomatococcus* (KONEMAN et al., 2008).

Até o momento, o gênero *Staphylococcus* possui 52 espécies e 28 subespécies (LPSN, 2016), 17 delas podem ser isoladas de amostras biológicas humanas, sendo *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus* os representantes mais presentes em isolados clínicos (BARRETO e PICOLI, 2008).

Os estafilococos são cocos Gram e catalase-positivos, com aproximadamente 0,5 a 1,5µm de diâmetro, imóveis, não esporulados. Podem apresentar diversos arranjos, que vão desde isolados, aos pares, em cadeias curtas, ou agrupados irregularmente (com aspecto semelhante a um cacho de uvas), devido a sua divisão celular, que ocorre em vários planos (LIMA et al, 2015). As colônias são usualmente lisas e convexas com borda contínua (KONEMAN et al., 2008). São microrganismos fastidiosos por isso são cultivados em meios ricos contendo caldo e/ou sangue (HARVEY et al, 2008). *Staphylococcus* crescem em meios não seletivos que são incubados tanto em aerobiose, gerando a produção de pigmentos nas colônias, quanto em anaerobiose, ambas resultando na formação de colônias grandes e lisas (KONEMAN et al, 2008; MURRAY et al, 2009).

Em relação à parede celular bacteriana, pode-se dizer que cerca de 90% desta é constituída por peptidoglicano, permitindo a estes microrganismos reter o cristal violeta durante o processo de coloração de Gram e por esse motivo são consideradas bactérias gram-positivas (TORTORA et al., 2006).

A produção de coagulase é importante princípio de diferenciação para as espécies de estafilococos: coagulase-positivos e coagulase-negativos (BECKER et al, 2016). Essa divisão é baseada na capacidade de coagular o plasma, que é uma propriedade considerada, há longo tempo, como importante marcador de patogenicidade dos estafilococos (TRABULSI et al., 2002). *S. aureus* é distinguido dos *Staphylococcus* coagulase-negativos (CoNS) principalmente pela positividade para coagulase. Além disso, as colônias de *S. aureus* tendem a ser amarelas e hemolíticas, em vez de cinzas e não-hemolíticas como as dos estafilococos coagulase-negativos (SCHAECHTER et al, 2009).

Em placas de Ágar sangue, um halo de beta-hemólise desenvolve-se em torno das colônias de *S. aureus*, o que não ocorre nos *Staphylococcus* coagulase-negativo (CoNS). Um meio importante para a identificação do *S. aureus* é o ágar manitol salgado, seletivo para essa espécie, uma vez que *S. aureus* consegue fermentar o manitol, produzindo ácido lático. Essa espécie se desenvolve também na presença de 7,5% de NaCl, que estimula a produção de coagulase, enzima que caracteriza a espécie (CASSETTARI et al., 2005; MURRAY et al, 2009; KONEMAN et al., 2008; INGRAHAM e INGRAHAM, 2011).

Como microrganismo oportunista, *Staphylococcus aureus* se comporta tanto como comensal quanto como microrganismos patogênicos. São encontrados colonizando a microbiota normal da pele e de outros sítios anatômicos como a nasofaringe, axilas, períneo e trato gastrointestinal; podendo tornar-se patogênico e causar diversas infecções, em condições que ocorrem a ruptura da barreira cutânea ou a diminuição da imunidade (SALES e SILVA, 2012; SOLLID et al., 2014).

2.2 Colonização e Infecções relacionadas ao *Staphylococcus* spp.

S. aureus faz parte da microbiota da pele e mucosa humana e podem se comportar como microrganismos patogênicos oportunistas, causando infecções cutâneas relativamente simples (celulite, impetigo e abscessos), até doenças sistêmicas potencialmente fatais (LOWY, 2003). As doenças malignas subjacentes são reconhecidas como importantes fatores de risco para o desenvolvimento de bacteremia e é através dela que o microrganismo pode se implantar em locais distantes, podendo causar endocardite, osteomielite, pioartrite e formação de abscessos metastáticos na pele, tecido subcutâneo, pulmões, fígado, rins e cérebro (ALMEIDA et al, 2013).

Os CoNS são considerados simples comensais da pele, que podem desenvolver infecções subagudas ou mesmo crônica, com um quadro clínico inespecífico, e facilmente tratável (BECKER et al, 2016). Entretanto, vem sendo considerado como microrganismos patogênicos emergentes, reconhecidos como causadores de processos infecciosos de pós-operatório oftalmológico, endocardites de válvulas nativas ou prostéticas, pneumonias, osteomielites e feridas cirúrgicas em infecções hospitalares (VOUNG, 2002)

Uma das razões pelas quais os estafilococos são considerados potencialmente patogênicos é a sua capacidade de se ligar às superfícies e desenvolver estruturas rígidas, muitas vezes referidas como um biofilme, portanto os biofilmes são definidos como um conjunto de

células bacterianas justapostas dentro de uma matriz e ligadas a uma superfície conferindo maior resistência à terapia antimicrobiana e às defesas do hospedeiro (PAHARIK & HORSWILL, 2016).

O *Staphylococcus aureus* é considerado um microrganismo patogênico de grande relevância no que se refere às infecções adquiridas, seja na comunidade ou em ambiente hospitalar, devido sua alta frequência e patogenicidade que o possibilita a produzir doenças, tanto em indivíduos saudáveis quanto em imunocomprometidos e sua alta capacidade em apresentar resistência a antimicrobianos tornou-se importante objeto de estudo (CATÃO et al, 2013).

Sua transmissão ocorre principalmente por contato direto com indivíduos colonizados ou infectados e também em contato com superfícies ou instrumentos contaminados (MACAL et al., 2014; KHAN, AHMAD & MEHBOOB, 2015). A maioria das infecções provocadas por *S. aureus* resulta de portadores assintomáticos, em que o indivíduo pode ser colonizado por períodos curtos ou longos, causando doença quando há algum comprometimento do sistema imunológico. Na população mundial cerca de 20% a 30% das pessoas são portadores persistentes e 60% alberga *S. aureus* de forma intermitente (DELEO et al., 2010; JENKINS et al., 2015).

O maior problema do portador assintomático é que, mesmo não apresentando sinais ou sintomas clínicos de doença ele representa potencial fonte de infecção, e pode estar disseminando o microrganismo patogênico pelos ambientes em que circula (RODRÍGUEZ - NORIEGA & SEAS, 2010). O estado de portador assintomático é ainda mais preocupante, quando este é um profissional da saúde. Devido a facilidade na transmissão do *S. aureus*, o portador é um fator de risco importante na epidemiologia e patogênese da doença, visto que a maioria das infecções relacionadas à assistência à saúde são adquiridas após exposição a mãos contaminadas de profissionais da saúde ou através do contato com outros pacientes colonizados e/ou infectados (ALVAREZ, LABARCA e SALLES, 2010).

A patogênese do *S. aureus* é complexa e depende de diversos fatores associados à doença clínica, os quais incluem a resistência aos antimicrobianos, a susceptibilidade do hospedeiro e a expressão de fatores de virulência que permitem a colonização persistente, evasão do sistema imune e disseminação no hospedeiro. O conjunto de fatores de virulência necessários para o desenvolvimento da infecção estafilocócica depende do sítio da infecção, o qual pode ser determinante na disseminação do microrganismo patogênico (VANDENESCH, LINA & HENRY, 2012; GORDON, WILLIAMS & CHAN, 2013; YU et al., 2015).

2.3 Virulência do *Staphylococcus* spp.

As células procarióticas são capazes de coexistir com organismos eucarióticos através de vários tipos de inter-relações. Um desses tipos de relação pode resultar em prejuízo para o hospedeiro, com diferentes graus de severidade. A extensão dos danos ocorre em função da saúde do hospedeiro e/ou da virulência bacteriana, e esta pode ser maximizada através de fatores de virulência especializados (RATTI & SOUSA, 2009). Para que cause infecção, é necessário que os fatores de virulência de *S. aureus* atuem de forma coordenada, até mesmo de maneira redundante, de tal forma que se um de seus fatores de virulência for afetado, os outros continuarão ativos (NILSDOTTER-AUGUSTINSSON et al, 2005).

Esses fatores de virulência podem ser classificados, basicamente, nas três seguintes categorias: a) fatores relacionados com a aderência às células do hospedeiro ou à matriz extracelular, como a produção de moléculas de fibrinogênio, fibronectina, colágeno ou da enzima coagulase; b) fatores relacionados com a evasão da defesa do hospedeiro, como diversas enterotoxinas estafilocócicas (SEs A-E, G-J, K, L, M, O e P), a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST), a proteína A, lipases e polissacarídeos capsulares; e c) fatores relacionados com a invasão na célula do hospedeiro e a penetração nos tecidos ou adesão de superfícies de cateteres e próteses, os quais incluem as proteínas (toxinas) a, b, d, g e d- hemolisinas (SANTOS et al, 2007).

Possuem vários mecanismos de virulência, como proteínas que atuam na adesão desta bactéria a superfícies e na invasão de tecidos de hospedeiros, exoproteínas que atuam contra mecanismos de imunidade, além de também possuir toxinas que causam hemólise (destruição dos hemócitos, ou glóbulos vermelhos) e que formam poros em membranas, permitindo o “vazamento” de íons e outras moléculas pequenas das células de hospedeiros. (TRABULSI *et al.*, 2002; STROHL et al., 2004; TORTORA *et al.*, 2006 KONEMAN *et al.*, 2008).

S. aureus possui vários fatores de virulência que podem contribuir para sua capacidade de produzir doença. Os principais fatores de virulência são cápsula (exopolissacarídeo), peptidoglicano, ácidos teicóicos, proteína A adesinas, hemolisinas, enzimas, toxinas extracelulares, leucocidinas, fibrinolisinina e as exoproteínas (STROHL et al, 2004 KONEMAN et al, 2008).

Junto aos fatores supracitados, também produz toxinas como as enterotoxinas estafilocócicas (SEs) que estão associadas a quadros de intoxicação alimentar; a leucocidina de Panton-Valentine (PVL) responsável pela formação de poros na membrana dos leucócitos

induzindo a citólise; a toxina esfoliativa estafilocócica (ETs) que induz eritema e esfoliação da pele, fenômeno observado na síndrome da pele escaldada; a toxina 1 da síndrome do choque tóxico estafilocócico (TSST-1), a qual estimula a proliferação de linfócitos T, causando a síndrome do choque tóxico; e a alfa, beta e delta-hemolisina que apresentam atividade hemolítica (BIEN, SOKOLOVA e BOZKO, 2011; VANDENESCH, LINA e HENRY, 2012; COSTA et al, 2013; YU et al., 2015; KONG, NEOH e NATHAN, 2016; WARYAH et al., 2016).

A alfa-hemolisina produzida por estafilococos é muito ativa contra eritrócitos de algumas espécies animais. Esta toxina apresenta ação necrosante em pequenos vasos e aparentemente induz a formação de poros, alterando a permeabilidade da membrana celular. As hemolisinas estafilocócicas beta, gama e delta apresentam menor toxicidade, mas seus mecanismos de atuação ainda não foram bem esclarecidos. Por outro lado, a leucocidina apresenta ação destrutiva direcionada a neutrófilos e macrófagos, permitindo que *S. aureus* escapem ileso da fagocitose (LUZ, 2008)

Uma proteína de superfície espécie-específica ancorada à parede celular do *S. aureus*, proteína A estafilocócica (*SpA*, do inglês *Staphylococcus* protein A), tem a habilidade de interagir com muitos componentes do hospedeiro, possivelmente desenvolvendo um papel como fator de virulência em infecções (KONEMAN *et al.*, 2008).

As exotoxinas são proteínas ou enzimas produzidas no interior de algumas bactérias Gram-positivas, decorrentes da multiplicação e metabolismo dos microrganismos, e liberadas na corrente sanguínea.

A maioria dos fatores de virulência em *Staphylococcus* spp. é coordenado pelo regulador gene acessório (*agr*, do inglês accessory gene regulator), um grupamento de genes com atividade quorum sensing (QS). O QS é um mecanismo de comunicação celular que permite controlar a expressão de genes em resposta a sua densidade populacional através da secreção de moléculas autoindutoras (GORDON, WILLIAMS e CHAN, 2013; KONG, NEOH e NATHAN, 2016).

As enterotoxinas exibem atividade de superantígeno, estimulando a proliferação policlonal de linfócitos T através do complexo formado entre moléculas do complexo principal de histocompatibilidade classe II com a porção variável do receptor de cadeia β ou α do linfócito T (LUZ, 2008).

Tanto o *S. aureus* quanto *S. epidermidis* apresentam um outro mecanismo de virulência, a produção de exopolissacarídeos que promovem a adesão intercelular (PIA), também chamada de polímero N-acetil-glucosamina (PNAG). O PIA/PNAG é sintetizado por enzimas

codificadas pelo operon *ica* (JABBOURI & SADOVSKAYA, 2010), envolvidos na formação de biofilmes em dispositivos médicos implantáveis (BARBIERI et al, 2015).

2.4 Biofilme

O biofilme é uma comunidade estruturada de células bacterianas que está encerrada em uma matriz polimérica autoproduzida e adere-se a uma superfície inerte ou viva (ANTUNES et al, 2011; MELAKE et al, 2017). Dependendo das espécies bacterianas, do tipo cepa e das condições ambientais, a matriz do biofilme é constituída por substâncias de várias formas químicas como exopolissacarídeos, proteínas, ácidos teicoicos e DNA extracelular (eDNA). Os biofilmes bacterianos são capazes de resistir a antibióticos, desinfetantes, fagocitose e outros componentes do sistema de defesa imune e inflamatória inata e adaptativa do hospedeiro (ARCIOLA et al, 2005; HOIBY et al, 2011).

O crescente uso de biomateriais implantáveis vem elevando a expectativa de vida humana, através do re-estabelecimento de inúmeras funções vitais, mas concomitantemente, causa um aumento das infecções associadas a biomateriais, que passaram a ser reconhecidas como um dos maiores problemas clínicos (BUSSCHER *et al.*, 2012). Aproximadamente 80% de todas as infecções no mundo estão associadas a biofilmes, especialmente, envolvendo biomateriais (TRENTIN, GIORDANI E MACEDO, 2013).

O processo de formação do biofilme requer dois estágios: a adesão da bactéria à superfície inerte e a formação de um agregado celular. Após a inserção no paciente, o biomaterial implantado é rapidamente coberto por plasma e proteínas da matriz extracelular, como fibrinogênio, fibronectina, vitronectina, tromboplastina e fator de von Willebrand, que são reconhecidos por receptores presentes na superfície celular das bactérias iniciando o processo de adesão (VON EIFF et al. 2002). A adesão bacteriana, seja em uma superfície abiótica (inanimada, como plásticos e metais) ou biótica (como células e tecidos animais ou vegetais), e o primeiro estágio na formação de biofilmes e é considerado um processo bastante complexo. Como regra geral, a adesão primária (ou adesão reversível) entre bactérias e superfícies abióticas ocorre mediada por interações físico-químicas não específicas, enquanto que a adesão a superfícies bióticas é acompanhada por interações moleculares mediadas por ligações específicas do tipo receptor-ligante (DUNNE, 2002). O estágio de adesão reversível é, portanto, ditado por interações entre a bactéria e o material, incluindo forças hidrodinâmicas,

interações eletrostáticas, forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas (PAVITHRA & DOBLE, 2008).

Uma vez que o organismo e a superfície alcançam uma proximidade crítica (em torno de 1 nm), a determinação final de adesão depende da soma de forças de atração ou repulsão gerada entre as duas superfícies. Essas interações eletrostáticas tendem a favorecer a repulsão, porque a maioria das bactérias e superfícies inertes e carregada negativamente; por outro lado, as interações hidrofóbicas parecem apresentar maior influência sobre o resultado da adesão primária. A repulsão entre duas superfícies pode ser superada por interações do tipo ligações de hidrogênio ou por interações moleculares específicas, mediadas por adesinas (KATSIKOGIANNI; MISSIRLIS, 2004),

Após a adesão de células bacterianas, ocorre um aumento na produção, na liberação e na detecção de moléculas sinalizadoras autoindutoras que regulam a formação de biofilme (BJARNSHOLT; GIVSKOV, 2007; HODGKINSON; WELCH; SPRING, 2007). Em seguida, ocorre um processo de acumulação celular influenciado por fatores bacterianos e ambientais (VON EIFF et al. 2002).

Conforme a densidade bacteriana aumenta, essas moléculas autoindutoras podem se acumular e induzir a transcrição de genes específicos que regulam várias funções como motilidade, virulência, produção de matriz exopolissacarídica (EPS) e a formação de biofilmes. Esse processo de comunicação encontrado em muitas bactérias patogênicas, que acopla a transcrição de genes específicos com a densidade celular bacteriana, e referido como *Quorum sensing* (QS). (RUTHERFORD; BASSLER, 2012).

O mecanismo de acumulação melhor estudado até o presente em estafilococos, está relacionado à produção da Adesina Intercelular Polissacarídica (PIA) ou N-acetil glucosamina polimérica (PNAG) codificada pelo operon *icaRADBC* (OTTO, 2009, MARTINI et al, 2016), composto por quatro genes biossintéticos (*icaADBC*) e um gene de regulação (*icaR*). A PIA é um homopolímero linear composto por aproximadamente 130 resíduos de N-acetilglucosamina ligados por β -1, 6, dos quais 15 a 20% são desacetilados (MARTINI et al, 2016). As enzimas IcaA e IcaD, quando co-expressadas, mostram melhor atividade para a montagem de glucosaminoglicanos ligados a β (1-6) que compreendem PIA. A ausência de IcaD está associada a uma diminuição na produção de PIA. As funções prováveis do IcaC estão relacionadas a extrusão da PIA da célula bacteriana, enquanto o IcaB parece funcionar como uma desacetilase. Embora a expressão do gene *icaA* possa promover a baixa produção de PIA, a expressão de genes *icaAD* ou *icaADC* estimula uma produção aumentada de biofilme (GOTZ, 2002; MARTINI et al, 2016).

Além da produção da PIA/PNAG, essa acumulação pode ocorrer por meio de uma adesão protéica mediada por proteínas de superfície como a Bap (Proteína Associada ao Biofilme) e Aap (Proteína Associada a Acumulação), mecanismos de aderência e acumulação celular independente do operon *ica* (MARTINI et al, 2016).

A segunda etapa da adesão bacteriana é a adesão secundária ou adesão irreversível. Nesse momento, os microrganismos fracamente ligados a superfície consolidam o processo de adesão, através da produção de EPS. Durante essa fase de adesão, os microrganismos são capazes de se ligar a células da mesma ou de diferentes espécies, formando agregados que estarão firmemente ligados a superfície (STOODLEY *et al.*, 2002). Os biofilmes maduros consistem de estruturas semelhantes a cogumelos, envoltos pelo EPS, permeados por canais de água. Esses canais funcionam como um sistema circulatório de entrega de nutrientes, da interface para o interior do biofilme e de remoção de restos metabólicos (HALL-STOODLEY, COSTERTON and STOODLEY, 2004).

Sob determinadas situações, quando o ambiente não se encontra mais favorável ou, ainda, devido a uma programação celular para a virulência, ocorre o desprendimento de células planctônicas ou de grupos de células unidas pelo EPS que podem colonizar novo local (BAYLES, 2007)

Numerosos estudos destacam a importância do biofilme bacteriano como agente facilitador da invasividade e persistência microbianas. No entanto, a produção de biofilmes não é investigada rotineiramente, na verdade, a microbiologia clínica convencional testa apenas as formas planctônicas, que são inteiramente diferentes das formas sésseis contidas na biomassa microbiana (MARCIA *et al*, 2014)

A formação de biofilmes é considerada um importante fator de virulência para estafilococos (STEPANOVIĆ *et al.*, 2007). A formação de biofilmes em superfícies de implante aumenta a resistência a agentes antimicrobianos e leva à falha terapêutica ao serem utilizados. No caso da vancomicina, causa uma difusão lenta nas camadas internas de biofilmes bacterianos, porém a exposição gradual das células bacterianas a baixas concentrações facilita o desenvolvimento da resistência à vancomicina (ANTUNES *et al*, 2011). Embora vários estudos tenham descrito maior nível de produção de biofilme por microrganismos multidroga-resistentes (MDROs), a correlação entre a produção de biofilmes e a aquisição de resistência aos antimicrobianos ainda é debatida (REITER *et al*, 2011; SANCHEZ *et al*, 2013).

Assim, avaliação da capacidade de produção de biofilmes representa um pré-requisito necessário para o desenvolvimento de novos tratamentos médicos ou intervenções cirúrgicas,

uma vez que, no presente, a estratégia mais eficaz contra o biofilme é a sua remoção cirúrgica (DI DOMENICO et al, 2017).

2.5 Métodos para a detecção da produção de biofilme

O estudo dos biofilmes é bastante recente, possuindo em torno de 35 anos, e envolve diversas áreas do conhecimento científico, sendo uma ciência multidisciplinar (TRENTIN, GIORDANI e MACEDO, 2013). Vários métodos são usados atualmente em áreas médicas para a detecção da produção de biofilmes. Esses métodos se dividem em métodos qualitativos, como a aderência do tubo de borossilicato e a produção de expolissacarídeo no ágar vermelho do Congo (CRA), e métodos quantitativos, como a produção de biofilme em placa, são usados em laboratórios de rotina. Técnicas moleculares tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR), que amplifica os genes envolvidos na produção de biofilmes, complementam esses métodos.

2.5.1 Adesão ao tubo de borossilicato

Esta pesquisa da produção de biofilme efetuada pelo método de Christensen et al 1985, consiste detectar a aderência de uma camada de material corado com uma solução aquosa a 0,4% de azul de tripan (Sigma). O resultado positivo é indicado pela presença aderido à parede interna dos tubos. A presença de um anel corado somente na superfície de contato líquido-ar não foi considerada como resultado positivo (OLIVEIRA & CUNHA, 2010).

Um estudo avaliou a sensibilidade e especificidade do teste de aderência no tubo, comparando com a presença dos genes *ica* (padrão-ouro), e foi possível obter 100% de sensibilidade e 100% especificidade do teste do tubo (BRIDIER et al, 2010). Martini e colaboradores, em 2016, obtiveram a sensibilidade de 85,7% quando compararam a adesão em tubo de borossilicato com a detecção genética de formação de biofilme. Oliveira e cunha, em 2010, relatam que o teste de adesão em tubo apresentou melhores resultados do que o teste com vermelho congo, sendo obtido 100% de sensibilidade e especificidade.

2.5.2 Produção do exopolissacarídeo em meio ágar vermelho congo

Utilizado para identificar estafilococos produtores de slime (polissacarídeo extracelular) que permite a bactéria aderir às superfícies bióticas e abióticas, sendo considerado o fator de virulência importante para a adesão e colonização. O slime pode reduzir também a resposta imune aos fagócitos, interferindo com os mecanismos de defesa do hospedeiro. Trata-se de um método de fácil execução e a obtenção de resultados é mais rápida.

Essa técnica baseia-se no cultivo de estafilococos sobre um meio de ágar sólido, suplementado com o corante vermelho congo, sendo os estafilococos classificados como produtores ou não produtores de slime. O corante vermelho Congo é utilizado como indicador de pH, apresentando coloração preta em intervalos de pH entre 3,0 e 5,2. Placas com o meio ágar vermelho Congo são semeadas e incubadas em ambiente aeróbio por 24 - 48 horas a 37°C. Uma escala de referência de cinco cores é utilizada para determinar com precisão todas as variações de cor mostradas pelas colônias. Isolados apresentando dois tons de preto, preto brilhante e opaco seco preto, são classificados como produtores de biofilme, enquanto as colônias vermelhas, cor-de-rosa e bordéux são classificadas como negativo (OLIVEIRA et al, 2010).

Ainda que o teste do ágar vermelho Congo seja vastamente utilizado em estudos com biofilme, principalmente com *Staphylococcus* spp., não se sabe ao certo qual o mecanismo específico da resposta envolvida neste método. Apesar disto, alguns dados indicam que a reação positiva, evidenciada pelo escurecimento da colônia produtora de biofilme, decorreria da constituição polissacarídica da matriz extracelular do biofilme, cuja produção é intensificada pelo suplemento nutricional do meio (FREITAS, VAN DER SAND & SIMONETTI, 2010).

2.5.3 Produção de biofilme em placa de poliestireno

A produção do biofilme em placa permite quantificar o material bacteriano corado com solução de cristal violeta aderido na placa de microtitulação, através da leitura da absorbância em leitor de ELISA. As amostras são classificadas de acordo com sua densidade ótica, seguindo a classificação de Stepanovic et al, 2007. A densidades óticas para cada isolado (DO_i) é obtida pela média dos valores das triplicatas, sendo este valor comparado com a densidade ótica do controle negativo (DO_c). Os isolados são classificados em quatro categorias: não aderente se

$DO_i \leq DO_c$; fracamente aderente (+) se $DO_c < DO_i \leq 2 \times DO_c$; moderadamente aderente (++) se $2 \times DO_c < DO_i \leq 4 \times DO_c$; ou fortemente aderente (+++) se $4 \times DO_c < DO_i$.

É um dos métodos mais amplamente utilizados para detecção de biofilmes. Baseia-se na capacidade do cristal violeta penetrar na parede de bactérias Gram positivas ou leveduras e permanecer retido no citoplasma. Esse método é uma ferramenta quantitativa para detecção de biofilme e pode ser usado como uma técnica confiável, pois pode detectar o processo de formação de biofilmes anexado à superfície ou a produção polissacárido extracelular segregado (SAISING et al, 2012).

Estudos anteriores reportaram maior eficiência na detecção de formação de biofilme quando utilizado o teste de aderência em placas em relação ao ágar vermelho congo (GUIMARÃES et al., 2012; MELO et al., 2013).

2.5.4 Pesquisa do gene *ica*

A detecção dos genes *ica* pode ser realizada através de técnicas de PCR simples e PCR multiplex. Consistindo na obtenção da amplificação dos genes que compõem o operon *ica*, *icaRADBC* separadamente ou todos simultaneamente.

O estudo de Oliveira e Cunha, em 2010, relata que a expressão dos genes *ica* é altamente variável e pode ser induzida por variações nas condições da cultura, como um aumento na concentração de açúcares ou outras substâncias que induzem estresse.

Alguns métodos fenotípicos baseados em resultados colorimétricos podem sofrer interferências no desenvolvimento desses testes que acarretam em dúvidas na interpretação dos resultados. Reforçando assim a utilização de testes moleculares devem ser utilizados juntamente com os testes fenotípicos para obter uma concordância entre os testes (COUTO et al, 2001, ARCIOLA et al, 2012). Como também, a análise por PCR apenas revela a predisposição genética para formação de biofilmes e expressão de genes *ica*, assim a real formação de biofilmes deve ser confirmada por métodos fenotípicos adicionais (MELO et al., 2013).

Arciola e colaboradores. (2012) mostraram que técnicas moleculares para identificação dos genes *ica*, que codificam a síntese do *slime*, representa uma ferramenta muito importante para uma identificação acurada de cepas virulentas formadoras de *slime*.

2.6 Resistência a agentes antimicrobianos

Os microrganismos sofrem mecanismos que favorecem a seleção natural, que resulta na emergência de isolados resistentes aos diferentes antimicrobianos, e assim, quando uma população microbiana é exposta a um agente antimicrobiano, os microrganismos mais susceptíveis são eliminados, sobrevivendo somente os resistentes ao antimicrobiano (OMS, 2000). A exposição a antibióticos contribui para a seleção de mutantes resistentes e favorece a transferência horizontal de elementos genéticos móveis como plasmídeos, integrons e transposons que portam vários genes de resistência contra distintas famílias de antibióticos (CAMOU, ZUNINO & HORTAL, 2017).

A atividade dessas substâncias antimicrobianas pode ser dividida em três etapas subsequentes: a primeira ocorre pela sua associação com as bactérias e penetrar em seu invólucro, a segunda através do transporte ao seu sítio alvo intracelular e a terceira etapa constitui-se da ligação com o sítio-alvo bioquímico específico. E a resistência aos antimicrobianos pode ocorrer em cada uma dessas etapas. Os microrganismos patogênicos desenvolveram uma multiplicidade de formas de resistir a ação antibiótica, sendo os mecanismos de resistência clinicamente relevantes: 1) Inativação do agente antimicrobiano por ação enzimática, 2) Excreção do antibiótico pela ação de bombas de efluxo, 3) Modificação do sítio-alvo, 4) Exacerbação na síntese de sítio-alvo, para promoverem esgotamento do fármaco (SCHAECHTER et al., 2009).

O aumento da resistência aos antimicrobianos é um problema sério, que se não for combatido a tempo, pode comprometer a saúde das futuras gerações (OMS, 2016). A ocorrência de microrganismos resistentes aumentou dramaticamente e exponencialmente nas últimas décadas como resultado do uso e abuso de antibióticos. A resistência antimicrobiana não é apenas um dilema médico, mas uma ameaça global que exige, para seu controle, uma ação coordenada por muitos agentes de saúde e instituições diferentes (CAMOU, ZUNINO & HORTAL, 2017).

Durante seis anos subsequentes à introdução da penicilina, amostras hospitalares de *S. aureus* resistentes pularam de um nível muito baixo para 80% do total (INGRAHAM & INGRAHAM, 2011). Com o acúmulo sucessivo de resistência a muitas penicilinas através das penicilinases, outros agentes mais tóxicos, tais como a vancomicina, foram restituídos, com hesitação, à utilização clínica (SCHAECHTER et al., 2009).

A resistência do *S. aureus* aos antibióticos tem sido desenvolvida por mutações em seus genes ou pela aquisição de genes de resistência de bactérias da mesma ou de outra espécie. Geralmente, a resistência que ocorre por mutação gera uma alteração no sítio de ação do antibiótico, enquanto a resistência por aquisição de genes de resistência frequentemente envolve a inativação ou a destruição da droga sendo transmitida por plasmídeos e transposons (TAVARES, 2002; BERNARD et al., 2004). E a difusão de genes de resistência aumenta com a utilização de antimicrobianos em determinado centro médico. Os genes de resistência múltipla podem acumular-se em determinada amostra pela eficácia do mecanismo de transposição genética, podendo conduzir ao aparecimento de “supermicrobios”, microrganismos resistentes a um grande número de agentes antimicrobianos. A ameaça do acúmulo de fatores de resistência, é entretanto, bastante real (SCHAECHTER et al., 2009).

A ocorrência de *Enterococcus* vancomicina resistente (VRE) e *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente (MRSA), deixaram de ser limitados às enfermarias, e estão disseminando pela comunidade. Embora a maioria das drogas ainda seja ativa, a ocorrência da resistência microbiana pode atingi-las em pouco tempo (OTÍLIA, 1999).

Nas décadas anteriores, uma perda contínua de susceptibilidade à maioria dos antibióticos disponíveis foi registrada para CoNS. Grandes aumentos na porcentagem de isolados resistentes foram observados particularmente para a penicilina, oxacilina, ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina e gentamicina (BECKER et al, 2014).

O surgimento de bactérias multidroga-resistentes (MDR) agravou o problema das infecções na saúde pública, criando um novo fardo na assistência médica em hospitais, particularmente para pacientes admitido em unidades de terapia intensiva (UTI). Em unidades de cuidados intensivos, existe é um uso antimicrobiano extensivo, que impõe uma pressão de seleção e promove o surgimento do MDR (CORNEJO-JUÁREZ et al, 2015).

A emergência cepas de *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina (MRSA/MRCoNS) e a dificuldade no tratamento das infecções causadas por esses microrganismos tornou, em muito casos, os glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina) a única alternativa terapêutica, porém nos últimos anos emergiram em todo o mundo isolados com susceptibilidade reduzida a glicopéptidos (SORIANO et al., 2008; ANTUNES et al, 2011; CÁZARES-DOMÍNGUEZ et al., 2015). O uso constante da vancomicina e, por conseguinte o aumento da pressão seletiva, ocasionou o aparecimento de MRSA tolerante (VT-MRSA) e com resistência à vancomicina (GOMES, WARD e LAPLANTE, 2015; KOH et al., 2016).

Alguns estudos relatam um número crescente de estirpes de *S. epidermidis* glicopeptídeos-resistentes (GRSE) em todo o mundo (CREMNITER et al., 2010). Isolados de

S. aureus e principalmente os estafilococos coagulase-negativos (CoNS) resistentes à meticilina/oxacilina e com reduzida susceptibilidade aos glicopeptídeos foram relatados no Japão, Estados Unidos, Europa e Ásia desde o final da década de 80 (HOWDEN et al., 2010).

No Brasil, cepas estafilocócicas com susceptibilidade reduzida a glicopéptidos foram relatadas em hospitais em São Paulo, Rio de Janeiro e Porto Alegre, e de estafilococos coagulase negativos resistentes à vancomicina e à teicoplanina em São Paulo há uma década (MAMIZUKA & OLIVEIRA, 2000, MELO et al., 2005). E recentemente, *S. aureus* contendo genes *vanA* e *vanB* também foram descritos no Brasil (ROSSI et al., 2014; BREVES et al., 2015).

Alguns antimicrobianos que exibem atividade *in vitro* contra *S. aureus* permanecem ativos contra cepas resistentes aos glicopéptidos, como rifampicina e ácido fusídico (HOWDEN et al., 2010). Nos últimos anos, foram desenvolvidos um número limitado de novos antimicrobianos, dentre eles, as cefalosporinas de 5ª geração, ceftarolina e ceftobiprole, que mostraram ser efetivos contra isolados de MRSA (BATISTA et al., 2015). Outros antimicrobianos não pertencentes ao grupo de beta-lactamas e com atividade contra esses microrganismos estavam disponíveis no início do século 21, além de serem amplamente empregados na prática clínica, são linezolide, daptomicina e tigeciclina (RODVOLD & McCONEGHY, 2014).

2.7 Glicopeptídeos

Entre os glicopeptídeos estão a vancomicina e a teicoplanina. Ambas são moléculas muito grandes e, portanto, têm dificuldade em penetrar em células Gram-negativas (MIMS et al., 2005). São bactericidas, e têm alta afinidade para o terminal de D-ala-D-ala do peptidoglicano, interferindo na síntese da parede celular ligando-se à D-alanina-D-alanina ao final das cadeias de pentapeptídeos que fazem parte da estrutura da parede celular bacteriana em crescimento. Essa ligação inibe a reação de transglicosilação e impede a incorporação de novas subunidades precursoras extracelular não reticuladas, além de obstruir as reações da proteína de ligação à penicilina na síntese de parede celular (SANGAPPA & THIAGARAJAN, 2012). Uma vez que os glicopeptídeos atuam em um estágio mais precoce que os betalactâmicos, não é útil combiná-los (MIMS et al., 2005).

Historicamente, tem sido observada uma resistência de maior relevância clínica adquirida contra os glicopeptídeos nos microrganismos *Enterococcus faecium* e *Enterococcus*

faecalis (enterococos resistentes à vancomicina - VRE) (CASADEWALL, REYNOLDS & COURVALIN, 2001). Os primeiros relatórios de CoNS com diminuição da suscetibilidade aos glicopeptídeos foram publicados nos Estados Unidos no final da década de 1970 (CREMNITER et al, 2010), e pouco depois em países europeus (PARAGIOUDAKI et al, 2004).

Mediante ao seu amplo emprego na prática clínica, houve o surgimento de cepas de *S.aureus* e outras espécies estafilocócicas com sensibilidade reduzida à vancomicina e demais glicopeptídeos (THATI et al., 2011), denominados de *S.aureus* com sensibilidade intermediária à vancomicina/glicopeptídeos (VISA/GISA) e *S.aureus* resistentes à vancomicina/glicopeptídeos (VRSA/GRSA) (HOWDEN et al., 2010). Estudos recentes relatam um número crescente de *S. epidermidis* glicopeptídicos-resistentes (GRSE) estirpes de todo o mundo (CREMNITER et al., 2010).

Isolados de *Staphylococcus aureus* e principalmente estafilococos coagulase-negativos resistentes à metilina/oxacilina e com reduzida susceptibilidade aos glicopeptídeos foram relatados no Japão, Estados Unidos, Europa e Ásia desde o final da década de 80 (HOWDEN et al., 2010).

Vários fenótipos de resistência foram descritos, os quais podem ser diferenciados pela capacidade de transferência (ou seja, associação a plasmídeos), de indução e por ampliação da resistência. Os genes associados aos níveis mais elevados de resistência aos glicopeptídeos são *vanA*, *vanB* e *vanD*, que codificam uma ligase produtora de pentapeptídeos terminando em D-alanina-D-lactato (CASADEWALL, REYNOLDS & COURVALIN, 2001).

O gene *vanA* está associado a elementos passíveis de transposição relacionados à *Tn1546* (cerca de 11kb em tamanho) que podem ser de natureza cromossômica ou plasmidial (transferíveis). O gene *vanB* está associado à resistência de alto nível à vancomicina, mas não à teicoplanina (embora a resistência a essa substância possa ser induzida por exposição prévia à vancomicina). A resistência do tipo *vanB* pode estar ligada ao cromossomo ou ao plasmídeo e associada a um elemento de transposição muito grande (34kb), o *Tn 1549* (MIMS et al., 2005), o gene *vanD* é único e caracterizado por expressar constitutivamente ou de forma indutiva a resistência moderada à vancomicina e a teicoplanina (CASADEWALL, REYNOLDS & COURVALIN, 2001).

A vancomicina é um glicopeptídeo tricíclico que tem mostrado crescente importância médica devido a sua efetividade contra microrganismos com resistência múltipla a drogas, como os estafilococos metilino-resistentes (STROHL et al., 2004). É produzida pelo actinomiceto do solo *Streptomyces orientalis*, sendo por isso considerada um antibiótico natural

(BLACK, 2002), sendo acentuadamente bactericida contra estafilococos (JAWETZ et al., 1998).

Originalmente, a toxicidade da vancomicina era um problema grave, mas aperfeiçoamentos nos procedimentos de purificação durante sua produção corrigiram o problema amplamente. Embora tenha um espectro de atividade pequeno, tem sido extremamente importante ao lidar com o problema do *S. aureus* meticilino-resistente (MRSA), devendo ser usada no tratamento de pacientes com infecções graves causadas por microrganismos Gram-positivos resistentes a betalactâmicos e para pacientes com problemas alérgicos graves aos mesmos (STROHL et al., 2004).

A vancomicina deve ser administrada por via endovenosa para tratamento de infecções sistêmicas graves (JAWETZ et al., 1998). Essa substância não é absorvida pelo trato gastrointestinal e não penetra no líquido cérebro-espinhal de pacientes sem meningite. Entretanto, as concentrações bactericidas são atingidas na maioria dos pacientes com meningite por causa da maior permeabilidade da barreira hemato-encefálica. Essa substância é excretada pelos rins.

A vancomicina atua somente no tratamento de bactérias Gram-positivas, sendo empregado principalmente nos tratamentos de infecções causadas por cocos e por bastonetes resistentes aos antibióticos betalactâmicos especialmente os *S. aureus* e *S. epidermidis* multirresistentes e *Clostridium difficile*. No quadro clínico de colite associada a antibióticos, a vancomicina possa ser uma escolha, embora a preocupação com este tratamento possa gerar a origem aos enterococos resistentes aos glicopeptídeos na flora intestinal tenha levado ao uso cada vez mais frequente de compostos alternativos (MIMS et al., 2005).

Os isolados clínicos de *S. haemolyticus* foram as primeiras cepas resistentes à vancomicina relatadas do gênero *Staphylococcus* (SCHWALBE, STAPLETON & GILLIGAN, 1987). A descrição de *S. aureus* com reduzida sensibilidade à vancomicina (VISA e h-VISA) gerou uma grande preocupação na comunidade científica, no sentido de como enfrentar esta bactéria desde a sua detecção laboratorial até o manejo do paciente infectado. Os microbiologistas clínicos devem inteirar-se dos procedimentos que podem ser utilizados para detectar corretamente *Staphylococcus aureus* com sensibilidade reduzida à vancomicina (SARSV) em amostras clínicas (MARLOWE et al., 2001).

Uma característica que tem sido observada em SARSV é a morfologia colonial heterogênea na cultura primária das amostras clínicas. Este aspecto é particularmente evidente no segundo dia de incubação, quando as colônias pequenas crescem entre colônias de tamanho usual na placa de meio de cultura, apresentando aspecto de crescimento misto. No entanto,

quando as colônias pequenas são examinadas, é confirmada a identificação de *S. aureus* com MIC da vancomicina mais elevado que o das colônias maiores usuais da mesma amostra (MARLOWE et al., 2001). Os mecanismos envolvidos não são claros, mas CoNS com reduzida suscetibilidade aos glicopéptidos mostram o espessamento da parede celular e tendem a formar agregados celulares (CREMNITER et al, 2010).

2.8 Mecanismos de Resistência à vancomicina

Os glicopeptídeos, assim como os antibióticos beta-lactâmicos, exercem seus efeitos antimicrobianos inibindo a síntese da parede celular do *S. aureus*. A célula bacteriana tem uma pressão osmótica alta e para que se multiplique em um meio com uma pressão externa baixa, ela precisa sintetizar continuamente uma estrutura extracelular chamada peptidoglicano ou mureína, a qual previne a ruptura da célula devido a sua forma rígida. A produção do peptidoglicano se inicia com a síntese do componente monomérico (monômero de mureína) dentro da célula bacteriana, este, em seguida, é transferido para fora da célula por carreadores lipídicos presentes na membrana citoplasmática (HIRAMATSU, 2001).

As enzimas glicosiltransferase e transpeptidase, também chamada de proteína ligadora de penicilina (penicillin-binding protein – PBP), localizada na membrana citoplasmática, transformam o monômero de mureína em uma estrutura gigante de peptidoglicano. A glicosiltransferase polimerisa os monômeros de mureína para produzir cadeias nascentes de peptidoglicano. Em seguida, a transpeptidase liga as cadeias de peptidoglicano recém-formadas às cadeias de peptidoglicano já existentes nas células de *S. aureus* (ligação cruzada). Quando a ponte interpeptídica é formada, o terminal D-alanina do monômero de mureína é desligado do peptidoglicano completado. Cerca de 20% dos resíduos de D-alanina-D-alanina permanecem não processados pelas PBP (HOWDEN et al, 2010).

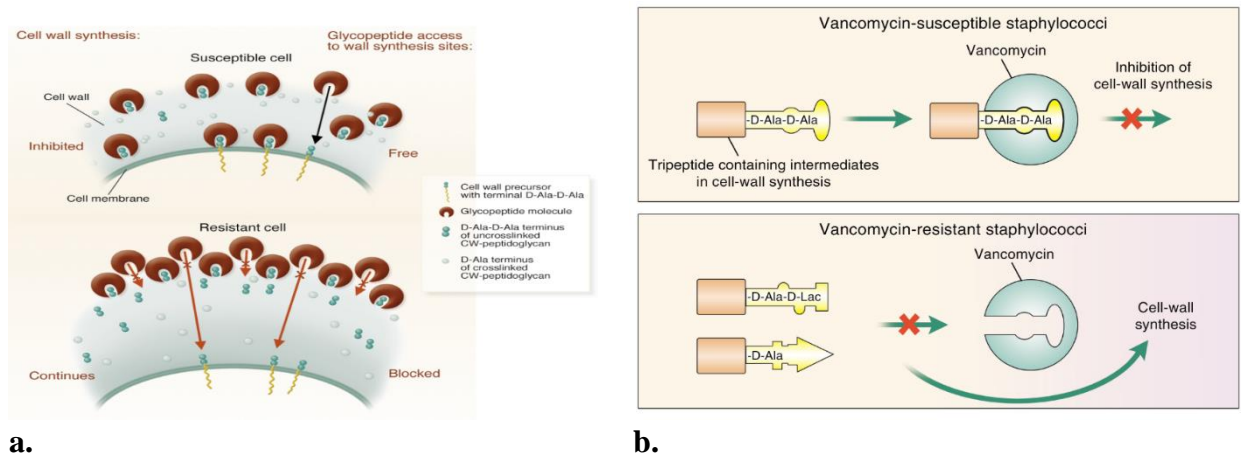
O mecanismo de resistência em VISA inclui a síntese de quantidades adicionais de peptidoglicano resultando em um espessamento da parede celular, como pode ser observado na Figura 1a. Este espessamento leva ao aumento no número de resíduos D-alanil-D-alanina, capazes de ligar-se às moléculas de vancomicina que são sequestradas nas camadas externas da parede celular, limitando assim o acesso à membrana citoplasmática. (BIERBAUM et al., 2009, ANTUNES et al, 2011). Os isolados vancomicina resistentes possuem um mecanismo de disseminação muito mais eficiente do que os VISA (ZHU et al., 2008).

Acredita-se que o doador do gene *vanA* ao *S. aureus* tenha sido o *Enterococcus faecalis*, através de transferência conjugativa de plasmídeo contendo o operon *vanA*. Este integra o Transposon *Tn1546* composto de *vanR*, *vanS*, *vanX*, *vanY* e *vanH*, presentes em um plasmídeo de 120 Kb (TENOVER et al., 2004). Os *vanH*, *vanA* e *vanX* codificam proteínas necessárias para a expressão da resistência. O gene *vanH* é um D-hidroxi-ácido desidrogenase que reduz o piruvato em D-lactato, os quais são utilizados pelo *VanA*, uma ligase, que usa os resíduos de D-Lactato e D-Alanina para sintetizar o di-peptídeo D-alanina-D-lactato, o qual é incorporado no precursor do peptídeoglicano. O *vanX* é uma di-peptidase requerida para a hidrólise do D-ala-D-ala, o *vanY* é uma D,D-carboxipeptidase, não essencial para a resistência, cliva o resíduo de D-ala do C-terminal dos precursores pentapeptídeos sintetizados usando D-ala-D-ala dipeptídeos que escaparam da hidrólise do *vanX*. A expressão do operon *vanA* é regulada por dois genes, *vanR* e *vanS*, localizados próximos do *vanH* que formam um sistema regulador de dois componentes (PÉRICHON & COURVALIN 2004; SAHA et al., 2008, SANGAPPA & THIAGARAJAN, 2012).

A resistência em VRSA é causada pela alteração na parede celular do peptídeo terminal D-alanil-D-alanina da parede celular bacteriana para D-alanil-D-lactato, impedindo a inibição da síntese de parede celular pela vancomicina, (SCHITO, 2006), como pode ser observado na figura 1b.

Desde 1997, duas grandes categorias de resistência à vancomicina em *Staphylococcus aureus* foram definidos. A primeira categoria refere-se *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA) isolados clínicos com gene *vanA* mediando resistência de alto nível ($MIC \geq 16 \mu g/mL$), o segundo categoria inclui *S. aureus* vancomicina-intermediário (VISA) isolados que desenvolveram resistência de baixo nível ($MIC \geq 4$ a $< 16 \mu g/mL$) por meio do espessamento da parede celular (VAUDAUX et al., 2010).

Figura.1 – Mecanismos de resistência do microrganismo à ação dos glicopeptídeos (a. Espessamento da parede celular devido a síntese exacerbada de peptídeoglicanos e b. Modificação do sítio-alvo).



Fonte: LOWY, 2003

2.9 Métodos de detecção da resistência à vancomicina

Na literatura são relatadas algumas técnicas fenotípicas para detectar o perfil de susceptibilidade de linhagens bacterianas frente à vancomicina, as quais o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) padroniza a utilização de métodos de diluição em ágar Brain Heart Infusion (BHIA) ou Muller-Hinton (MHA) suplementado com concentrações dos glicopeptídeos e o E-test, e a determinação do MIC em caldo, macro ou microdiluição (CLSI, 2014). Para facilitar a detecção de cepas com sensibilidade reduzida a esse fármaco, os métodos propostos têm sido alterados em seus meios, inóculo e período de incubação (HIRAMATSU et al., 1997). Incluindo placas com gradiente do antibiótico, placas de ágar screening, Etest, população de estudo e perfil da população em análise (PAP-AUC) (WOOTTON et al., 2007). Os isolados de *Staphylococcus* com reduzida sensibilidade à vancomicina e teicoplanina não são mais detectados pela técnica de disco-difusão e o uso de teste em ágar BHI contendo 4 ou 6 µg de vancomicina, determinação de MIC ou E-test são requeridos (LALEY, LANZ & SCHROCK, 2004 TENOVER, 2004, CLSI, 2014).

O método de screening com meio BHI ou MH suplementado com 6µg/mL (BHIV6) de vancomicina deve ser inoculado com 10µL de uma suspensão de 0,5 McFarland do organismo e incubado a 35-37°C por 24 h., as cepas com reduzida sensibilidade à vancomicina demonstram crescimento de uma ou mais colônias depois 24h de incubação (SWENSON, PATEL & JORGENSEN, 2007). Porém o meio BHIV6 usado para triar cepas VISA não é muito adequado para detectar cepas com MIC entre 2 e 4µg/mL, pois essas não são consideradas susceptíveis à

vancomicina, sendo assim não detectadas por esse método. BURNHAM e cols, em 2010, desenvolveram um meio de screening suplementado com 3µg/mL (BHIV3) buscando detectar cepas com reduzida susceptibilidade a vancomicina (VISA e h-VISA), no entanto essa metodologia não é padronizada pelo CLSI, mas sugere um método de detectá-las.

O E-test é elaborado com inóculos padronizados usando a escala 0,5 de McFarland, incubadas em meio ágar MH por 24h a 35°C. Essa técnica é uma opção atrativa como teste alternativo por ser de fácil execução. Contudo vários estudos relatam que o E-test apresenta MIC sobreestimados se comparados àqueles obtidos por outros testes de referência (SADER, RHOMBERG & JONES, 2009; HOWDEN et al., 2010; MANFREDINI, PICOLI & BECKER, 2011).

A microdiluição em caldo, no entanto, é uma técnica um pouco mais trabalhosa, pois exige controles de qualidade e execução mais laboriosos do que o E-test, mesmo que suas condições de preparação do inóculo sejam semelhantes. Porém segundo o CLSI, em 2012, utiliza-se a suspensão bacteriana ajustada para obter o grau de turbidez equivalente a escala 0,5 de McFarland. Posteriormente inocula outra solução salina de NaCl 2%, dessa suspensão retira-se 5µL e transfere para a placa de 96 poços fundo chato estéreis, inoculando-as. Essas placas já irão conter 180 µL de meio Muller-Hinton tratado com 20 µL em 8 diluições seriadas de vancomicina (de 1 µg/mL a 128 µg/mL g/ml), para obter uma concentração bacteriana final de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL em cada poço da placa de microdiluição. Sendo esse método um teste confirmatório dos MICs obtidos pelo E-test.

Alguns estudos apresentam um teste considerado padrão-ouro na detecção de cepas com perfil intermediário à vancomicina (VISA e h-VISA), a análise do perfil da população simplificado, no qual envolve a inoculação de 10µL de uma suspensão de 10^8 UFC/mL em meio suplementado com 4µg/mL de vancomicina. O crescimento após 24hs. é considerado como potencial cepa VISA, algum crescimento após 48hs. é considerado potencial cepa h-VISA. Esse método necessita que seja feita a determinação do MIC, a fim de confirmar se o MIC dessas cepas se encontra na faixa de concentração de vancomicina padronizada para classificá-las como portadoras de resistência intermediária a vancomicina (HOWDEN et al., 2010; VAUDAUX et al., 2010; VAN HAL & PATERSON, 2011).

A avaliação morfométrica do espessamento da parede celular bacteriana usando imagens fotográficas obtidas após microscopia eletrônica de transmissão (MET) tem sido proposta para auxiliar na investigação de *S. aureus* com reduzida sensibilidade à vancomicina (HANAKI et al., 1998; CUI et al., 2000).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Analisar através de técnicas fenotípicas, molecular e estrutural isolados de *Staphylococcus* spp. com susceptibilidade reduzida e resistente à vancomicina oriundos de profissionais de saúde e de pacientes oncológicos

3.2 Específicos

- Avaliar o perfil de susceptibilidade à vancomicina através de técnicas fenotípico-moleculares isolados de *Staphylococcus* spp
- Pesquisar a capacidade de produção de biofilme em isolados de pacientes oncológicos através de técnicas fenotípicas;
- Pesquisar e comparar a ocorrência do gene *icaAD* em em isolados de pacientes oncológicos produtores e não produtores de biofilmes *Staphylococcus* spp
- Descrever características ultraestruturais de *Staphylococcus* spp de microbiota com susceptibilidade reduzida e resistente à vancomicina.

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho do estudo

Trata-se de um Estudo Observacional descritivo sobre a ocorrência de *Staphylococcus spp.* com susceptibilidade reduzida e resistente à vancomicina nas provenientes de colonização dos profissionais de saúde e amostras clínicas da infecção/colonização dos pacientes oncológicos de dois Hospitais de Recife, Pernambuco, Brasil.

4.2 Isolados *Staphylococcus spp.*

Os isolados deste presente estudo foram provenientes de microbiota provenientes de profissionais de saúde, provenientes de um estudo prévio, realizado por Rabelo et al, 2014.

Os isolados de pacientes oncológicos foram obtidos de amostras clínicas de vários sítios de infecção de pacientes oncológicos, cedidos pelo laboratório de bacteriologia terceirizado do Hospital do Câncer de Pernambuco. Os isolados foram encaminhados para o Laboratório Bacteriologia e Biologia Molecular (LBBM), Departamento de Medicina Tropical/CCS/UFPE durante o período de junho/2012 a outubro/2016.

4.3 Re-identificação do *Staphylococcus spp.*

Os isolados obtidos no estudo de Rabelo et al, 2014 que estavam estocados em glicerol e Brain Heart Infusion (BHIB) em freezer à temperatura -20°C foram semeados em BHI por 48 horas e foram plaqueados em Ágar sangue 5% para observação macroscópica das colônias bacterianas. Como também os isolados clínicos do Hospital do Câncer que foram recebidos pelo Laboratório Terceirizado.

Ambos isolados, clínicos e de microbiota foram re-identificados através das características macroscópicas (tamanho da colônia, coloração, opacidade e brilho), pelo tipo de hemólise (β -hemólise e α -hemólise), figura 2. Sendo posteriormente identificadas através dos seguintes testes fenotípicos: coloração de Gram, catalase, coagulase em tubo, aglutinação do látex, fermentação do manitol, prova da DNase e Susceptibilidade à novobiocina.

Figura 2 – Placas de Agar-Sangue de Carneiro com amostra de *Staphylococcus spp.* Semeada



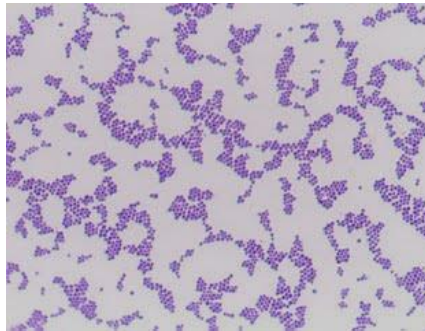
Fonte: Adaptado pelo autor.

Para identificação, serão realizados os seguintes testes fenotípicos:

➤ **Coloração de Gram:** Através das características morfo-tintoriais analisadas pelo método de Gram, observa-se a presença de cocos Gram-positivos aos pares ou agrupados, figura 3 (KONEMAN, 2008).



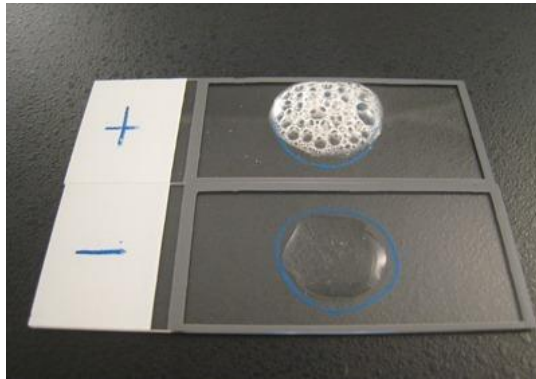
Fig.3 – Coloração de Gram (cocos em cacho Gram-positivos)



Fonte: Arquivo de fotos do autor.

➤ **Teste da catalase:** A detecção desta enzima é realizada sobre uma lâmina limpa, onde é depositada uma alçada de cultivo bacteriano puro e adicionada uma gota de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A formação de bolhas indica prova positiva e a não formação de bolhas indica prova negativa, figura 4 (KONEMAN, 2008).

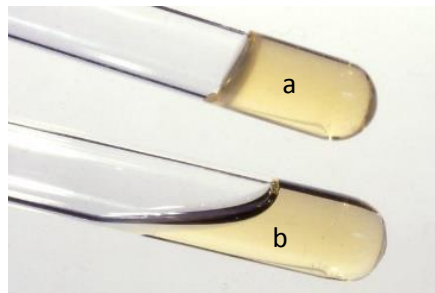
Figura 4 – Teste da catalase: (+) isolado catalase positivo, (-) isolado catalase negativo



Fonte: Arquivo de fotos do autor.

➤ **Teste de Coagulase:** É realizada a pesquisa da enzima coagulase através da metodologia em lâmina (coagulase ligada) e tubo (coagulase livre), utilizando plasma de coelho liofilizado. No presente estudo opta-se pela metodologia em tubo, sendo inoculada uma alçada de colônia pura e isolada em um tubo contendo 0,5 mL de plasma reconstituído e incuba-se a 37°C. As leituras são realizadas após 4 e 24 h. A formação de coágulo é indicativa de prova positiva, Figura 5 (KONEMAN, 2008).

Figura5 - Teste da coagulase (a. coagulase positivo e b. coagulase negativo)



Fonte: Arquivo de fotos do autor.

➤ **Fermentação de Manitol:** Estria-se o inóculo bacteriano na superfície da placa com o ágar manitol a 7,5% de NaCl. Ao utilizar o manitol, a cor do meio que originalmente é rosa, torna-se amarela, indicando fermentação por parte da bactéria inoculada, figura 6 (KONEMAN, 2008).

Figura 6 – Meio do manitol salgado semeado com *S.aureus*



Fonte: Arquivo de fotos do autor.

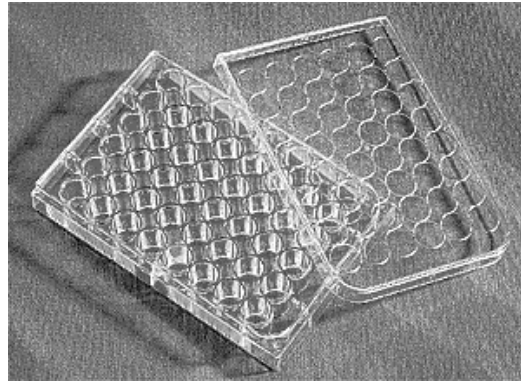
4.4 Análise do perfil de susceptibilidade à vancomicina:

Para análise do perfil de susceptibilidade à vancomicina os isolados foram rastreados por teste usando BHI suplementado com 6 µg/mL de vancomicina (BHI-V6). Os inóculos ajustados para 0,5 turvação McFarland (HOWDEN et al, 2010).

O método utilizado para determinar o MIC para a vancomicina foi a microdiluição de caldo, de acordo com as diretrizes CLSI (2014). Um isolado clínico de *Enterococcus faecium* que abrigou o gene *vanA* usado como controle positivo (VILELA, et al., 2006) e a cepa *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) como controle negativo.

Para a determinação de MIC por microdiluição de caldo, preparou-se uma suspensão bacteriana do padrão de McFarland de 0,5 a partir de colônias cultivadas em placas de ágar sangue durante 24 horas a 35°C. A partir desta cultura, foram selecionadas seis a oito colônias, homogeneizadas em solução salina (NaCl a 2%) e a suspensão foi inoculada em outra solução de sal de NaCl a 2% e, a partir desta solução, uma alíquota de 5 µL foi aspirada e inoculada na microplaca de 96 poços contendo 180 µL de caldo de Mueller-Hinton e 20 µL de solução de uso de vancomicina a 1280 µg/mL, foram realizadas 8 diluições em série (1 µg/mL a 128 µg/mL) para obter uma concentração final de aproximadamente 5×10^5 CFU/mL em cada bem da placa de microdiluição, figura 7, e a placa foi incubada por 24hs a 35°C (CLSI, 2012).

Figura 7 – Placa de ELISA com 96 poços onde é realizado a microdiluição em caldo



Fonte: Arquivo de fotos do autor.

4.5 Análise fenotípica da produção de exopolissacarídeos

A produção de exopolissacarídeos (EPS) foi avaliada através do semeio em Agar Vermelho Congo (AVC) usando um método modificado por Freeman et al. (1989). O AVC permite a detecção da produção de exopolissacarídeos por variação em a cor das colônias no meio. O meio foi preparado adicionando 0,3 g do corante vermelho do Congo (1g/L) (Merck®) em 300mL do ágar Infusão de cérebro e coração (BHI, Himedia®) suplementado com 15g sacarose (50g/L). Os isolados bacterianos foram semeados nas placas do AVC e incubado a 37°C por 24 horas. O *S. aureus* (ATCC 25923) e *S. epidermidis* (ATCC 12228) foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente. No presente estudo, a classificação das colônias ocorreu pela observação de características macroscópicas das mesmas, como: coloração, aspecto das colônias e opacidade. Foram consideradas positivas colônias negras, rugosas e opacas, bem como as colônias negativas foram as que apresentaram coloração vermelha, lisa e brilhante

4.6 Ensaio da Produção de Biofilme

A capacidade dos isolados de *Staphylococcus sp.* de produzir biofilme foi realizado como descrito por Stepanovic et al., 2000. As cepas estafilocócicas cresceram em TSB (Tryptic Soy Broth) adicionado de 1% de sacarose durante 24 horas a 35°C. Em seguida, 200 µl das suspensões bacterianas foram aplicadas em triplicata na placa de poliestireno de 96 poços fundo chato e incubadas durante 24 horas a 35°C. Após esse período, as suspensões bacterianas foram

removidas e cada poço foi lavados três vezes com 250 µl de solução fisiológica a 0,9% estéril. Posteriormente, foi realizada a fixação com 200 µl de etanol PA por 15 minutos. Decorrido esse tempo, o etanol foi removido e as placas foram deixadas para secar a temperatura ambiente, e em seguida foram coradas com 200 µL de solução de Cristal Violeta durante 5 minutos. A seguir, as placas foram lavadas em água corrente e secas a temperatura ambiente. Foram incluídos também, o controle negativo (CN), composto apenas pelo caldo TSB com sacarose. A leitura da absorbância foi realizada no Leitor de ELISA, em comprimento de onda de 570nm e os isolados foram classificados segundo Stepanovic e cols. (2000). O valor das densidades ótica para cada isolado (DO_i) foi obtido pela média dos três poços, sendo este o valor comparado com a densidade ótica do controle negativo (DO_c). Os isolados foram classificados em quatro categorias de acordo com a média das DOs (densidades ótica) relacionada com os resultados obtidos para a DO_c. As categorias foram baseadas nos seguintes critérios: não aderente ($DO_i \leq DO_c$), fracamente aderente ($DO_c < DO_i \leq 2 \times DO_c$), moderadamente aderente ($2 \times DO_c < DO_i \leq 4 \times DO_c$) ou fortemente aderente ($4 \times DO_c < DO_i$).

4.7 Ensaio da Produção de Biofilme na presença de vancomicina

A capacidade dos isolados de *Staphylococcus sp.* de produzir biofilme na presença de vancomicina foi realizado similarmente como descrito acima. As cepas estafilocócicas cresceram em TSB (Tryptic Soy Broth) adicionado de 1% de sacarose a durante 24 horas a 35°C. Em seguida, 180µl da suspensão bacteriana foi adicionada nos poços das placas de microtitulação, e 20µl adicionadas 8 diferentes concentrações de vancomicina (0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64; 128; 256µg/mL) em diferentes poços para o mesmo isolado em triplicata e incubadas durante 24 horas a 35°C. A seguir as suspensões foram submetidas ao mesmo procedimento do ensaio da produção de biofilme sem vancomicina.

4.8 Análise da escala de concordância dos testes fenotípicos

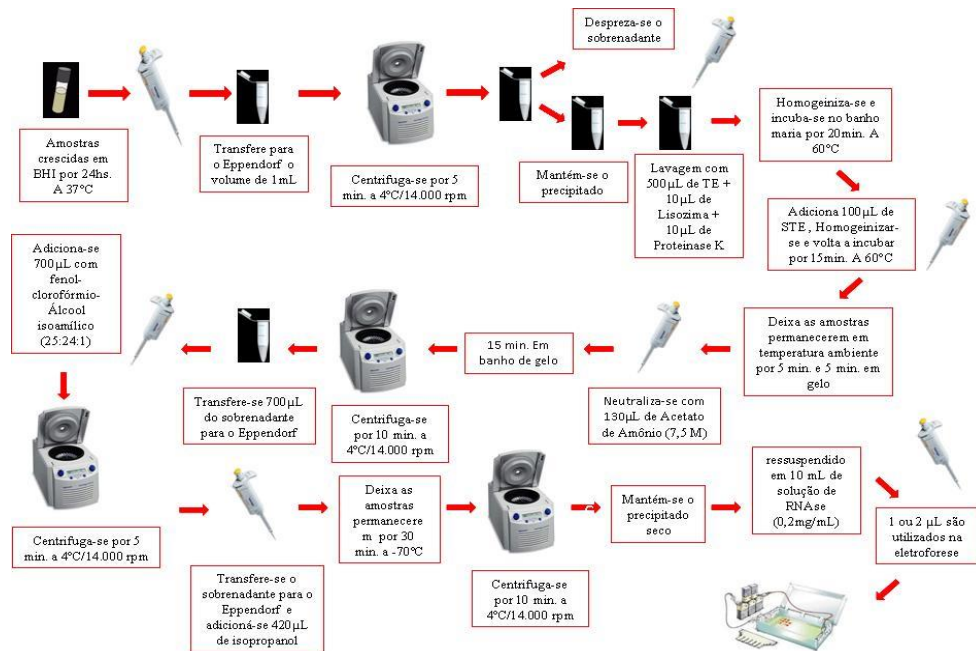
A concordância entre os testes fenotípicos para avaliar a produção de biofilme foi realizado pelo índice k (kappa) (OPAS,1997).

4.9 Extração do DNA total

Para realização da pesquisa molecular, DNA foi extraído pelo método de *lise* química. As bactérias foram inoculadas em caldo BHI por um período de 24 horas a 37°C, sendo transferido para tubos *ependorfs* o volume de 1 mL, que depois foram centrifugadas por 5 min. a 4°C/14.000 rpm. Após centrifugação, o precipitado foi recuperado, desprezando-se o sobrenadante, procedendo-se a lavagem, adicionando-se 500 µL de TE (EDTA 1Mm, Tris-HCl 10mM), 10 µL de lisozima (10mg/ml) e 10 µL de Proteinase K (5 mg/mL), em seguida homogeneizou-se por inversão suave 20x e posteriormente incubando-as em banho-maria a 60°C por 20min. para iniciar a lise celular.

Decorrido o tempo de incubação em banho-maria, acrescentaram-se 100 µL de STE (2,5% de SDS, 10mM de Tris-HCl pH8 e 0,25Mm de EDTA), sendo homogeneizado por inversão suave 20x e tornando a incubá-las em banho-maria a 60°C por 15 minutos. Transcorrido esse tempo as amostras foram deixadas por 5 minutos a temperatura ambiente e 5 minutos em banho com gelo, a suspensão foi neutralizada com 130 µL de acetato de amônio 7,5 M (homogeneíza-se 20x), deixou-se as amostras permanecerem por 15 minutos em banho de gelo para que houvesse a precipitação de proteínas e restos celulares. Centrifugou-se por 10 minutos (4°C/ 14.000rpm), e transferiu-se aproximadamente 700 µL do sobrenadante para outro tubo e adicionou-se o mesmo volume de Fenol-Clorofórmio-Álcool isoamílico (25:24:1), homogeneizou-se 20x e logo após centrifugou-se por 5 minutos (4°C/14.000rpm). Recuperou-se o sobrenadante em outro tubo e foi adicionado 420 µL de isopropanol para precipitar os ácidos nucleicos. Incubou-se as amostras a -70°C por 30 minutos. Centrifugou-se por 10 minutos (4°C/ 14.000rpm), o sobrenadante foi descartado em bomba de vácuo, e o precipitado foi seco e ressuspendido em 10 µL de solução de RNase (0,2mg/mL) com pipeta cuidadosamente para não haver perdas do DNA. O DNA obtido foi quantificado por comparação com a quantidade conhecida do DNA de fago Lambda clivado com enzima Hind III. Uma alíquota de 1 ou 2 µL do DNA extraído foi utilizada na eletroforese, Figura 8.

Fig. 8 – Demonstração esquemática da técnica de Extração de DNA total



Fonte: Esquema adaptado pelo autor.

4.10 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR):

A reação de cadeia de polimerase (PCR, do inglês “*Polymerase Chain Reaction*”) foi utilizada a pesquisa da presença do gene *vanA* e gene *icaAD* nos isolados estudados, tabela 1.

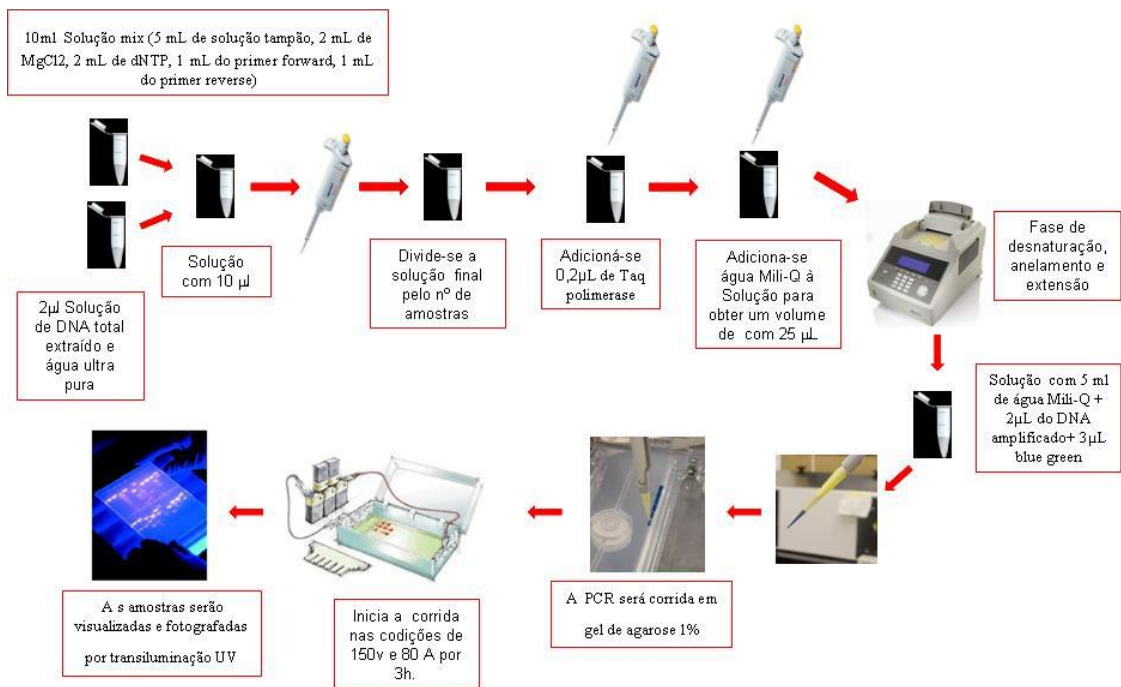
O preparo da PCR foi realizado em um volume de 25 µL, com água duplamente processada “Qualidade PCR” (W-350 SIGMA), solução tamponante de reação 10x diluída para uma concentração final 1x (tris 20mM e KCl 50mM), 25 mM de cloreto de magnésio, 0,2 U de *taq* DNA polimerase, os 4 nucleotídeos (dNTP) na concentração de 2 mM de cada um. foram utilizados 20 pmol do primers para amplificação do gene *vanA* e 40 pmol do primers para amplificação do gene *icaAD* e 1 µl de DNA extraído O termociclador foi programado nas seguintes condições para a PCR do gene *vanA*: desnaturação a 94°C por 30 segundos, seguida por anelamento a 55°C por 30 segundos, e extensão a 72°C por 1 minuto. A amplificação será repetida por 35 ciclos. O ciclo final compreendeu 72°C por 10 minutos. Na PCR do gene *icaAD*, o termociclador foi programado nas seguintes condições: desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida por anelamento a 52°C por 1 minuto, e extensão a 72°C por 1 minuto. A amplificação foi repetida por 35 ciclos. O ciclo final compreendeu 72°C por 10 minutos.

Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% preparado com tampão 0,5x TBE (1xTBE é de 89 mM Tris, 89 mM de ácido bórico e EDTA 2,5 mM [pH

8,3]) por 30min em 100 V, e as bandas dos produtos da PCR foram visualizadas e fotografadas usando transiluminação UV.

Na figura 9 é possível observar de forma ilustrada como foi realizado esse procedimento.

Figura 9 - Demonstração esquemática da técnica de PCR



Fonte: Esquema adaptado pelo autor.

Os primers escolhidos para amplificação do gene *vanA*, pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1 – Primers utilizados para a pesquisa molecular por PCR.

Gene	Primers (5'-3') sequências	Artigo
<i>VanA</i>	F – 5'-TGAATAACATCGGCATTAC-3' R – 5'-TTATTTAACGGGGAAATC-3'	SAHA et al., 2008
<i>icaAD</i>	F - 5'-CTAACTAACGAAAGGTAG-3' R ' 5'-GGCAATATGATCAAGATAC-3'	VASUDEVAN et al, 2003

4.11 Microscopia Eletrônica de Transmissão.

As culturas dos isolados escolhidos para realização desta técnica, foram incubadas a 37°C durante 24 horas. Após o período de incubação os isolados foram centrifugados por 5min, a 2000rpm, desprezou-se o sobrenadante e a massa bacteriana foi lavada três vezes com PBS a 10%. Depois das lavagens foi feita a fixação com tampão fosfato a 0,1M, glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4% por 24hs. Após esse período foram realizadas lavagens com tampão fosfato 0,1M, seguidas de lavagens com tampão cacossilato 0,1M. Posteriormente os isolados foram submetidos a pós-fixação em tetróxido de Ósmio 1% e tampão cacossilato 0,1M durante 1h30min. Em seguida realizou-se duas lavagens com tampão cacossilato 0,1M e duas lavagens com água destilada por 10min. Cada isolado foi submetido a contrastação “in bloco” com acetato de uranila 2% e abrigou da luz por 24h. Realizou-se novamente lavagens com água destilada. Foram desidratados em séries crescentes de acetona (30, 50, 70, 90 e 3x 100%) por 15min cada. Para em seguida ser realizada a infiltração em resina epom (1:3, 1:2, 1:1, 2:1 e pura) e posteriormente foi realizada a emblocagem. Posteriormente, foram obtidas secções ultrafinas usando um ultramicrotômero (Leica UC6), corado com uranil acetato e citrato de chumbo, e depois examinado sob um microscópio eletrônico de transmissão (MET) DIEMECH e cols. (2013).

5 RESULTADOS (foram apresentados em forma de artigos)

5.1 Artigo 1 - Detecção Fenotípica e Genética da produção de biofilmes em *Staphylococcus* spp. com susceptibilidade reduzida à vancomicina de pacientes oncológicos.

INTRODUÇÃO:

O crescente uso de biomateriais implantáveis vem elevando a expectativa de vida humana, através do reestabelecimento de inúmeras funções vitais, porém concomitantemente, exacerba o problema das infecções associadas a estes produtos, sendo assim reconhecidos como um problema relacionado à terapia das infecções^[5]. De acordo com o centro norte-americano “National Institutes of Health” (NIH), aproximadamente 80% de todas as infecções no mundo estão associadas a biofilmes, especialmente, envolvendo biomateriais^[37].

Os estafilococos coagulase-negativos (CoNS) e *Staphylococcus aureus* são identificados comumente como responsáveis por infecções subclínicas e sua capacidade de estarem relacionados a formação de biofilmes que propiciam as infecções bacterianas^[3]. Além disso, a presença de dispositivos médicos internos em pacientes pode induzir formação de biofilme bacteriano, o que resulta em infecção persistente^[20].

A colonização de diversos sítios corporais pelos CoNS e a colonização transitória por *S. aureus* podem ser uma fonte de infecção para pacientes imunocomprometidos^[27]. Estudos mostram que a imunossupressão ou imunocomprometimento está associada ao aumento do risco de colonização de *Staphylococcus sp.* colocando os pacientes em risco de infecção e morbidade adicional^[19]. Vários fatores contribuem para esse risco, incluindo a imunossupressão relacionada à doença e tratamentos agressivos, como quimioterapia, terapia de radiação, uso de esteróides e transplantação de células-tronco hematopoiéticas^[29].

As complicações infecciosas são uma grave causa de morbidade e mortalidade nos pacientes oncológicos, especialmente aqueles com neoplasias malignas hematológicas subjacentes e aproximadamente 60% das mortes são relacionados às infecções^[40].

A emergência cepas de *Staphylococcus sp.* resistentes à meticilina (MRSA/MRCoNS) e a dificuldade no tratamento das infecções causadas por esses microrganismos tornou, em muitos casos, os glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina) a única alternativa terapêutica^[34]. O uso constante da vancomicina e, por conseguinte o aumento da pressão seletiva, ocasionou o aparecimento de MRSA tolerante (VT-MRSA) e com resistência à vancomicina^[15, 17].

Alguns estudos relatam um número crescente de estirpes de *S. epidermidis* glicopeptídeos-resistentes (GRSE) em todo o mundo^[10]. Isolados de *S. aureus* e principalmente os estafilococos coagulase-negativos (CoNS) resistentes à meticilina/oxacilina e com reduzida susceptibilidade aos glicopeptídeos foram relatados no Japão, Estados Unidos, Europa e Ásia desde o final da década de 80^[16]

No Brasil, cepas estafilocócicas com susceptibilidade reduzida a glicopéptideos foram relatadas em hospitais em São Paulo e Rio de Janeiro há uma década^[22] e, recentemente, *S. aureus* contendo genes *vanA* e *vanB* também foram descritos no Brasil^[30, 4].

O surgimento de bactérias multidroga-resistentes (MDR) tornou-se um problema de saúde pública, acrescentando problema à assistência médica em hospitais, particularmente para pacientes admitido em unidades de terapia intensiva (UTI). Em unidades de terapia intensiva, existe uso extensivo de antimicrobianos, o que impõe uma pressão seletiva e promove o

surgimento do MDR^[9]. Além disso, na UTI, o risco de infecção é aumentado devido às doenças subjacentes ou condições do paciente, imunidade diminuída e exposição a dispositivos invasivos múltiplos (ventilação mecânica, veia central cateteres (CVC) e cateteres do trato urinário)^[9].

O tratamento de infecções estafilocócicas tem se tornado um grande desafio para a comunidade médica, pois além de se tratar de um microrganismo com capacidade de formar biofilme o que agrava o seu potencial de virulência e reduz as opções de uso de antimicrobianos. Nesse contexto, conhecer as características fenotípicas e moleculares de *Staphylococcus sp.* resistente à meticilina e com reduzida susceptibilidade à vancomicina é necessário para entender e controlar a sua disseminação, como também auxiliar na antibioticoterapia.

MÉTODOS

População do estudo

Isolados clínicos provenientes de pacientes internados no Hospital do Câncer de Pernambuco, de amostras diversas após a rotina hospitalar foram coletados e identificados no Laboratório de referência do Hospital do presente estudo, sendo transportadas em meio sólido ágar Casoy inclinado para o laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular (LBBM), Universidade Federal de Pernambuco durante o período de julho de 2012 a outubro de 2016.

Isolamento e identificação

Os isolados foram inoculados em placas de Ágar sangue 5%, incubadas 24 horas, a 37°C para observação das características macroscópicas. Sendo posteriormente identificadas através dos seguintes testes fenotípicos: coloração de Gram, catalase, coagulase em tubo, aglutinação do látex, fermentação do manitol, prova da DNase e Susceptibilidade à novobiocina.

Screening de vancomicina

Os isolados de *Staphylococcus spp* foram submetidos a teste de susceptibilidade à vancomicina através técnica de screening com meio Brain-Heart-Infusion (BHI) suplementado com 6µg/ml do sal de vancomicina (OXOID). Utilizou-se inóculos com grau 0,5 de turbidez pela escala de McFarland^[16]

Determinação da concentração Mínima Inibitória (MIC)

Para avaliar a susceptibilidade à vancomicina foi realizado a microdiluição em caldo e seguindo a padronização do Clinical Laboratory Standards Institute^[8].

O método utilizado para determinar a MIC da vancomicina foi a microdiluição em caldo. Um isolado clínico de *Enterococcus faecium* albergando *vanA* foi utilizado como controle positivo^[39] e a cepa *E. faecalis* (ATCC 29212) como controle negativo. Na determinação da MIC por microdiluição em caldo, utilizou-se a suspensão bacteriana na escala 0,5 de McFarland que foi preparada a partir de uma cultura em placa de ágar sangue incubada por 24 horas. Desta cultura extraiu-se 6 a 8 colônias para serem inoculadas em solução salina de NaCl a 2% e ajustada para obter o grau de turbidez equivalente a escala 0,5 de McFarland. Posteriormente inocula outra solução salina de NaCl 2%, dessa suspensão retira-se 5µL e transfere para a placa de 96 poços fundo chato estéreis, inoculando-as. Essas placas já irão conter 180 µl de meio Muller-Hinton tratado com 20 µL em 8 diluições seriadas de vancomicina (de 1 µg/mL a 128 µg/mL g/ml), para obter uma concentração bacteriana final de aproximadamente 5 x 10⁵ UFC/mL em cada poço da placa de microdiluição^[8].

A interpretação do MIC foi realizada de acordo com os seguintes critérios: para *S. aureus* foram sensíveis os isolados que apresentaram MIC ≤ 2 µg/mL, intermediários 4-8

$\mu\text{g/mL}$ e resistentes $\geq 16 \mu\text{g/mL}$, e para os *CoNS* foram sensíveis os MICs $\leq 4 \mu\text{g/mL}$, intermediários $8-16 \mu\text{g/mL}$ e resistentes $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ [21].

Análise fenotípica da produção de exopolissacarídeos

A produção de exopolissacarídeos (EPS) foi avaliada através do semeio em Agar Vermelho Congo (AVC) usando um método modificado^[14]. O AVC permite a detecção da produção de exopolissacarídeos por variação em a cor das colônias no meio. O meio foi preparado adicionando 0,3 g do corante vermelho do Congo (1g/L) (Merck®) em 300mL do ágar Infusão de cérebro e coração (BHI, Himedia®) suplementado com 15g sacarose (50g/L). Os isolados bacterianos foram semeados nas placas do AVC e incubado a 37°C por 24 horas. O *S. aureus* (ATCC 25923) e *S. epidermidis* (ATCC 12228) foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente. No presente estudo, a classificação das colônias ocorreu pela observação de características macroscópicas das mesmas, como: coloração, aspecto das colônias e opacidade. Foram consideradas positivas colônias negras, rugosas e opacas, bem como as colônias negativas foram as que apresentaram coloração vermelha, lisa e brilhante

Ensaio da Produção de Biofilme

A capacidade dos isolados de *Staphylococcus sp.* de produzir biofilme foi realizado como descrito^[35]. As cepas estafilocócicas cresceram em TSB (Tryptic Soy Broth) adicionado de 1% de sacarose durante 24 horas a 35°C. Em seguida, 200 μl das suspensões bacterianas foram aplicadas em triplicata na placa de poliestireno de 96 poços fundo chato e incubadas durante 24 horas a 35°C. Após esse período, as suspensões bacterianas foram removidas e cada poço foi lavados três vezes com 250 μl de solução fisiológica a 0,9% estéril. Posteriormente, foi realizada a fixação com 200 μl de etanol PA por 15 minutos. Decorrido esse tempo, o etanol foi removido e as placas foram deixadas para secar a temperatura ambiente, e em seguida foram coradas com 200 μL de solução de Cristal Violeta durante 5 minutos. A seguir, as placas foram lavadas em água corrente e secas a temperatura ambiente. Foram incluídos também, o controle negativo (CN), composto apenas pelo caldo TSB com sacarose. A leitura da absorbância foi realizada no Leitor de ELISA, em comprimento de onda de 570nm e os isolados foram classificados segundo Stepanovic^[35]. O valor das densidades ótica para cada isolado (DO_i) foi obtido pela média dos três poços, sendo este o valor comparado com a densidade ótica do controle negativo (DO_c). Os isolados foram classificados em quatro categorias de acordo com a média das DOs (densidades ótica) relacionada com os resultados obtidos para a DO_c. As categorias foram baseadas nos seguintes critérios: não aderente (DO_i \leq DO_c), fracamente aderente (DO_c < DO_i \leq 2xDO_c), moderadamente aderente (2xDO_c < DO_i \leq 4x DO_c) ou fortemente aderente (4xDO_c < DO_i).

Ensaio da Produção de Biofilme na presença de vancomicina

A capacidade dos isolados de *Staphylococcus sp.* de produzir biofilme na presença de vancomicina foi realizado similarmente como descrito acima. As cepas estafilocócicas cresceram em TSB (Tryptic Soy Broth) adicionado de 1% de sacarose a durante 24 horas a 35°C. Em seguida, 180 μl da suspensão bacteriana foi adicionada nos poços das placas de microtitulação, e 20 μl adicionadas 8 diferentes concentrações de vancomicina (0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64; 128; 256 $\mu\text{g/mL}$) em diferentes poços para o mesmo isolado em triplicata e incubadas durante 24 horas a 35°C. A seguir as suspensões foram submetidas ao mesmo procedimento do ensaio da produção de biofilme sem vancomicina.

Técnicas Moleculares

O DNA foi extraído como descrito^[24] dos isolados produtores de biofilmes detectados pelas diferentes técnicas fenotípicas e utilizados na Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) usando a amplificação do gene *icaAD*, os Primers descritos^[38] (frente 5'-CTAACTAACGAAAGGTAG-3' e 5'-GGCAATATGATCAAGATAC-3' reverso). O DNA extraído foi utilizado na eletroforese.

Análise da escala de concordância dos testes fenotípicos

A concordância entre os testes fenotípicos para avaliar a produção de Biofilme foi verificado pelo índice k (kappa)^[28]

RESULTADOS

No presente estudo foram obtidos 56 isolados de pacientes oncológicos, 48/56 (85,7%) de *S. aureus* e 8/56 (14,3%) de estafilococos coagulase-negativo, em relação a procedência das amostras clínicas, 12/48(25%) dos isolados de *S. aureus* foram de hemoculturas e também secreção traqueal, sendo 16 isolados distribuídos em vários sítios de infecção (Tabela 1). Em relação aos oito isolados estafilococos coagulase-negativo três foram de hemocultura e dois de urocultura e ponta de cateter e um de ferida operatória, como descrito na Tabela 1.

Todos isolados foram submetidos ao teste de susceptibilidade à vancomicina através da técnica de ágar suplementado e microdiluição com o fármaco citado, sendo obtido o crescimento de dez (18%) isolados no screening com 6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de Vancomicina, oito *S. aureus* e dois CoNS. Em relação aos resultados da microdiluição em caldo com vancomicina, observamos que nos isolados de *S. aureus* seis isolados apresentaram $\text{MIC} \leq 2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ e dois isolados apresentaram $\text{MIC} \geq 16 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Já nos isolados Coagulase-negativos, dois apresentaram $\text{MIC} \leq 2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, como pode ser visto na tabela 2.

Em relação a capacidade de produzir Biofilme, utilizando as técnicas de produção de exopolissacarídeo em AVC e ensaio da produção de biofilme, no primeiro ensaio foram obtidos 47/56 (84%) isolados positivos (40 *S. aureus* e 7 CoNS), no segundo teste, 10 (17,9%) isolados se enquadraram como não aderentes (9 *S. aureus* e 1 CoNS), 36 (64,2%) como fracamente aderente (30 *S. aureus* e 6 CoNS) e 10 (17,9%) foram moderadamente aderentes (9 *S. aureus* e 1 CoNS). Ao relacionar esses achados, observou-se que 41(73%) isolados apresentaram positividade em ambas as metodologias. Foi avaliado o índice de concordância entre os testes acima citados e foi obtido um índice de 0,3 (concordância mediana).

Na formação de Biofilme em presença de vancomicina, foi observado 15 isolados que se enquadraram como não aderentes (13 *S. aureus* e 2 CoNS), 29 como fracamente aderente (24 *S. aureus* e 5 CoNS) e 5 foram moderadamente aderentes (4 *S. aureus* e 1 CoNS) e 5 foram fortemente aderentes (todos *S. aureus*). Cruzando os resultados obtidos por essa técnica com os resultados alcançados com a técnica de produção de exopolissacarídeo em AVC, observou-se que 39 (70%) dos isolados foram positivos em ambas as técnicas. Ao comparar a produção do biofilme sem vancomicina com a produção do biofilme na presença da vancomicina, foi possível encontrar um índice de 0,7 (Boa concordância), o mesmo índice foi obtido ao comparar a produção do biofilme com vancomicina com a produção de exopolissacarídeo.

Ao determinar a produção de biofilme em presença de vancomicina, observou-se que todos os isolados apresentaram formação de biofilme em concentração maior do que os MICs obtidos previamente na determinação da susceptibilidade à vancomicina, sendo observado que entre isolados de *S. aureus*, 6 isolados apresentaram $\text{MIC} \leq 4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ e 2 isolados apresentaram $\text{MIC} \geq 64 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Já nos isolados CoNS, 2 apresentaram $\text{MIC} \leq 8 \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Os isolados foram submetidos a pesquisa molecular do gene *icaAD*, e 39,3% (22/56) dos isolados produtores de biofilme eram portadores do gene *icaAD* (19 *S. aureus* e 3 CoNS), assim distribuídos diante da capacidade de produzir biofilme em placa de microtitulação: dos isolados de *S. aureus* *icaAD* positivos, 10 foram fracamente aderente e 9 moderadamente aderente, já entre os isolados de CoNS, dois foram fracamente aderentes e um foi moderadamente aderente. Porém quando relacionados com os resultados da produção de biofilme na presença da vancomicina, obteve-se a seguinte distribuição, nos 19 isolados de *S. aureus* 10 mostraram-se fracamente aderentes, 5 moderadamente aderentes e cinco fortemente aderente, e nos isolados de CoNS, dois foram fracamente aderentes e um fortemente aderente. Quanto ao teste com vermelho congo, 22(39,3%) isolados produtores do exopolissacarídeo foram positivos na pesquisa do gene *icaAD* (Tabela 3).

Diante dos dados obtidos na pesquisa do gene *icaAD*, é possível observar que dois isolados de *S. aureus* portadores do gene *icaAD*, apresentaram resistência à vancomicina, além de serem produtores de biofilme tanto pela técnica de produção de exopolissacarídeo em AVC, como também pela produção do biofilme em placa de poliestireno nas duas condições, sem e com vancomicina. Nenhum isolados CoNS que carregava o gene *icaAD* apresentou resistência à vancomicina, porém apresentavam capacidade de produzir biofilme, como observado na tabela 2.

DISCUSSÃO

No presente estudo foi observado uma maior ocorrência de isolados de *S. aureus* (85,7%) em relação aos isolados de estafilococos coagulase negativo (14,3%) nas amostras oriundas de pacientes oncológicos. Um estudo semelhante relatou que 17 isolados (33,3%) foram estirpes de *S. aureus* e 23 (45,1%) foram cepas de *S. Epidermidis*^[12]. Outro estudo, sobre a incidência de *Staphylococcus spp.* oriundos de hemocultura de pacientes oncológicos, reporta que os SCoN foram os microrganismos mais isolados no estudo, representando 27% do total de amostras positivas (39/146), seguido pelo *S. aureus*, com um total de 26 isolados (18%)^[32].

Em relação a distribuição dos estafilococos nas amostras clínicas obtidas, *S. aureus* foi mais frequente nas amostras de hemocultura, secreção traqueal perfazendo 50% das amostras clínicas, destacando também fragmento ósseo e ponta de cateter. Por outro lado, SCoN não foram isolados de amostras de secreção traqueal, mas houve isolamento em hemoculturas. Estudo realizado na China, relatou CoNS (14.9%) e *S. aureus*(3.5%) em hemocultura^[7] resultados contrários ao nosso. Estudo semelhante^[26], com pacientes em risco de desenvolver neutropenia febril, reporta a ocorrência de 44% de *Staphylococcus spp.* e 15% de *S. aureus* em hemocultura. Outro estudo^[25], sobre prevalência de agentes patogênicos em hemoculturas, detectou a ocorrência de 66.7% *S. aureus* e 17.6% CoNS, com dados comparativos ao presente estudo.

Sobre a presença predominante de *S. aureus* nas amostras de secreção traqueal, é importante mencionar que obtivemos uma frequência menor de CoNS, mas alguns estudos apontam a participação de *Staphylococcus spp.* causando pneumonias. Um estudo, encontrou ocorrência de 37% de *S. aureus* em aspirado traqueal em infecções respiratórias^[36]. Outro estudo, que pesquisou o impacto das infecções adquiridas no hospital com bactérias multirresistentes em uma UTI oncológica, relata a ocorrência de 48,3% de *S.aureus* causadores de pneumonia em amostras de secreção traqueo-bronqueal^[9].

Os biofilmes estafilocócicos são obstáculos para sucesso terapêutico devido à diminuição de sensibilidade aos antimicrobianos e resposta imune do hospedeiro^[33]. No presente estudo houve crescimento de 10/56(18%) isolados (8 *S. aureus* e 2 CoNS) no ágar

Brain-Heart Infusion suplementado com 6 µg/mL de vancomicina, demonstrando que os isolados em questão apresentam redução da susceptibilidade a esse fármaco. Um estudo^[21], obteve 68% de *S. aureus* e 46,1% de CoNS foram intermediários ou resistente à vancomicina no teste de ágar suplementado com o antimicrobiano. Pela determinação do MIC, foi o possível detectar, no presente estudo, dois isolados de *S. aureus* que apresentaram MIC \geq 16 µg/µl, sendo portanto, considerados fenotipicamente resistentes. Ao determinar a produção de biofilme em presença de vancomicina, observou-se que todos os isolados apresentaram produção de biofilme em presença de vancomicina maior do que os MICs, os isolados de *S. aureus* resistentes aumentaram em 4x o valor do MIC obtido. Resultados similares foram obtidos^[1] em um estudo sobre alta resistência à vancomicina por *Staphylococcus spp.* produtores de biofilme, onde obteve um aumento de até 16x na concentração do MIC. Esta observação mostra que a produção de biofilmes resulta em uma importante barreira à difusão antimicrobiana.

Detectamos que 84% dos isolados estafilocócicos foram positivos no teste de produção do exopolissacarídeo em AVC. Um estudo^[23], relata que 75% dos isolados clínicos de estafilococos foram biofilme positivos determinados pelo método AVC. Outro estudo^[33], relata a ocorrência de 90,8% de isolados produtores de exopolissacarídeo testados por AVC. Já alguns pesquisadores^[31], descrevem a ocorrência de 84,7% dos estafilococos coagulase-negativos produtores de biofilme, enquanto 62,5% dos estafilococos coagulase positivos eram produtores de biofilme.

Através dos métodos para avaliar a produção de biofilme, foi possível observar que 73% dos isolados foram capazes de produzir biofilme e o exopolissacarídeo. Pesquisadores^[11] reportam a ocorrência de 94,6% de isolados de *S. aureus* produtores de biofilme. Um outro estudo sobre a detecção do gene *icaAD* e seu papel na produção de biofilme em *Staphylococcus sp.*, reporta a ocorrência de 45,6% de *S.aureus* e 76,9% CoNS de isolados produtores de biofilme pela técnica de produção de biofilme em placa^[21].

No presente estudo, 22/47(47%) isolados positivos no teste com AVC também apresentaram positividade no teste de produção de biofilme em placa e apresentaram o gene *icaAD*. Pesquisadores^[18], encontraram 90% (36/40) de isolados positivos no teste de produção de biofilme, teste do vermelho congo e pesquisa do gene *icaAD*. Estudo^[21], relata a presença de genes *ica*, em 43% e 63,5% de isolados de *S.aureus* e CoNS, respectivamente, com testes fenotípicos para biofilme.

O gene *icaAD* foi detectado em 39,3% dos isolados estudados. Um estudo^[23], relata a ocorrência de 81% do gene *icaAD* de estafilococos produtores de biofilme, isolados de pacientes e pessoas saudáveis. Foi observada a ocorrência de 97% do gene *icaAD* nos isolados *Staphylococcus spp*^[13].

Os demais isolados detectados pelo teste de produção de biofilme em placa de poliestireno, pode ter sua capacidade de produzir biofilme devido a outros mecanismos que auxiliam a agregação e formação do biofilme. A produção fenotípica de EPS por *icaAD*-negativo sugerem que os isolados de estafilococos desenvolveram o biofilme através de uma via gene *ica*-independente^[13]. Os mecanismos envolvidos na transcrição e regulação do locus *ica* é parcialmente compreendida, e diferentes mecanismos regulatórios são conhecidos em *S. aureus* e *S. epidermidis*^[2].

Quanto ao achado de isolados de *S. aureus* resistentes à vancomicina, produtores de biofilme e portadores do gene *icaAD*, pesquisadores^[21] encontraram 77,8% de *S. aureus*. O ambiente do biofilme tem sido reportado como promotor da disseminação de genes de resistência antimicrobiana, provavelmente por facilitar contato célula-célula e consequentemente aumento da transferência genética^[20, 33].

AGRADECIMENTOS

O presente estudo contou com a colaboração Msc. Cynthia, cedendo os primers para o gene *mecA*, com a colaboração de Dr. Eulália Ximenes que auxiliou na aquisição da cepa padrão ATCC 33591 *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente.

FINANCIAL SUPPORT

Este trabalho foi apoiado financeiramente pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), atribuído a MAVM (processo nº 474777 / 2013-8).

CONFLICT OF INTEREST

Os autores declaram não haver quaisquer conflito de interesse.

REFERENCES

1. Antunes ALS, Bonfanti JW, Perez LRR et al (2011) High vancomycin resistance among biofilms produced by *Staphylococcus* species isolated from central venous catheters, *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 106: 51-55.
2. Arciola CR, Campoccia D, Speziale P et al (2012) Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials, *Biomaterials*. 33: 5967-5982.
3. Barbieri R, Pesce M, Franchelli S et al (2015) Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococci* causing breast peri-implant infections in oncologic patients. *BMC Microbiology*. 15: 1-10.
4. Breves A, Miranda CAC, Flores C et al (2015) Methicillin- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in health care workers and medical device. *Braz J Pathol Lab Med*. 51:143-52.
5. Busscher HJ and Van Der Mei HC (2012) How do bacteria know they are on a surface and regulate their response to an adhering state? *PLoS Pathog*. 8: 1-3.
6. Cázares-Domínguez V, Cruz-Córdova A, Ochoa S et al (2015) Vancomycin Tolerant, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Reveals the Effects of Vancomycin on Cell Wall Thickening, *PLoS ONE* 10: 1-16.
7. Chen SZ, Lin KN, Xiao M et al (2017) Distribution and drug resistance of pathogens of blood stream infection in patients with hematological malignancies after chemotherapy. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 38: 951-955.
8. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) (2012). CLSI M07-A9 Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
9. Cornejo-Juárez P, Vilar-Compte D, Pérez-Jiménez C, et al (2015) The impact of hospital-acquired infections with multidrug-resistant bacteria in an oncology intensive care unit, *Intern. J. of Infect. Dis.*, 31: 31–34.
10. Cremniter J, Slassi A, Quincampoix JC et al (2010) Decreased susceptibility to teicoplanin and vancomycin in coagulase-negative staphylococci isolated from orthopedic-device-associated infections. *J Clin Microbiol*. 48:1428– 1431;
11. Di Domenico EG, Farulla I, Prignano G et al (2017) Biofilm is a Major Virulence Determinant in Bacterial Colonization of Chronic Skin Ulcers Independently from the Multidrug Resistant Phenotype, *Int. J. Mol. Sci*. 18:1-19.
12. El-hendia AA, Mohamed AA, EL-shalakanya AH et al (2016) Biofilm formation by blood stream staphylococcal isolates from febrile neutropenic cancer patients, *Menoufia Med J*. 29:49–353.

13. Ferreira AA, Tette PAS, Mendonça RCS et al (2014) Detection of exopolysaccharide production and biofilm-related genes in *Staphylococcus* spp. isolated from a poultry processing plant, *Food Sci. Technol*, 34: 710-716.
14. Freeman DJ, Falkine R FR, Keane CT (1989) New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol*. 42: 872-874.
15. Gomes DM, Ward KE, Laplante KL (2015) Clinical implications of vancomycin heteroresistant and intermediately susceptible *Staphylococcus aureus*, *Pharmacotherapy*. 35: 424-32.
16. Howden BP, Davies JK, Johnson, PDR et al (2010) Reduced Vancomycin Susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and Heterogeneous vancomycin-intermediate strains: Resistance Mechanisms, Laboratory Detection and Clinical Implications. *Clin Microbiol Rev*. 23: 99-139.
17. Koh YR, Kim KH, Chang CL et al (2016) Prevalence and clinical impact of heterogeneous vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* isolated from hospitalized patients. *Annals of Laboratory Medicine*. 36: 235-243.
18. Los R, Sawicki R, Juda M et al (2010) Comparative analysis of phenotypic and genotypic methods for the determination of the biofilm-forming abilities of *Staphylococcus epidermidis*, *FEMS Microbiol Lett*. 310: 97–103.
19. McNeil JC, (2014) *Staphylococcus aureus* – antimicrobial resistance and the immunocompromised child, *Infect. and Drug Resist*. 7:117–127;
20. Melake NA, ZakariA AS, Ibrahim NH et al (2014) Prevalence of Agr Specificity Groups among *in vitro* Biofilm Forming Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Nasal Carriers, *International J Microbio Res*. 5: 76-84,
21. Melake NA, Hendawy GR, Labib AZ et al (2017) Detection of intercellular adhesion *icaAD* genes in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci and their role in biofilm production, *Menoufia Med J*. 29: 789–800.
22. Melo GB, Melo MC, Gama AP et al (2005) Analysis of the genetic diversity of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Braz J Microbiol*. 36:126-30.
23. Oliveira A and Cunha RS (2010) Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase negative staphylococci, *BMC Res Notes*. 3: 260-268;
24. Oliveira WLM, Manguiera EVC, Vilela MA et al (2015) Diversity of Scmec types in Methicillin Resistant *Staphylococcus* spp. Causing Hospital-Associated Infections, *J. Microbiol. Pathol*. 2: 1-8.
25. Opintan, J.A. and Newman, M.J.(2017) Prevalence of antimicrobial resistant pathogens from blood cultures: results from a laboratory based Nation wide surveillance in Ghana, *Antimicrob Resist and Infect Cont* 6:1-6.
26. Osmani AH, Jabbar AA, Gangwani MK et al (2017) Outcomes of High Risk Patients with Febrile Neutropenia at a Tertiary Care Center, *Asian Pac J Cancer Prev*.18: 2741-2745.
27. Palazzo ICV, Araujo MLC, Darini ALC (2005) First Report of Vancomycin-Resistant Staphylococci Isolated from Healthy Carriers in Brazil, *J Clin Microbiol*. 43: 179-85.
28. PAN-AMERICANA HEALTH ORGANIZATION (PAHO) – FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE/ CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA (1997) Métodos de Investigação Epidemiológica em Doença Transmissíveis. 1: 12-13.
29. Rosolem MM, Rabello LSCF, Lisboa T et al (2012) Critically ill patients with cancer and sepsis: Clinical course and prognostic factors, *J of Crit Care*. 27: 301–307.
30. Rossi FMD, Diaz L, Wollam A, et al (2014) Transferable vancomycin resistance in a community-associated MRSA lineage. *N Engl J Med*. 370: 1524-31.
31. Saising J, Singdam S, Ongsakulm M et al (2012) Lipase, protease, and biofilm as the major virulence factors in staphylococci isolated from acne lesions, *BioScience Trends*. 6: 160-164.

32. Santos ACM, Brzezinski LS, Silva GS et al (2016) Incidência de *Staphylococcus* spp. isolados em hemocultura de pacientes oncológicos, *Anais do XI EVINCI*.
33. Seng R, Kitti T, Thummeepak R et al (2017) Biofilm formation of methicillin-resistant coagulase negative Staphylococci (MR-CoNS) isolated from community and hospital environments, *PLoS ONE*. 12:1-13.
34. Soriano A, Marco F, Martínez JA et al (2008) Influence of Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration on the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis*. 46:193- 200.
35. Stepanović S, Vuković D, Dakić I et al (2000) A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation, *J Microbiol Met*. 40:175-179.
36. Tetenta S, Metersky, ML (2011) Tracheal aspirate Gram stain has limited sensitivity and specificity for detecting *Staphylococcus aureus*, *Respirol*. 16, p.86–89;
37. Trentin DS, Giordani RB, Macedo AJ (2013) Pathogenic bacterial biofilms: general, clinical and combat strategies, *Rev. Liber*. 14:113-238.
38. Vasudevan P, Nair MKM, Annamalai, T et al (2003) Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet Microbiol*, 92:179-185.
39. Vilela MA, Souza SL, Palazzo ICV et al (2006) Identification and molecular characterization of Van A-typy vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* in northeast of Brazil *Mem Inst Osw Cruz*. 101:716 - 719
40. Zembower TR (2014) Epidemiology of Infections in Cancer Patients, Infectious Complications in Cancer Patients, *Canc Treat and Res*.161:43- 89.

Tabela 1- Distribuição dos isolados de *Staphylococcus* sp. oriundos de pacientes oncológicos do Hospital do Câncer de Pernambuco entre as amostras clínicas obtidas no período de junho/12 a Outubro/16.

Isolados de <i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. aureus</i>	CoNS	Total (n=56)
Amostra clínica			
Hemocultura	12	3	15
Secreção Traqueal	12	-	12
Urocultura	1	2	3
Líquido Peritoneal	1	-	1
Fragmento Ósseo	4	-	4
Abcesso	1	-	1
Ponta de Cateter	4	2	6
Fragmento de Tecido	1	-	2
Orofaringe	2	-	2
Feridas	2	1	3
Ferida Operatória	1	-	1
Líquido Pleural	2	-	2
Líquido vesícula Biliar	1	-	1
Secreção de Quadril	1	-	1
Líquido Cavitário	1	-	1
Secreção da Tíbia	1	-	1
Secreção de axila	1	-	1
Total	48	8	56

Tabela2 - Relação entre resistência à vancomicina e a capacidade de produzir biofilme em pacientes oncológicos o Hospital do Câncer de Pernambuco no período de Junho/12 a Outubro/16

Métodos	AVC*		Produção de Biofilme**			Produção de Biofilme em presença de vancomicina**				Gene <i>icaAD</i>	
	Pos	Neg	NA	FA	MA	NA	FA	MA	FOA	Pos	Neg
<u><i>S.aureus</i></u>											
BHI-V (6µg/mL)											
Crescimento	8	1	1	4	4	2	3	3	1	5	4
Não crescimento	32	7	8	27	5	12	22	2	3	14	25
Microdiluição em Caldo											
Sensível	7	-	1	3	2	2	2	1	1	3	3
Intermediário	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Resistente	2	-	-	-	2	-	-	2	-	2	-
<u><i>S.CoN</i></u>											
BHI-V (6µg/mL)											
Crescimento	1	1	-	1	1	1	-	-	-	1	1
Não crescimento	6	-	1	5	-	2	4	-	1	2	4
Microdiluição em Caldo											
Sensível	2	-	-	1	1	1	-	-	1	1	1
Intermediário	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Resistente	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*AVC= Ágar vermelho Congo; (-) = não houve isolados com essa característica

**NA – Não aderente; FA – Fracamente aderente; MA – Moderadamente aderente; FOA – Fortemente aderente.

Tabela 3 - Relação entre pesquisa do gene *icaAD* e a capacidade de produzir biofilme em pacientes oncológicos o hospital do Câncer de Pernambuco no período de Junho/12 a Outubro/16

Métodos	Gene <i>icaAD</i>	
	positivo	Negativo
<i>S.aureus</i>	19	29
AVC		
Positivo	19	21
Negativo		8
Produção de Biofilme em placa		
Não aderente	-	9
Fracamente aderente	10	20
Moderadamente aderente	9	-
Fortemente aderente	-	-
Produção de Biofilme tratado		
Não aderente	-	14
Fracamente aderente	10	15
Moderadamente aderente	5	-
Fortemente aderente	4	-
<i>CoNS</i>	3	5
AVC		
Positivo	3	4
Negativo	0	1
Produção de Biofilme em placa		
Não aderente	-	1
Fracamente aderente	2	4
Moderadamente aderente	1	-
Fortemente aderente	-	-
Produção de Biofilme tratado		
Não aderente	-	3
Fracamente aderente	2	2
Moderadamente aderente	-	-
Fortemente aderente	1	-



FIGURA 1 – Teste da produção do exopolissacarídeo (slime) através do Ágar vermelho congo: isolados positivos (preto) e isolados negativos (vermelho).

5.2 Artigo 2 - Alterações Ultraestruturais de *Staphylococcus* spp. resistentes e sensíveis à vancomicina provenientes de profissionais de saúde

Introdução

As infecções bacterianas associadas à assistência saúde estão tornando-se mais frequentes e nos países em desenvolvimento devido aos recursos financeiros limitados, estas infecções são consideradas problemas de saúde pública^[1]. Dados relacionados às taxas de morbidade e mortalidade em infecções com microrganismos patogênicos bacterianos resistentes aos antimicrobianos demonstram que a terapêutica destas infecções é um desafio mundial^[2].

Entre as bactérias gram positivas destaca-se *Staphylococcus aureus*, um microrganismo patogênico que afeta humanos com potencial ampliado para causar infecções cutâneas leves como também a infecções graves como endocardite, osteomielite, pneumonia e infecções da corrente sanguínea^[3].

Por outro lado, os *Staphylococcus* coagulase-negativo (SCoN) apresentam uma baixa virulência quando comparado ao *S. aureus*, porém ambos demonstram perfis de resistência aos antimicrobianos, tornando-se problema relacionado aos cuidados da saúde, especialmente em ambientes hospitalares, como unidades terapia intensiva, pacientes idosos e imunocomprometidos^[3, 4].

Estudos epidemiológicos analisando a microbiota de profissionais de saúde, realizados em diferentes superfícies bióticas (mãos, nasofaringe) descrevem a ocorrência de *S. aureus* e CoNS com perfis de resistência a diferentes antimicrobianos^[5-8]. Por outro lado^[9], demonstra que *Staphylococcus* spp. que constituem a microbiota de pacientes colonizam o ambiente hospitalar, propiciando a circulação de bactérias multidroga resistente (MDR).

A resistência à metilina é a marca registrada em *S. aureus* e CoNS que pode ser considerado um indicador de resistência a múltiplos fármacos^[2]. Existem várias opções para o

tratamento de infecções por *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina, incluindo linezolide, tigeciclina, daptomicina. No entanto, a vancomicina continuou a ser a principal opção de tratamento^[10, 4].

O aumento do uso de vancomicina para tratar infecções bacterianas causadas por MRSA, *Clostridium difficile* e *Enterococcus* acentuaram a emergência de *S. aureus* resistente à vancomicina (VRSA). O primeiro relato de *S. aureus* vancomicina intermediário (VISA), com MIC de 8-16 µg/mL, foi descrito no Japão, seguido da descrição de casos em muitos países^[11]. Como também foram descritos isolados VISA associado a sub-populações com perfil de hetero-resistencia VISA (hVISA), sendo este termo expandido para outros glicopeptídeos, denominado glicopeptídeo intermediário *S. aureus* (GISA e hGISA, se heterogêneos) também são usados^[12].

Os mecanismos de resistência à vancomicina em *S. aureus* podem ser relacionados a elementos genéticos, transposon *Tn1546*, que foi adquirido a partir de *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina. A maioria das cepas surgiram em pacientes hospitalizados com feridas diabéticas coinfectadas também por enterococos resistentes à vancomicina (VRE)^[13], por outro lado a descrição de isolados VRSA identificados com um MIC de vancomicina ≥ 100 µg/mL provenientes de pacientes diabéticos com feridas coinfectadas por *E. faecalis* e também MRSA resistentes sugerem mecanismos bioquímicos^[14].

Outros mecanismos de resistência à vancomicina incluem alterações na parede celular, resultando em reorganização e espessamento da mesma, e devido a estas modificações na parede celular a penetração da vancomicina fica reduzida, inibindo a ligação ao precursor de ácido N-acetil-murâmico, o alvo citoplasmático. Além disso, hVISA e VISA podem representar estado evolutivo bacteriano favorecendo a persistência no meio ambiente^[12].

Este perfil hetero-resistente também foi descrito em CoNS resistente a glicopéptideos (*S. epidermidis* e *S. haemolyticus*) relacionado ao espessamento da parede celular^[15, 16].

Linhagens de *Staphylococcus* quando expostas à vancomicina desenvolveram resistência em pacientes submetidos à terapia com este fármaco e também à nível experimental com linhagens sensíveis e controle^[17, 18].

Através da microscopia eletrônica de transmissão (MET)^[19] analisou primeira cepa clínica VRSA, descrevendo a parede celular desta linhagem, com produção aumentada de peptidoglicano, mais monômeros de mureína e mais camadas (30-40) presentes na parede celular, o mecanismo de resistência à vancomicina. Um estudo^[20] cita que linhagens VRSA de vários países inclusive do Brasil, apresentavam espessamento da parede celular, presumivelmente devido à acumulação de quantidades aumentadas de peptidoglicano como um novo modelo de resistência à vancomicina.

Um estudo epidemiológico realizado^[5], descreve a ocorrência de linhagens de *Staphylococcus* spp. resistentes à vancomicina (6µg/mL) pelo método screening em isolados de microbiota de profissionais de saúde, em Hospital Universitário de Pernambuco, Brasil. O presente estudo objetivou analisar as alterações ultraestruturais da parede celular em isolados de *Staphylococcus* spp. sensíveis e resistentes, proveniente da microbiota de profissionais de saúde.

MÉTODOS

Foram analisados isolados de *Staphylococcus* spp. oriundos do estudo^[5], provenientes de secreção de nasofaringe de profissionais de saúde de três setores hospitalares, Unidade de Terapia Intensiva (UTIs), Clínicas Cirúrgicas e Serviço de Hemodiálise/Nefrologia do Hospital Universitário de Pernambuco, Brasil.

No presente estudo foram analisados 102 isolados de *Staphylococcus* spp que estavam mantidos em estoque congelado, em caldo BHI adicionado de glicerol, a -20°C e em Ágar

Nutriente inclinado a 4°C. Os mesmos foram re-identificados de acordo com técnicas padronizadas para a identificação de *Staphylococcus* spp.

Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos (TSA)

Os isolados de *Staphylococcus* spp., foram submetidos à técnica de difusão de discos em Ágar Mueller-Hinton seguindo a padronização e interpretação do Clinical Laboratory Standards Institute^[21], utilizando os seguintes antimicrobianos: penicilina 10U, gentamicina 10µg, clindamicina 2µg, sulfazotrin 1,25/23.75µg, ciprofloxacina 5µg, cloranfenicol 30µg, cefoxitina 30µg, teicoplanina 30µg, eritromicina 15µg e linezolid 5µg. Procedeu-se a leitura dos halos de inibição formados após a incubação por 24hs. à 35°C, utilizando o paquímetro.

Teste de Susceptibilidade à Vancomicina

Os isolados de *Staphylococcus* sp. foram submetidos à teste de susceptibilidade à vancomicina através técnica de screening com meio Brain-Heart-Infusion (BHI) suplementado com 6 µg/mL do sal de vancomicina (OXOID). Utilizou-se inóculos com grau 0,5 de turbidez pela escala de McFarland^[22].

Para determinar a MIC à vancomicina foram realizados dois métodos, a microdiluição em caldo e E-test, seguindo a padronização do CLSI (2014) e foi utilizada como cepa padrão para controle positivo um isolado clínico de *Enterococcus faecium* portador do gene *vanA*^[23] e como controle negativo *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Primeiramente foi realizado o E-test de vancomicina, utilizando inóculos com 0,5 de turbidez pela escala de McFarland que foram semeados em meio Müller-Hinton, incubando-as por 48 horas a 35°C. Após esse tempo, foi realizada a leitura conforme especificações do fabricante e comparando-se aos pontos de corte^[21].

Na determinação da MIC por microdiluição em caldo, utilizou-se a suspensão bacteriana na escala 0,5 de McFarland que foi preparada a partir de uma cultura em placa de ágar sangue

incubada por 24 horas a 35°C. Desta cultura extraiu-se 6 a 8 colônias para serem homogeneizadas em solução salina de NaCl a 2% a fim de ajustar a turbidez para a escala 0,5 de McFarland. Sendo posteriormente inoculadas em microplacas com fundo chato com 96 poços estéreis contendo 100 µL de meio Muller-Hinton com solução de vancomicina, do qual foram realizadas 8 diluições seriadas (de 1 µg/mL a 128 µg/mL), e 5 µL do inóculo ajustado para obter uma concentração bacteriana final de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL em cada poço da placa de microdiluição^[22].

Técnicas Moleculares

Os isolados resistentes à vancomicina pelas diversas técnicas fenotípicas foram submetidos à extração de DNA utilizando o protocolo descrito^[24] e submetidos à técnica de Reação Cadeia Polimerase (PCR) para amplificação do gene *vanA* e *mecA* utilizando as condições e os primers para amplificação do gene *vanA* (forward - TGAATAACATCGGCATTAC e reverse - TTATTTAACGGGGAAATC) descrito no estudo^[25], e para amplificação do gene *mecA* os primers P1, 5'-GGTCCCATTA ACTCTGAAG-3' e P3, 5'-AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC-3' descritos^[26].

Microscopia Eletrônica de Transmissão.

As culturas dos isolados escolhidos para realização desta técnica, foram incubadas a 37°C durante 24 horas. Após o período de incubação os isolados foram centrifugados por 5min, a 2000rpm, desprezou-se o sobrenadante e a massa bacteriana foi lavada três vezes com PBS a 10%. Depois das lavagens foi feita a fixação com tampão fosfato a 0,1M, glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4% por 24hs. Após esse período foram realizadas lavagens com tampão fosfato 0,1M, seguidas de lavagens com tampão cacossilato 0,1M. Posteriormente os isolados foram submetidos a pós-fixação em tetróxido de Ósmio 1% e tampão cacossilato 0,1M durante

1h30min. Em seguida realizou-se duas lavagens com tampão cacosilato 0,1M e duas lavagens com água destilada por 10min. Cada isolado foi submetido a contrastação “in bloco” com acetato de uranila 2% e abrigou da luz por 24h. Realizou-se novamente lavagens com água destilada. Foram desidratados em séries crescentes de acetona (30, 50, 70, 90 e 3x 100%) por 15min cada. Para em seguida ser realizada a infiltração em resina epom (1:3, 1:2, 1:1, 2:1 e pura) e posteriormente foi realizada a emblocagem. Posteriormente, foram obtidas secções ultrafinas usando um ultramicrotômero (Leica UC6), corado com uranil acetato e citrato de chumbo, e depois examinado sob um microscópio eletrônico de transmissão (MET)^[27].

RESULTADOS

Na avaliação do perfil de susceptibilidade dos isolados de *Staphylococcus* spp. frente aos antimicrobianos, observou-se que 84,3%(86/102) dos isolados apresentaram perfil multidroga-resistência. Em relação ao perfil de resistência à vancomicina, 19 isolados foram resistentes no screening em meio BHIV6: *S. aureus* (7) e CoNS (12). Posteriormente estes isolados foram submetidos ao método do E-test para determinar a concentração inibitória mínima de vancomicina. Os sete isolados de *S. aureus* apresentaram os seguintes intervalos de MICs: um isolado com MIC de $\leq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$ (sensível), quatro com MIC entre 4 e 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e dois não apresentaram determinação de MIC por falta de zona de inibição. Dos 12 isolados de estafilococos coagulase-negativos, 10 isolados apresentaram MIC de $\leq 4\mu\text{g}/\text{mL}$ e dois isolados MIC de $\geq 32\mu\text{g}/\text{mL}$.

Procendeu-se então para determinação do MIC por microdiluição em caldo, na qual observou-se que dos sete isolados de *S. aureus*, cinco foram sensíveis (MIC $\leq 2 \mu\text{g} / \text{mL}$) e dois resistentes (MIC $\geq 16\mu\text{g} / \text{mL}$). Em relação aos 12 isolados de estafilococos coagulase-negativos, nove apresentaram CIM de $\leq 2\mu\text{g} / \text{mL}$ e três CMI de $\geq 32\mu\text{g} / \text{mL}$.

A fim de comparar os métodos fenotípicos utilizados para estimar sensibilidade à vancomicina foi realizado o teste de concordância *Kappa*. Quando comparamos os screenings

de 5 e 6 µg/mL com a microdiluição em caldo foram obtidos os índices de 0,0 (ruim) e 0,46 (regular) respectivamente. Ao compararmos o E-test com a microdiluição foi obtido um índice de 0,96, sendo considerado um ótimo índice de concordância.

A análise ultraestrutural através da microscopia eletrônica de transmissão foi realizada nos isolados que apresentaram crescimento a partir do intervalo entre 4 e 8 µg/mL de vancomicina e de uma cepa de *Staphylococcus* spp. sem exposição à vancomicina (cepa controle negativo).

Comparando as imagens obtidas do controle negativo (Fig 1), foi possível observar que os isolados com perfil de susceptibilidade intermediária e resistente, apresentaram não só espessamento da parede celular, mas também outras alterações ultraestruturais, nos isolados MIC entre 4 e 8 µg/mL. Observou-se divisão celular abortada, apresentando espessamento de septo de divisão, ainda divisão aberrante demonstrando espessamento de septos de divisão assimétricos e sem separação das células-filhas, condensação de ribossomos, destruição dos envelopes celulares (parede celular e membrana citoplasmática) formação de septo anômalo e descontínuo, retração da membrana citoplasmática, septo de divisão unilateral (Fig 1).

Já nos isolados que apresentaram MIC ≥ 16 µg/ml, observou-se condensação do material genético na origem do septo com quantidade desproporcional, espessamento da membrana externa, descolamento da membrana citoplasmática, condensação dos ribossomos, descontinuação dos envoltórios celulares, parede celular, membrana citoplasmática (Fig 1).

Dos cinco isolados com MICs considerados resistentes, apenas um isolado (*Staphylococcus epidermidis*) transportou o gene *vanA*, o qual foi confirmado por sequenciamento que mostrou 100% de similaridade com dez sequências de *Enterococcus* sp. depositadas em GenBank (KT581638).

Para caracterizar geneticamente os isolados, a detecção do gene *mecA* foi realizada por PCR, e foi encontrada em 13/19 (39,4%) isolados resistentes à meticilina, dos quais um

isolado de MRSA foi do setor de Nefrologia / Hemodiálise. Dos 12 MRCoNS, 5 foram obtidos de Nefrologia, 4 de Cirurgia / Doenças Infecciosas e Parasitárias e 3 de UTI. O isolado que apresentou o gene *vanA* também apresentou o gene *mecA* e foi oriundo da UTI, e em relação aos demais isolados não portadores do gene *vanA*, cinco tiveram o gene *mecA* (todos MRCoNS) e 13 não apresentaram este gene (6 MSCoNS e 7 MSSA).

DISCUSSÃO

Ao avaliar o perfil de resistência aos antimicrobianos dos isolados de profissionais de saúde, foi observado que os mesmos apresentaram o perfil de multidroga resistência (MDR). Um estudo relata a ocorrência semelhante, sendo detectada multidroga resistência em 80,9% de isolados de *Staphylococcus* spp. oriundos de swabs nasais de profissionais de saúde^[28]. Pesquisadores^[29], descreveram MDR em isolados de *S. aureus* que colonizam a nasofaringe de profissionais de saúde na Nigéria.

A utilização da vancomicina como opção terapêutica e a alta prevalência de cepas de *S. aureus* em hospitais brasileiros, somado à falta de controle sobre o uso de antimicrobianos e as condições inadequadas de instituições de saúde pública, favoreceu o surgimento de cepas de susceptibilidade intermediária (VISA), ou resistente à vancomicina (VRSA)^[30], sendo descrito em 2001 os primeiros relatos de cepas VRSA provenientes de pacientes com queimaduras submetidos à terapêutica com vancomicina durante o período de trinta dias, onde não foram detectados a ocorrência dos genes *vanA*, *vanB* e *vanC*^[31].

Hiramatsu^[20], em artigo de revisão referia o isolamento subsequente de isolados de *S. aureus* resistentes à vancomicina nos EUA, França, Coreia, África do Sul e Brasil, alertando que o surgimento de linhagens resistentes à vancomicina deste microrganismo patogênico seria um problema global e descreve o termo hetero-VRSA, linhagens de *S. aureus*, quando expostos à vancomicina ficavam potencialmente resistentes à terapia com este fármaco. Década depois

surge a descrição dos relatos de *S. aureus* intermediário de vancomicina (VISA) e intermediário heterogêneo de vancomicina *S. aureus* (hVISA)^[12].

No presente estudo observou-se cinco isolados que apresentaram resistência à vancomicina com MIC ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ (dois VRSA e três VRS) pela técnica da microdiluição procedentes da microbiota de PS, todos submetidos à pesquisa do gene *vanA* mas apenas uma cepa MRS albergava este gene. A descrição da ocorrência dos genes *vanA* e *vanB* descritos no Brasil em linhagens estafilocócicas reportam relatos de casos esporádicos^[32, 33] semelhante à descrição de três isolados de *S. epidermidis* procedentes de pacientes internados em UTI Kampala, Uganda, que albergavam os genes *vanA* e *vanB*^[34] sendo este padrão semelhante ao nosso, ao descrever uma baixa ocorrência dos genes, mas no nosso estudo estes isolados foram provenientes de microbiota.

No presente estudo não detectamos linhagens com resistência intermediária à vancomicina, discordando com resultados^[35] onde foram encontrados 6% de cepas VISA entre linhagens MRSA, por outro lado em estudo no sudeste brasileiro em linhagens *S. aureus* detectou Hvisa^[36].

O primeiro relato de VRS em portadores assintomáticos no Brasil foi em 2005^[37], e neste artigo, o mecanismo de resistência à vancomicina nos estafilococos não foram relacionados a mecanismos genéticos (gene *vanA*, *vanB* e *vanC*) pois estes genes não foram encontrados, sendo observado o espessamento da parede celular, que contribuiu para a resistência à vancomicina nas estirpes estafilocócicas estudadas. Alguns estudos demonstraram a ausência do genes de resistência à vancomicina *vanA*, *vanB*, *vanC* nas estirpes hVISA e VISA^[19], VRSA^[20] e VRS^[15], os mecanismos de resistência se concentraram em analisar a biossíntese da parede celular através da TEM.

Nos isolados resistentes à vancomicina no presente estudo foi demonstrado o espessamento da parede celular, através da TEM, pesquisadores^[38] referem que esta alteração

é considerado um pré-requisito para a resistência à vancomicina, no entanto uma diminuição das ligações cruzadas do peptidoglicano e um alto teor de resíduos de D-alanil-D-alanina livres na parede celular podem aumentar a resistência das cepas. Um estudo^[12], relatam que o espessamento de parede celular pode dificultar a penetração da vancomicina através da parede celular até seu sítio-alvo, ácido N-acetil-murâmico alvo citoplasmático fica localizado na membrana citoplasmática.

Um estudo^[39] com isolados clínicos de MRSA tolerantes à vancomicina de pacientes pediátricos, demonstrou que o espessamento da parede celular age como mecanismo de tolerância à vancomicina, sugerindo que esse mecanismo é necessário para cepas resistentes à vancomicina.

Um outro estudo reporta que as alterações na espessura da parede celular e septo de divisão estão relacionadas com a resistência à metilicina, devido a diminuição da atividade das proteínas de ligação à penicilina (PBP), produzindo um excesso de resíduos de aminoácidos terminal d-alanil-d-alanina, assim melhorando a expressão de genes associados à síntese da parede celular que leva a uma produção aumentada de ácido teicóico da parede^[40].

Paralelamente à observação do espessamento de parede celular foram observadas, no presente estudo, outras alterações como localização e formação do septo de divisão anômalas, distribuição anômala de ribossomos e cromossomos, divisão celular abortada, destruição dos envoltórios celulares (parede celular e membrana celular), retração do citoplasma, floculação do peptidoglicano. Um estudo sobre alterações graduais na estrutura da parede celular em cepas de *S. aureus* vancomicina resistentes mutantes, relata que ocorre uma desativação no gradual no sistema de transpeptidase da síntese da parede celular, que leva a diminuição gradual de PBP4 e redução na transcrição de PBP2a, a diminuição dessas duas transpeptidases leva a redução de componentes oligoméricos altamente reticulados no peptidoglicano, causando assim um desorganização da parede celular^[41].

Um estudo^[42] relata que outra via utilizada por cepas com resistência à vancomicina, para promover o espessamento da parede celular é a biossíntese de mureína, porém esse processo consome muito ATP e importantes metabólitos, como o fosfoenolpiruvato, o que ocasiona em uma maior depleção energética reduzindo a produção de importantes metabólitos. Sendo portanto, razoável assumir que a superprodução de mureína causa efeitos prejudiciais no rápido crescimento da célula devido ao seu pesado fardo no fornecimento de ATP e principais metabólitos essenciais para a replicação celular. Outro estudo^[43] relata que a diminuição da atividade autolítica em cepas com susceptibilidade reduzida à vancomicina promove o acúmulo de componentes da parede celular e inviabiliza a separação das células-filha. Nesse panorama. Alguns pesquisadores^[12], em seu estudo, relatam que vários mecanismos moleculares estão envolvidos na biossíntese da parede celular, e o estresse metabólico de expressão de proteínas para a manutenção das cepas com reduzida susceptibilidade à vancomicina é o que leva ao aumento da produção de ribossomos e acúmulo do mesmo no citoplasma.

Em estudo de revisão realizado^[44] sobre eventos moleculares para promoção de resistência à vancomicina em *S. aureus*, concluem que os sistemas VraTSR e GraSR ativados, aumentaram a transcrição de genes para síntese e modificação da parede celular, incluindo *pbpB*, *dltABCD* e *mprF*, assim aumentando a biossíntese da parede celular. A baixa regulação do sistema WalKR diminui a expressão de autolisinas e PBP4, diminuindo assim a autólise e a reticulação do muropeptido. Além de que alterações na funcionalidade ou mutações sofridas em alguns genes podem afetar a síntese de proteínas de parede celular, ajustar o metabolismo celular para suportar a síntese de precursores de parede celular, influenciando coletivamente no equilíbrio entre a síntese da parede celular e a hidrólise, que levaria ao espessamento da parede celular. O espessamento da parede celular e sua diminuição de ligação cruzada, fornece mais resíduos livre de D-Ala-D-Ala. Assim, para chegar ao septo da divisão, a maior parte da vancomicina pode ser presa, elevando a resistência à vancomicina. Por outro lado, a alteração

do metabolismo central (TCA) pode aumentar o ciclo lipídico através da regulação da proteína CcpE, que promove a biossíntese do peptidoglicano nascente.

Através desse estudo foi possível observar a alta ocorrência de isolados estafilocócicos com perfil multidroga resistência presentes na microbiota dos profissionais de saúde. Esse dado se torna ainda mais preocupante por se tratarem de isolados com potencial para se tornarem fonte de infecções relacionadas a assistência a saúde, além de que apresentam-se com microrganismos difíceis de serem tratados.

CONCLUSÃO

A resistência à vancomicina nos isolados de *Staphylococcus* spp provenientes de microbiota de profissionais de saúde analisados foi decorrente da ocorrência do gene *vanA* e alterações estruturais (espessamento da parede celular), mas os outros genes relacionados a resistência como *vanB* e *vanC* não foram investigados. Nestes isolados também observamos um perfil de MDR como também detectamos a ocorrência do gene *mecA*.

O mecanismo de resistência à vancomicina nas estirpes de *Staphylococcus* spp. aguarda mais estudos na sua elucidação, no entanto, a espessura da parede celular é uma dos fatores que favorecem o surgimento da resistência à vancomicina, sendo estas linhagens não apenas restritas ao ambiente hospitalar, estando presente na microbiota de profissionais de saúde, fato este descrito neste estudo, sendo um dos primeiros relatos em hospital universitário do Nordeste Brasileiro.

AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa teve a colaboração da Dra. Marcia Maria Camargo de Moraes que forneceu a cepa enterocócica de controle positivo para o gene vanA.

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi apoiado financeiramente pela FACEPE (Fundação de Amparo Ciência do Estado de Pernambuco) à MAVM (processo APQ 0579-2.12 / 06) e Conselho Nacional Científico e Tecnológico (CNPq) à MAVM (processo nº 474131 / 2011-4).

CONFLITO DE INTERESSES

Nós declaramos que não temos conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

- [1]MURNI IK, DUKE T, KINNEY S, DALEY AJ, SOENARTO Y. Reducing hospital-acquired infections and improving the rational use of antibiotics in a developing country: an effectiveness study. *Arch Dis.* 2015; 100, 454-459
- [2]AKOVA M. Epidemiology of antimicrobial resistance in blood-stream infections. *Virulence* 2016; 7:252-66
- [3]TONG SY, DAVIS JS, EICHENBERGER E, HOLLAND TL, FOWLER VG JR. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev.* 2015; 28, 603-613
- [4]BECKER K, HEILMANN C, PETERS G Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* 2014, 27, 870-926
- [5]RABELO MA, NETO AMB, LOIBMAN SO, LIMA JLC, FERREIRA EL, LEAL NC, MACIEL MAV. The occurrence and dissemination of methicillin and vancomycin-resistant *Staphylococcus* in samples from patients and health professionals of a university hospital in Recife, State of Pernambuco, Brazil *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014; 47, 437-446
- [6]MAHMOUD AL, ALBADAWY HS, BOLIS SM, BILAL NE, AHMED AO, IBRAHIM ME. Inducible clindamycin resistance and nasal carriage rates of *Staphylococcus aureus* among healthcare workers and community members. *African Health Sciences* 2015, 15; 861-867
- [7]VISALACHY S, PALRAJ SK, KOPULA SS, SEKAR U. Carriage of Multidrug Resistant Bacteria on Frequently Contacted Surfaces and Hands of Health Care Workers. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2016, 10; 18-20
- [8]WIDERSTRÖM M, WISTRÖM J, EDEBRO H, MARKLUND E, BACKMAN M, LINDQVIST P, MONSEN T. Colonization of patients, healthcare workers, and the environment with healthcare-associated *Staphylococcus epidermidis* genotypes in an intensive care unit: a prospective observational cohort study. *BMC Infectious Diseases* 2016, 16;743
- [9]HAN JH, SULLIVAN N, LEAS BF, PEGUES DA, KACZMAREK JL, UMSCHIED CA. Cleaning Hospital Room Surfaces to Prevent Health Care-Associated Infections: A Technical Brief. *Ann Intern Med.* 2015, 163; 598–607
- [10]RODVOLD KA, MCCONEGHY KW. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* therapy: past, present, and future. *Clin Infect Dis.* 2014, 58; S20–27.
- [11]HIRAMATSU K, ARITAKA N, HANAKI H, KAWASAKI S, HOSODA Y, HORI S, FUKUCHI Y, KOBAYASHI I. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet.* 1997, 350;1670–1673
- [12]HOWDEN BP, DAVIES JK, JOHNSON PD, STINEAR TP, GRAYSON ML. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* 2010, 23:99–139
- [13]SIEVERT DM, RUDRIK JT, PATEL JB, MCDONALD LC, WILKINS MJ, HAGEMAN JC. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002-2006. *Clin Infect Dis.* 2008,46:668–674
- [14]GARDETE S, TOMASZ A. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest.* 2014,124;2836–1240

- [15]SANYAL D, GREENWOOD D. An electron microscope study of glycopeptide antibiotic-resistant strains of *Staphylococcus epidermidis*. J. Med. Microbiol. 1993, 39;204–210
- [16]GIOVANETTI E, BIAVASCO F, PUGNALONI A, LUPIDI R, BIAGINI G, VARALDO PE. An electron microscopic study of clinical and laboratory-derived strains of teicoplanin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. Microb. DrugResist. 1996, 2;239–243.
- [17]HARAGA I, NOMURA S, SHIGERU F, OHJIMI H, HANAKI H, HIRAMATSU K, AND NAGAYAMA A. Emergence of vancomycin resistance during therapy against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a burn patient- importance of low-level resistance to vancomycin. Int J Infect Dis. 2002, 6: 302-308
- [18]ROCH M, CLAIR P, RENZONI A, REVERDY ME, DAUWALDER O, BES M, MARTRA A, FREYDIÈRE AM, LAURENT F, REIX P, DUMITRESCU O, VANDENESCH F. Exposure of *Staphylococcus aureus* to Subinhibitory Concentrations of β -Lactam Antibiotics Induces Heterogeneous Vancomycin- Intermediate *Staphylococcus aureus* Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2014, 58;5306–5314
- [19]HANAKI H, KUWAHARA-ARAI K, BOYLE-VAVRA S, DAUM RS, LABISCHINSKI H, HIRAMATSU K. Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. *Antimicrob Chemother* 1998; 42;199–209
- [20]HIRAMATSU, K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance *Lancet Infectious Diseases* 2001, 1; 147–155
- [21]CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. CLSI M100-S24 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing - Twenty-Sixth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014
- [22]CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. CLSI M07-A9 Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012
- [23]VILELA MA, SOUZA SL, PALAZZO ICV, FERREIRA JC, MORAIS JR, DARINI ALC. Identification and molecular characterization of Van A-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in Northeast of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006, 101; 716-719
- [24]OLIVEIRA WLM, MANGUEIRA EVC, VILELA MA, JÚNIOR SP, LEAL NC, ALMEIDA AMP. Diversity of SCCmec types in Methicillin Resistant *Staphylococcus* spp. Causing Hospital-Associated Infections. J J Microbiol Pathol 2015, 2; 0-8.
- [25]SAHA B, SINGH AK, GHOSH A, BAL M. Identification and characterization of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Kolkata (South Asia). J Med Microbiol. 2008, 57; 72-9
- [26]PETINAKI E, ARVANITI A, DIMITRACOPOULOS G, SPILIOPOULOU I. Detection of *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes among clinical isolates of methicillin-resistant staphylococci by combined polymerase chain reactions. J Antimicrob Chemother 2001, 47; 297-04.
- [27]DIMECH GS, SOARES LAL, FERREIRA MA, OLIVEIRA AGV, CARVALHO MC, XIMENES EA. Phytochemical and Antibacterial Investigations of the Extracts and Fractions from the Stem Bark of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne and Effect on Ultrastructure of *Staphylococcus aureus* Induced by Hydroalcoholic Extract, The ScientificWorld Journal 2013

- [28]ĆIRKOVIĆ I, ĐUKIĆ SN, CAREVIĆ B, MAZIĆ NT, LJEVIĆ VM, STEPANOVIĆ S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage among hospitalized patients and healthcare workers in the clinical center of serbia, *Arch. Biol. Sci.* 2014, 66; 87-92
- [29]FADEYI A, ADEBOYE MAN, FOWOTADE A, NWABUISI C, BOLAJI BO, OYEDEPO OO, ADESIYUN OO, OLANREWaju T, ADERIBIGBE A, SALAMI AK, DESALU OO, AKANBI AA, RAHEEM RA, OLALERE A. Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus* Carriage amongst Healthcare Workers of the Critical Care Units in a Nigerian Hospital. *Am J Infect Dis.* 2010, 6; 18-3.
- [30]OLIVEIRA GA, LEVY CE, MAMIZUKA EM. *Staphylococcus aureus* apresentando resistência intermediária à vancomicina: mecanismos de resistência, detecção laboratorial e perspectivas de emergência no Brasil. *J Bras Patol.* 2000, 36; 96-102.
- [31]OLIVEIRA GA, DELL'AQUILA AM, MASIERO RL, LEVY CE, GOMES MS, CUI L, HIRAMATSU K, MAMIZUKA EM. Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* reduced susceptibility to vancomycin. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2001, 22; 443-8
- [32]ROSSI F, DIAZ L, WOLLAM A, PANESSO D, ZHOU Y, RINCON S, NARECHANIA A, XING G, DI GIOIA TSR, DOI A, TRAN TT, REYES J, MUNITA JM, CARVAJAL LP, HERNANDEZ-ROLDAN, A, BRANDÃO D, VAN DER HEIJDEN IM, MURRAY BE, PLANET PJ, WEINSTOCK GM, ARIAS CA. Transferable vancomycin resistance in a community-associated MRSA lineage. *N Engl J Med.* 2014, 370, 1; 524-31
- [33]BREVES A; MIRANDA CAC, FLORES C; FILIPPIS I; CLEMENTINO MM. Methicillin- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in health care workers and medical devices, *J Bras Patol Med Lab* 2015, 51; 143-152
- [34]ROHDE H, BURANDT EC, SIEMSEN N, FROMMELT L, BURDELSKI C, WURSTER S, SCHERPE S, DAVIES AP, HARRIS LG, HORSTKOTTE MA, KNOBLOCH JK, RAGUNATH C, KAPLAN JB, MACK D. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections *Biomaterials* 2007,28;1711-20.
- [35]COSTA TM, MORGADO PGM, CAVALCANTE FS, DAMASCO AP, NOUÉR AS, SANTOS KRN. Clinical and Microbiological Characteristics of Heteroresistant and Vancomycin- Intermediate *Staphylococcus aureus* from Bloodstream Infections in a Brazilian Teaching Hospital *PLOS ONE* 2016, 11; 2-11
- [36]SILVEIRA AC, SAMBRANO GE, PAIM TG, CAIERÃO J, CORDOVA CM, D'AZEVEDO PA. Is prediffusion test an alternative to improve accuracy in screening hVISA strains and to detect susceptibility to glycopeptides/lipopeptides? *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014, 79; 401-04
- [37]PALAZZO ICV, ARAUJO MLC, DARINI ALC. First Report of Vancomycin-Resistant *Staphylococci* Isolated from Healthy Carriers in Brazil. *J Clin Microbiol.* 2005, 43; 179-185.
- [38]REIPERT A, EHLERT K, KAST T, BIERBAUM G. 2003. Morphological and genetic differences in two isogenic *Staphylococcus aureus* strains with decreased susceptibilities to vancomycin. *Antimicrob. Agents Chemother* 2003, 47 568-576
- [39]CÁZARES-DOMÍNGUEZ V, CRUZ-CÓRDOVA, A, OCHOA AS, ESCALONA G, ARELLANO-GALINDO J, RODRÍGUEZ-LEVIZ A, HERNÁNDEZ-CASTRO R, LÓPEZ-VILLEGAS EO, XICOHTENCATL-CORTES J. Vancomycin Tolerant, Methicillin-Resistant

Staphylococcus aureus Reveals the Effects of Vancomycin on Cell Wall Thickening, *PLoS ONE* , 2015, 10; 1-16

[40]GARCÍA AB, VIÑUELA-PRIETO JM, LÓPEZ-GONZÁLEZ L, CANDEL FJ. Correlation between resistance mechanisms in *Staphylococcus aureus* and cell wall and septum thickening, *Infection and Drug Resistance* 2017, 10; 353–356

[41]SIERADZKI K, TOMASZ A. Gradual Alterations in Cell Wall Structure and Metabolism in Vancomycin-Resistant Mutants of *Staphylococcus aureus* *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* 1999, 181; 7566–7570.

[42]CUI L, MA X, SATO K, OKUMA K, TENOVER FC, MAMIZUKA EM, GEMMELL CG, KIM M, PLOY MC, SOLH NE, FERRAZ V, HIRAMATSU K. Cell Wall Thickening Is a Common Feature of Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*, *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* 2003, 41;5–14

[43]SANTOS-BENEIT F, ORDÓÑEZ-ROBLES M, MARTÍN JF. Glycopeptide resistance: Links with inorganic phosphate metabolism and cell envelope stress, *Biochemical Pharmacology* 2017, 133;74–85

[44]HU Q, PENG H, RAO X. Molecular Events for Promotion of Vancomycin Resistance in Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus*, *Front. Microbiol* 2016, 7;1-18

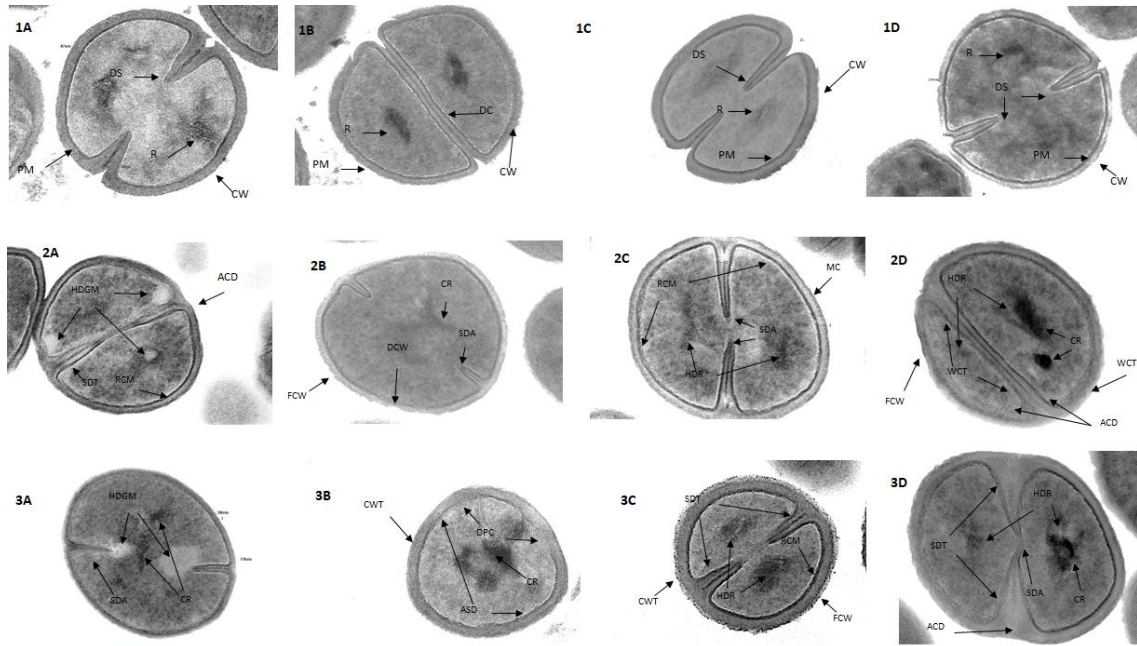


Fig.1 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão: 1) *Staphylococcus* spp. - controle não tratado (**1A**, **1B**, **1C** e **1D**) - cocos na divisão celular apresentando (Membrana de Plasma - PM; Ribossomos - R; Mural de Celda - CW; Divison Spectrum - DS) 2) *Staphylococcus* spp. após exposição a vancomicina com perfil de resistência intermediária ($4 \leq \text{MIC} \leq 8 \mu\text{g} / \text{mL}$) durante 24 horas a 37°C : **A** - Op (ACD), Divisão heterogênea de material genético (HDGM) Espessamento do septo de divisão (SDT); Retração da membrana citoplasmática (RCM); **B** - Condensação de ribossomos no centro celular (CR), parede celular ondulada (FCW), septo de divisão anômalo (SDA); Destruição dos envoltórios celulares (DCW - PC, MC); **C** - Septo de Division anômalo (SDA), célula aumentada (EC), divisão de ribossomos heterogêneos (HDR), retração da membrana plasmática (RPM); **D** - Condensação dos ribossomos (CR), Divisão Ribossomal Heterogênea (HDR), Divisão celular assimétrica abortada (AACD), parede celular ondulada (FCW), espessamento da parede celular (CWT), espessamento do septo de divisão (SDT); **3**) *Staphylococcus* spp. após exposição a vancomicina com perfil de resistência resistente ($\text{MIC} \geq 32 \mu\text{g} / \text{mL}$) durante 24 horas a 37°C : **A** - *Staphylococcus* com gene *vanA* com divisão de septo anômalo (SDA), divisão heterogênea de material genético (HDGM), ribossoma de condensação (CR); **B** - Espessamento da parede celular (CWT), ausência de divisão do septo (ASD), Destruição da membrana citoplasmática (CPD); Condensação do ribossomo sem centro celular (CR); **C** – Espessamento da parede celular (CWT), espessamento do septo de divisão (SDT), divisão dos ribossomos heterogêneas (HDR), a retração da membrana citoplasmática (RCM), parede celular ondulada (FCW); **D** - Condensação Ribossoma (CR), Divisão Heterogênea Ribossomal (HDR), dividindo a espessura do septo (SDT), Divisão Divisão Anômala (SDA), Divisão de células abortadas (ACD)

6 CONCLUSÕES

- Em relação a análise fenotípica e genética do perfil de susceptibilidade à vancomicina, detectamos cinco isolados da microbiota de profissionais de saúde e dois isolados de *S. aureus* de pacientes oncológicos resistentes à vancomicina pela técnica fenotípica e apenas um isolado (*Staphylococcus epidermidis*) albergava o gene *vanA* proveniente da microbiota.
- Em relação a capacidade de produzir biofilme, utilizando as técnicas de produção de exopolissacarídeo em AVC e ensaio da produção de biofilme, observou-se que 41(73%) isolados apresentaram positividade em ambas as metodologias.
- Na formação de biofilme em presença de vancomicina, foi observado 15 isolados que se enquadraram como não aderentes (13 *S. aureus* e 2 CoNS), 29 como fracamente aderente (24 *S. aureus* e 5 CoNS) e 5 foram moderadamente aderentes (4 *S. aureus* e 1 CoNS) e 5 foram fortemente aderentes (todos *S. aureus*)
- A produção do biofilme não está relacionada com a ocorrência do gene *icaAD* em em isolados de pacientes oncológicos de *Staphylococcus* spp
- Dos cinco isolados resistentes à vancomicina provenientes da microbiota, um isolado (*Staphylococcus epidermidis*) albergava o gene *vanA*, os demais apresentaram espessamento de parede celular, além de outras alterações estruturais celulares que sugerem outros mecanismos que estes isolados demonstraram através da microscopia eletrônica de Transmissão (MET).

REFERÊNCIAS

- AKOVA, M. Epidemiology of antimicrobial resistance in bloodstream infections. *Virulence* 2016; 7: 252-266.
- ALMEIDA, L.M.; ALMEIDA, M.Z.P.R.B.; MENDONÇA, C.L. et al Comparative analysis of *agr* groups and virulence genes among subclinical and clinical mastitis *Staphylococcus aureus* isolates from sheep flocks of the Northeast of Brazil, *Braz J of Microbiol* 2013; 44(2): 493-498.
- ALVAREZ, C.; LABARCA, J.; SALLES, M. Prevention strategies for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America. *Braz. J. of Infect. Dis.*, 2010; 14(2): 107-108.
- ANTUNES, A.L.S.; BONFANTI, J.W.; PEREZ, L.R.R. et al High vancomycin resistance among biofilms produced by *Staphylococcus* species isolated from central venous catheters, *Mem Inst Osw Cruz* 2011; 106: 51-55.
- ARCIOLA, C.R.; CAMPOCCIA, D.; BALDASSARRI, L. et al Detection of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* from implant infections. Comparison of a PCR-method that recognizes the presence of *ica* genes with two classic phenotypic methods. *J Biomed Mater Res A* 2006; 76: 425-430.
- ARCIOLA, C.R.; CAMPOCCIA, D.; SPEZIALE, P. et al Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials, *Biomat* 2012; 33: 5967-5982.
- AZIMIAN, A.; HAVAEI S. A.; FAZELI, H.; et al Genetic Characterization of a Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolate from the Respiratory Tract of a Patient in a University Hospital in Northeastern Iran, *J Clin. Microbiol* 2012; 50(11): 3581-3585.
- BARBIERI, R.; PESCE, M.; FRANCHELLI, S. et al Phenotypic and genotypic characterization of Staphylococci causing breast peri-implant infections in oncologic patients, *BMC Microbiol* 2015; 15(26): 1-10.
- BARRETO, M.F.; PICOLI, S.U. *Staphylococcus* em um hospital de Porto Alegre (RS). *Rev Bras An Clín*, 2008; 40(4): 285-287.
- BATISTA, B.G.; RAUBER, J.M.; BRUSCHI, J.S. et al New cephalosporin as an alternative for treatment of infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Rev Epidemiol Control Infect* 2015; 5(2): 94-99.
- BAYLES, K.W. The biological role of death and lysis in biofilm development. *Nat. Rev Microbiol*, 2007; 5: 721-726.
- BECKER K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* 2014; 27: 870-926.

BERNARD, L.; VAUDAUX, P.; ROHNER P. et al Comparative analysis and validation of different assays for glycopeptide susceptibility among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains, *J Microb Meth* 2004; 57(2): 231-239.

BIEN, J.; SOKOLOVA, O.; BOZKO, P. Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response. *J of Path* 2011; 2011: 1-13.

BIERBAUM, G., Mechanisms of the Development of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. Disponível em: http://www.genomik.uniwuerzburg.de/pathogenomik_plus_2006_2009/research_groups/cluster_1/, 02.12.2015

BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M. The role of quorum sensing in the pathogenicity of the cunning aggressor *Pseudomonas aeruginosa*. *An. and Bioan. Chem* 2007; 387: 409-414.

BLACK, J.G. Microbiologia - Fundamentos e Perspectivas, 4ª Ed., São Paulo Guanabara-Koogan, p. 319, 2002.

BREVES, A.; MIRANDA, C.A.C.; FLORES, C. et al Methicillin- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in health care workers and medical devices, *J Bras Patol Med Lab* 2015; 51: 143-152.

BRIDIER A.; DUBOIS-BRISONNET, F.; BOUBETRA, A. et al The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method. *J Microbiol Methods* 2010;82: 64-70.

BURNHAM, C.A.D.; WEBER, C.J.; DUNNE, W.M. JR. Novel Screening Agar for Detection of Vancomycin-Nonsusceptible *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2010; 48(3): 949-51.

BUSSCHER, H.J.; VAN DER MEI, H.C. How do bacteria know they are on a surface and regulate their response to an adhering state? *PLoS Pathog* 2012; 8: 1-3.

CAFISO, V.T.; BERTUCCIO, T.; SANTAGATI, M. et al Presence of the *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:1081-1088.

CAMOU, T. ZUNINO, P.; HORTAL, M. Alarma por la resistencia a antimicrobianos: situación actual y desafíos / Antimicrobial resistance alarm: current situation and challenges. *Rev méd Urug* 2017;33(4): 277-284.

CASADEWALL, B.; REYNOLDS, P.E.; COURVALIN, P. Regulation of Expression of the *vanD* Glycopeptide Resistance Gene Cluster from *Enterococcus faecium* BM4339, *J Bacteriol* 2001; 183(11): 3436-3446.

CASSETTARI, V.C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E.A.S. et al *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? *Bras J infect Dis* 2005; 9(1): 70-76.

CATÃO, R.; MAYER, R.; SILVA, P.M.F. et al Prevalencia de infecções hospitalares por *Staphylococcus aureus* e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. *Rev Enferm UFPE On Line* 2013; 7(8): 5257-5264.

CÁZARES-DOMÍNGUEZ, V.; CRUZ-CÓRDOVA, A.; OCHOA, A.S. et al Vancomycin Tolerant, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Reveals the Effects of Vancomycin on Cell Wall Thickening, *PLoS ONE* 2015; 10: 1-16.

CHRISTENSEN, G.D.; SIMPSON, W.A.; YONGER, J.J. et al Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 1985; 22: 996-1006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. CLSI M07-A9 Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. CLSI M100-S24 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing - Twenty-Sixth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014

CORNEJO-JUÁREZ, P.; VILAR-COMPTE, D.; PÉREZ-JIMÉNEZ, C. et al The impact of hospital-acquired infections with multidrug-resistant bacteria in an oncology intensive care unit, *Intern J of Infect Dis* 2015; 31: 31–34.

COSTA, A. R.; BATISTÃO, D.W.F.; RIBAS, R.M. „*Staphylococcus aureus* virulence factors and disease. *Microb Path and Strat for Comb them: Scien, Technol. and Educ*,2013; 1(1): 702-710.

COUTO, I.; PEREIRA, S., MIRAGAIA, M. et al Identificación of clinical staphylococcal isolates from humans by Internal Transcribed Spacer PCR. *I. Clin. Microbiol*, v. 39, p.3099–3103, 2001.

CREMNITER, J.; SLASSI, A.; QUINCAMPOIX, J.C. Decreased susceptibility to teicoplanin and vancomycin in coagulase-negative staphylococci isolated from orthopedic-device-associated infections. *J Clin Microbiol* 2010; 48:1428– 1431.

CUI, L.; MURAKAMI, H.; KUWAHARA-ARAI, K. et al Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50, *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(9): 2276-2285.

DELEO, F.R.; OTTO, M.; KREISWIRTH, B.N. et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2010; 375(9725): 1557-1568, 2010.

DI DOMENICO, E.G.; FARULLA, I.; PRIGNANO, G. Biofilm is a Major Virulence Determinant in Bacterial Colonization of Chronic Skin Ulcers Independently from the Multidrug Resistant Phenotype, *Int J Mol Sci* 2017; 18:1-19.

DIMECH, G.S.; SOARES, L.A.L.; FERREIRA, M.A. et al Phytochemical and Antibacterial Investigations of the Extracts and Fractions from the Stem Bark of *Hymenaea stigonocarpa*

Mart. ex Hayne and Effect on Ultrastructure of *Staphylococcus aureus* Induced by Hydroalcoholic Extract, *Sci. World J.* 2013;2013:1–8.

DUNNE JR., W.M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin. Microbiol. Rev* 2002; 15: 155-166.

FREITAS, V.R.; VAN DER SAND, S.T.; SIMONETTI, A.B. In vitro biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* on the surface of high-speed dental handpieces. *Rev Odontol UNESP* 2010; 39(4): 193-200.

GALBUSERA, E.; RENZONI, A.; ANDREY, D.O. et al Site-Specific Mutation of *Staphylococcus aureus* VraS Reveals a Crucial Role for the VraR-VraS Sensor in the Emergence of Glycopeptide Resistance *Antimicrob. Agents Chemother* 2011; 55(3):1008-1020.

GOMES, D. M.; WARD, K. E.; LAPLANTE, K. L. Clinical implications of vancomycin heteroresistant and intermediately susceptible *Staphylococcus aureus*, *Pharmacother* 2015; 35(4): 424-432.

GORDON, C.P.; WILLIAMS, P.; CHAN, W.C. Attenuating *Staphylococcus aureus* virulence gene regulation: a medicinal chemistry perspective. *J of Med Chem* 2013; 56(4): 1389-1404.

GOTZ, F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol* 2002;43:1367-1378.

GOUD, R.; GUPTA, S.; NEOGI, U. et al Community prevalence of methicillin and vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* in and around Bangalore, southern India. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011; 44(3): 309-12.

GRECO, C.A. Growth and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* and other relevant contaminant bacteria during storage of platelet concentrates (tese). Ottawa: Faculty of Medicine, University of Ottawa; 2011.

GUIMARÃES, G.; FRANÇA, C.A.; KRUG, F.S. et al Caracterização fenotípica, produção de biofilme e resistência aos antimicrobianos em isolados de *Staphylococcus* spp obtidos de casos de mastite em bovinos e bubalinos. *Pes. Vet Bras* 2012; 32(12): 1219-1224.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev Microbiol*, 2004; 2: 95-108.

HAN, J.H.; SULLIVAN, N.; LEAS, B.F. Cleaning Hospital Room Surfaces to Prevent Health Care-Associated Infections: A Technical Brief. *Ann Intern Med* 2015; 163: 598–607.

HANAKI, H.; KUWAHARA-ARAI, K.; BOYLE-VAVRA, S. et al Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains *Mu3* and *Mu50*. *Antimicrob Chemother* 1998; 42:199–209.

HARVEY, R.A *Microbiologia Ilustrada*. 2ª ed, Porto Alegre: Artmed, 2008.

HIRAMATSU, K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance *Lancet Infect. Dis.* 2001;1: 147–155.

HIRAMATSU, K.; ARITAKA, N.; HANAOKI, H. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 1997; 350: 1670–1673.

HODGKINSON, J.T.; WELCH, M.; SPRING, D.R. Learning the language of bacteria. *ACS Chem. Biol* 2007; 2: 715-717.

HOIBY, N.; CIOFU, O. J.H.K., SONG, Z.J. et al The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci* 2011; 3: 55-65.

HOWDEN, B.P.; DAVIES, J.K.; JOHNSON, P.D. et al Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev* 2010; 23: 99–139.

INGRAHAM, J.L.; INGRAHAM, C.A. Introdução a Microbiologia – Uma abordagem em estudos de casos. 3ª ed. São Paulo: Editora Cengage Learning, p. 527-533, 2011

JABBOURI, S.; SADOVSKAYA, I. Characteristics of the biofilm matrix and its role as a possible target for the detection and eradication of *Staphylococcus epidermidis* associated with medical implant infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010; 59(3): 280–291.

JAWETZ, E.; MELNICK, J.L.; ADELBERG, E.A. Microbiologia Médica, 20ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, p. 124, 1998.

JENKINS, A.; BINH, A.D.; THUY, T. M. et al. Differential expression and roles of *Staphylococcus aureus* virulence determinants during colonization and disease. *mBio* 2015; 6(1): 1-10.

KATSIKOIANNI, M.; MISSIRLIS, Y.F. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Europ Cells & Mat* 2004; 8: 37-57.

KHAN, H.A.; AHMAD, A.; MEHBOOB, R., Nosocomial infections and their control strategies. *Asian Pacific J of Trop Biomed* 2015; 5(7): 509-514.

KOH, Y.R.; KIM, K.H.; CHANG, C.L. Prevalence and clinical impact of heterogeneous vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* isolated from hospitalized patients. *An of Lab. Med.* 2016; 36(1): 235-243.

KONEMAN, Elmer et al. Diagnóstico Microbiológico. 6ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p. 637-643, 2008.

KONG, C.; NEOH, H.; NATHAN, S. Targeting *Staphylococcus aureus* Toxins: A Potential form of Anti-Virulence Therapy. *Tox* 2016; 8(3): 2-21.

LALEY, R.T.; LANZ, E.; SCHROCK, C.G.; Rapid control of an outbreak of *Staphylococcus aureus* on a neonatal intensive care department using standard infection control practices and nasal mupirocin, *Am J Infect Control* 2004;32: 44-47.

LIMA, M.F.P.; BORGES, M.A.; PARENTE, R.S. et al *Staphylococcus aureus* and nosocomial infections - literature review, *Rev UNINGÁ Review* 2015; 21(1): 32-39.

LIST OF PROKARYOTIC NAMES WITH STANDING IN NOMENCLATURE (LPSN). Genus *Staphylococcus*. Disponível em: <http://www.bacterio.net/staphylococcus.html>> Acesso em: 28 Dec. 2017.

LOS, R.; SAWICKI, R.; JUDA, M.A. et al Comparative analysis of phenotypic and genotypic methods for the determination of the biofilm-forming abilities of *Staphylococcus epidermidis*, *FEMS Microbiol Lett* 2010; 310: 97–103.

LOWY, F. D., Antimicrobial Resistance: The Example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 2003; 111: 1265 – 1273.

LUZ, I.S. Caracterização molecular das toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo de coalho em municípios da região agreste de Pernambuco. 2008, Dissertação de mestrado (Mestre em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife

MACAL, C.M.; NORTH, M.J.; COLLIER, N. et al Modeling the transmission of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a dynamic agent-based simulation. *J of Translat Med* 2014; 12(1): 1-12.

MACIÀ, M.D.; ROJO-MOLINERO, E.; OLIVER, A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm - Growing bacteria. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20: 981–990.

MAHMOUD, A.L.; ALBADAWY, H.S.; BOLIS, S.M. et al Inducible clindamycin resistance and nasal carriage rates of *Staphylococcus aureus* among healthcare workers and community members. *Afric Healt. Scienc.* 2015; 15: 861-867.

MAMIZUKA, E.M.; OLIVEIRA, G.A. Isolamento de cepas de *Staphylococcus aureus* com sensibilidade reduzida à vancomicina em hospital brasileiro. *Pharm Bras* 2000; 6: 7-8.

MANFREDINI, C.; PICOLI, S.U.; BECKER, A.P. et al Comparison of methods to determination of vancomycin sensitivity in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* *J Bras Patol Med Lab* 2011; 47(2): p. 141-145.

MARLOWE, E.M.; COHEN, M.D.; HINDLER, J.F. et al Practical strategies for detecting and confirming vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*: tertiary-care hospital laboratory's experience, *J Clin Microbiol* 2001; 39(7): 2637 – 2639.

MARTINI, R.; HÖRNER, R.; RAMPELOTTO, R.F. et al Investigation of biofilm formation in coagulase-negative staphylococci isolated from platelet concentrate bags, *Rev Inst Med Trop* 2016;58(1): 1-7.

MATHUR, T.; SINGHAL, S.; KLAN, S. et al Detection of biofilm formation among the clinical isolate of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian J Med* 2006; 24: 25-29.

MELAKE, N.A.; HENDAWY, G.R.; LABIB, A.Z. et al Detection of intercellular adhesion *icaAD* genes in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci and their role in biofilm production, *Menoufia Med J* 2017; 29: 789–800.

- MELO, G.B.; MELO, M.C.; GAMA, A.P. Analysis of the genetic diversity of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Braz J Microbiol* 2005; 36(2): 126-130.
- MELO, P. C.; FERREIRA, L.M.; NADER FILHO, A. et al Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Braz J of Microbiol* 2013; 44(1): 119-124.
- MIMS, C.; DOCKRELL, H.M.; GOERING, R.V. et al *Microbiologia médica*, 3ª ed., Rio de Janeiro, Elsevier, p. 520-521, 2005.
- MURNI, I.K.; DUKE, T.; KINNEY, S. et al Reducing hospital-acquired infections and improving the rational use of antibiotics in a developing country: an effectiveness study. *Arch Dis* 2015; 100: 454-459.
- MURRAY, P.R.; et al. *Microbiologia Médica*. 6ª ed, Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.
- NILSDOTTER-AUGUSTINSSON, A.; CLAEISSON, C.; LINDGREN, P.E.; Adherence of *Staphylococcus epidermidis* to extracellular matrix proteins and effects of fibrinogen-bound bacteria on oxidase activity and apoptosis in neutrophils. *APMIS* 2005; 113: 361-373.
- OLIVEIRA, A.; CUNHA, R.S. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase negative staphylococci, *BMC Res Notes* 2010; 3: 260-268.
- OLIVEIRA, D. G. M.; SOUZA, P.R.; WATANABE, E. Avaliação da higiene das mãos na perspectiva Microbiológica. *Rev Panam Infectol* 2010; 12(3): 28-32.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Resistência aos antibióticos. Genebra: OMS, 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs433/>. [Consulta: 8 de junho de 2017]
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). World health report on infections disease 2000 – Vencendo a resistência microbiana. 2000. Disponível em: < <http://www.ccih.med.br/vencendoresistencia.html>>. Acesso em: 22/11/2017.
- OTILIA, S.H.L.R. Perfil de sensibilidade do *S. aureus* e *S. epidermidis* no Hospital Municipal Souza Aguiar,. *Rev Soc Bras Med Trop* 1999;.32(1): 423.
- OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis*: the “accidental” pathogen. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7: 555-67.
- PAHARIK, A.E. HORSWILL, A.R. The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, regulation, and host response, *Microbiol Spectr.* 2016; 4(2): 1-48.
- PARAGIOUDAKI, M.; STAMOULI, V.; KOLONITSIOU, F. et al Intravenous catheter infections associated with bacteraemia: a 2-year study in a university hospital. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 431–435.
- PAVITHRA, D.; DOBLE, M. Biofilm formation, bacterial adhesion and host response on polymeric implants-issues and prevention. *Biomed Mat* 2008; 3:1-13.
- PERICHON, B.; COURVALIN, P. VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(11): 4580–4587.

RABELO, M.A.; BEZERRA NETO, A.M.; SILVA, E.C.B.F. et al Phenotypic methods for determination of methicillin resistance in *Staphylococcus spp.* from health care workers. *Braz J Pathol Lab Med* 2013; 49(2): 91-96.

RABELO, M.A.; NETO, A.M.B.; LOIBMAN, S.O. et al The occurrence and dissemination of methicillin and vancomycin-resistant *Staphylococcus* in samples from patients and health professionals of a university hospital in Recife, State of Pernambuco, Brazil *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014; 47: 437-446.

RATTI, R.P.; SOUSA, C.P. *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 2009; 30(2): 137-143.

REHM, S.J.; TICE, A. *Staphylococcus aureus*: methicillin-susceptible *S. aureus* to methicillin-resistant *S. aureus* and vancomycin-resistant *S. aureus*. *Clin Infect Dis* 2010; 51(2):176 –182.

REITER, K.C.; SILVA T.G.P.; OLIVEIRA, C.F. High biofilm production by invasive multiresistant staphylococci. *APMIS* 2011; 119: 776–781.

RODRÍGUEZ - NORIEGA, E.; SEAS, C. The changing pattern of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America: implications for clinical practice in the region. *Braz J of Infect Dis* 2010; 14(2): 87-96.

RODVOLD, K.A.; MCCONEGHY, K.W. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* therapy: past, present, and future. *Clin Infect Dis* 2014; 58: 20–27.

ROHDE, H.; FRANKENBERGER, S.; ZÄHRINGER, U. et al Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. *Eur J Cell Biol* 2010; 89(1): 103-111.

ROSSI, F.; DIAZ, L.; WOLLAM, A. et al Transferable vancomycin resistance in a community-associated MRSA lineage. *N Engl J Med* 2014; 370(1): 524-531.

RUTHERFORD, S.T.; BASSLER, B.L. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and Possibilities for Its Control *Cold Spring Harbor Perspect in Med* 2012; 2:1-26.

SADER, H.S.; RHOMBERG, P.R.; JONES, R.N._ Nine-Hospital Study Comparing Broth Microdilution and Etest Method Results for Vancomycin and Daptomycin against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother* 2009; 53(7): 3162-3165.

SAHA, B.; SINGH, A.K.; GHOSH, A. et al Identification and characterization of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Kolkata (South Asia). *J Med Microbiol* 2008; 57: 72-79.

SAISING, J.; SINGDAM, S.; ONGSAKULM, M. et al Lipase, protease, and biofilm as the major virulence factors in staphylococci isolated from acne lesions, *BioScience Trends* 2012; 6: 160-164.

- SALES, L.M.; SILVA, T.M. *Staphylococcus aureus* meticilina resistente: um desafio para a saúde pública. *Acta Biomed. Bras* 2012; 3(1): 1-13.
- SANCHEZ, C.J.; MENDE, K.; BECKIUS, M.L. et al Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infect. Dis* 2013; 13(47): 1-12.
- SANGAPPA, M.; THIAGARAJAN, P. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: resistance genes and their regulation, *Intern J of Pharm. and Pharmac Sci* 2012; 4(1): 658-667.
- SANTOS, A.L.; SANTOS, D.O.; FREITAS, C.C. et al *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *Bras Patol Med Lab* 2007; 43(6): 413-423.
- SCHAECHTER, M; et al. Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas. 3ª ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.
- SCHITO, G.C. The Importance of the Development of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*, *CMI* 2006; 12(1): 3 – 8.
- SCHWALBE, R.S.; STAPLETON, J.T.; GILLIGAN, P.H. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. *N. Engl. J. Med* 1987; v. 316: 927–931.
- SIEVERT, D.M.; RUDRIK, J.T.; PATEL, J.B. et al Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002-2006. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 668–674.
- SOLLID, J.; ERICSON, U.; HANSSSEN, A.M. et al *Staphylococcus aureus*: determinants of human carriage. *Infect Gen and Evol* 2014; 21(1): 531-541.
- SORIANO, A.; MARCO, F.; MARTÍNEZ, J.A. et al Influence of Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration on the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 193- 200.
- STEPANOVIC, S VUKOVIC´, D.; HOLA, V. et al Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 2007; 115(8): 891-899.
- STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G. et al Biofilms as complex differentiated communities. *An Rev of Microbiol* 2002; 56: 187-209.
- STROHL, W.A.; ROUSE, H.; FISHER, B.D., Microbiologia Ilustrada, Porto Alegre, editora Artmed, p. 61 , 2004
- SWENSON JM, PATEL JB, JORGENSEN JK. Special phenotypic methods for detecting antibacterial resistance, Chapter 74. In: Murray P.R.; Baron E.S.; Jorgensen J.H.; Landry ML Tavares, W. Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfecciosos. Rio de Janeiro, Atheneu, 2002.
- TENOVER, F. C.; WEIGEL, L. M.; APPELBAUM, P. C. et al, Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolate from a Patient in Pennsylvania, *Antimicrob Agents and Chemother* 2004; 48(1): 275 – 280.

- THATI, V.; SHIVANNAVAR, C.T.; GADDAD, S.M. Vancomycin resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from intensive care units of tertiary care hospitals in Hyderabad, *Indian J Med Res* 2011; 134(5): 704-708.
- TIWARI, H.K.; SEN, M.R. Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. *BMC Infect Dis* 2006; 6(156): 1-6.
- TONG, S.Y.; DAVIS, J.S.; EICHENBERGER, E. et al *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev* 2015; 28: 603-613.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. Princípios de doença e epidemiologia. In: Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L. eds. Microbiologia. Porto Alegre, 8ª ed. Artmed, p.570, 2006.
- TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPertz, O.F. et al Microbiologia, 3ª Ed., São Paulo, editora Atheneu, p.149-156, 2002.
- TRENTIN, D.S.; GIORDANI, R.B.; MACEDO, A.J. Pathogenic bacterial biofilms: general, clinical and combat strategies, *Revista Liberato* 2013; 14: 113-238.
- VAN HAL, S.J.; PATERSON, D.L. Systematic Review and Meta-Analysis of the Significance of Heterogeneous Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* Isolates, *Antimicrob. Agents Chemother* 2011; 55(1): 405-410.
- VANDENESCH, F.; LINA, G.; HENRY, T. *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors. *Front. in Cell. and Infect. Microbiol* 2012; 2(12): 1-15.
- VASUDEVAN, P.; NAIR, M.K.M.; ANNAMALAI, T. et al Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet Microbiol* 2003; 92:179-185.
- VAUDAUX, P.; HUGGLER, E.; BERNARD, L. et al Underestimation of vancomycin and teicoplanin MICs by broth microdilution leads to underdetection of glycopeptide-intermediate isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54(9): 3861-70.
- VILELA, M.A.; SOUZA, S.L.; PALAZZO, I.C.V. et al Identification and molecular characterization of Van A-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in Northeast of Brazil. *Mem Inst Osw Cruz* 2006; 101: 716-719.
- VISALACHY, S.; PALRAJ, S.K., KOPULA, S.S. Carriage of Multidrug Resistant Bacteria on Frequently Contacted Surfaces and Hands of Health Care Workers. *J of Clin and Diag Res* 2016; 10: 18-20
- VON EIFF, C.; PETERS, G.; HEILMANN, C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *The Lancet Infect Dis* 2002; 2: 677-685.
- VUONG, C.; KOCIANOVA, S.; VOYICH, J.M. Crucial Role for Exopolysaccharide Modification in Bacterial Biofilm Formation, Immune Evasion, and Virulence. *J Bio Chem* 2004; 279(54): 881-86.

WALSH, T.R.; BOLMSTRO, A.; QWÄRNSTRÖM, A. et al Evaluation of Current Methods for Detection of staphylococci with Reduced Susceptibility to Glycopeptides, *J of Clin Microbiol* 2001; 39(7): 2439–2444.

WARYAH, C.B. et al. Diversity of Virulence Factors Associated with West Australian Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Isolates of Human Origin. *BioMed Res. Internat.*, v. 2016, p. 1-10, 2016.

WATSUKI, K. TIWARI, J.G.; WELLS, K. et al. Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression. *J Dermatol Sci*, 2006; 42: 203-214.

WIDERSTRÖM, M.; WISTRÖM, J.; EDEBRO, H. Colonization of patients, healthcare workers, and the environment with healthcare-associated *Staphylococcus epidermidis* genotypes in an intensive care unit: a prospective observational cohort study. *BMC Infectious Diseases* 2016; 16 (743): 1-8.

WOOTTON, M.; MACGOWAN, A.P.; WALSH, T.R. et al Multicenter Study Evaluating the Current Strategies for Isolating *Staphylococcus aureus* Strains with Reduced Susceptibility to Glycopeptides_ *J.of Clin Microbiol* 2007;45(2): 329–332.

YU, F.; LIU, Y.; JINNAN, L.V. et al. Antimicrobial susceptibility, virulence determinant carriage and molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates associated with skin and soft tissue infections. *Braz. J. of Infect. Dis.* 2015; 19(6): 614-622.

ZEMBOWER, T.R. Epidemiology of Infections in Cancer Patients, Infectious Complications in Cancer Patients, *Canc Treat and Res* 2014; 161: 43- 89.

ZHU, W.; CLARK, N. C.; McDOUGAL, L. K. Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates Associated with Inc18-Like *vanA* Plasmids in Michigan, *Antim. Agents and Chemother* 2008; 52(2): 452 – 457.

APÊNDICE A**PHENOTYPIC AND GENETIC DETECTION OF BIOFILM PRODUCTION IN
STAPHYLOCOCCUS SPP. WITH REDUCED SUSCEPTIBILITY TO VANCOMYCIN
FROM CANCER PATIENTS**

Armando M. Bezerra Neto ¹, Marcelle A. Rabelo ¹, Jailton L. C. Lima ², Jussyêgles N. P. Pereira ², Paulo S. R. Araújo, Nilma C. Leal³, Maria A. V. Maciel ^{1,2},

1 Postgraduate Program in Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

2 Department of Tropical Medicine, Center of Health Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife-Pernambuco, Brazil,

3 Laboratory of Microbiology, Aggeu Magalhães Research Center - FIOCRUZ (CPqAM - FIOCRUZ), Recife-Pernambuco, Brazil

Adress for correspondence

Armando Monteiro Bezerra Neto

Centro de Ciências da Saúde – CCS-UFPE

Av. Professor Moraes Rego, s/n. Cidade Universitária - Recife - PE – Brasil.

CEP: 50.670-420 Caixa Postal: 7472

e-mail: monteiro.armando10@gmail.com

Telefone: (81)8889-0273/2126-8526

ABSTRACT

The occurrence of reduced susceptibility to vancomycin in *Staphylococcus* spp. is the cause of complications in patients with cancer, can be aggravated by biofilm production. The purpose of this study was to search the occurrence of isolates of *Staphylococcus* spp. with reduced susceptibility to vancomycin biofilm producers from cancer patients, through phenotypic-molecular techniques. 56 isolates from various clinical samples of cancer patients were analyzed, 85.7% of *S. aureus* and 14.3% of coagulase-negative staphylococci (CoNS). All of the isolates were submitted to the vancomycin susceptibility test. 18% of the isolates were screened with 6µg/µl vancomycin, eight *S. aureus* and two CoNS. In broth microdilution it was observed that two *S. aureus* isolates had MIC \geq 16µg/µl. The results obtained with of the exopolysaccharide production and biofilm production techniques, it was observed that 70% of the isolates were positive in both. When comparing the production of the biofilm with and without vancomycin, it was possible to find a good correlation between the techniques. 39.3% of the biofilm producing isolates were carriers the *icaAD* gene. Two isolates of *S. aureus* carriers of the *icaAD* gene presented resistance to vancomycin and were also biofilm producers by exopolysaccharide production and production of the biofilm with or without vancomycin. The occurrence of *S. aureus* biofilm producers, carriers of the *icaAD* gene and vancomycin resistant in cancer patients, suggest that biofilm research should be included as a bacteriological routine since in these isolates antimicrobial treatments they may be less effective and can evolve into a persistent infection.

Keywords: *Staphylococcus* spp.; reduced susceptibility; cancer patient; biofilm; vancomycin; gene *icaAD*;

INTRODUCTION

The increasing use of the implantable biomaterials has increased human life expectancy through the reestablishment of innumerable vital functions, but at the same time cause the development of more severe infections that are introduced with these techniques and must therefore be part of the treatment of these related infections (BUSSCHER et al., 2012). According to the US National Institutes of Health (NIH), approximately 80% of all infections worldwide are associated with biofilms, especially involving biomaterials (TRENTIN et al., 2013).

Coagulase-negative *Staphylococci* (CoNS) and *Staphylococcus aureus* are commonly identified as responsible for subclinical infections and their ability to be related to the formation of biofilms that promote bacterial infections (BARBIERI et al., 2015). In addition, the presence of medical implants in patients may induce bacterial biofilm formation, which results in persistent infection (MELAKE et al., 2014).

The colonization of several body sites by the CoNS and transient colonization by *S. aureus* may be a source of infection for immunocompromised patients (PALAZZO et al., 2005). Studies have shown that immunosuppression or immunocompromising is associated with an increased risk of colonization of *Staphylococcus* spp. putting patients at risk of infection that causes a higher chance of morbidity (MCNEIL, 2014). Several factors contribute to this risk, including disease-related immunosuppression and aggressive treatments such as chemotherapy, radiation therapy, steroid use and hematopoietic stem cell transplantation (ROSOLEM et al., 2012)

Infectious complications are a serious cause of morbidity and mortality in cancer patients, especially those with underlying haematological malignancies. Over approximately 60% of mortality are related to these infections (ZEMBOWER, 2014).

The strains of *Staphylococcus* spp. resistant to methicillin (MRSA / MRCoNS) and the difficulty in treating these infections caused by these microorganisms has in many cases made the glycopeptides (vancomycin and teicoplanin) the only alternative treatment (SORIANO et al., 2008; CÁZARES-DOMÍNGUEZ et al., 2015). The use of vancomycin led to the appearance of tolerant MRSA (VT-MRSA) and vancomycin resistance strains (GOMES, WARD and LAPLANTE, 2015; KOH et al., 2016).

Some studies report an increasing number of glycoprotein-resistant strains of *S. epidermidis* (GRSE) worldwide (CREMNITER et al., 2010). Already isolates of *S. aureus* and mainly coagulase-negative staphylococci (CoNS) resistant to methicillin / oxacillin and with reduced susceptibility to glycopeptides have been reported in Japan, the United States, Europe and Asia since the late 1980s (HOWDEN et al. 2010).

In Brazil, staphylococcal strains with reduced susceptibility to glycopeptides were reported a decade ago in hospitals in São Paulo and Rio de Janeiro (MELO et al., 2005) and recently *S. aureus* containing *vanA* and *vanB* genes have also been encountered in Brazil as well (ROSSI et al., 2014; BREVES et al., 2015).

The emergence of multidrug-resistant bacteria (MDR) has become a public health problem, causing extra medical care in hospitals, particularly for patients admitted to intensive care units (ICUs). In intensive care units, there is extensive use of antimicrobials, which imposes a higher risk of the onset of MDR (CORNEJO-JUÁREZ et al., 2015). In addition, in the ICU, the risk of infection is increased due to the underlying diseases (CVD) and urinary tract catheters (CORNEJO-JUÁREZ et al., 2015). In the present work, the results of the impact of these risks are presented.

The treatment of staphylococcal infections has become a major challenge for the medical community, as it is a biofilm-forming microorganism which aggravates its virulence potential and therefore reduces the options for antimicrobial use. In this context, phenotypic and molecular characteristics of *Staphylococcus* spp. which is resistant to methicillin and has reduced susceptibility to vancomycin it is necessary to understand and control its dissemination to support effective antibiotic treatment.

METHODS

Study population

Clinical isolates from patients hospitalized at Hospital of the Cancer of Pernambuco, several samples after the hospital routine were collected and identified in the reference laboratory of the Hospital of the present study, being transported in a solid Casoy agar medium inclined to the laboratory of Bacteriology and Molecular Biology (LBBM), Federal University of Pernambuco from July 2012 to October 2016.

Isolation and identification

The isolates were inoculated in 5% blood agar plates, incubated 24 hours, at 37°C to observe the macroscopic characteristics. After being identified by the following phenotypic tests: Gram staining, catalase, tube coagulase, latex agglutination, mannitol fermentation, DNase test and susceptibility to novobiocin.

Vancomycin Susceptibility Testing

The isolates were screened by vancomycin susceptibility test using BHI supplemented with 6 µg/mL of vancomycin (BHI-V6). Inoculums were adjusted to 0.5 McFarland turbidity (CLSI, 2012).

The method used to determine MIC to vancomycin was broth microdilution. One clinical isolate of *Enterococcus faecium* harboring *vanA* was used as positive control (Vilela et al., 2006) and the *E. faecalis* (ATCC 29212) strain as negative control. For determination of MIC by broth microdilution, a bacterial suspension of McFarland standard of 0.5 was prepared from colonies cultured on blood agar plates for 24 hours. From this culture, six to eight colonies were selected, homogenized in saline solution (2% NaCl) and the suspension was inoculated in another 2% NaCl salt solution and, from this solution, a 5 μ L aliquot was aspirated and Plated in 96-well microplates containing 180 μ L of Mueller-Hinton broth and 20 μ L of vancomycin stock solution at 1280 μ g/mL, 8 serial dilutions (1 μ g/mL to 128 μ g/mL) were performed to obtain a final concentration Of approximately 5×10^5 CFU / mL in each well of the microdilution plate (CLSI, 2012).

MIC interpretation was performed according to the following criteria: isolates with MIC ≤ 2 μ g/mL, intermediate 4-8 μ g/mL and resistant ≥ 16 μ g/mL were sensitive for *S. aureus* and for the CoNS were MICs ≤ 4 μ g / mL, intermediate 8-16 μ g/mL and resistant ≥ 32 μ g/mL (MELAKE et al., 2017).

Phenotypic analysis of the production of exopolysaccharides

Production of exopolysaccharides (EPS) was evaluated by sowing in Congo Red Agar (CRA) using a method modified by Freeman et al. (1989). The CRA allows the detection of the production of exopolysaccharides by variation in the color of the colonies in the medium. The medium was prepared by adding 0.3 g Congo red dye (1g/L) (Merck®) in 300mL of brain and heart infusion (BHI, Himedia®) supplemented with 15g sucrose (50g / L). The bacterial isolates were seeded on the CRA plates and incubated at 37 ° C for 24 hours. *S. aureus* (ATCC 25923) and *S. epidermidis* (ATCC 12228) were used as positive and negative controls, respectively. In the present study, the classification of the colonies occurred by the observation of macroscopic characteristics of the colonies, such as: coloration, colony appearance and opacity. Black, rough and opaque colonies were considered positive, as well as the negative colonies were those that presented red, smooth and shiny coloration

Biofilm Production Assay

The capacity of *Staphylococcus* spp. to produce biofilm was performed as described by Stepanovic et al., 2000. Staphylococcal strains were grown in TSB (Tryptic Soy Broth) added 1% sucrose for 24 hours at 35°C. Then 200 μ l of the bacterial suspensions were applied in triplicate on the flat bottom 96-well polystyrene plate and incubated for 24 hours at 35°C. After this time, the bacterial suspensions were removed and each well was washed three times with 250 μ l sterile 0.9% physiological solution. Subsequently, the fixation with 200 μ l ethanol PA for 15 minutes was performed. After that time the ethanol was removed and the plates were allowed to dry at room temperature, and then stained with 200 μ l of Violet Crystal solution for 5 minutes. The plates were washed in running water and dried at room temperature. Also included were the negative control (CN), composed only of the TSB broth with sucrose. The absorbance reading was performed on the ELISA Reader at wavelength of 570 nm and the isolates were classified according to Stepanovic et al. (2000). The value of the optical densities for each isolate (DOi) was obtained by the mean of the three wells, this being the value compared to the optical density of the negative control (DOc). The isolates were classified into four categories according to the mean OD (optical density) related to the results obtained for DOc. The categories were based on the following criteria: nonadherent (DOi <DOc), poorly adherent (DOc <DOi <2x DOc), moderately adherent (2x ODc <DOi <4x DOc) or strongly adherent (4x ODc <DOi).

Assay of Biofilm Production in the presence of vancomycin

The capacity of *Staphylococcus* spp. of producing biofilm in the presence of vancomycin was performed similarly as described above. Staphylococcal strains were grown in TSB (Tryptic Soy Broth) added 1% sucrose for 24 hours at 35°C. Then, 180 µl of the bacterial suspension was added to the wells of the microtiter plates, and 20 µl added 8 different concentrations of vancomycin (0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 ; 256 µg/mL) in different wells for the same isolate in triplicate and incubated for 24 hours at 35°C. The suspensions were then subjected to the same procedure as the biofilm production test without vancomycin.

Molecular techniques

DNA was extracted as described by Oliveira et al., 2015 from the biofilm-producing isolates detected by the different phenotypic techniques, and used in the Polymerase Chain Reaction (PCR) using the amplification of the *icaAD* gene, the Primers described by Vasudevan et al., 2003 (front 5'-CTAACTAACGAAAGGTAG-3' and 5'-GGCAATATGATCAAGATAC-3' reverse).

Analysis of concordance scale of phenotypic tests

The agreement between the phenotypic tests to evaluate the biofilm production was performed by the k (kappa) index (PAHO, 1997).

RESULTS

In the present study, 56 isolates from cancer patients were obtained, 48/56 (85.7%) of *S. aureus* and 8/56 (14.3%) of coagulase-negative staphylococci. The origin of the clinical samples; 12 / 48 (25%) of *S. aureus* isolates were from blood cultures and also tracheal secretion, 16 isolates obtained at several sites of infections (Table 1). In relation to the eight isolates coagulase-negative staphylococci three of them were extracted of the blood culture, two of the uroculture and catheter tip and one of an operative wound, as described in Table 1.

All isolates were submitted to the vancomycin susceptibility test by means of supplemented agar and microdilution with the mentioned drug. Ten (18%) of the isolates were screened with 6 µg/ml vancomycin, eight *S. aureus* and two CoNS. Regarding the microdilution results in vancomycin broth, we observed that in the *S. aureus* isolates six isolates had MIC \leq 2 µg/µl and two isolates presented MIC \geq 16 µg/µl. In the Coagulase-negative isolates, two presented MIC \leq 2 µg/µl, as can be seen in table 2.

In relation to the capacity to produce biofilm, using the techniques of production of exopolysaccharide in RCA and biofilm production test, in the first assay, 47/56 (84%) positive isolates (40 *S. aureus* and 7 CoNS) were obtained in the second test, 10 (17.9%) isolates were classified as non-adherent (9 *S. aureus* and 1 CoNS), 36 (64.2%) as weakly adherent (30 *S. aureus* and 6 CoNS) and 10 (17.9%) were moderately adherent (9 *S. aureus* and 1 CoNS). When relating these findings, it was observed that 41 (73%) isolates were positive in both methodologies. The concordance index between the above tests was evaluated and an index of 0.3 was obtained (median agreement).

In the formation of biofilm in the presence of vancomycin, 15 isolates were classified as non-adherent (13 *S. aureus* and 2 CoNS), 29 as weakly adherent (24 *S. aureus* and 5 CoNS) and five were moderately adherent (4 *S. aureus* and 1 CoNS) and five were strongly adherent (all *S. aureus*). Crossing the results obtained by this technique with the results obtained with the technique of exopolysaccharide production in RCA, it was observed that 39 (70%) of the isolates were positive in both techniques. When comparing biofilm production without vancomycin with biofilm production in the presence of vancomycin, it was possible to find an

index of 0.7 (Good agreement), the same index was obtained when comparing biofilm production with vancomycin with the production of exopolysaccharide.

When determining the biofilm production in the presence of vancomycin, it was observed that all the isolates presented biofilm formation in a higher concentration than the previously obtained MICs in the determination of the susceptibility to vancomycin, being observed that among isolates of *S. aureus*, six isolates presented MIC ≤ 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ and two isolates presented MIC ≥ 64 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. In the CoNS isolates, two had MIC ≤ 8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

The isolates were submitted to a molecular research of the *icaAD* gene, and 39.3% (22/56) of the biofilm isolates were carriers of the *icaAD* gene (19 *S. aureus* and 3 CoNS), thus distributed in the capacity to produce biofilm in microtiter plate: of the *S. aureus* *icaAD* positive isolates, 10 were poorly adherent and nine moderately adherent, among the CoNS isolates, two were poorly adherent and one was moderately adherent. However, when related to biofilm production results in the presence of vancomycin, the following distribution was obtained: in the 19 isolates of *S. aureus* 10 they were weakly adherent, five moderately adherent and five strongly adherent, and in the isolates of CoNS, two were weakly adherent and one strongly adherent. As for the red congo test, 22 (39.3%) isolates producing the exopolysaccharide were positive for the *icaAD* gene (Table 3).

The data obtained in the research *icaAD* gene, it is possible to observe that two isolates of *S. aureus* with the *icaAD* gene presented resistance to vancomycin, as well as being biofilm producers both by the production technique of exopolysaccharide in RCA, as well as by the production of the biofilm in polystyrene plate under both conditions, without and with vancomycin. None of the isolated CoNS that carried the *icaAD* gene presented resistance to vancomycin, but they had the capacity to produce biofilm, as observed in table 2.

DISCUSSION

In the present study, a higher occurrence of *S. aureus* isolates (85.7%) was observed in relation to the isolates of CoNS (14.3%) in samples from cancer patients. A similar study reported that 17 isolates (33.3%) were *S. aureus* strains and 23 (45.1%) were strains of *S. epidermidis* (EL-HENDIA et al., 2016). Another study, on the incidence of *Staphylococcus* spp. from blood cultures of cancer patients, reported that the CoNS were the most isolated microorganisms in the study, representing 27% of the total positive samples (39/146), followed by *S. aureus*, with a total of 26 isolates (18%) (SANTOS et al., 2016).

In relation to the distribution of staphylococci in the clinical specimens obtained, *S. aureus* was more frequent in the blood culture samples, tracheal secretion accounting for 50% of the clinical samples, also emphasizing bone fragment and catheter tip. On the other hand, CoNS were not isolated from tracheal secretion samples, but there was isolation in blood cultures. A study conducted in China reported CoNS (14.9%) and *S. aureus* (3.5%) in blood culture (CHEN et al., 2017) results contrary to ours, similar to Osmani et al. (2017) in his study, with patients at risk of developing febrile neutropenia, reports the occurrence of 44% of *Staphylococcus* spp. and 15% of *S. aureus* in blood culture. Another study, on the prevalence of pathogens in blood cultures, detected the occurrence of 66.7% *S. aureus* and 17.6% CoNS (OPINTAN & NEWMAN, 2017) with data comparing to the present study.

About the predominant presence of *S. aureus* in the tracheal secretion samples, it is important to mention that got less frequent CoNS, but some studies suggest the participation of *Staphylococcus* spp. causing pneumonia. Tetenta & Metersky, (2011), found a 37% occurrence of *S. aureus* in tracheal aspirate in respiratory infections. Another study, which investigated the impact of hospital-acquired infections with multiresistant bacteria in an oncology ICU, reports

the occurrence of 48.3% of *S. aureus* cause pneumonia in samples of tracheobronchial secretion (CORNEJO-JUÁREZ et al. 2015).

Staphylococcal biofilms are obstacles to therapeutic success due to decreased antimicrobial susceptibility and host immune response (SENG et al., 2017). In the present study, 10/56 (18%) isolates (8 *S. aureus* and 2 CoNS) were grown in the Brain-Heart Infusion agar supplemented with 6 µg / mL vancomycin, demonstrating that the isolates in question show a reduction in susceptibility to this drug. Melake et al. (2017) obtained in their study 68% of *S. aureus* and 46.1% of CoNS were intermediate or resistant to vancomycin in the test of agar supplemented with the antimicrobial. By MIC determination, it was possible to detect in the present study two isolates of *S. aureus* that had MIC \geq 16 µg / µl and were therefore considered phenotypically resistant. When determining the biofilm production in the presence of vancomycin, it was observed that all the isolates presented biofilm production in the presence of vancomycin greater than the MICs, the isolates of resistant *S. aureus* increased by 4 times the MIC value obtained. Similar results were obtained by Antunes et al. (2011) in their study on high resistance to vancomycin by *Staphylococcus* spp. biofilm producers, where it achieved a 16 times increase in MIC concentration. This observation shows that the production of biofilms results in an important barrier to antimicrobial diffusion.

We detected that 84% of the staphylococcal isolates were positive in the exopolysaccharide production test in RCA method meanwhile Oliveira and Cunha (2010) reported that 75% of the clinical isolates of staphylococci were positive biofilms but Seng et al. (2017) report higher occurrence (90.8%) of exopolysaccharide-producing isolates tested with the same method. Saising et al. (2012) describe the occurrence of 84.7% of biofilm-producing coagulase-negative staphylococci, while 62.5% of coagulase-positive staphylococci were biofilm producers.

Through the methods to evaluate biofilm production, it was possible to observe that 73% of the isolates were able to produce biofilm and the exopolysaccharide. Di Domenico et al. (2017), report the occurrence of 94.6% of biofilm producing *S. aureus* isolates. Another study on the detection of the *icaAD* gene and its role in the production of biofilm in *Staphylococcus* spp., reports the occurrence of 45.6% *S. aureus* and 76.9% CoNS of biofilm producing isolates by the plaque biofilm production technique (MELAKE et al., 2017).

In the present study, 22/47 (47%) positive isolates in the RCA test were also positive in the plaque biofilm production test and presented the *icaAD* gene. Los et al. (2010), found 90% (36/40) of positive isolates in the biofilm production test, the Congo red test and the *icaAD* gene search. Melake et al. in 2017, reported the presence of *ica* genes in 43% and 63.5% of *S. aureus* and CoNS isolates, respectively, with phenotypic biofilm tests.

The *icaAD* gene was detected in 39.3% of the isolates studied. Oliveira and Cunha, (2010) report the occurrence of 81% of the *icaAD* gene of biofilm-producing staphylococci, isolated from patients and healthy people. Ferreira et al. (2014), observed the occurrence of 97% of the *icaAD* gene in the isolates *Staphylococcus* spp.

The other isolates detected by the test of biofilm production in polystyrene plate may have their capacity to produce biofilm due to other mechanisms that aid the aggregation and formation of the biofilm. The phenotypic production of exopolysaccharide by *icaAD*-negative suggests that staphylococci isolates developed the biofilm through a gene-independent pathway (FERREIRA et al., 2014). The mechanisms involved in transcription and regulation of the single locus are partially understood, and different regulatory mechanisms are known in *S. aureus* and *S. epidermidis* (ARCIOLA et al., 2012).

In relation to the finding of *S. aureus* isolates resistant to vancomycin, biofilm producers and *icaAD* gene carriers, Melake et al. (2017) found 77.8% of *S. aureus*. The biofilm environment has been reported to promote the spread of antimicrobial resistance genes, probably by facilitating cell-cell contact and consequently increased gene transfer (MELAKE et al, 2014; SENG et al., 2017).

ACKNOWLEDGMENT

The present study was supported by Msc. Cynthia, yielding the primers for the *mecA* gene, with the collaboration of Dr. Eulália Ximenes, who assisted in the acquisition of the standard strain ATCC 33591 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

FINANCIAL SUPPORT

This work was financially supported by a grant from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), awarded to MAVM (process #474777/2013-8).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

1. Antunes ALS, Bonfanti JW, Perez LRR et al (2011) High vancomycin resistance among biofilms produced by *Staphylococcus* species isolated from central venous catheters, *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 106: 51-55.
2. Arciola CR, Campoccia D, Speziale P et al (2012) Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials, *Biomaterials*. 33: 5967-5982.
3. Barbieri R, Pesce M, Franchelli S et al (2015) Phenotypic and genotypic characterization of Staphylococci causing breast peri-implant infections in oncologic patients. *BMC Microbiology*. 15: 1-10.
4. Breves A, Miranda CAC, Flores C et al (2015) Methicillin- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in health care workers and medical device. *Braz J Pathol Lab Med*. 51:143-52.
5. Busscher HJ, Van Der Mei HC (2012) How do bacteria know they are on a surface and regulate their response to an adhering state? *PLoS Pathog*. 8: 1-3.
6. Cázares-Domínguez V, Cruz-Córdova A, Ochoa S et al (2015) Vancomycin Tolerant, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Reveals the Effects of Vancomycin on Cell Wall Thickening, *PLoS ONE* 10: 1-16.
7. Chen SZ, Lin KN, Xiao M et al (2017) Distribution and drug resistance of pathogens of blood stream infection in patients with hematological malignancies after chemotherapy. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 38: 951-955.
8. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) (2012). CLSI M07-A9 Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
9. Cornejo-Juárez P, Vilar-Compte D, Pérez-Jiménez C, et al (2015) The impact of hospital-acquired infections with multidrug-resistant bacteria in an oncology intensive care unit, *Intern. J. of Infect. Dis.*, 31: 31–34.
10. Cremniter J, Slassi A, Quincampoix JC, Tardy Vs, Bauer T et al (2010) Decreased susceptibility to teicoplanin and vancomycin in coagulase-negative staphylococci isolated from orthopedic-device-associated infections. *J Clin Microbiol*. 48:1428– 1431;
11. DI Domenico EG, Farulla I, Prignano G, Gallo MT et al (2017) Biofilm is a Major Virulence Determinant in Bacterial Colonization of Chronic Skin Ulcers Independently from the Multidrug Resistant Phenotype, *Int. J. Mol. Sci*. 18:1-19.
12. EL-hendia AA, MOHAMED AA, EL-shalakanya AH et al (2016) Biofilm formation by blood stream staphylococcal isolates from febrile neutropenic cancer patients, *Menoufia Med J*. 29:49–353.
13. Ferreira AA, TETTE PAS, MENDONÇA RCS et al (2014) Detection of exopolysaccharide production and biofilm-related genes in *Staphylococcus* spp. isolated from a poultry processing plant, *Food Sci. Technol*, 34: 710-716.
14. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT (1989) New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol*. 42: 872-874.
15. Gomes DM, Ward KE, Laplante KL (2015) Clinical implications of vancomycin heteroresistant and intermediately susceptible *Staphylococcus aureus*, *Pharmacotherapy*. 35: 424-32.
16. Howden BP, DAVIES JK, Johnson, PDR, Stinear TP, Grayson ML (2010) Reduced Vancomycin Susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and Heterogeneous vancomycin-intermediate strains: Resistance Mechanisms, Laboratory Detection and Clinical Implications. *Clin Microbiol Rev*. 23: 99-139.

17. Koh YR, Kim KH, Chang CL.; YIJ (2016) Prevalence and clinical impact of heterogeneous vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* isolated from hospitalized patients. *Annals of Laboratory Medicine*. 36: 235-243.
18. Los R, Sawicki R, Juda M, Stankevic M, Rybojad P, Sawicki M, Malm A, Ginalska GA (2010) Comparative analysis of phenotypic and genotypic methods for the determination of the biofilm-forming abilities of *Staphylococcus epidermidis*, *FEMS Microbiol Lett*. 310: 97–103.
19. Mcneil JC, (2014) *Staphylococcus aureus* – antimicrobial resistance and the immunocompromised child, infection and drug resistance. 7:117–127;
20. Melake NA, Zakaria AS, Ibrahim NH et al (2014) Prevalence of Agr Specificity Groups among *in vitro* Biofilm Forming Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Nasal Carriers, *International Journal of Microbiological Research*. 5: 76-84,
21. Melake NA, Hendawy GR, Labib AZ, Mahmoud AB, SALEM EH (2017) Detection of intercellular adhesion *icaAD* genes in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci and their role in biofilm production, *Menoufia Med J*. 29: 789–800.
22. Melo GB, Melo MC, Gama AP et al (2005) Analysis of the genetic diversity of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Braz J Microbiol*. 36:126-30.
23. Oliveira A and Cunha RS (2010) Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase negative staphylococci, *BMC Research Notes*. 3: 260-268;
24. Oliveira WLM, Mangueira EVC, Vilela MA et al (2015) Diversity of *Scmec* types in Methicillin Resistant *Staphylococcus* spp. Causing Hospital-Associated Infections, *J. J. Microbiol. Pathol*. 2: 1-8.
25. OPINTAN, J.A. and NEWMAN, M.J. Prevalence of antimicrobial resistant pathogens from blood cultures: results from a laboratory based Nationwide surveillance in Ghana, *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. 6:1-6.
26. Osmani AH, Jabbar AA, Gangwani MK, Hassan B (2017) Outcomes of High Risk Patients with Febrile Neutropenia at a Tertiary Care Center, *Asian Pac J Cancer Prev*.18: 2741-2745.
27. Palazzo ICV, Araujo MLC, Darini ALC. First Report of Vancomycin-Resistant Staphylococci Isolated from Healthy Carriers in Brazil, *J Clin Microbiol*. 43: 179-85.
28. PAN-AMERICANA HEALTH ORGANIZATION (PAHO) – FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE/ CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA (1997) Métodos de Investigação Epidemiológica em Doença Transmissíveis. 1: 12-13.
29. Rosolem MM, Rabello LSCF, Lisboa T et al (2012) Critically ill patients with cancer and sepsis: Clinical course and prognostic factors, *Journal of Critical Care*. 27: 301–307.
30. Rossi FMD, Diaz L, Wollam A, Panesso D, Zhou Y, Rincon S et al (2014) Transferable vancomycin resistance in a community-associated MRSA lineage. *N Engl J Med*. 370: 1524-31.
31. Saising J, Singdam S, Ongsakulm M, Voravuthikunchai SP (2012) Lipase, protease, and biofilm as the major virulence factors in staphylococci isolated from acne lesions, *BioScience Trends*. 6: 160-164.
32. Santos ACM, Brzezinski LS, Silva GS, Gonçalves B, Rodrigues LS, Vasco JFM, Incidência de *Staphylococcus* spp. isolados em hemocultura de pacientes oncológicos, *Anais do XI EVINCI*.
33. Seng R, Kittit T, Thummeepak R et al (2017) Biofilm formation of methicillin-resistant coagulase negative Staphylococci (MR-CoNS) isolated from community and hospital environments, *PLoS ONE*. 12:1-13.
34. Soriano A, Marco F, Martínez JA et al (2008) Influence of Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration on the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis*. 46:193- 200.

35. STEPANOVIĆ S, VUKOVIĆ D, DAKIĆ I et al (2000) A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation, *J Microbiol Met.* 40:175-179.
36. TETENTA, S. and METERSKY, M.L. Tracheal aspirate Gram stain has limited sensitivity and specificity for detecting *Staphylococcus aureus*, *Respirology.*16, p.86–89;
37. TRENTIN DS, GIORDANI RB, MACEDO AJ (2013) Pathogenic bacterial biofilms: general, clinical and combat strategies, *Revista Liberato.*14:113-238.
38. Vasudevan P, Nair MKM, Annamalai, T et al (2003) Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet Microbiol*, 92:179-185.
39. Vilela MA, Souza SL, Palazzo ICV et al (2006) Identification and molecular characterization of Van A-typy vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* in northeast of Brazil *Mem Inst Osw Cruz.* 101:716 - 719
40. Zembower TR (2014) Epidemiology of Infections in Cancer Patients, Infectious Complications in Cancer Patients, *Canc Treat and Res.*161:43- 89.

Table 1- *Staphylococcus* spp. isolates distribuion from clinical samples from patients of Cancer Hospital of Pernambuco, Brazil.

<i>Staphylococcus</i> spp. isolates	<i>S. aureus</i>	CoNS	Total (n=56)
Clinical Sample			
Blood	12	3	15
Tracheal secretion	12	-	12
Urine	1	2	3
Peritoneal fluid	1	-	1
Bone fragment	4	-	4
Abscess secretion	1	-	1
Catheter tip	4	2	6
Tissue fragment	1	-	1
Oropharynx	2	-	2
Wounds	2	1	3
Others	8	-	8
Total	48	8	56

Table 2 – Relation between *icaAD* gene detection and vancomycin susceptibility profile in patients of Cancer Hospital of Pernambuco, Brazil

Métodos	CRA*		Biofilm Production*			Production of Biofilm with vancomycin*				Gene <i>icaAD</i>	
	Pos	Neg	NA	WA	MA	NA	WA	MA	SA	Pos	Neg
<u><i>S.aureus</i></u>											
BHI-V (6µg/mL)											
Growth	8	1	1	4	4	2	3	3	1	5	4
Non-growth	32	7	8	27	5	12	22	2	3	14	25
Broth microdilution											
Sensitive	7	-	1	3	2	2	2	1	1	3	3
Intermediate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Resistant	2	-	-	-	2	-	-	2	-	2	-
<u><i>SCoN</i></u>											
BHI-V (6µg/mL)											
Growth	1	1	-	1	1	1	-	-	-	1	1
Non-growth	6	-	1	5	-	2	4	-	1	2	4
Broth microdilution											
Sensitive	2	-	-	1	1	1	-	-	1	1	1
Intermediate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Resistant	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*CRA – Congo Red Agar

**NA – Non-adherent; WA – weakly adherent; MA - moderately adherent; SA – Strongly adherent.

Table 3 – Relation between *icaAD* gene detection and biofilm production capacity in patients of Cancer Hospital of Pernambuco, Brazil.

Methods	Gene <i>icaAD</i>	
	positive	negative
<u><i>S.aureus</i></u>	19	28
CRA		
Positive	10	21
Negative	9	7
Biofilm Production		
Non-adherent	-	9
weakly adherent	10	19
moderately adherent	9	-
Strongly adherent	-	-
Production of Biofilm with vancomycin		
Non-adherent	-	17
weakly adherent	10	17
moderately adherent	5	-
Strongly adherent	5	-
<u>CoNS</u>	3	6
CRA		
Positivo	3	4
Negativo	0	1
Biofilm Production		
Non-adherent	-	1
weakly adherent	1	5
moderately adherent	1	-
Strongly adherent	-	-
Production of Biofilm with vancomycin		
Non-adherent	-	3
weakly adherent	2	2
moderately adherent	-	-
Strongly adherent	-	1



FIGURE 1 - Test of exopolysaccharide (slime) production using congo red agar: positive isolates (black) and negative isolates (red).

25/01/2018

Gmail - CMIC-D-18-00046 - Submission Confirmation



Armando Monteiro <monteiro.armando10@gmail.com>

CMIC-D-18-00046 - Submission Confirmation

1 mensagem

Current Microbiology (CMIC) <em@editorialmanager.com>

20 de janeiro de 2018 23:48

Responder a: "Current Microbiology (CMIC)" <vidhya.velayudhan@springer.com>

Para: Armando Monteiro Bezerra Neto <monteiro.armando10@gmail.com>

Dear Mr Bezerra Neto,

Thank you for submitting your manuscript, "Phenotypic and genetic detection of biofilm production in *Staphylococcus* spp. with reduced susceptibility to vancomycin from cancer patients", to Current Microbiology

The submission id is: CMIC-D-18-00046

Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the journal website.

Your username is: monteiro.armando10

If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at <https://cmic.editorialmanager.com/>.

With kind regards,
Springer Journals Editorial Office
Current Microbiology

APÊNDICE B**ULTRASTRUCTURAL CHANGES OF *Staphylococcus spp.* RESISTANT AND SENSITIVE TO VANCOMYCIN FROM HEALTH PROFESSIONALS**

Armando Monteiro Bezerra Neto¹, Marcelle Aquino Rabelo¹, Jailton Lobo da Costa Lima¹, Stéfany Ojaimi Loibman¹ Eulália Ximenes Camelo Pessoa de Azevedo¹, Fábio André Brayner dos Santos², Luíz Carlos Alves², Nilma Cintra Leal², Maria Amélia Vieira Maciel¹

1 Postgraduate Program in Tropical Medicine, Department of Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil;

2 Research Institute Aggeu Magalhães IAM / FIOCRUZ, Recife, Pernambuco, Brazil;

Mailing address:

Armando Monteiro Bezerra Neto

Centro de Ciências da Saúde – CCS-UFPE

Av. Professor Moraes Rego, s/n. Cidade Universitária - Recife - PE – Brasil.

CEP: 50.670-420 Caixa Postal: 7472

e-mail:monteiro.armando10@gmail.com

Telefone: (81)8889-0273/2126-8526.

ABSTRACT

Background The use of vancomycin as a therapeutic agent for infections caused by methicillin-resistant and multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. to detect ultrastructural changes of *Staphylococcus* spp. resistant and sensitive to vancomycin of healthcare workers.

Materials and Methods Isolates *Staphylococcus* spp. from health professionals were submitted to the antimicrobial susceptibility test, and from vancomycin resistance detection was carried out molecular and ultra structural research. **Results** One-hundred-and-two isolates obtained from healthcare workers from the University Hospital, Recife, Brazil, Multidrug resistance was observed in 84.3% of the isolates. 19 isolates exhibited growth in brain heart infusion medium supplemented with 6 µg/mL vancomycin (BHIV6). Subsequently, these isolates were submitted to E-test, four isolates with minimum inhibitory concentration (MIC) between 4 and 8 µg/mL and two isolates had MIC \geq 16 µg/mL. Of the 12 CoNS isolates, only two had MIC of \geq 32 µg/mL. In broth microdilution method two isolates of *S. aureus* and three CoNS were vancomycin resistant. Of the five resistant isolates, only one (*S. epidermidis*) harbored the *vanA* gene, the others isolates presented cell wall thickening, as well as other alterations to cellular structures were studied using transmission electron microscopy (TEM). **Conclusion** The mechanism of resistance to vancomycin in *Staphylococcus* spp. analyzed was related to the genetic element and also the thickening of the cell wall in being these lines present in the microbiota of healthcare workers.

Key-words: *Staphylococcus* spp; Healthcare workers; vancomycin; multidrug-resistance; cell wall thickening; ultrastructural changes

INTRODUCTION

The frequency of bacterial infections associated with healthcare sector is increasing, in fact, in developing countries, limited financial resources are necessitating these, infections to be considered as public health problems^[1]. Data related to morbidity and mortality rates in infections bacterial pathogens resistant to antimicrobials clearly indicate that the treatment of these infections is a global challenge ^[2].

Staphylococcus aureus, a gram-positive bacterium, is a pathogen that affects humans and has increased potential to cause simple skin infections as well as serious infections such as endocarditis, osteomyelitis, pneumonia, and bloodstream infections ^[3].

In comparison to *S. aureus*, coagulase-negative *Staphylococci* (CoNS) strain are less virulent, but demonstrate a similar antimicrobial resistance profiles, thus becoming a concern in the healthcare sector, especially in hospitals in the the intensive care units (ICU), or in areas involving geriatric and/or immunocompromised patients ^[4, 3].

Epidemiological studies analyzing the microbiota of healthcare workers at different biotic surfaces such as hands and nasopharynx report the occurrence of *S. aureus* and CoNS along with their antimicrobial resistance profiles ^[5-8]. On the other hand, ^[9], have demonstrated that the *Staphylococcus* species from the patient's microbiota can colonize the hospital environment, favoring the circulation of multidrug-resistant (MDR) strains.

Methicillin resistance is the hallmark of multidrug resistance in *S. aureus* and CoNS ^[2]. Several agents, including linezolid, tigecycline, and daptomycin, are available for the treatment of infections caused by methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). However, vancomycin continues to remain the main therapeutic agent ^[10, 4].

Increased use of vancomycin to treat bacterial infections caused by MRSA, *Clostridium difficile*, and *Enterococcus* species accentuated the emergence of vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA). The occurrence of *S. aureus* strains with intermediate resistance to

vancomycin (VISA), with an MIC of 8–16 µg/mL, was first reported in Japan, followed by case studies in other countries ^[11]. VISA isolates are associated with sub-populations with heterogeneous VISA (hVISA); this term includes other glycopeptides too, namely, glycopeptide-intermediate *S. aureus* (GISA and hGISA, if heterogeneous) ^[12].

The mechanisms underlying vancomycin resistance in *S. aureus* might be related to the genetic element transposon *Tn1546*, which was obtained from vancomycin-resistant *E. faecalis*. Most strains appeared in hospitalized patients with diabetic wounds who were also coinfecting with vancomycin-resistant enterococci (VRE) ^[13]. The report of VRSA isolates with an MIC of ≥ 100 µg/mL obtained from diabetic patients with wounds coinfecting with *E. faecalis* and resistant MRSA suggests the involvement of biochemical mechanisms ^[14].

Other mechanisms of resistance to vancomycin include alterations in the cell wall, resulting in reorganization and thickening, which reduce the penetration of vancomycin and inhibit its binding to the N-acetyl-muramic acid precursor, the cytoplasmic target. In addition, hVISA and VISA might represent the bacterial evolutionary status and the adaptations favoring persistence in the environment ^[12].

The hetero-resistant profile has also been reported for glycopeptide-resistant CoNS (*S. epidermidis* and *S. haemolyticus*) in relation to cell wall thickening ^[15, 16]. Strains of *Staphylococcus*, when exposed to vancomycin, developed resistance; this was observed at the clinical as well as experimental levels with sensitive and control strains ^[17, 18].

Using transmission electron microscopy (TEM), Hanaki et al ^[19] analyzed the first clinical VRSA strain and reported that the cell wall of this strain showed increased production of peptidoglycan and murein monomers with additional layers (30–40), which is indicative of the mechanism underlying vancomycin resistance. A study ^[20] cites VRSA lineages from several countries, including Brazil, which showed thickening of the cell wall, presumably

because of the accumulation of increased amounts of peptidoglycan, as a new model of vancomycin resistance.

An epidemiological study conducted ^[5], reported the occurrence of staphylococcal strains, resistant to 6 µg/mL of vancomycin, tracing the isolates obtained from the microbiota of healthcare workers of the Hospital Universitário de Pernambuco, Brazil.

The present study aimed to analyze the ultrastructural alterations to the cell wall in vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive isolates of *Staphylococcus* species obtained from the microbiota of healthcare workers.

METHODS

Strains

One-hundred-and-two *Staphylococcus* strains, isolated in a previous study ^[5] from the nasopharyngeal secretions of healthcare professionals working in the three sectors of the University Hospital of Pernambuco, Brazil, namely, ICU, surgical clinics, and hemodialysis service/nephrology, during the first half of 2011, were included in this study. This study was approved by the Research Ethics Committee of the Universidade Federal of Pernambuco – CEP/CCS/UFPE (CAAE N° 0490.0.172.000-11).

These strains were maintained in the frozen state in brain heart infusion (BHI) broth containing 25% glycerol at -20°C. Nutrient agar slants at 4°C were used for analysis. All isolates were re-identified according to the standardized techniques for the identification of *Staphylococcus* species, including catalase test, coagulase test, mannitol fermentation, and deoxyribonuclease test (DNASE).

Antimicrobial Susceptibility Testing (AST)

These isolates were tested by the disc diffusion method in Mueller-Hinton agar, according to the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines ^[21] by using the following antibiotics: penicillin (10 U), gentamicin (10 µg), clindamycin (2 µg), sulfazotrim

(1.25/23.75 µg), ciprofloxacin (5 µg), chloramphenicol (30 µg), ceftiofur (30 µg), erythromycin (15 µg), and linezolid (5 µg). After incubation for 24 h at 35°C, the zones of inhibition were measured using a caliper.

Vancomycin Susceptibility Testing

The isolates were screened for vancomycin susceptibility using BHI medium supplemented with 6 µg/mL vancomycin (BHI-V6). The inoculum density was adjusted to match the turbidity of the 0.5 McFarland turbidity standard [22].

Two methods were used to determine the MIC to vancomycin: broth microdilution and E-test (BIOMÉRIEUX), according to the CLSI guidelines [21]. One clinical isolate of *E. faecium* harboring the *vanA* gene was used as the positive control [23], and an *E. faecalis* (ATCC 29212) strain was used as the negative control. E-test was performed using a suspension matching the turbidity of the 0.5 McFarland turbidity standard, which was plated onto Müller-Hinton medium and incubated at 35°C for 48 h. The results were interpreted according to the manufacturer's specifications, by comparing it with CLSI cut off values [21].

For MIC determination by the broth microdilution method, a bacterial suspension matching the turbidity of the 0.5 McFarland turbidity standard was prepared from the colonies cultured on blood agar plates for 24 h. Approximately 6–8 colonies were selected, homogenized in saline (2% NaCl), and re-inoculated in fresh 2% NaCl solution. A 5-µL aliquot from this solution was plated in 96-well microplates containing 180 µL of Mueller-Hinton broth and 20 µL of vancomycin stock solution (1280 µg/mL), and 8 serial dilutions (1–128 µg/mL) were performed to obtain a final inoculum density of $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL in each well [22].

Molecular Techniques

DNA was extracted from the vancomycin-resistant isolates, as described [24]. Polymerase chain reaction (PCR) to amplify the *vanA* and *mecA* genes was performed using the primers and conditions described [25] (forward 5'-TGAATAACATCGGCATTAC-3' and reverse 5'-

TTATTTAACGGGGAAATC-3'), and ^[26] (P1 5'-GGTCCCATTA ACTCTGAAG-3' and P3 5'-AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC-3').

Transmission electron microscopy (TEM)

The isolates chosen for this method were grown at 37°C for 24 h, followed by centrifugation of the culture medium for 5 min at 2000 rpm. The supernatant was discarded, and the bacterial mass was washed thrice with 10% phosphate-buffered saline (PBS). After washing, the cells were fixed with 0.1 M phosphate buffer, 2.5% glutaraldehyde, and 4% paraformaldehyde for 24 h. Subsequent washes were performed with 0.1 M phosphate buffer, followed by washes with 0.1 M cacodylate buffer. Further, the isolates were post-fixed in 1% osmium tetroxide and 0.1 M cacodylate buffer for 1.5 h. Two washes each were then performed with 0.1 M cacodylate buffer and distilled water, respectively, for 10 min. Each isolate was subjected to “in block” staining with 2% uranyl acetate and protected from exposure to light for 24 h, before rinsing with distilled water. They were dehydrated in an increasing series of acetone (30, 50, 70, 90, and 3× 100%) for 15 min at each concentration. This was followed by Epon mix resin infiltration (1:3, 1:2, 1:1, 2:1, and pure) and embedding. Subsequently, ultrafine sections were obtained using an ultramicrotome (Leica UC6), stained with uranyl acetate and lead citrate, and examined by TEM ^[27].

RESULTS

Susceptibility profiles of the clinical strains of *Staphylococcus* species showed that 84.3% (86/102) of the isolates were multidrug resistant. Vancomycin resistance was observed in 19 isolates: seven *S. aureus* and 12 CoNS strains. Subsequently, E-test was performed to determine the MIC of vancomycin. Seven *S. aureus* isolates showed the following MICs: one isolate with MIC of $\leq 2\mu\text{g/mL}$ (sensitive), four with MIC between 4 and $8\mu\text{g/mL}$ and MIC could not be determined for two isolates because of the lack of zone of inhibition. Of the 12 CoNS isolates, 10 had an MIC of $\leq 4\mu\text{g/mL}$ and two had an MIC of $\geq 32\mu\text{g/mL}$.

Subsequently, the broth microdilution method showed that five of the seven *S. aureus* isolates were sensitive ($\text{MIC} \leq 2 \mu\text{g/mL}$) and two were resistant ($\text{MIC} \geq 16 \mu\text{g/mL}$). Of the 12 CoNS, nine had an MIC of $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ and three had an MIC of $\geq 32 \mu\text{g/mL}$.

Kappa concordance test was used to compare the phenotypic methods for detection of vancomycin resistance. Screening with BHI medium (containing $6 \mu\text{g/mL}$ vancomycin) was compared with the broth microdilution method to get a Kappa value of 0.46 (moderate agreement), and comparison of the E-test with the broth microdilution method yielded a Kappa value of 0.96 (excellent agreement).

Ultrastructural analysis by TEM was performed for isolates that could resist vancomycin as well as for a *Staphylococcus* strains that was not exposed to vancomycin (negative control).

On comparing the images obtained for the negative control, the isolates with an MIC of $4\text{--}8 \mu\text{g/mL}$ (intermediate and complete resistance) were found to show not only cell wall thickening, but also other ultrastructural alterations such as aberrant cell division showing asymmetric septal thickening and without separation of the daughter cells, ribosomal condensation, destruction of cellular envelopes (cell wall and cytoplasmic membrane), anomalous and discontinuous septum formation, retraction of the cytoplasmic membrane, and septum formation causing unilateral division (Fig. 1).

In the isolates with a MIC of $\geq 16 \mu\text{g} / \text{mL}$, condensation of genetic material was observed at the septum origin in unequal amounts, cell wall thickening, cytoplasmic membrane retraction, ribosomal condensation, and cytoplasmic membrane rupture of cell envelopes (Figure 1).

Of the five resistant isolates, just one strain *S. epidermidis* carried the *vanA* gene, which was confirmed by sequencing to show 100% similarity with the 10 sequences of *Enterococcus* spp. deposited in GenBank (KT581638).

To characterize genetically the isolates, the *mecA* gene was detected using PCR in 13/19 (39.4%) of methicillin resistant isolates, of which an isolate of MRSA was obtained in the Nephrology / Hemodialysis sector. Of the 12 strains of CoNS resistant to multiple drugs, five, four and three strains were obtained from the Nephrology, Surgery / Infectious and Parasitary and UTI sectors, respectively. The isolate carrying the *vanA* gene also showed the *mecA* gene; was obtained from the ICU. Of the other non-carriers of the *vanA* gene, five carried the *mecA* gene (all multi-drug resistant CoNS) and 13 did not have this gene (6 CoNS and 7 methicillin-sensitive *S. aureus*).

DISCUSSION

The antimicrobial resistance profile of the isolates obtained from healthcare workers showed the MDR profile. A previous study reports a similar occurrence, with multidrug resistance being detected in 80.9% of the staphylococcal isolates obtained from the nasal swabs of healthcare workers [28]. Fadeyi et al. [29] described the MDR nature of *S. aureus* isolates colonizing the nasopharynx of healthcare professionals in Nigeria.

The use of vancomycin as a therapeutic agent and the high prevalence of *S. aureus* strains in Brazilian hospitals, in addition to the lack of control over the use of antimicrobials and the inadequate facilities available at public health institutions, favored the emergence of VISA or VRSA [30]. The isolation of VRSA strains from burn patients within 30 days of vancomycin therapy was first reported in 2001, along with the occurrence of the *vanA*, *vanB*, and *vanC* genes [31].

Hiramatsu [20] reviewed the subsequent isolation of VRSA strains in the USA, France, Korea, South Africa, and Brazil; his findings indicated that the emergence of vancomycin resistance would become a global problem. In fact, he described the term “hetero-VRSA.” A decade later, Howden et al. [12] described VISA and hVISA.

In the present study, five isolates that showed resistance to vancomycin with an MIC of ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ (2 VRSA and 3 strains with reduced susceptibility to vancomycin) were obtained by the broth microdilution method from the microbiota of healthcare workers. All strains were checked for the *vanA* gene, but only one strain harbored this gene. Sporadic occurrence of the *vanA* and *vanB* genes in staphylococcal strains has been reported in Brazil [32, 33], similar to the description of three *S. epidermidis* isolates from ICU patients, in Kampala, Uganda which harbored the *vanA* and *vanB* genes [34], a similar pattern was observed in our study, with a low occurrence of these genes, but these isolates belonged to the microbiota of healthcare workers.

In the present study, we did not detect strains with intermediate resistance to vancomycin, unlike the results obtained [35], in a 6% of strains of MRSA were found VISA strains, on the other hand, in a study in southeastern Brazil in strains *S. aureus* detected hVISA [36].

The first instance of VRS in asymptomatic carriers in Brazil was reported in 2005 [37] they found that the mechanisms underlying vancomycin resistance in staphylococci are not related to genetic mechanisms (*vanA*, *vanB*, and *vanC* genes) because these genes are not detect, being observed the thickening of the cellular wall, which contributes to vancomycin resistance in the staphylococcal strains. Some studies have showed the absence of these genes in the hVISA, VISA [19], and VRSA [20, 15] strains.

In the VRSA isolate in the present study, cell wall thickening was observed by TEM. Reipert et al. [38] have previously reported that this alteration is a prerequisite for vancomycin resistance; however, the decrease in peptidoglycan cross-linking and the high content of free D-alanyl-D-alanine residues in the cell wall might increase the resistance in these strains. Howden et al. [12] reported that cell wall thickening might hinder the penetration of vancomycin through the cell wall to its target site and that the target N-acetyl-muramic acid is located in the cytoplasmic membrane.

In a study on vancomycin-tolerant MRSA clinical isolates obtained from pediatric patients, Cázares-Domínguez et al.^[39] showed that the thickening of the cell wall is a mechanism inducing vancomycin tolerance, suggesting that this mechanism is necessary for vancomycin resistance.

Another study reported that changes in the cell wall thickness and the division septum are related to methicillin resistance because of the decreased activity of penicillin-binding proteins (PBP), producing an excess of D-alanyl-D-alanine residues, thus enhancing the expression of the genes associated with cell wall synthesis and leading to increased production of teichoic acid^[40].

In addition to cell wall thickening, other alterations such as location and formation of an anomalous septum, anomalous distribution of the ribosomes and chromosomes, aborted cell division, destruction of cellular envelopes (cell wall and cell membrane), cytoplasmic retraction, and peptidoglycan flocculation were observed. A study on the gradual changes occurring in the cell wall structure in VRSA strains showed that gradual deactivation occurs in the transpeptidase system involved in cell wall synthesis, leading to a gradual decrease in PBP4 and PBP2a transcription. The decrease in these two transpeptidases can reduce the highly crosslinked oligomeric components in the peptidoglycan, thus causing cell wall disorganization^[41].

Cui et al.^[42] reported that another pathway used by vancomycin-resistant strains to promote cell wall thickening is murein biosynthesis, but this process consumes a lot of ATP and important metabolites such as phosphoenolpyruvate, which leads to greater energy depletion by reducing the production of important metabolites. It is, therefore, reasonable to assume that overproduction of murein causes detrimental effects on the rapid growth of the cell because of the heavy burden exerted on the supply of ATP and key metabolites essential for cell replication. Beneit et al.^[43] reported that the decrease in autolytic activity in the VRS strains

promotes the accumulation of cell wall components and prevents the separation of daughter cells. In this context, Howden et al. ^[12], in their study, reported that several molecular mechanisms are involved in cell wall biosynthesis, and that the metabolic stress of expressing the proteins required for the maintenance of VRS leads to increased ribosome production and ribosomal accumulation in the cytoplasm.

In a review ^[44] on the molecular events promoting vancomycin resistance in *S. aureus*, activated VraTSR and GraSR systems were shown to have increased gene transcription for cell wall synthesis and modification, including the *pbpB*, *dltABCD*, and *mprF* genes, thus enhancing cell wall biosynthesis. Low regulation of the WalKR system decreases the expression of autolysins and PBP4, thus reducing autolysis and crosslinking of the muropeptide. In addition, changes in the functionality or mutations in some genes might affect the synthesis of cell wall proteins and alter cellular metabolism to support the synthesis of cell wall precursors, thereby collectively influencing the balance between cell wall synthesis and hydrolysis, which further leads to cell wall thickening. Cell wall thickening and decreased peptidoglycan cross-linking provides more free D-alanyl-D-alanine residues. Thus, most of the vancomycin can be arrested before it reaches the septum, thereby developing resistance to vancomycin. On the other hand, alteration of central metabolism can increase the lipid cycle by regulating the CcpE protein, which promotes the biosynthesis of the nascent peptidoglycan.

This study showed the high occurrence of staphylococcal isolates with an MDR profile in the microbiota of health professionals. This fact generates more concern because these isolates carry the potential to become primary sources of infection in the healthcare sector, in addition to causing difficult-to-treat infections.

CONCLUSION

Vancomycin resistance in the *Staphylococcus* isolates obtained from the microbiota of healthcare workers could be attributed to the occurrence of the *vanA* gene as well as

ultrastructural changes (such as cell wall thickening). However, other resistance-related genes such as *vanB* and *vanC* were not investigated. These isolates showed an MDR profile, along with the presence of the *mecA* gene.

The mechanism of resistance to vancomycin in strains of *Staphylococcus* spp., however the thickness of the cell wall is one of the factors favoring vancomycin resistance, and these strains are not only restricted to the hospital environment, but also present in the microbiota of healthcare workers. In fact, this study is one of the first report the occurrence of the *vanA* gene from a university hospital in Northeast Brazil.

ACKNOWLEDGMENTS

This research had the collaboration of Dr. Marcia Maria Camargo de Morais who provided the positive control enterococcal strain for the *vanA* gene.

FINANCIAL SUPPORT

This work was financially supported by FACEPE (Fundação de Amparo Ciência do Estado de Pernambuco) to MAVM (process APQ 0579-2.12/06) and Conselho Nacional Científico e Tecnológico (CNPq) grant to MAVM (process #474131/2011-4).

CONFLICT OF INTEREST

We declare that we have no conflict of interest.

REFERÊNCIAS

- [1]MURNI IK, DUKE T, KINNEY S, DALEY AJ, SOENARTO Y. Reducing hospital-acquired infections and improving the rational use of antibiotics in a developing country: an effectiveness study. *Arch Dis.* 2015; 100, 454-459
- [2]AKOVA M. Epidemiology of antimicrobial resistance in blood-stream infections. *Virulence* 2016; 7:252-66
- [3]TONG SY, DAVIS JS, EICHENBERGER E, HOLLAND TL, FOWLER VG JR. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev.* 2015; 28, 603-613
- [4]BECKER K, HEILMANN C, PETERS G Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* 2014, 27, 870-926
- [5]RABELO MA, NETO AMB, LOIBMAN SO, LIMA JLC, FERREIRA EL, LEAL NC, MACIEL MAV. The occurrence and dissemination of methicillin and vancomycin-resistant *Staphylococcus* in samples from patients and health professionals of a university hospital in Recife, State of Pernambuco, Brazil *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014; 47, 437-446
- [6]MAHMOUD AL, ALBADAWY HS, BOLIS SM, BILAL NE, AHMED AO, IBRAHIM ME. Inducible clindamycin resistance and nasal carriage rates of *Staphylococcus aureus* among healthcare workers and community members. *African Health Sciences* 2015, 15; 861-867
- [7]VISALACHY S, PALRAJ SK, KOPULA SS, SEKAR U. Carriage of Multidrug Resistant Bacteria on Frequently Contacted Surfaces and Hands of Health Care Workers. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2016, 10; DC18-DC20
- [8]WIDERSTRÖM M, WISTRÖM J, EDEBRO H, MARKLUND E, BACKMAN M, LINDQVIST P, MONSEN T. Colonization of patients, healthcare workers, and the environment with healthcare-associated *Staphylococcus epidermidis* genotypes in an intensive care unit: a prospective observational cohort study. *BMC Infectious Diseases* 2016, 16;743
- [9]HAN JH, SULLIVAN N, LEAS BF, PEGUES DA, KACZMAREK JL, UMSCHIED CA. Cleaning Hospital Room Surfaces to Prevent Health Care-Associated Infections: A Technical Brief. *Ann Intern Med.* 2015, 163; 598–607
- [10]RODVOLD KA, MCCONEGHY KW. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* therapy: past, present, and future. *Clin Infect Dis.* 2014, 58; S20–7.
- [11]HIRAMATSU K, ARITAKA N, HANAKI H, KAWASAKI S, HOSODA Y, HORI S, FUKUCHI Y, KOBAYASHI I. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet.* 1997, 350;1670–1673
- [12]HOWDEN BP, DAVIES JK, JOHNSON PD, STINEAR TP, GRAYSON ML. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* 2010, 23:99–139
- [13]SIEVERT DM, RUDRIK JT, PATEL JB, MCDONALD LC, WILKINS MJ, HAGEMAN JC. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002-2006. *Clin Infect Dis.* 2008,46:668–674
- [14]GARDETE S, TOMASZ A. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest.* 2014,124;2836–1240

- [15]SANYAL D, GREENWOOD D. An electron microscope study of glycopeptide antibiotic-resistant strains of *Staphylococcus epidermidis*. J. Med. Microbiol. 1993, 39;204–210
- [16]GIOVANETTI E, BIAVASCO F, PUGNALONI A, LUPIDI R, BIAGINI G, VARALDO PE. An electron microscopic study of clinical and laboratory-derived strains of teicoplanin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. Microb. DrugResist. 1996, 2;239–243.
- [17]HARAGA I, NOMURA S, SHIGERU F, OHJIMI H, HANAKI H, HIRAMATSU K, AND NAGAYAMA A. Emergence of vancomycin resistance during therapy against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a burn patient- importance of low-level resistance to vancomycin. Int J Infect Dis. 2002, 6: 302-308
- [18]ROCH M, CLAIR P, RENZONI A, REVERDY ME, DAUWALDER O, BES M, MARTRA A, FREYDIÈRE AM, LAURENT F, REIX P, DUMITRESCU O, VANDENESCH F. Exposure of *Staphylococcus aureus* to Subinhibitory Concentrations of β -Lactam Antibiotics Induces Heterogeneous Vancomycin- Intermediate *Staphylococcus aureus* Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2014, 58;5306–5314
- [19]HANAKI H, KUWAHARA-ARAI K, BOYLE-VAVRA S, DAUM RS, LABISCHINSKI H, HIRAMATSU K. Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. *Antimicrob Chemother* 1998; 42;199–209
- [20]HIRAMATSU, K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance *Lancet Infectious Diseases* 2001, 1; 147–155
- [21]CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. CLSI M100-S24 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing - Twenty-Sixth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014
- [22]CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. CLSI M07-A9 Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012
- [23]VILELA MA, SOUZA SL, PALAZZO ICV, FERREIRA JC, MORAIS JR, DARINI ALC. Identification and molecular characterization of Van A-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in Northeast of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006, 101; 716-719
- [24]OLIVEIRA WLM, MANGUEIRA EVC, VILELA MA, JÚNIOR SP, LEAL NC, ALMEIDA AMP. Diversity of SCCmec types in Methicillin Resistant *Staphylococcus* spp. Causing Hospital-Associated Infections. J J Microbiol Pathol 2015, 2; 0-8.
- [25]SAHA B, SINGH AK, GHOSH A, BAL M. Identification and characterization of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Kolkata (South Asia). J Med Microbiol. 2008, 57; 72-9
- [26]PETINAKI E, ARVANITI A, DIMITRACOPOULOS G, SPILIOPOULOU I. Detection of *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes among clinical isolates of methicillin-resistant staphylococci by combined polymerase chain reactions. J Antimicrob Chemother 2001, 47; 297-04.
- [27]DIMECH GS, SOARES LAL, FERREIRA MA, OLIVEIRA AGV, CARVALHO MC, XIMENES EA. Phytochemical and Antibacterial Investigations of the Extracts and Fractions from the Stem Bark of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne and Effect on Ultrastructure of *Staphylococcus aureus* Induced by Hydroalcoholic Extract, The ScientificWorld Journal 2013

- [28]ĆIRKOVIĆ I, ĐUKIĆ SN, CAREVIĆ B, MAZIĆ NT, LJEVIĆ VM, STEPANOVIĆ S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage among hospitalized patients and healthcare workers in the clinical center of serbia, *Arch. Biol. Sci.* 2014, 66; 87-92
- [29]FADEYI A, ADEBOYE MAN, FOWOTADE A, NWABUISI C, BOLAJI BO, OYEDEPO OO, ADESIYUN OO, OLANREWaju T, ADERIBIGBE A, SALAMI AK, DESALU OO, AKANBI AA, RAHEEM RA, OLALERE A. Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus* Carriage amongst Healthcare Workers of the Critical Care Units in a Nigerian Hospital. *Am J Infect Dis.* 2010, 6; 18-3.
- [30]OLIVEIRA GA, LEVY CE, MAMIZUKA EM. *Staphylococcus aureus* apresentando resistência intermediária à vancomicina: mecanismos de resistência, detecção laboratorial e perspectivas de emergência no Brasil. *J Bras Patol.* 2000, 36; 96-102.
- [31]OLIVEIRA GA, DELL'AQUILA AM, MASIERO RL, LEVY CE, GOMES MS, CUI L, HIRAMATSU K, MAMIZUKA EM. Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* reduced susceptibility to vancomycin. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2001, 22; 443-8
- [32]ROSSI F, DIAZ L, WOLLAM A, PANESSO D, ZHOU Y, RINCON S, NARECHANIA A, XING G, DI GIOIA TSR, DOI A, TRAN TT, REYES J, MUNITA JM, CARVAJAL LP, HERNANDEZ-ROLDAN, A, BRANDÃO D, VAN DER HEIJDEN IM, MURRAY BE, PLANET PJ, WEINSTOCK GM, ARIAS CA. Transferable vancomycin resistance in a community-associated MRSA lineage. *N Engl J Med.* 2014, 370, 1; 524-31
- [33]BREVES A; MIRANDA CAC, FLORES C; FILIPPIS I; CLEMENTINO MM. Methicillin- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in health care workers and medical devices, *J Bras Patol Med Lab* 2015, 51; 143-152
- [34]ROHDE H, BURANDT EC, SIEMSEN N, FROMMELT L, BURDELSKI C, WURSTER S, SCHERPE S, DAVIES AP, HARRIS LG, HORSTKOTTE MA, KNOBLOCH JK, RAGUNATH C, KAPLAN JB, MACK D. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections *Biomaterials* 2007,28;1711-20.
- [35]COSTA TM, MORGADO PGM, CAVALCANTE FS, DAMASCO AP, NOUÉR AS, SANTOS KRN. Clinical and Microbiological Characteristics of Heteroresistant and Vancomycin- Intermediate *Staphylococcus aureus* from Bloodstream Infections in a Brazilian Teaching Hospital *PLOS ONE* 2016, 11; 2-11
- [36]SILVEIRA AC, SAMBRANO GE, PAIM TG, CAIERÃO J, CORDOVA CM, D'AZEVEDO PA. Is prediffusion test an alternative to improve accuracy in screening hVISA strains and to detect susceptibility to glycopeptides/lipopeptides? *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014, 79; 401-04
- [37]PALAZZO ICV, ARAUJO MLC, DARINI ALC. First Report of Vancomycin-Resistant *Staphylococci* Isolated from Healthy Carriers in Brazil. *J Clin Microbiol.* 2005, 43; 179-185.
- [38]REIPERT A, EHLERT K, KAST T, BIERBAUM G. 2003. Morphological and genetic differences in two isogenic *Staphylococcus aureus* strains with decreased susceptibilities to vancomycin. *Antimicrob. Agents Chemother* 2003, 47 568-576
- [39]CÁZARES-DOMÍNGUEZ V, CRUZ-CÓRDOVA, A, OCHOA AS, ESCALONA G, ARELLANO-GALINDO J, RODRÍGUEZ-LEVIZ A, HERNÁNDEZ-CASTRO R, LÓPEZ-VILLEGAS EO, XICOHTENCATL-CORTES J. Vancomycin Tolerant, Methicillin-Resistant

Staphylococcus aureus Reveals the Effects of Vancomycin on Cell Wall Thickening, *PLoS ONE* , 2015, 10; 1-16

[40]GARCÍA AB, VIÑUELA-PRIETO JM, LÓPEZ-GONZÁLEZ L, CANDEL FJ. Correlation between resistance mechanisms in *Staphylococcus aureus* and cell wall and septum thickening, *Infection and Drug Resistance* 2017, 10; 353–356

[41]SIERADZKI K, TOMASZ A. Gradual Alterations in Cell Wall Structure and Metabolism in Vancomycin-Resistant Mutants of *Staphylococcus aureus* *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* 1999, 181; 7566–7570.

[42]CUI L, MA X, SATO K, OKUMA K, TENOVER FC, MAMIZUKA EM, GEMMELL CG, KIM M, PLOY MC, SOLH NE, FERRAZ V, HIRAMATSU K. Cell Wall Thickening Is a Common Feature of Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*, *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* 2003, 41;5–14

[43]SANTOS-BENEIT F, ORDÓÑEZ-ROBLES M, MARTÍN JF. Glycopeptide resistance: Links with inorganic phosphate metabolism and cell envelope stress, *Biochemical Pharmacology* 2017, 133;74–85

[44]HU Q, PENG H, RAO X. Molecular Events for Promotion of Vancomycin Resistance in Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus*, *Front. Microbiol* 2016, 7;1-18.

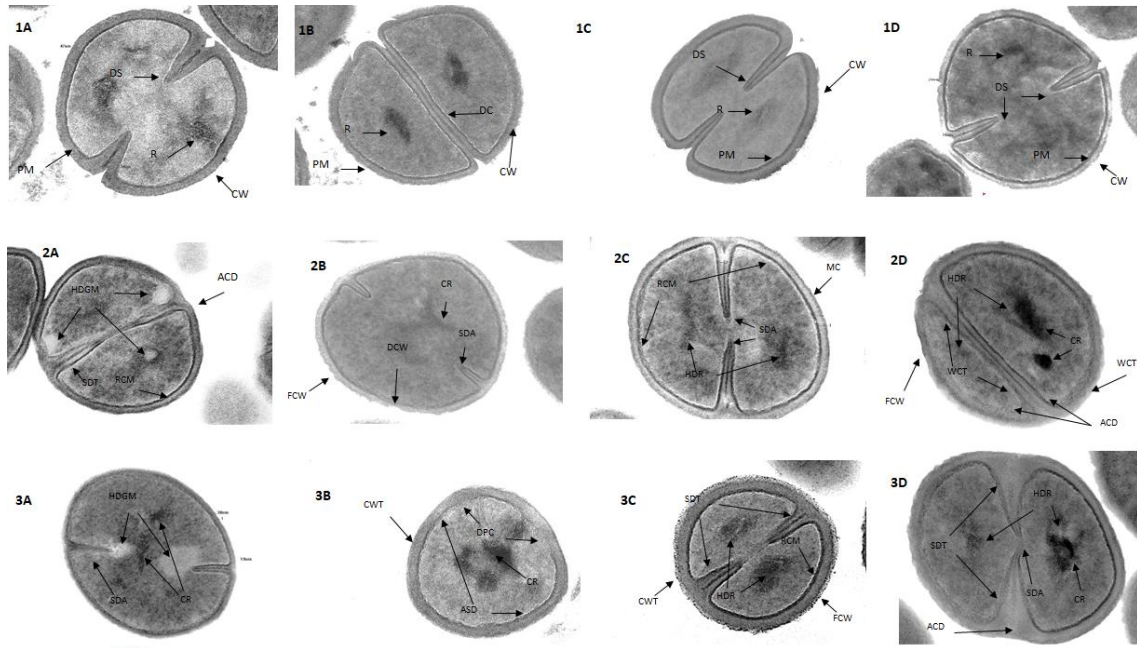


Fig.1 –Electron transmission microscope images: 1) *Staphylococcus* spp. – untreated control (1A, 1B, 1C and 1D) - cocci in cell division presented (Plasma Membrane – PM; Ribossomes – R; Cell Wall – CW; Divison Spectrum – DS) 2) *Staphylococcus* spp. after exposure to vancomycin with intermediate resistance profile ($4 \leq \text{MIC} \leq 8 \mu\text{g} / \text{mL}$) for 24 hours at 37°C : **A** - Aborted cell division (ACD), Heterogeneous Division of genetic material (HDGM) Splitting septal thickening (SDT); Retention of the cytoplasmic membrane (RCM); **B** - Condensation of ribosomes in cell center (CR), Fluctuation cell wall (FCW), Septum division anomalous (SDA); Destruction of cell wraps (DCW - PC, MC); **C** Septum Division Anomalous (SDA), Enlarged cell (EC), Heterogeneous ribosome division (HDR), Retraction Plasma membrane (RPM); **D** - Condensation Ribosome (CR), Heterogeneous Ribosomal Division (HDR), Aborted Asymmetric Cell Division (AACD), Fluctuation cell wall (FCW), Cell Wall Thickness (CWT), Split Division Thickness (SDT); 3) *Staphylococcus* spp. after exposure to vancomycin with resistant resistance profile ($\text{MIC} \geq 32 \mu\text{g} / \text{mL}$) for 24 hours at 37°C : **A** – *Staphylococcus* with gene *vanA* with septum division anomalous (SDA), heterogeneous division of genetic material (HDGM), condensation ribosome (CR); Cell wall thickness (CWT), absence of septum division (ASD), Cytoplasmic membrane destruction (CPD) Condensation of ribosome without cell center (CR); CWT, dividing septum thickening (SDT), heterogeneous ribosome division (HDR), cytoplasmic membrane retraction (RCM), Fluctuation cell wall (FCW); **D** - Condensation Ribosome (CR), Heterogeneous Division Ribosomal (HDR), dividing septum thickness (SDT), Splitting Division Anomalous (SDA), Aborted Cell Division (ACD).

25/01/2018 Gmail - Successfully received: submission Ultrastructural changes in vancomycin-sensitive and vancomycin-resistant strains of Staphyloc...



Armando Monteiro <monteiro.armando10@gmail.com>

Successfully received: submission Ultrastructural changes in vancomycin-sensitive and vancomycin-resistant strains of Staphylococcus species obtained from healthcare workers. for Biomedical Journal

1 mensagem

Biomedical Journal <Evisesupport@elsevier.com>
Responder a: bj@elsevier.com
Para: monteiro.armando10@gmail.com

21 de janeiro de 2018 20:44

This message was sent automatically. Please do not reply.

Ref: BJ_2018_25

Title: Ultrastructural changes in vancomycin-sensitive and vancomycin-resistant strains of Staphylococcus species obtained from healthcare workers.

Journal: Biomedical Journal

Dear Mr. Monteiro Bezerra Neto,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Biomedical Journal. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at: http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=BJ and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Biomedical Journal

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2018 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156877.