

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DAS METODOLOGIAS DE DETECÇÃO
BACTERIANA E DE RESISTÊNCIA DOS
Staphylococcus COAGULASE NEGATIVA ISOLADOS
DAS BOLSAS DE CONCENTRADOS PLAQUETÁRIOS**

TESE DE DOUTORADO

Rosiéli Martini

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

**AVALIAÇÃO DAS METODOLOGIAS DE DETECÇÃO
BACTERIANA E DE RESISTÊNCIA DOS *Staphylococcus*
COAGULASE NEGATIVA ISOLADOS DAS BOLSAS DE
CONCENTRADOS PLAQUETÁRIOS**

Rosiéli Martini

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosmari Hörner
Coorientador: Prof. Dr. Daniel Ângelo Sganzerla Graichen

Santa Maria, RS, Brasil
2015

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

MARTINI, ROSIÉLI
AVALIAÇÃO DAS METODOLOGIAS DE DETECÇÃO BACTERIANA E
DE RESISTÊNCIA DOS *Staphylococcus COAGULASE NEGATIVA*
ISOLADOS DAS BOLSAS DE CONCENTRADOS PLAQUETÁRIOS /
ROSIÉLI MARTINI.-2015.
186 p.; 30cm

Orientadora: ROSMARI HORNER
Coorientador: DANIEL ÂNGELO SGANZERLA GRAICHEN
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2015

1. microbiologia 2. biofilme 3. reação séptica
transfusional 4. *Staphylococcus coagulase negativa* 5.
concentrados plaquetários I. HORNER, ROSMARI II.
GRAICHEN, DANIEL ÂNGELO SGANZERLA III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

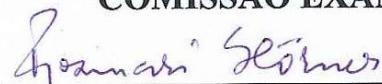
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**AVALIAÇÃO DAS METODOLOGIAS DE DETECÇÃO BACTERIANA
E DE RESISTÊNCIA DOS *Staphylococcus* COAGULASE NEGATIVA
ISOLADOS DAS BOLSAS DE CONCENTRADOS PLAQUETÁRIOS**

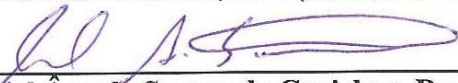
elaborada por
Rosiéli Martini

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciências Farmacêuticas

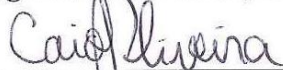
COMISSÃO EXAMINADORA:



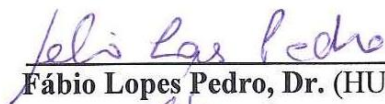
Rosmari Hörner, Dr^a. (Presidente/Orientadora/UFSM)



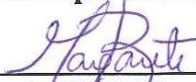
Daniel Angelo Sganzerla Graichen, Dr. (Coorientador/UFSM)



Caio Fernando de Oliveira, Dr. (UNISC)



Fábio Lopes Pedro, Dr. (HUSM)



Margarete Dulce Bagatini, Dr^a. (UFFS)



Virgínia Maria Cóser, Dr^a. (HUSM)

Santa Maria, 22 de Maio de 2015.

*Dedico esta conquista, em especial, aos meus pais Claudio e Ires
e as minhas irmãs Franciele e Andreia!
Eles que sempre acreditaram em mim e me incentivaram.
Obrigada por todo o amor, dedicação, carinho e apoio.
Amo vocês!!!*

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus e Pai pela presença constante em minha vida, te agradeço por ter permitido que eu tivesse força e saúde para chegar até aqui. Obrigada por tudo em minha vida, sejam vitórias, sejam lutas e principalmente pelas conquistas e por todo o seu amor. *"Se vós estiverdes em mim, e as minhas palavras estiverem em vós, pedireis tudo o que quiserdes, e vos será feito"* (João 15:7).

Agradeço especialmente aos meus pais, Claudio e Ires, por todo o amor, ensino, apoio e, principalmente, doação. Por me ensinarem os valores que fazem parte de uma pessoa de verdade e por acreditarem nos meus sonhos. *"A vocês, que se doaram por inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que muitas vezes, eu pudesse realizar os meus."*

Às minhas maninhas lindas Franciele e Andreia, por fazerem parte do meu crescimento, pelo amor, apoio, carinho e confiança. Agradeço todos os dias por eu ter essa família maravilhosa e por vocês serem além de minhas irmãs as minhas melhores amigas. *"Ter uma irmã é ter companhia para uma vida inteira."*

A todos os meus amigos, principalmente as minhas *"the best and forever"*: as Patrícias da minha vida, a Tarci e a Cris. Obrigada pelas palavras de incentivo, pelo apoio constante, pelo ombro amigo que sempre esteve presente na hora que lágrimas rolaram, mas, principalmente, por todas as gargalhadas que compartilhamos juntas. *"Amigo a gente não procura, o coração da gente é quem encontra."*

À minha orientadora professora Rosmari Hörner, agradeço por trilhar comigo esse caminho com muito carinho. Aquela amiga que sempre me incentivou e lado a lado me fez chegar até aqui. *"Ao longo de tua caminhada tu guiaste o meu caminho, mostraste a cada momento compreensão, luta, paciência, inteligência e dedicação"*. Muito obrigada.

Ao meu coorientador professor Daniel Ângelo Sganzerla Graichen agradeço por todos os ensinamentos e por todo o tempo que disponibilizou para responder minhas dúvidas, por estar sempre presente, nos momentos de preocupações e de alegria. Obrigada por todo o incentivo.

À minha madrinha Ivanete, aos meus avós Augusto e Assunta, minha vizinha Maria (*in memoriam*) e toda a minha família, vocês fazem parte desta conquista.

Ao meu pequeno Smuffy, que através de um simples olhar sempre demonstrou o companheirismo e a alegria durante toda essa trajetória, mesmo nos dias tristes com todo o seu carinho e alegria conseguiu me deixar feliz. *"Os animais já nascem sabendo amar!"*

Aos colegas do LabMicro e do LaBac/CCS por poder compartilhar as minhas experiências e dúvidas e aprender cada dia mais com cada um de vocês.

À Universidade Federal de Santa Maria, ao programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

A toda a equipe do HEMORGS de Santa Maria e do Banco de Sangue do Hospital Universitário de Santa Maria, especialmente a Viviane e ao Zanoni.

A toda a equipe do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Santa Maria, especialmente as farmacêuticas do setor de Microbiologia.

A toda a equipe do Laboratório de Genética Evolutiva (GenEvo) do Centro de Educação Superior Norte (CESNORS), especialmente a bióloga Mayza.

A todos os professores do curso de Farmácia e da Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria.

Muito obrigada a todos por esta conquista.

*“Nas grandes batalhas da vida,
o primeiro passo para a vitória
é o desejo de vencer.”
Mahatma Gandhi*

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

AVALIAÇÃO DAS METODOLOGIAS DE DETECÇÃO BACTERIANA E DE RESISTÊNCIA DOS *Staphylococcus* COAGULASE NEGATIVA ISOLADOS DAS BOLSAS DE CONCENTRADOS PLAQUETÁRIOS

AUTORA: ROSIÉLI MARTINI

ORIENTADORA: ROSMARI HÖRNER

COORIENTADOR: DANIEL ÂNGELO SGANZERLA GRAICHEN

Santa Maria, 22 de Maio de 2015.

A terapia de transfusões de plaquetas vem desempenhando um papel importante na conduta do tratamento de pacientes com doenças hematológicas e oncológicas, mas representa um risco para sepse bacteriana. Os concentrados de plaquetas (CPs) são os componentes do sangue com a maior taxa de contaminação bacteriana e são responsáveis pela grande maioria das reações sépticas transfusionais. Entre os contaminantes, os *Staphylococcus* coagulase negativa (SCoN) são os mais frequentemente isolados. Sendo assim, o presente trabalho objetivou avaliar os métodos de detecção bacteriana e a identificação dos micro-organismos, bem como investigar o perfil de suscetibilidade, a formação do biofilme e os mecanismos de resistência das cepas de *Staphylococcus* isoladas das bolsas de CPs. As unidades de CPs foram provenientes do Hemocentro do Estado do Rio Grande do Sul (HEMORGS), localizado na cidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul. Empregaram-se técnicas de cultura qualitativa, quantitativa e de crescimento diário para a detecção da contaminação bacteriana. Os micro-organismos isolados foram identificados através do VITEK® 2, e por meio de testes convencionais e automatizados foi determinado o perfil de suscetibilidade. O biofilme e os mecanismos de resistências foram avaliados por testes fenotípicos e pela investigação da presença dos genes. Detectou-se uma elevada taxa de contaminação bacteriana (2,32% - 16/691) e o melhor método para a detecção foi a associação das metodologias quantitativa e qualitativa. Todos os contaminantes foram caracterizados como SCoN e *S. haemolyticus* foi a espécie predominante (31,25%). Todos os isolados foram suscetíveis à vancomicina e apresentaram resistência à penicilina e a benzilpenicilina. Aproximadamente 62,5% foram resistentes à clindamicina e à eritromicina, e 50% foram classificadas como cepas resistentes a múltiplas drogas (MDR). Constatou-se: a formação do biofilme e a presença dos genes *icaACD*, cepas MRSCoN e a presença do gene *mecA*; Teste D positivo (iMLS_B) e os genes *ermAC*. Recomenda-se o uso do teste em aderência em tubo de borossilicato (ABT) para a detecção da formação do biofilme e do Teste D para investigar a resistência iMLS_B, em SCoN. Pode-se concluir que todas as espécies identificadas são habitantes da microbiota cutânea e a provável causa da contaminação das bolsas foi a pele do doador. A associação de sistemas de cultura irá reduzir os riscos de transfusões de CPs contaminados e das reações sépticas transfusionais. Além disso, os resultados obtidos mostram a necessidade do alerta sobre a importância do conhecimento da virulência e das resistências apresentadas por micro-organismos isolados de CPs e ainda, espera-se que esses dados sejam um estímulo para pesquisas nessa área.

Palavras-chaves: Concentrados plaquetários; *Staphylococcus*; reação séptica transfusional; biofilme; suscetibilidade; genes.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Post-graduate Program in Pharmaceutical Sciences
Universidade Federal de Santa Maria

ASSESSMENT OF METHODS OF BACTERIAL DETECTION AND RESISTANCE OF COAGULASE-NEGATIVE STAPHYLOCOCCI ISOLATED FROM BAGS OF PLATELET CONCENTRATES

AUTHOR: ROSIÉLI MARTINI

ADVISOR: ROSMARI HÖRNER

CO-ADVISOR: DANIEL ÂNGELO SGANZERLA GRAICHEN

Santa Maria, May 22nd, 2015.

Platelet transfusion therapy has played an important role in the treatment of patients with hematological and oncological diseases. However, platelet transfusion represents a risk for bacterial sepsis. Platelet Concentrates (PCs) are blood components with the highest rate of bacterial contamination, being responsible for the vast majority of septic transfusion reactions. Among contaminants, coagulase-negative Staphylococci (CoNS) are the most frequently isolated. Therefore, this study aimed to assess the methods of bacterial detection and micro-organisms identification, as well as to investigate the susceptibility profile, biofilm formation and the mechanisms of resistance of Staphylococci strains isolated from bags of PCs. The PCs units were obtained from the Blood Bank of the State of Rio Grande do Sul (HEMORGS), in Santa Maria. Qualitative and quantitative culture techniques and daily growth were employed to detect bacterial contamination. The isolated micro-organisms were identified through VITEK® 2, and the susceptibility profile was determined by means of conventional and automated testing. Biofilm and mechanisms of resistance were assessed by phenotypic tests and investigation of the presence of genes. A high rate of bacterial contamination was detected (2.32% - 16/691) and the best method for detection were the combination of quantitative and qualitative methodologies. All contaminants were characterized as CoNS and *S. haemolyticus* was the predominant specie (31.25%). All isolates were susceptible to vancomycin and resistant to penicillin and benzylpenicillin. Approximately 62.5% were resistant to clindamycin and erythromycin, and 50% were classified as multiple drug resistance (MDR) strains. Furthermore, biofilm formation and the presence of *icaACD* genes were detected, as well as MRSCoN strains, and presence of the *mecA* gene, D-Test positive (iMLS_B) and *ermAC* genes. The use of adhesion in borosilicate tube (ABT) test for the detection of biofilm formation, and D-Test to investigate the iMLS_B resistance, in CoNS, are recommended. Thus, we concluded that all identified species are inhabitants of the skin flora and the most probable cause of bags contamination is the skin of the donor. The association of culture systems will reduce the risk of transfusion of contaminated PCs and septic transfusion reactions. Moreover, the results show the need for attention to knowing the virulence and resistance shown by micro-organisms isolated from PCs, and it is expected that this study be a stimulus for more research in this area.

Keywords: Platelet concentrates; staphylococci; septic transfusion reaction; biofilm; susceptibility; genes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1 Introdução

- Figura 1 - Escala de obtenção de hemocomponentes e hemoderivados originados a partir do sangue total. 32
- Figura 2 - Formação do biofilme em quatro etapas: 1: adesão primária e rápida da célula bacteriana na superfície do corpo estranho seguido do revestimento destas células por proteínas da matriz extracelular do hospedeiro; 2: acúmulo do biofilme com as bactérias se proliferando e se acumulando para formar várias camadas de agregados de células que são incorporados na matriz extracelular; 3: amadurecimento do biofilme com circulação de nutrientes para as células nas camadas mais profundas; e 4: desprendimento celular com disseminação e colonização dos micro-organismos em outros sítios 47

2 Publicações Científicas

2.1 Artigo 1

- Figura 1 - Distribuição das amostras positivas de acordo com a técnica de detecção bacteriana utilizada..... 71

2.2 Artigo 2

- Figure 1 - Distribution of the 16 species of coagulase-negative staphylococci isolated from 691 bags of Platelet Concentrates. 94

LISTA DE TABELAS

1 Introdução

Tabela 1 - Limites de detecção de alguns métodos empregados para a determinação da contaminação bacteriana em CPs atualmente disponíveis.....	36
---	----

2 Publicações Científicas

2.1 Artigo 1

Tabela 1 - Distribuição dos índices de contaminação bacteriana em amostras de plaquetas de acordo com o dia de incubação no CMH, pela técnica do crescimento diário	72
---	----

2.2 Artigo 2

Table 1: Results regarding the research of genes <i>icaA</i> , C and D in the 16 samples of coagulase-negative staphylococci isolates from Platelet Concentrates, by the Polymerase Chain Reaction technique and the phenotypic tests for biofilm production.	95
--	----

2.3 Manuscrito 1

Table 1 - Comparison of the susceptibility profile of the 16 isolates of coagulase-negative Staphylococci from Platelet Concentrates, using the qualitative methodologies of Disk Diffusion and VITEK® 2, according to the criteria of CLSI ¹⁴	115
Table 2 - Analysis of MRCoNS of the 16 coagulase-negative <i>Staphylococcus</i> isolates from Platelet Concentrates through the phenotypic tests of Cefoxitin Disk Diffusion, screening of cefoxitin by VITEK® 2, research of the gene <i>mecA</i> by the Polymerase Chain Reaction technique.....	118
Table 3 - Analysis of resistance of the 16 isolates of coagulase-negative <i>Staphylococcus</i> of Platelet Concentrates against the antimicrobials of the MLS class of group B through the phenotypic tests of disk diffusion, screening of inducible/constitutive resistance of clindamycin by VITEK® 2, and the research of the genes <i>ermA</i> , B and C by Polymerase Chain Reaction technique.....	119

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AABB	<i>American Association of Blood Banks</i>
Aap	<i>Accumulation-associated protein</i>
ABT/ATB	<i>Adhesion in borosilicate tube/Adesão em Tubo de Borossilicato</i>
<i>agr</i>	<i>accessory gene regulator</i>
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AS/BA	Ágar Sangue/ <i>Blood Agar</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AtlE	<i>Autolysin E</i>
Bap	<i>Biofilm-associated protein</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
<i>bhp</i>	<i>bap homology protein</i>
bpm	batimentos cardíacos por minuto
BORSA	Resistência <i>Borderline</i> à Oxacilina
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
<i>Ccr</i>	<i>cassette chromosome recombinases</i>
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
CESNORS	Centro de Educação Superior Norte do Rio Grande do Sul
CGP	Cocos Gram Positivos
CIM/MIC	Concentração Inibitória Mínima/ <i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
cm	centímetro
cMLS _B	Resistência constitutiva ao grupo MLS _B
CO ₂	Dióxido de Carbono ou Gás Carbônico
CPs/PCs	Concentrados Plaquetários/ <i>Platelet Concentrates</i>
CRA/ACV	<i>Congo Red Agar/Ágar Congo Vermelho</i>
DACT	Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
DD	Disusão do disco
DNA/ADN	<i>Deoxyribonucleic Acid/Ácido Desoxirribonucleico</i>
<i>eBDs</i>	<i>enhanced bacterial detection system</i>
EmpP	<i>Extracellularmatrix binding protein</i>
<i>erm</i>	<i>erythromycin ribosome methylation</i>
EPS	Matriz Exopolissacarídea
EUA	Estados Unidos Da América
<i>FACs</i>	<i>Fluorescence-activated cell sorting analysis</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
<i>fem</i>	<i>factor essential for methicillin resistance</i>
GehD	<i>Collagen-binding protein</i>
GenEvo	Laboratório de Genética Evolutiva
GN	Gram-negativos (as)
GP	Gram-positivos (as)
h	hora (s)
HEMORGS	Hemocentro do Estado do Rio Grande do Sul
HUSM	Hospital Universitário de Santa Maria
<i>ica</i>	<i>intercellular gene cluster adhesion</i>
iMLS _B	Resistência induzida ao grupo MLS _B

ipm	incursões por minuto
K	Índice Kappa
<i>luxS</i>	<i>system luxS</i>
MDR	<i>Multiple Drug Resistance</i>
ME	<i>Major Error</i>
MiE	<i>Minor Error</i>
MHB/CMH	<i>Mueller Hinton Broth/Caldo Mueller Hinton</i>
mL	mililitro
MLS _B	Macrolídeos, Lincosamidas e Estreptograminas do grupo B
mm	milímetros
mm ³	milímetros cúbicos
mmHg	milímetros de Mercúrio
MODSA	Baixa afinidade à oxacilina
MRS	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus</i>
MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
MRCoNS/MRSCoN	<i>Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci/ Staphylococcus Coagulase Negativa resistentes à meticilina</i>
MS _B	Macrolídeo e Estreptograminas do grupo B
MSCRAMMs	<i>Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules</i>
NAT	<i>Nucleic acid amplification techniques</i>
PBPs	<i>Penicillin Binding Proteins</i>
PBP2a	<i>Penicillin Binding Proteins 2A</i>
pCO ₂	Pressão parcial de Dióxido de Carbono
PCR/RCP	<i>Polymerase Chain Reaction/Reação em Cadeia de Polimerase</i>
PGD	<i>Pan genera detection</i>
PIA	<i>Polyssacharide Intercellular Adhesine</i>
PPGCF	Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas
PPR	Penicilina-penicilinase resistente
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA/ARN	<i>Ribonucleic Acid/Ácido Ribonucleico</i>
RNAr	<i>ribossomal Ribonucleic Acid</i>
rpm	rotações por minuto
RS	Rio Grande do Sul
RT-PCR	<i>Real Time - Polymerase Chain Reaction</i>
SCC _{mec}	<i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i>
SCoN/CoNS	<i>Staphylococcus Coagulase Negativa/Coagulase-Negative Staphylococci</i>
SdrG	<i>Surface-associated fibrinogen binding protein</i>
SENTRY	<i>Antimicrobial Surveillance Program</i>
SM	Santa Maria
TSA	<i>Trypticase Soy Agar</i>
TSB	<i>Trypticase Soy Broth</i>
TTI	<i>Transfusion Transmitted Infections</i>
UFC/CFU	Unidades Formadoras de Colônia/ <i>Colony-Forming Units</i>
VME	<i>Very Major Error</i>
VPN/NPV	Valor Preditivo Negativo/ <i>Negative Predictive Value</i>
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetros

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, nº 34 de 11 de junho de 2014.....	167
Anexo B - Portaria nº 2.712 de 12 de novembro de 2013	169
Anexo C - Registro no Comitê de Ética em Pesquisa	171
Anexo D - Publicação do Artigo 1	175
Anexo E - Carta de Aceite do Artigo 2	177

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A - Resultados do Alinhamento Genético - Artigo 2	181
Apêndice B - Técnica da Macrodiluição em Caldo - Vancomicina - Manuscrito 1	185

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	31
1.1 Concentrados Plaquetários	31
1.2 Contaminação bacteriana	33
1.3 Reações sépticas	37
1.4 <i>Staphylococcus</i> spp.	40
1.5 Patogenicidade dos <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa	41
1.6 Biofilme bacteriano	44
1.7 Resistência a meticilina/oxacilina de <i>Staphylococcus</i> - MRSCoN	50
1.8 Resistência aos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas do grupo B de <i>Staphylococcus</i> - MLS_B	55
1.9 Justificativa	57
1.10 Objetivos	58
1.10.1 Objetivo principal	58
1.10.2 Objetivos específicos.....	58
2 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS	61
2.1 Artigo 1 - Avaliação do Desempenho de Culturas Convencionais na Detecção da Contaminação Bacteriana em Concentrados Plaquetários em um Hospital Universitário do Sul do Brasil	63
Resumo	67
Introdução	67
Material e métodos	69
Amostras	69
Ensaio	70
Qualitativo	70
Quantitativo	70
Crescimento diário.....	70
Identificação bacteriana	71
Conceitos éticos	71
Resultados	71
Discussão	73
Agradecimento	74
Conflito de interesse	74
Abstract	75
Referências - Literatura citada	77
2.2 Artigo 2 - Investigation of biofilm formation in coagulase-negative staphylococci isolated from bags of Platelet Concentrates	81
Abstract	85
Resumo	87
1 Introduction	89
2 Materials and methods	90
2.1 Inclusion criteria for bacterial isolates	90
2.1.1 Assays for bacterial detection in PCs ³⁹	92
2.2 Bacterial isolates of the 691 PCs	92
2.3 Phenotypic identification	92
2.4 Sample preparation	92
2.5 Amplification of the gene 16S of ribosomal RNA (RNAr)	93
2.6 Phenotypic methods for the research of biofilm production	93

2.6.1 Adhesion in borosilicate tube (ABT).....	93
2.6.2 Congo red agar (CRA).....	93
2.7 Genotypic method for the research of biofilm production.....	93
2.8 Statistical analysis.....	93
2.9 Ethical considerations.....	93
3 Results	94
4 Discussion	95
5 Acknowledgments	98
6 Conflict of interest	98
7 References - Literatura citada	98
2.3 Manuscrito 1 - Antimicrobial susceptibility profile and research of <i>mecA</i> and <i>erm</i> genes in coagulase-negative <i>Staphylococci</i> isolated from bags of Platelet Concentrates	105
Abstract	109
1 Introduction	111
2 Materials and methods	112
2.1 Inclusion criteria for bacterial isolates.....	112
2.2 Susceptibility testing against antimicrobial agents by disk diffusion and VITEK® 2; and determination of minimum inhibitory concentration of vancomycin.....	112
2.3 Phenotypic and genotypic analyses of genes of resistance.....	112
2.4 Amplification of the gene 16S of ribosomal RNA (RNAr).....	113
2.5 Identification of MRCoNS.....	113
2.6 Resistance detection of macrolides, lincosamides and streptogramins of group B.....	113
2.7 Statistical analysis.....	113
2.8 Ethical considerations.....	113
3 Results and Discussion	114
4 Acknowledgments	121
5 Conflict of interest	121
6 References - Literatura citada	121
3 DISCUSSÃO	127
4 CONCLUSÕES	137
REFERÊNCIAS	139
ANEXOS	165
APÊNDICES	179

APRESENTAÇÃO

Esta tese de doutorado está estruturada em seções dispostas na seguinte forma: **INTRODUÇÃO, PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES e REFERÊNCIAS.**

Os itens **MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO DOS RESULTADOS e REFERÊNCIAS** se encontram inseridos nos artigos e no manuscrito que estão contidos na seção denominada **PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS** e representam a íntegra deste estudo.

O item **REFERÊNCIAS** se refere somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO e DISCUSSÃO** desta tese.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Concentrados plaquetários

O primeiro relato de transfusão sanguínea entre animais e o homem ocorreu no ano de 1665 e dois anos depois Jean Batiste Denys descreveu a primeira transfusão sanguínea entre seres humanos (BLOOD-BOOK, 2003). Já em 1911, Duke relatou a primeira transfusão de plaquetas (GOMES; ALBIERO, 2001) e somente em 1964, foi descrito o primeiro relato de transfusão de concentrados plaquetários (CPs) (ÁSTER; JANDL, 1964). As plaquetas são transfundidas na forma de CPs, que são uma suspensão de plaquetas em plasma, preparados por dupla centrifugação do sangue total ou obtidos pelo método de aférese (BRASIL, 2010a).

Nos serviços de hemoterapia os produtos derivados do sangue total são separados um a um através de processos físicos como centrifugação e congelamento e são denominados hemocomponentes, tais como: plasma, CPs, concentrado de hemácias ou glóbulos vermelhos e crioprecipitado. Já os produtos preparados em escala industrial, a partir do fracionamento do plasma e por processos físico-químicos, são chamados de hemoderivados, tais como: albumina, globulinas e os fatores de coagulação (BRASIL, 2010b) (Figura 1). Os componentes sanguíneos também podem ser obtidos por aférese. Este método envolve o uso de um equipamento de separador de células, onde a circulação do sangue do doador é conectada a uma centrífuga; a separação ocorre durante a coleta, na qual determinado componente é transferido para uma bolsa e os demais retornam ao doador (MOHAMMADI, 2006). Atualmente, os CPs são armazenados em temperatura ambiente, entre 22 ± 2 °C, sob agitação constante e possuem validade de três a cinco dias (BRASIL, 2010a).

Anteriormente, as plaquetas eram armazenadas em uma temperatura de 4 °C (MOLLISON et al., 1993; YOMTOVIAN, 2004), porém, sob essas condições a viabilidade e a hemostasia eram afetadas. A temperatura ambiente e o armazenamento por três dias foram propostos na década de 70. Em 1981, com o desenvolvimento das bolsas de plástico permeáveis ao gás, com a finalidade de preservar a qualidade das plaquetas em temperatura ambiente, a vida útil dos CPs foi prorrogada para cinco dias e em 1984 para sete. No entanto, o armazenamento nestas condições favorecia a propagação do crescimento bacteriano (MOHAMMADI, 2006). Em 1986 o fator determinante para a redução do tempo de armazenamento para cinco dias foi devido ao aumento do índice de transmissão de bactérias por infusão de CPs contaminados. Nos dias de hoje, com o surgimento das novas

metodologias de detecção, o tempo de armazenamento permitido pelo *Food and Drug Administration* (FDA) é de sete dias nos Estados Unidos da América (EUA) (FDA, 2004) e no Brasil, de acordo com a legislação vigente, é de três a cinco dias (BRASIL, 2010a).

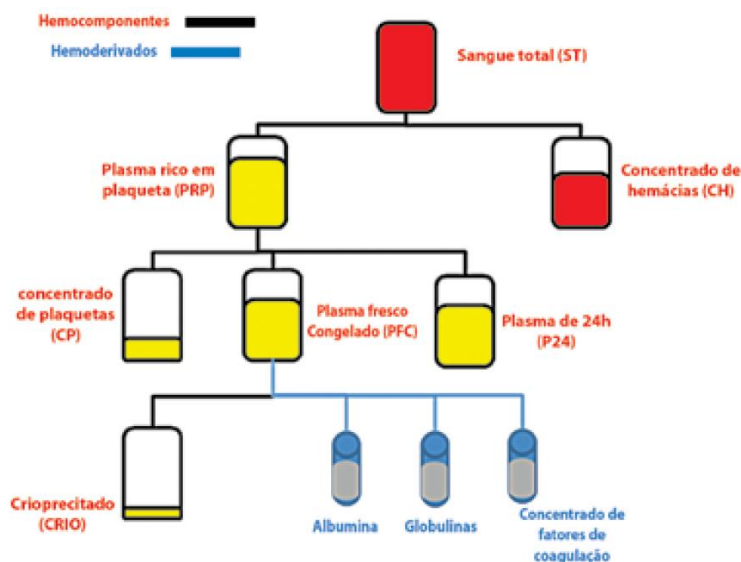


Figura 1 - Escala de obtenção de hemocomponentes e hemoderivados originados a partir do sangue total.

Fonte: Adaptado de BRASIL, 1998.

A transfusão de hemocomponentes é um processo indispensável na terapia moderna, podendo salvar vidas e melhorar a saúde dos receptores. A transfusão de CPs é essencial no tratamento de pacientes, especialmente da unidade de hematologia-oncologia e necessária também para manter a hemostasia em procedimentos cirúrgicos. Sendo uma forma de reduzir os riscos de hemorragias que são mais frequentes em pacientes portadores de neoplasias, em tratamento quimioterápico, submetidos a transplantes ou com falência de medula óssea (NIU et al., 2006). Contudo, como outras intervenções terapêuticas, a transfusão de CPs pode levar a complicações agudas ou tardias, referindo-se, principalmente, as chances de risco de transmissão de agentes infecciosos, como as bactérias (BRASIL, 2010b).

A detecção da contaminação nos CPs é realizada através de exames bacteriológicos, os quais constituem procedimentos de rotina nos hemocentros dos países acreditados pelo FDA. A partir de 2004, conforme determinação da Associação Americana dos Bancos de Sangue, devem ser empregadas medidas para detectar e limitar a presença de bactérias em todos os CPs, porém, não houve indicação de uma metodologia padrão (AABB, 2004). No Brasil, a

regulamentação sobre que dispõe sobre as boas práticas no ciclo do sangue é a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) nº 34, de 11 de junho de 2014, a qual determina que a cultura de triagem seja realizada em apenas 1% da produção mensal ou em dez unidades por mês (ANEXO A) (BRASIL, 2014).

No entanto, a Portaria nº 2.712, de 12 de novembro de 2013, que redefine o regulamento técnico dos procedimentos hemoterápicos descreve que, em relação ao controle bacteriológico de CPs continua sendo igual ao relatado pela anterior RDC (nº 57, 16.12.2010) e pela atual RDC (nº 34, 11.06.2014) (BRASIL, 2010a e 2014). Entretanto, com a adição do parágrafo oito (§ 8) do artigo 116, recomenda: *“Pelo alto risco de contaminação microbiológica dos concentrados de plaquetas pela sua condição de armazenamento, recomenda-se realização de avaliação de contaminação microbiológica em 100% desta produção”* (ANEXO B) (BRASIL, 2013).

1.2 Contaminação bacteriana

As bactérias foram reconhecidas como risco para doenças infecciosas ainda quando o sangue era coletado em garrafas de vidro (MOLLISON et al., 1993). As transfusões sanguíneas com suspeita de transmissão de bactérias vêm sendo descritas há mais de meio século (NOVAK, 1939). A introdução dos sistemas fechados vem contribuindo para a redução desse risco, mas apesar das melhorias realizadas nos sistemas de triagem, nos métodos de armazenamento e nos procedimentos de antisepsia, a contaminação bacteriana continua sendo o foco de preocupação para a medicina transfusional (BERKOW et al., 2003), especialmente através da infusão de CPs (HILLYER et al, 2003; YOMTOVIAN, 2004).

O índice de contaminação bacteriana em CPs é muito variável, dependente da metodologia de cultura empregada, bem como do local do estudo e do tempo (horas) de coleta das amostras (VASSALO; MURPHY, 2006). O risco de transfusão de unidades de CPs contaminados pode ser tão alto quanto um em cada 150 transfusões em pacientes das unidades de hematologia-oncologia (CORASH, 2011). De acordo com estudos de vigilância, que abrangem dez centros de sangue de diversos países, a taxa de contaminação em unidades de CPs pode variar entre 0,01% a 1% (RAMIREZ-ARCOS; GOLDMAN, 2012). Já outro estudo, com dados de 18 contribuições de investigações de 16 diferentes países, foi relatado o índice de contaminação de 0,01% a 0,08% (PIETERSZ et al., 2014). A sepse bacteriana é considerada a segunda causa mais comum de óbitos devido às transfusões (primeiro lugar é a incompatibilidade), com taxas de mortalidade variando entre 1/20.000 a 1/85.000

(BLAJCHMAN, 2004). Os CPs têm a maior frequência e, portanto, a maior probabilidade de provocar reações sépticas transfusionais. Isto se deve principalmente pela sua temperatura de estocagem, que proporciona o crescimento bacteriano das bactérias que colonizam a pele (MCDONALD et al., 2004).

No Brasil há poucos dados referentes à contaminação bacteriana em CPs; um dos mais conhecidos é o estudo realizado em Goiânia que apresentou uma taxa de contaminação de 0,4% dos CPs (CUNHA et al., 2008) e o estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa o qual detectou um índice de contaminação bacteriana em CPs de 1,47% (MARTINI et al., 2012). Os cocos Gram positivos (CGP) são os responsáveis por aproximadamente 58% dos casos de contaminação bacteriana (ANDREU et al., 2002). Entre esses, destacam-se os *Staphylococcus coagulase negativa* (SCoN/CoNS) que são considerados patógenos causadores de infecções hospitalares e comunitárias (GIBSON; NORRIS, 1958) e *Staphylococcus epidermidis* é a espécie mais prevalente em CPs (HSUEH et al., 2009; MARTÍNEZ et al., 2010; WALTHER-WENKE et al., 2010). A grande preocupação relacionada a esses micro-organismos se deve à sua capacidade de desenvolver resistência aos antimicrobianos (KLOOS; BANNERMAN, 1994). Normalmente eles não crescem em temperaturas entre 1 a 6 °C, mas se multiplicam rapidamente nos CPs que são armazenadas entre 20 a 24 °C (BRECHER; HAY, 2005).

As possíveis fontes da origem dos contaminantes de CPs podem ser: bacteremia assintomática de doadores e realização de exames endoscópicos ou procedimentos odontológicos anteriormente à doação (JAFARI et al., 2002; MOHAMMADI, 2006); falha no processo de fabricação e esterilização das bolsas de coleta de sangue (HELTBERG et al., 1993); desinfecção inadequada da pele no local da flebotomia (MOHAMMADI, 2006); utilização de desinfetantes contaminados (GARCIA-ERCE et al., 2002); e a manipulação inapropriada ou o uso de equipamentos/dispositivos não estéreis (MOHAMMADI, 2006). Mesmo sendo difícil determinar a fonte de contaminação de CPs, acredita-se que as principais procedências são as anteriormente citadas, enfatizando a importância da seleção cuidadosa, especialmente dos doadores (TIPPLE et al., 1990), além da necessidade do cuidado extremo durante a coleta e a manufatura dos hemocomponentes (BLAJCHMAN et al., 2004). Contudo, na maioria dos casos, a fonte da contaminação bacteriana permanece não identificada (BRECHER; HAY, 2005).

De maneira geral, micro-organismos oriundos da pele do doador, sejam eles transitórios ou residentes, são responsáveis por cerca de 90% das contaminações (STAINSBY et al., 2003), métodos otimizados de antisepsia são ideais para a redução desse risco (GOLDMAN, 2004). Para o Banco de Sangue da Cruz Vermelha da Austrália, a antisepsia

da pele é considerada a medida mais importante e necessária para a prevenção da contaminação bacteriana (WONG et al., 2004). Uma associação entre o aprimoramento na antisepsia da pele e a eliminação dos primeiros dez mililitros (mL) da coleta podem reduzir entre 75 a 90% da contaminação dos hemocomponentes por bactérias provenientes da pele (AUBUCHON et al., 2002). Através de algumas pesquisas a respeito do desprezo dos primeiros dez mL de sangue os autores relataram uma redução de 0,35 para 0,21% (DE KORTE et al., 2002). Outro estudo reportou que reduziu de 47% da contaminação, quando foi utilizada a eliminação da alíquota inicial, e de 57%, quando associado com um procedimento de desinfecção aprimorado (MCDONALD et al., 2004). Desviar as primeiras alíquotas de sangue constitui procedimento de rotina em alguns países (LEE et al., 2002). Inclusive no Brasil são utilizadas bolsas de coleta de sangue com sítio coletor, o qual armazena os primeiros mL de sangue que serão utilizados para a coleta de amostras e somente depois o sangue passa a ser armazenado na bolsa.

Várias técnicas têm sido sugeridas para a triagem da contaminação bacteriana em CPs, mas nenhuma padronizada. Isso se deve ao fato de nenhuma atender todos os requisitos necessários, destacando em especial: alta sensibilidade e especificidade, curto intervalo de tempo e custo acessível (MITCHELL; BRECHER, 1999). Alguns métodos de detecção bacteriana em CPs utilizados são: parâmetros metabólicos através do consumo de glicose e da produção de ácidos (WERCH et al., 2002; HAY; BRECHER, 2004); microscopia com os corantes de Gram e de laranja de acridina (MITCHELL; BRECHER, 1999); epifluorescência com coloração fluorescente de ácido nucléico e microscopia automatizada (SEAVER et al., 2001); detecção de ácido desoxirribonucléico/ácido ribonucleico (DNA/RNA) por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR) (SEN, 2000); eletroquimioluminescência (CHANEY et al., 1999); amplificação de ácido nucléico (NAT) (STORMER et al., 2007); imunoenensaio com detecção de vários gêneros de bactérias em plaquetas (PGD) (Verax biomedical, Worcester, USA) (HALL et al., 2004); fluorescência ativada por separação celular (FACS) (MOHR et al., 2006); métodos automatizados de cultura como *BacT/Alert*® (BioMérieux, Boxtel, Netherlands) e o sistema de detecção bacteriana aprimorado não automatizado (*eBDS*) (Pall Medical, Covina, CA) (FDA, 2004); redução ou inativação de organismos patogênicos, teste conhecido como *Intercept technology* (SVAOOR et al., 2002), entre outros. A Tabela 1 descreve, resumidamente, alguns ensaios utilizados para a detecção bacteriana em CPs com os limites de detecção da contaminação bacteriana.

Tabela 1 - Limites de detecção de alguns métodos empregados para a determinação da contaminação bacteriana em CPs atualmente disponíveis (MOHAMMADI, 2006; ROOD, 2011).

Sistema de detecção	Límite de detecção (UFC/mL)
BacT/Alert	1x10
RT-PCR	3x10 ¹
DNA/RNA	5x10 ¹
NAT	5x10 ¹
eBDS	1 - 5x10 ²
Scansystem otimizado	1x10 ¹ - 1x10 ³
Imunoensaio	1x10 ³
Epifluorescência	3 - 5x10 ³
Acridina	1x10 ⁴ - 1x10 ⁵
FACS	1x10 ⁵
Eletroquioluminescência	3 - 5x10 ⁵
Gram	1x10 ⁵ - 1x10 ⁶
Parâmetros metabólicos	1x10 ⁷ - 1x10 ⁸

DNA/RNA= detection of Deoxyribonucleic Acid/Ribonucleic Acid; eBDS = enhanced bacterial detection system; FACS = Fluorescence-activated cell sorting analysis; NAT = Nucleic acid amplification techniques; PGD = Pan genera detection; RT-PCR = Real Time - Polymerase Chain Reaction.

No que se refere às metodologias de detecção bacteriana nos bancos de sangue, os CPs na sua maioria são triados por métodos de cultura. Entre estes, o sistema *BacT/Alert*® é usado quase que, exclusivamente, em todos os países onde a triagem bacteriana tem sido implementada (PIETERSZ et al., 2007). Existe também a metodologia convencional com caldo de cultura enriquecido (*Trypticase soy broth* (TSB), *Brain Heart infusion* (BHI) ou *Mueller Hinton broth* (MHB/CMH)) que aqui no Brasil é muito utilizada para o controle de qualidade dos hemocomponentes, essa metodologia recupera a maioria das bactérias presentes nos hemocomponentes. Embora amplamente utilizada, por razões econômicas, é muito trabalhosa, pois seu tempo de incubação mínimo é cinco dias. Além do mais, após essa incubação, deve-se realizar o sub-cultivo em placas de Petri com meios de enriquecimento incubar e novamente durante 48 horas (h) (BRASIL, 2004).

Mesmo que, nem todos os CPs positivos sejam detectados antes da transfusão, o sistema de cultura é capaz de impedir a transfusão da maioria dos CPs contaminados com concentrações de bactérias clinicamente significativas (DE KORTE et al., 2006). Em suma, várias são as metodologias que podem ser utilizadas para detectar a contaminação bacteriana, anterior à transfusão de CPs. No entanto, necessita-se da seleção de um método adequado que deve ser fundamentado em uma combinação de sensibilidade e rapidez. É também indispensável que seja equilibrado com os benefícios, os riscos e os custos de cada método de triagem, antes de sua introdução na rotina (MOHAMMADI, 2006).

1.3 Reações sépticas

Em 1951, como uma das primeiras complicações relacionadas à transfusão sanguínea, Borden e Hall descreveram a ocorrência de sepse pós-transfusional em um paciente, devido a uma contaminação bacteriana da bolsa de sangue transfundida (BORDEN; HALL, 1951). Relatos envolvendo situações de sepse, choque séptico e óbitos associados à transfusão sanguínea contaminada com bactérias começaram a surgir com evidências científicas apenas no início dos anos 90 (BLAJCHMAN, 2002). As reações sépticas transfusionais ocasionadas pela infusão de CPs contaminados com bactérias são associadas a uma alta taxa de morbidade e mortalidade dos receptores (BLAJCHMAN, 2002; MCDONALD et al., 2004).

Mesmo que todos os hemocomponentes sejam suscetíveis à contaminação bacteriana, e também os receptores às complicações sépticas pós-transfusionais, os CPs são os mais propensos para o desenvolvimento bacteriano (YOMTOVIAN, 2004). No que se refere aos receptores dos CPs, cerca de 85% pertencem às unidades de oncologia e hematologia adulta e pediátrica ou de transplante de medula óssea, suscetíveis ao desenvolvimento de graves consequências, caso a bolsa transfundida esteja contaminada (UHC, 1998). Essas infecções bacterianas apresentam elevados riscos de saúde para os transfundidos, especialmente para estes indivíduos imunocomprometidos e que são submetidos constantemente às transfusões plaquetárias devido ao tratamento quimioterápico (CLAWSON; WHITE, 1971).

Sequelas clínicas devido à transfusão de CPs contaminados com bactérias vão desde a ausência de sintomas à febre moderada, sepse, hipotensão e óbito (MOHAMMADI, 2006). Uma reação séptica transfusional pode ser caracterizada por sinais e sintomas como: febre (com aumento de temperatura de um a dois °C), calafrios, tremores, taquicardia, hipotensão, ruborização, náusea, vômitos e choque. Pode ser imediata, quando ocorre em até 24 h após a transfusão, ou tardia, após as 24 h (BRASIL, 2007). Sinais e sintomas encontram-se descritos

no Manual Técnico de Hemovigilância da ANVISA (BRASIL, 2007) e os parâmetros de Bone et al., são fontes disponíveis para auxílio na caracterização da bacteremia. Considera-se: sepse quando da presença de duas ou mais das seguintes condições: temperatura $>38\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou $<36\text{ }^{\circ}\text{C}$, frequência cardíaca >90 batimentos cardíacos por minuto (bpm), frequência respiratória >20 incursões por minuto (ipm) ou pressão parcial de gás carbônico (pCO_2) <32 de milímetros de mercúrio (mmHg), contagem de leucócitos $>12.000/\text{milímetros cúbicos}$ (mm^3) ou $<4.000/\text{mm}^3$, ou 10% de formas imaturas; sepse grave: sepse associada a disfunção de órgão, hipoperfusão ou hipotensão e choque séptico: hipotensão induzida pela sepse (BONE et al., 1992).

Dados do FDA apontam que nos EUA a contaminação bacteriana por transfusão sanguínea de hemocomponentes foi a causa mais frequente das mortalidades, depois das reações hemolíticas (AABB, 2005). Entre 1985 a 1999 foram descritos 694 óbitos ligados ao uso de sangue e seus derivados, sendo que 77 destes (11%) foram devido à presença de contaminação bacteriana (DODD, 2003). De 1994 a 1998, o sistema de hemovigilância da Agência Francesa de Sangue registrou 185 casos com 18 óbitos por transfusão de hemocomponentes contaminados com bactérias (ANDREU et al., 2002). O sistema de vigilância do Reino Unido relatou 26 infecções transmitidas por transfusão, incluindo seis óbitos entre 1995 a 2002 (SHOT, 2002). Além disso, durante 1998 a 2000, foram relatados ao FDA nove casos fatais de transfusão de CPs (KUEHNERT et al., 2001). No Brasil, são raros os dados publicados a respeito da ocorrência e dos índices das reações sépticas transfusionais. Um estudo relatado por nosso grupo informou três possíveis casos após a infusão de CPs contaminados (MARTINI et al., 2012), sendo citado em demais pesquisas internacionais (ALI et al., 2014; KREUTER; HAGAN, 2014).

De acordo com Blajchman, a taxa de óbito por infusão de uma bolsa de sangue contaminado depende de vários fatores, tais como: a espécie do micro-organismo; a concentração do agente transfundido (unidades formadoras de colônia por mililitro - UFC/mL); o sistema imune do receptor; e a antibioticoterapia (BLAJCHMAN, 2004). Uma concentração inicial de 10^1 UFC/mL, presente na bolsa de sangue logo após a doação, poderá não ser detectada (WAGNER et al., 1997). Contudo, estudos experimentais com cultivo bacteriano, realizados após a inoculação de bactérias em bolsas de CPs, demonstraram uma fase de estagnação, que oscila entre 24 a 48 h, seguida por uma fase de rápida proliferação, que poderá elevar essa contagem a 10^8 UFC/mL (PUNSALANG et al., 1989).

O risco de um receptor apresentar o choque séptico relacionado à contaminação bacteriana de hemocomponentes transfundidos é estimado entre 70 a 400 casos para cada

milhão de unidades de CPs transfundidos (DUMONT et al., 2010) e o risco de morte normalmente ocorre em cada 1/60.000 indivíduos (NESS et al., 2001; BLAJCHMAN, 2002). A reação séptica transfusional varia muito na intensidade dos sintomas, podendo chegar até quadros mais graves. Os efeitos clínicos mais graves geralmente estão associados às bactérias como, por exemplo, *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis* (WENKE-WALTHER, 2008). Apesar de que sepse bacteriana após infusão de sangue seja rara, episódios de transfusão associados à septicemia podem levar a desfechos fatais ou a outras sequelas graves (BURNS; WERCH, 2004).

Em vista disso, é fundamental que os clínicos estejam conscientes do problema e preparados para considerar a possibilidade de uma contaminação bacteriana quando investigarem reações transfusionais febris, especialmente em pacientes que recentemente receberam infusão de CPs (BURNS; WERCH, 2004). Lamentavelmente, apesar da possibilidade de serem minimizadas e/ou evitadas, as reações sépticas transfusionais são pouco relatadas ou subnotificadas. Possivelmente isso esteja relacionado com: a desconsideração de uma contaminação bacteriana frente a uma reação transfusional; os micro-organismos isolados dos CPs são confundidos com os contaminantes de cateteres; devido a elevada porcentagem de reações hemolíticas não febris após o uso de CPs; a pouca experiência dos profissionais na caracterização de uma reação séptica transfusional; o extenso atendimento hospitalar que pode prejudicar a detecção da reação séptica transfusional tardia, entre outros (BLAJCHMAN; GOLDMAN, 2001; AABB, 2005; BRASIL, 2007).

Melhorias na detecção da contaminação bacteriana são desafios a almejar, não apenas de sensibilidade e de especificidade, mas também de eficiência econômica e logística para fornecer um abastecimento seguro de CPs para pacientes (BURNS; WERCH, 2004). Talvez a mais promissora abordagem considerada para a redução ou prevenção de transfusões associadas à sepse seja a utilização de testes para detectar bactérias diretamente nos componentes sanguíneos poucos minutos antes da sua infusão (WAGNER et al., 1994). Além disso, faz-se necessário que normas de biossegurança sejam seguidas na execução de técnicas de antisepsia junto a um controle de qualidade total dos hemocomponentes. Visto que falhas nesta etapa constituem uma das principais fontes de contaminação de componentes sanguíneos (SANTOS et al., 2008) e as bactérias residentes da microbiota normal da pele, como os *Staphylococcus*, são considerados os mais envolvidos (HSUEH et al., 2009; MARTÍNEZ et al., 2010; WALTHER-WENKE et al., 2010).

1.4 *Staphylococcus* spp.

No ano de 1878, Robert Koch, isolou e descreveu pela primeira vez as bactérias do gênero *Staphylococcus*; em 1880, Alexander Ogston adaptou o nome do gênero bacteriano da palavra grega *staphylo* que significa cacho de uvas (BAIRD-PARKER, 1990). As bactérias do gênero *Staphylococcus* pertencem à família Staphylococcaceae, apresentam-se na forma de CGP, com diâmetro entre 0,5 e 1,5 micrômetros (μm), agrupados em cachos, isolados, aos pares ou em cadeias curtas. As colônias são arredondadas, lisas, opacas ou brilhantes, com diâmetro de um a dois milímetros (mm), convexas, cremosas e sua coloração pode variar de branca a amarela, dependendo da espécie. As bactérias são produtoras da enzima catalase, um importante teste para diferenciar a família Staphylococcaceae da Streptococcaceae (catalase negativa) (KONEMAN et al., 2008; MURRAY et al., 2010).

Os *Staphylococcus* geralmente apresentam metabolismo fermentativo são aeróbios ou anaeróbios facultativos, enquanto que os micrococcos são oxidativos e aeróbios restritos. Além de serem imóveis, não esporulados, oxidase negativa, crescem na presença de cloreto de sódio e são produtores ou não da enzima coagulase. A habilidade de produzir a enzima coagulase divide esse gênero em dois grupos. Somente as espécies *S. aureus*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus schleiferi coagulans* e alguns isolados de *Staphylococcus hyicus* são produtores desta enzima, os demais são caracterizados como SCoN (KONEMAN et al., 2008; MURRAY et al., 2010).

Inicialmente os SCoN foram classificados sob o título coletivo de *Staphylococcus albus*, nomeados devido à coloração branca de suas colônias nas placas de ágar, em contraste com a cor amarelada dos *S. aureus*. Embora fossem considerados micro-organismos não patogênicos, um estudo publicado no ano de 1958 mudou este conceito, no qual retratou 90 relatos de bacteremia por SCoN (PATRICK, 1990). O Sistema Nacional de Vigilância de Infecções Nosocomiais anunciou em 1996, que os SCoN representaram 11% dos micro-organismos isolados de infecções nosocomiais e foram as principais bactérias responsáveis por infecções nosocomiais da corrente sanguínea (SILVA et al., 2000).

Em relação à identificação das espécies de SCoN, o método manual mais utilizado é o esquema de Kloss e Bannerman modificado por Bannerman. A identificação é trabalhosa devido à quantidade de testes bioquímicos necessários para sua realização (KLOSS; BANNERMAN, 1997; BANNERMAN, 2003). Foram criados sistemas comerciais de identificação para as espécies de *Staphylococcus*, estes métodos apresentam uma acurácia de aproximadamente 70 a 90% (BANNERMAN, 2003). Apesar da metodologia convencional de

identificação ser ainda considerada o método mais utilizado, a mesma é lenta, trabalhosa e com interpretações subjetivas. Entretanto, os métodos automatizados diminuem o tempo para a identificação bacteriana. Além de identificar também avaliam a suscetibilidade às drogas antimicrobianas. Nos dias de hoje, encontram-se disponíveis vários sistemas de identificação automatizados (KONEMAN et al., 2008), com destaque ao VITEK® 2 (bioMérieux). De acordo com este método a identificação bacteriana e a leitura do teste de suscetibilidade antimicrobiana são obtidas entre duas a 15 h (BÉMER et al., 2005).

O gênero *Staphylococcus* compreende em torno de 42 espécies, sendo que 20 estão associadas a uma grande variedade de infecções de característica oportunista em seres humanos e animais. Os *S. aureus*, *S. epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus* destacam-se como os patógenos mais prevalentes (KONEMAN et al., 2008; TRABULSI; ALTHERTHUM, 2008). *S. aureus* é a espécie mais virulenta e o patógeno mais importante deste gênero e por muito tempo os SCoN foram considerados relativamente inócuos. No entanto, com o aumento do seu isolamento em infecções eles vêm obtendo destaque no âmbito hospitalar (VUONG; OTTO, 2002; SAKAI et al., 2004).

Aproximadamente existem 32 espécies de SCoN e cerca de 15 espécies são naturais de humanos, e as demais são consideradas patógenos não humanos (HUEBNER; GOLDMANN, 1999). Entre os SCoN, o *S. epidermidis* é a espécie mais frequentemente isolada do epitélio humano, sendo encontrada principalmente nas axilas e narinas. São importantes patógenos de infecções relacionadas à assistência à saúde, isolados com maior frequência em infecções da corrente sanguínea e associados à importante morbidade e mortalidade, especialmente, quando resistentes aos antibióticos beta-lactâmicos (OTTO, 2009). Mecanismos de resistência e fatores de virulência apresentados pelos SCoN não são claramente estabelecidos (HUEBNER; GOLDMANN, 1999). Sendo assim, torna-se de suma importância o conhecimento e o esclarecimento das principais formas de patogenicidade dessas bactérias.

1.5 Patogenicidade dos *Staphylococcus coagulase negativa* (SCoN)

Os SCoN são habitantes normais da pele e membranas de humanos, normalmente têm uma relação benéfica ou simbiótica com o hospedeiro e raramente patogênica. Todavia, nos últimos anos, uma grande variedade das espécies deste grupo passou a ser isolada de amostras clínicas de vários processos infecciosos (HEIKENS et al., 2005; BANNERMAN; PEACOCK, 2007). Atualmente são importantes patógenos nosocomiais, estão envolvidos em infecções associadas com implantes e a sua adesão aos polímeros provavelmente ocorre pela

contaminação com uma pequena quantidade de bactérias da microbiota endógena durante o implante do material (VON EIFF et al., 1999).

Os *S. epidermidis* são os SCoN de maior relevância clínica, associados às infecções relacionadas à assistência em saúde e à formação de biofilmes em dispositivos, como cateteres. Os *S. saprophyticus* apresentam-se como um dos principais agentes de infecção do trato urinário em mulheres, enquanto que os demais SCoN estão relacionados a quadros de osteomielite, endocardite, formação de abscessos e sepse, especialmente em pacientes imunocomprometidos (submetidos a terapia imunossupressora, pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida - AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*), recém-nascidos prematuros, cardiopatas, com grandes queimaduras, traumatismos, transplantados ou com alterações congênitas) (ZIEBUHR, 2001; BRASIL, 2004; SAKAI et al., 2004; KONEMAN et al., 2008; MURRAY et al., 2010).

Normalmente o padrão clínico de infecções ocasionados por SCoN demonstra que na maioria das vezes a resposta imune do indivíduo é determinante para o desenvolvimento da infecção. O ser humano saudável pode estar colonizado, mas o seu estado imunológico é responsável pelo desencadeamento da infecção. Os SCoN podem ser provenientes dos próprios pacientes, do ambiente, bem como, dos profissionais que atuam direta ou indiretamente na assistência à saúde (ALTOPARLAK et al., 2004). Já tem sido relatada grande semelhança entre SCoN isolados do sangue e de cateteres dos usuários das instituições com os recuperados do mesmo indivíduo em mucosas de orofaringe, orelha, nariz, axila, braço e perna (KRAUSE et al., 2003; HIGUCHI et al., 2007).

Micro-organismos, oriundos da cavidade bucal ou de outras mucosas, podem ser considerados prováveis agentes de infecções em outros sítios, sugerindo a importância das medidas de segurança que devem ser adotadas durante a assistência de um paciente e também entre pacientes (BOISSON et al., 2002; KRAUSE et al., 2003; HIGUCHI et al., 2007). Dessa forma, numerosos critérios têm sido adotados na tentativa de diferenciar bacteremia clinicamente significativa, ocasionadas por SCoN, dos contaminantes. Esses critérios incluem combinações de achados clínicos, origem da amostra de sangue e, principalmente, o número de culturas consideradas positivas (OUD et al., 1999).

Informações de âmbito nacional (SADER et al., 1999) relatam que o *S. epidermidis* é considerado o terceiro agente mais isolado em infecções da corrente sanguínea e o segundo mais isolado na América Latina, com índices de 80% de resistência à oxacilina (SADER et al., 2001; CHANG et al., 2003). O Programa de Vigilância Antimicrobiana (SENTRY - *Antimicrobial Surveillance Program*) monitora a prevalência dos patógenos e os padrões de

resistência aos antimicrobianos nos EUA, Canadá, América Latina e Europa. Estudos relacionados a este programa relatam que os SCoN são a terceira causa em infecções sistêmicas nosocomiais e também comunitárias, e que são a segunda causa de infecções nosocomiais (PFALLER et al., 1998; PFALLER et al., 1999; DIEKEMA et al., 2001). Cabe ainda ressaltar que eles lideram o grupo de bactérias isoladas de amostras de CPs, como relatado anteriormente. A contínua utilização de próteses, cateteres e de outras tecnologias invasivas contribui com que o *S. epidermidis* chegasse ao primeiro plano de patógenos nosocomiais, resultando em considerável morbidade e aumento de custos hospitalares (HUEBNER; GOLDMANN, 1999; ARCIOLA et al., 2002).

Em relação à resistência bacteriana e os fatores de virulência, vários aspectos devem ser considerados, como: bactérias patogênicas se tornando cada vez mais resistentes; aumento da resistência múltipla aos antimicrobianos; comunidades bacterianas em biofilme menos suscetíveis aos antimicrobianos; elevado nível de virulência para o hospedeiro; infecções e enfermidades envolvendo o biofilme bacteriano e, principalmente, a utilização de antimicrobianos ineficazes na presença de biofilme. As situações citadas resultam em aumento de: tempo de internação, índice de morbi-mortalidade, custos do sistema de saúde, taxas de resistência aos antimicrobianos e disseminação de bactérias resistentes (RICE, 2006).

A instituição de uma infecção e a sobrevivência dos SCoN depende, na maioria das vezes, que o micro-organismo apresente alguns fatores de virulência contra as defesas do hospedeiro. A pele humana tem os mecanismos de defesas limitados e após a penetração pela barreira do epitélio, as bactérias têm que enfrentar vários outros mecanismos. No entanto, a habilidade de aderência às superfícies abióticas resultando na formação do biofilme bacteriano confere um dos meios mais defensivos para a implementação da infecção bacteriana (SAGINUR et al. 2006). Um dado importante é que os SCoN associados às complicações infecciosas hospitalares são resistentes a múltiplos antimicrobianos, dificultando a indicação de um melhor tratamento para o paciente. Certamente a múltipla resistência está relacionada à pressão seletiva exercida pela difusão de uso de drogas antimicrobianas nos hospitais (ARCHER, 2000).

Isolados hospitalares são frequentemente resistentes à oxacilina e isso indica resistência cruzada com todas as classes de antimicrobianos β -lactâmicos incluindo as cefalosporinas (DE GIUSTI et al., 1999). Além disso, a resistência à oxacilina está em grande parte relacionada com a resistência a outros antimicrobianos, particularmente aos aminoglicosídeos e aos macrolídeos (LYYTIKÄINEN et al., 1996). O predomínio de SCoN resistentes à oxacilina é elevado na maioria das instituições de saúde, enfatizando assim, a

extrema importância na identificação deste grupo como colonizador ou agente de infecções (FRIGATTO et al., 2005). Ao longo do tempo, estes micro-organismos têm se tornado cada vez mais resistentes e a ameaça mais recente é o surgimento de isolados com níveis intermediários de resistência à vancomicina ou resistentes (HUEBNER; GOLDMANN, 1999; ARCIOLA et al., 2002).

Sabe-se ainda, que a δ -toxina é produzida pelo *S. epidermidis* e trata-se de uma hemolisina localizada no locus *agr* (OTTO et al., 1998), que atua através da formação de poros na membrana celular levando à lise de eritrócitos e de outras células, mas não causa danos severos aos tecidos, por este motivo as infecções geralmente são subagudas ou crônicas (VUONG; OTTO, 2002). Além do mais, *S. epidermidis* é um patógeno que induz endocardite, portanto, é sugestivo que a transfusão por CPs contaminados deve ser considerada como um fator de risco para a endocardite bacteriana (HSUEH et al., 2009).

A quantidade de biofilme produzida pode estar associada com a capacidade dos SCoN em causar infecções (DE SILVA et al., 2002) e o alto índice de resistência, principalmente à metilicina, também é considerado importante fator de virulência (WISPLINGHOFF et al., 2004). Todos os fatores de virulência presentes nos SCoN ainda não foram totalmente elucidados. Além do biofilme e das resistências já foi relatada também a presença de uma elastase com propriedade de degradação de IgA, IgM, albumina e fibrinogênio (VON EIFF et al., 2002; HUANG et al., 2006; KONEMAN et al., 2008).

Devido ao fato de que a maioria dos SCoN são bactérias comensais, muitas vezes é difícil determinar se um isolado representa o agente causador de uma infecção ou apenas contaminação. Sendo assim, o conhecimento dos genes que possibilitem a definição da sua influência como patógeno oportunista é um passo decisivo para o planejamento de ações terapêuticas direcionadas para o controle das infecções (YAO et al., 2005).

1.6 Biofilme bacteriano

Há muito tempo vem sendo relatada a existência de estruturas organizadas por células bacterianas em suspensões aquosas ou aderentes às superfícies, com a finalidade de que suas necessidades sejam cumpridas, que lhes permitam sobreviver e obter os metabólitos essenciais ao seu crescimento e a sua multiplicação. Inicialmente, esses aglomerados eram designados de suspensões planctônicas, em suspensão ou livres. Posteriormente, através de frequentes estudos, foi determinado que a maioria desse conjunto tem a habilidade de adesão às superfícies, permitindo assim concluir que a grande parte dos micro-organismos

encontrava-se fixados às superfícies. As primeiras observações de biofilme foram realizadas por Arthur T. Henrici em 1933, mas apenas em 1978 sua natureza abrangente e predominante foi determinada (HENRICI, 1933; COSTERTON et al., 1978; COSTERTON, 1999).

Os biofilmes são comunidades microbianas sésseis caracterizadas por células que são ligadas a um substrato, a uma interface ou umas as outras, de forma irreversível que são incorporadas a uma matriz polimérica, conhecidos também como *slime* (DONLAN; COSTERTON 2002). Pode ser também considerado um aglomerado simbiótico com grau de parceria entre as bactérias, sendo um indicador de adaptação bacteriana com o objetivo de aumentar a sua capacidade de sobrevivência e se aderirem às superfícies bióticas ou abióticas (COSTERTON, 1999; DONLAN, 2002). Cerca de 97% da composição é água, células microbianas, polímeros secretados, nutrientes, metabólitos absorvidos, produtos da lise celular, partículas como proteínas, DNA, RNA e polissacarídeos (SUTHERLAND, 2001).

A fim de que se torne possível a aderência das bactérias colonizadoras nas superfícies, as chamadas bactérias colonizadoras primárias necessitam produzir uma matriz exopolissacarídica (EPS), que auxilia na aderência e posteriormente as secundárias promovem a colonização e o crescimento da estrutura. A EPS, comumente chamada de visco ou matriz viscosa, é constituída por polímeros de origem microbiana as quais produzem os biopolímeros (FLEMMING et al., 2007). Essa matriz também é considerada um fator determinante no processo da formação do biofilme, uma vez que promove a adesão das bactérias à maioria das superfícies (COSTERTON, 1999). Entretanto, já existem estudos que demonstram que esta matriz não é estritamente necessária para a formação de biofilme (ROHDE et al., 2010).

A formação do biofilme é um processo dinâmico e complexo que envolve diversas etapas. Marshall, em 1971, descreveu que a formação envolvia apenas duas fases; hoje em dia, já é de largo conhecimento que esse processo é dividido em quatro fases. Com base em anotações obtidas em vários experimentos utilizando diferentes espécies bacterianas, foi proposto um modelo de formação em quatro etapas: adesão da superfície, acúmulo em múltiplas camadas de células bacterianas, amadurecimento do biofilme e o desprendimento das células, que poderão iniciar um novo ciclo de formação de biofilme em outra superfície (Figura 2) (COSTERTON, 1999; ROHDE et al., 2010).

A primeira fase (Fase 1 da Figura 2) se inicia com a adesão à superfície, a provável ligação no que se refere aos *Staphylococcus* ocorre através de adesinas da superfície bacteriana, como as SdrG (*Surface-associated fibrinogen binding protein*), GehD (*Collagen-binding protein*), EmbP (*Extracellularmatrix binding protein*) e AtlE (*Autolysin E*), que se ligam ao fibrinogênio, colágeno, fibronectina e vitronectina, respectivamente. Estas adesinas,

produzidas por SCoN, são conhecidas como componentes da superfície bacteriana reconhedores de moléculas adesivas (MSCRAMMs - *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) e se ligam especificamente às proteínas da matriz extracelular do hospedeiro (SELLMAN et al., 2008). A principal adesina do *S. epidermidis* é a autolisina AtlE, que é codificada pelo gene cromossômico *atlE* e tem a capacidade de se ligar diretamente à superfície polimérica e também à proteína vitronectina, sugerindo uma função no início da adesão e uma contribuição posterior na manutenção da aderência (HEILMANN et al., 1997).

A capacidade de adesão depende principalmente de três fatores: características da célula bacteriana, da superfície e do meio. Durante a primeira fase, há interação entre as moléculas da estrutura biótica ou abiótica e as dos micro-organismos, dependente também das propriedades físico-químicas da superfície e da bactéria (HEILMANN et al. 1997; VACHEETHASANEE et al. 1998; COSTERTON, 1999). A adesão pode ser específica quando existem interações interprotéicas, ou inespecífica caso a adesão seja mediada entre uma superfície abiótica (sem teor protéico) e as bactérias. Com o início da expressão das MSCRAMM, ocorre um reconhecimento das proteínas existentes na superfície e posterior, ocorre a ligação que promove a adesão inicial e após a formação e a maturação do biofilme (JEFFERSON, 2004; O'GARA, 2007). Também, muitas espécies de bactérias apresentam flagelos e fímbrias que são importantes para a adesão à superfície (MACK, 1999).

Na segunda etapa (Fase 2 da Figura 2) ocorre a acumulação, sendo uma das fases mais prolongadas, envolvendo a proliferação e a adesão intercelular formando várias camadas de bactérias (HUEBNER; GOLDMANN 1999). As bactérias se unem entre si e assim formam o biofilme. Esta fase pode ser mediada por determinados ácidos teicóicos, por proteínas associadas à acumulação, as Aap (*accumulation-associated protein*) e por uma adesina polissacarídica intercelular, denominada PIA (*polysaccharide intercellular adhesine*) (HUSSAIN et al. 1997; ROHDE et al. 2005). A PIA é um açúcar composto por resíduos N-acetilglicosamina ligados por ligações β -1,6 entre si. A PIA apresenta-se através das enzimas codificadas pelo operon do gene de adesão intercelular, o gene *ica* (*intercellular gene cluster adhesion*), sendo este mecanismo um dos mais conhecidos, também ligado aos *Staphylococcus* (HEILMANN et al., 1996; GOTZ, 2002). A maioria dos SCoN não tem contato direto com a superfície, dessa forma permanecem no biofilme pela expressão de mecanismos de adesão intercelular (ROHDE et al., 2007).

A superfície da parede das bactérias GP é coberta por peptidoglicanos e diferentes proteínas, adesinas e ácidos teicóicos. Esse peptidoglicano funciona como um esqueleto da

parede que é constituído por N-acetilglicosamina e por ácido N-acetilmuramico, úteis à formação da PIA e do biofilme (MACK, 1999). A PIA é codificada pelo operon *ica* que contém os genes *icaADBC* (biossíntese) e *icaR* (regulação) (HEILMANN et al., 1996; GOTZ, 2002). O locus *icaADBC* codifica as enzimas responsáveis pela síntese e desacetilação da PIA (HEILMANN et al., 1996; VUONG et al., 2004). O processo de formação do biofilme em *Staphylococcus* por meio do operon *ica* é pela produção de proteínas através do gene *icaA*. A presença do *icaD* favorece a produção, e maiores cadeias são sintetizadas com a presença do *icaC* (GERKE et al., 1998). Após esta fase, o *icaB* promove a desacetilização da molécula a fim de formar a PIA (GOTZ, 2002).

Na fase de maturação (Fase 3 da Figura 2) o biofilme tem uma estrutura tridimensional chamada “cogumelo” (Figura 2) (COSTERTON et al., 1995), com canais de circulação de nutrientes para as células nas camadas mais profundas. O amadurecimento do biofilme e o posterior desprendimento dos micro-organismos planctônicos estão menos elucidados em *S. epidermidis* (OTTO, 2009). É na última fase, a do desprendimento (Fase 4 da Figura 2) que ocorre a saída das células bacterianas do biofilme para que se torne possível a sua disseminação e a colonização de outros sítios (OTTO, 2008).

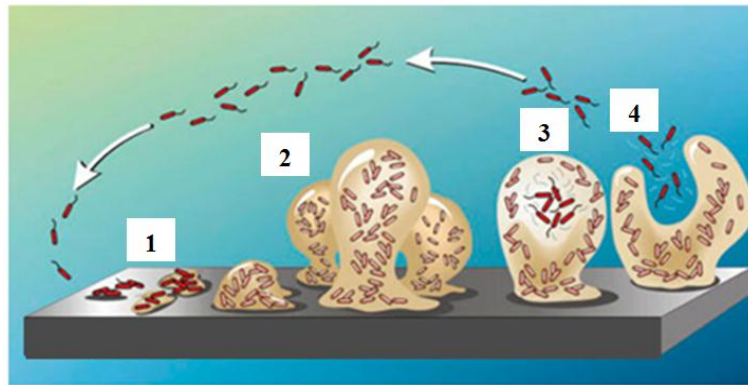


Figura 2 - Formação do biofilme em quatro etapas: **1:** adesão primária e rápida da célula bacteriana na superfície do corpo estranho seguido do revestimento destas células por proteínas da matriz extracelular do hospedeiro; **2:** acúmulo do biofilme com as bactérias se proliferando e se acumulando para formar várias camadas de agregados de células que são incorporados na matriz extracelular; **3:** amadurecimento do biofilme com circulação de nutrientes para as células nas camadas mais profundas; e **4:** desprendimento celular com disseminação e colonização dos micro-organismos em outros sítios.

Fonte: Adaptado de STOODLEY, et al., 2002.

Muitos fatores contribuem para a ocorrência da etapa de desprendimento celular, como: forças mecânicas através do fluxo sanguíneo; interrupção da produção de substâncias essenciais e enzimas que destroem a matriz. Essas enzimas podem ser as mesmas relacionadas à sua formação, e quando produzidas em grande número poderão ocasionar o descolamento, especialmente na superfície do biofilme, esse por sua vez mantém a espessura e controla a taxa de disseminação bacteriana através de moléculas sinalizadoras, um sistema de intercomunicação *quorum-sensing* (OTTO, 2008).

Já foram descritos em *Staphylococcus* dois sistemas *quorum sensing* com influência na formação de biofilme. O mais conhecido é o gene regulador acessório, o *agr* (*accessory gene regulator*) que controla a formação de biofilme, a sua não funcionalidade facilita a fixação primária do patógeno à superfície (VUONG et al., 2000) e o gene *luxS* (*system luxS*), sua supressão leva a um aumento na regulação da transcrição dos *icaADBC*, aumentando assim a síntese de PIA (MACK et al., 2006; XU et al., 2006).

Essas estruturas são altamente hidratadas e contém canais que permitem a difusão interna de nutrientes e de oxigênio, conferem proteção aos mecanismos de defesa do hospedeiro por não serem detectados pelo sistema imune inato e impedem a entrada dos antimicrobianos dificultando a difusão desses fármacos nos tecidos (DONLAN, 2002). Autores reportaram que o biofilme garante proteção contra os antimicrobianos através de dois fatores: pela penetração restrita dos antimicrobianos devido a camada protetora de EPS e pela redução na taxa de crescimento dos micro-organismos, pois a grande maioria dos antimicrobianos é mais eficiente no ataque quando as células bacterianas estão em crescimento (LEWIS, 2001; MELCHIOR et al., 2009). Além disso, um estudo mais recente demonstrou que o biofilme também ocasiona a redução da eficiência dos desinfetantes na pele de doadores de sangue (TAHA et al., 2014).

Os *Staphylococcus* formam biofilmes e estão descritos como um dos principais grupos formadores de biofilmes (MACK, 1999). A formação de biofilme por *S. epidermidis* pode estar sujeita às alterações ambientais como: concentrações sub-inibitórias de antimicrobianos, temperatura altas, suplementação de carboidratos, teor de dióxido de carbono e oxigênio, concentração de ferro, osmolaridade e exposição ao etanol, anaerobiose, entre outras (DOBINSKY et al., 2003; CAFISO et al., 2004; MACK et al., 2006; MACK et al., 2007). Acredita-se também que genes *icaAC* possam ser inativados pela inserção de uma sequência IS256, a qual faz parte do transposon, que pode se associar com os genes e extinguir a produção da PIA (ZIEBUHR et al., 1997; ZIEBUHR et al., 1999; CONLON et al., 2004). Além disso, os mecanismos envolvidos na formação de biofilme em cepas *icaADBC*-

independente podem estar inativos em culturas *in vitro* (ROHDE et al., 2005). Sendo assim, um fenótipo que é negativo para biofilme, não reflete necessariamente a incapacidade de formar um biofilme (CHRISTNER et al., 2010).

A expressão concomitante dos genes *icaADBC* é extremamente necessária para a síntese da PIA, no entanto, já existem relatos de *S. epidermidis* biofilme-negativos e *ica*-positivos. Dessa maneira, a formação de biofilme não é totalmente dependente do locus *ica*, podendo estar associada a uma série de fatores, outros genes e proteínas que podem promover a sua formação (KOGAN et al., 2006). Além da PIA, duas outras proteínas também parecem estar envolvidas, uma é a Aap (HUSSAIN et al., 1997; ROHDE et al., 2005) e a outra é a proteína associada ao biofilme, a Bap (*biofilm-associated protein*) (TORMO et al., 2005).

Já foi reportada a formação de biofilme na ausência do gene *ica* em cepas que apresentavam o gene *bap*, sem a necessidade da PIA. O gene *bap* pode ser encontrado em espécies estafilocócicas (TORMO et al., 2005). Um gene homólogo ao *bap*, o *bhp* (*bap* homology protein), ocorre em *S. epidermidis* de origem humana, no entanto, o mecanismo para a formação de biofilme ainda não está totalmente esclarecido (TORMO et al., 2005; VADYVALOO; OTTO 2005). Dessa forma, deve-se ressaltar que o potencial de virulência de uma bactéria não se restringe unicamente a um único fator, é um fenômeno muito complexo (MONTANARO et al., 2007).

No que diz respeito aos testes de identificação da produção de biofilme, uma série de metodologias fenotípicas foi desenvolvida para o cultivo e a quantificação do biofilme, entre essas: teste em aderência de tubo de borossilicado (ABT), teste em microplaca com cristal violeta, ágar Congo vermelho (CRA), radiomarcção, microscopia, entre outros (DEIGHTON et al. 2001; ARCIOLA et al. 2002; STEPANOVIC et al. 2007). O método de detecção primeiramente foi descrito por Christensen et al., em 1982, que demonstraram a presença do biofilme em tubo de borossilicato e consiste no esvaziamento do conteúdo do tubo de cultura e a formação de uma mancha residual do corante com a bactéria. Logo após, em 1985, o teste em microplaca de poliestireno com cristal violeta foi desenvolvido por Christensen et al. Este teste emprega uma microplaca com 96 poços que permite determinar, de forma semiquantitativa, a formação de biofilme a partir da leitura da densidade ótica. O biofilme formado é corado com cristal violeta em uma concentração de 0,5%, tornando possível realizar uma estimativa direta da presença macroscópica do biofilme aderido ao fundo da placa (CHRISTENSEN et al., 1982; CHRISTENSEN et al., 1985; ARCIOLA et al., 2006).

Posterior, Freeman et al. em 1989, relataram uma técnica baseada na utilização do CRA, onde os isolados, que são considerados PIA-positivos, formam colônias negras e os

PIA-negativos, colônias vermelhas. A partir dessas metodologias, muitos estudos puderam retratar que isolados patogênicos produzem uma maior quantidade de biofilme em relação aos não patogênicos, dessa forma, estabelecendo um instrumento de diferenciação entre uma infecção e uma possível contaminação (FREEMAN et al., 1989; SILVA et al., 2002; ALCARÁZ, 2003). A formação de biofilme em *S. epidermidis* tem sido amplamente documentada nas últimas décadas, determinando a importância da realização de métodos capazes de identificar a produção de biofilme em isolados clínicos (ARCIOLA et al., 2006).

No que se refere às técnicas moleculares, são utilizadas para a detecção dos genes de formação de biofilme, que envolvem a análise do DNA bacteriano, baseados em análises de elementos genéticos cromossômicos ou extracromossômicos (LEVY, 2000). O estudo de uma região específica do genoma de determinado organismo permite apontar os genes através do uso da Reação de Cadeia da Polimerase, a PCR (*Polymerase Chain Reaction*), técnica capaz de amplificar a região genômica de interesse. Utilizam-se iniciadores, *primers*, específicos para os genes a serem pesquisados. A detecção dos genes *icaA* e *icaD*, *aap* e *atlE* permitem uma boa avaliação da formação do biofilme (HEILMANN et al., 1996; DE ARAUJO et al., 2006; ROHDE et al., 2007; CAMPOCCIA et al. 2009).

1.7 Resistência a meticilina/oxacilina de *Staphylococcus* – MRSCoN

O antimicrobiano meticilina foi a primeira penicilina semissintética produzida ainda na década de 60, para tratamento de *S. aureus* resistentes à penicilina. Inicialmente foi considerada resistente à inativação das enzimas beta-lactamases, as quais hidrolisam o anel beta-lactâmico e provocam a perda da atividade antibacteriana (SHINEFIELD; RUFF, 2009). A meticilina bloqueia o crescimento bacteriano dos *Staphylococcus* por inibição da síntese da parede celular, através da ligação com as proteínas ligadoras da penicilina, as PBPs (*Penicillin Binding Proteins*), que estão presentes na parede celular desses micro-organismos. As quatro principais PBPs são PBP 1, 2, 3 e 4 e são produzidas tanto por isolados de *Staphylococcus* suscetíveis, como resistentes (CHAMBERS, 1997).

Logo após o advento da meticilina, em 1961 no Reino Unido ocorreram os primeiros relatos de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), assim, também resistentes aos demais beta-lactâmicos (cefalosporinas e outros). Posterior, com o aparecimento de cepas de SCoN resistentes à meticilina (MRSCoN) as infecções ocasionadas por *Staphylococcus* se tornaram um problema clinicamente grave, principalmente em relação as limitações terapêuticas (PFALLER et al., 1999; DIEKEMA et al., 2001; ROSSI; ANDREAZZI, 2005). Um aspecto

diferente da resistência à meticilina é a sua natureza heterogênea, onde o grau de resistência varia, especialmente, com as condições do meio de cultura e do antimicrobiano beta-lactâmico, com a concentração do inóculo, tempo de incubação, temperatura, pH e concentração de sal do meio (CHAMBERS, 1997; DE GIUSTI et al., 1999).

A resistência dos *Staphylococcus* à meticilina (MRS) na maioria das vezes é codificada pelo gene *mecA*, conhecida como resistência clássica, que altera uma enzima alvo dos antimicrobianos beta-lactâmicos, as PBPs, e quando alterada denomina-se proteínas ligadoras da penicilina alterada (PBP2a). Essa faz com que a meticilina e outros compostos penicilina-penicilinase resistente (PPR) tenham baixa afinidade pela parede celular e, conseqüentemente, percam sua atividade (ROSSI; ANDREAZZI, 2005). O grupo PPR é composto pela oxacilina (análogo mais estável da meticilina), meticilina, nafcilina, cloxacilina e dicloxacilina, e compõem a classe de fármacos de escolha para o tratamento de infecções por *Staphylococcus* produtores de penicilinas, mas que não apresentam a PBP2a (SCHITO, 2006). Esse mecanismo de resistência pode ocorrer de forma homogênea, quando todas as colônias expressam a resistência, ou heterogênea, na qual somente uma parte da colônia expressa (PFALLER et al., 1999; DIEKEMA et al., 2001; ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

As outras resistências não estão relacionadas com a presença do gene *mecA*, mas pela hiperprodução de beta-lactamases que pode ser: por inativação da oxacilina resultando em hidrólise parcial do anel beta-lactâmico (resistência *borderline* a oxacilina - BORSA) e presença de outra PBP com baixa afinidade à oxacilina (MODSA), e o gene responsável é conhecido como *bla* (TOMASZ et al., 1989, PFALLER et al., 1999; DIEKEMA et al., 2001; ITO et al., 2003, ROSSI; ANDREAZZI, 2005). Em vista disso, essas bactérias são resistentes a todas as penicilinas (sintéticas, semissintéticas e as resistentes as penicilinas), aztreonam, carbapenêmicos e cefalosporinas. Permanecendo poucas alternativas de terapia, entre elas os glicopeptídeos, como a vancomicina (CHAMBERS, 1997; MARTINEAU et al., 2000).

O gene *mecA* está presente em um DNA cromossomal denominado complexo *mec*, faz parte de um elemento genético móvel encontrado em isolados de MRSA, denominado cassete estafilocócico do cromossomo *mec*, o SCC*mec* (*staphylococcal cassette chromosome mec*) (HIRAMATSU et al., 2002; KATAYAMA et al., 2000). Esse elemento serve como veículo de troca de genes de resistência entre as espécies de SCoN e *S. aureus* (KATAYAMA et al., 2000). Facilita as trocas úteis para a sobrevivência dos *Staphylococcus* em vários ambientes, além de conter genes de resistência a outros antibióticos, e outros genes e pseudogenes que codificam enzimas com diversas funções (ITO et al., 2001; HIRAMATSU et al., 2004).

Elevados níveis de homologia são demonstrados pelo gene *mecA*, quando isolado nos MRSA e MRSCoN, entretanto, a sua origem ainda não está esclarecida. Um homólogo do gene *mecA*, com 88% de similaridade entre os aminoácidos foi identificado nos *Staphylococcus sciuri*. Um dado interessante é que o gene homólogo é ubíquo nessa espécie, mas o seu genótipo é suscetível, dessa forma, esse e outros dados sustentam a hipótese de que o gene *mecA* teve origem em espécies de SCoN, provavelmente uma espécie evolucionariamente muito próxima do *S. sciuri* (CHAMBERS, 1997).

Estudos mais recentes detectaram também um raro gene homólogo ao *mecA*, em cepas de *S. aureus* isoladas de humanos, que apresentaram resistência fenotípica à meticilina mas não apresentaram o gene *mecA*. Este gene foi denominado ^{mecA}_{LGA251} (CUNY et al., 2011; SHORE et al., 2011). Estudos também têm demonstrado que os elementos de *SCCmec* são mais diversificados em MRSCoN e novos genes *ccr* (*cassette chromosome recombinases*) ainda estão sendo continuamente identificados em diferentes espécies de SCoN (VITALI et al., 2014). Cabe ressaltar que o *SCCmec* possui dois complexos diferentes, o *mec* e o *ccr*, esse último codifica recombinases responsáveis pela mobilidade do *SCCmec* (ITO et al., 2001; ITO et al., 2003).

Outros genes denominados fator essencial para a resistência à meticilina, o *fem* (*factor essential for methicillin resistance*) foram identificados nos cromossomos dos MRSA e dos MRSCoN independentes do locus *mec* e contribuem para expressão da resistência aos beta-lactâmicos (HENZE et al., 1993). Não possuem envolvimento na síntese da PBP2a, e sim na formação da ligação cruzada dos precursores da cadeia do peptidoglicano-pentaglicina. Estudos demonstraram que a presença do gene *femA* é necessária para aumentar a atividade autolítica observada nas cepas contendo *mecA* (HENZE et al., 1993; BERGER-BACHI et al., 2002) e os genes *femAB* aparecem como os mais importantes (CARBON, 2000).

O gene *bla* (betalactamase) e o *mecA* (PBP2a) são geneticamente e bioquimicamente diferentes, mas são regulados por um sistema indutor e repressor semelhante. Eles podem controlar a produção da PBP2a e da betalactamase devido à homologia dos dois sistemas regulatórios (KATAYAMA et al., 2003). Os elementos reguladores que controlam a transcrição do gene *mecA* são o *mecI* e o *mecR1* (CHAMBERS, 1997). O *mecR1* codifica um indutor e o *mecI* um forte repressor do *mecA*. E os que regulam a produção das beta-lactamases são os *blaR1* e *blaI* (LIM; STRYNADKA, 2002).

Um importante mecanismo que representa uma via de transmissão de determinantes de resistência antimicrobiana, especialmente para os antimicrobianos aminoglicosídeos e beta-lactâmicos, são os plasmídeos. Vários SCoN possuem esses componentes e alguns podem ser

transferidos por conjugação entre espécies diferentes de SCoN ou até mesmo entre SCoN e *S. aureus* (HUEBNER; GOLDMANN, 1999). A resistência à meticilina é uma importante característica dos *Staphylococcus* e a dificuldade na detecção fenotípica dessa resistência é devido à expressão heterogênea do gene *mecA* (HEIKENS et al., 2005).

Segundo um levantamento de dados, entre 1997 e 2001, realizado pelo SENTRY em hospitais brasileiros e da América Latina a resistência à meticilina dos SCoN em hemoculturas foi de 80,8% e 76,2%, respectivamente (SADER et al., 2004). Os SCoN apresentam cerca de 75% dos isolados resistentes à meticilina (YORK et al., 1996), geralmente, acompanha a resistência a outros antimicrobianos. Com a expansão dessa resistência ocorreu o aumento do uso de glicopeptídeos para terapia empírica e até mesmo para profilaxia, ocasionando a potencial transmissão da resistência entre as espécies e a diminuição da suscetibilidade aos glicopeptídeos (DE GIUSTI et al., 1999). Sempre há a necessidade de realizar os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos antes do tratamento, principalmente para identificar precocemente a resistência à meticilina, com o intuito de diminuir o uso desnecessário dos glicopeptídeos e os custos hospitalares, quando o isolado for suscetível aos beta-lactâmicos (DOMARACHI et al., 1998; HUSSAIN et al., 2002).

Os primeiros casos de suscetibilidade diminuída à vancomicina foram reportados em *S. haemolyticus* (SCHWALBE et al., 1987). Posterior ocorreram relatos de *S. aureus* (CDC – MMWR, 1997) e em seguida dos *S. epidermidis* (SIERADZKI et al., 1999). Sabe-se que, o espessamento da parede celular foi o mecanismo de resistência envolvido, uma vez que esses isolados não apresentaram gene de resistência aos glicopeptídeos, entretanto, todos eram resistentes à meticilina (TENOVER et al., 2001).

Vários métodos de detecção de resistência à meticilina estão sendo desenvolvidos e empregados nos laboratórios (DE GIUSTI et al., 1999). O teste de disco-difusão é o método mais utilizado pelos laboratórios devido a sua fácil e rápida execução, e baixo custo (HUSSAIN et al., 2002). O Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial (CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*) é uma instituição norte-americana, no entanto, pela inexistência de uma padronização brasileira, os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos são baseados nesse protocolo. Periodicamente ocorrem revisões dos testes para detecção de resistência à meticilina em *Staphylococcus*, entre outras.

Em 1999, o CLSI estabeleceu uma diminuição nos pontos de corte para detecção da concentração inibitória mínima (CIM) da oxacilina, a fim de melhorar a correlação entre a detecção da resistência com a presença do gene *mecA* (CLSI, 1999). Outra mudança ocorreu em 2004, na qual a recomendação foi o uso do disco de cefoxitina no teste de disco-difusão,

como método de triagem. O disco de cefoxitina é considerado um melhor preditor para detectar a heterorresistência quando comparado ao disco de oxacilina, pois é um forte indutor da PBP2a (CLSI, 2004). O *S. lugdunensis* é a única espécie, entre os SCoN, que possui pontos de corte iguais aos utilizados para o micro-organismo *S. aureus*. Isso se deve à apresentação de algumas propriedades semelhantes, como a enzima coagulase ligada, o que resulta em testes de coagulase em lâmina ou testes de aglutinação em látex positivos para alguns isolados de *S. lugdunensis*, bem como, a agressividade com que causam as infecções (ANGUERA et al., 2005).

Atualmente, o CLSI recomenda o teste da cefoxitina como método de referência para prever a resistência à meticilina mediada por gene *mecA*, tanto para o grupo dos *S. aureus* e dos *S. lugdunensis*, como para os demais SCoN. O CLSI também recomenda e fornece valores de intervalos da CIM para esses dois grupos, no entanto, com uma diferença, para o primeiro grupo a CIM pode ser efetuada com os antimicrobianos oxacilina e cefoxitina, e para o segundo apenas com a cefoxitina (CLSI, 2014).

Os sistemas automatizados ou semiautomatizados são empregados como testes rápidos, entre eles destaca-se o sistema VITEK® 2 (bioMérieux, França) que possui um monitoramento contínuo do crescimento dos micro-organismos e também fornece a CIM dos antimicrobianos (BÉMER et al., 2005). Outros métodos já utilizados na rotina e também na pesquisa são: o MicroScan (Dade Behring, Califórnia), o teste de aglutinação em látex, triagem em ágar com oxacilina, determinação da CIM pelo método de Etest, e multiplex PCR para a pesquisa dos genes (LOUIE et al., 2001).

Muitos autores consideram que a detecção do gene *mecA* por PCR é a metodologia padrão ouro. Devido que, em casos de infecções severas, é clinicamente útil para detectar rapidamente a suscetibilidade e a identificação da bactéria (BROWN, 2001; MARTINEAU et al., 2000). Contudo, poucos são os laboratórios que usam essa técnica e possuem padrão econômico para aplicar testes de PCR em todos isolados de *Staphylococcus*, sendo assim, o teste de disco-disusão permanece sendo a metodologia de escolha para detectar a resistência dos MRS. O ideal seria a combinação do método fenotípico e genotípico para a detecção rápida e a obtenção acurada da suscetibilidade ou da resistência (SKOV et al., 2003).

1.8 Resistência aos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas do grupo B de *Staphylococcus* - MLS_B

Pesquisas com cepas hospitalares de *Staphylococcus* mostraram um aumento global da resistência à maioria dos antimicrobianos. Em 1986 a resistência à eritromicina era de 41,1%, no entanto, outro estudo posterior relatou que esse percentual aumentou para 63% (CUEVAS et al., 2004). Como outros macrolídeos, a eritromicina é considerada bacteriostática e pode se tornar bactericida em concentrações elevadas ou em contato com micro-organismos muito suscetíveis. Além disso, possui um médio espectro de ação e dessa forma, torna-se um substituto da penicilina G. A sua ação ocorre por inibição da síntese das proteínas, com a ligação à fração 50S do ribossomo, impedindo a fixação do RNA transportador e assim bloqueando o aporte dos aminoácidos componentes das proteínas (TAVARES, 2001).

A resistência adquirida à eritromicina vem sendo relatada em vários micro-organismos, principalmente os de ambiente hospitalar (TAVARES, 2001). Essa resistência pode ser ocasionada por vários motivos, entre esses, pelo menos três são mediados por plasmídeos (BRUNTON et al., 2006). Plasmídeos são pequenos elementos genéticos super-enovelados formados por cadeia dupla de DNA e localizados no citoplasma da célula bacteriana (QUINN et al., 2011). Então, a resistência pode ocorrer por redução da permeabilidade à droga, modificação dos sítios-alvo e também, por hidrólise do próprio antimicrobiano (BRUNTON et al., 2006). A azitromicina tem ação bacteriostática, e seu mecanismo de ação é muito semelhante ao da eritromicina, no entanto, diferencia-se por ter um espectro de ação mais amplo e sua farmacocinética é mais favorável e tem melhor tolerância (TAVARES, 2001).

A clindamicina é muito usada no tratamento de infecções de pele e de tecidos moles causadas por *Staphylococcus*. Possui boa absorção oral e a torna uma opção importante na terapia ambulatorial ou como seguimento após a terapia intravenosa (CIRAJ et al., 2009; SADARI et al., 2011). As estreptograminas são um grupo de antimicrobianos formados de uma mistura de duas classes diferentes, designadas estreptograminas A e B. A quinupristina-dalfopristina é uma estreptogramina semissintética injetável, resultante da mistura dos antimicrobianos quinupristina e dalfopristina e agem em sinergia (LECLERCQ; COURVALIN, 1991; SOUZA et al., 2005). Os antimicrobianos dos grupos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas do grupo B (MLS_B) são opções terapêuticas para tratamento de infecções estafilocócicas em peles e tecidos moles, além de serem alternativas para indivíduos com hipersensibilidade à penicilina (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

Existem dois mecanismos de resistência ligados aos antimicrobianos macrolídeos em *Staphylococcus* que são bem conhecidos: a modificação do alvo dos ribossomos por uma metilase que é mediada por genes *erm* (*erythromycin ribosome methylation*) (NAKAJIMA, 1999) e o mecanismo específico de efluxo do macrolídeo mediado pelo gene *msrA* (MATSUOKA et al., 1999). Outros mecanismos de resistência observados são a inativação dos macrolídeos por enzimas ou as mutações (MURRAY et al., 2014).

Staphylococcus resistentes à eritromicina (macrolídeos) podem apresentar resistência constitutiva ou induzível à clindamicina (lincosamidas), um mecanismo de resistência conhecido como resistência MLS_B . Na resistência constitutiva ($cMLS_B$) os isolados expressam resistência à eritromicina e à clindamicina, enquanto que na resistência induzível ($iMLS_B$) os isolados são resistentes apenas à eritromicina (ROSSI; ANDREAZZI, 2005). A resistência $iMLS_B$ é determinada pela presença de uma família de genes chamados *ermABC*, responsáveis por alterar o sítio alvo de ligação dos macrolídeos no ribossomo bacteriano, conferindo também resistência cruzada às lincosamidas e às estreptograminas do grupo B (OPLUSTIL et al., 2004).

Essa família de genes expressa as N-metiltransferases que realizam a metilação e dimetilação de um resíduo de adeninas no domínio funcional peptidil transferase do RNA ribossômico 23S (LAMBERT et al., 2005). Estão amplamente distribuídos em isolados de *Staphylococcus* oriundos de humanos e animais e localizados, principalmente, em plasmídeos pequenos (HAUSCHILD et al., 2006). A prevalência dos três genes é muito variável e estudos demonstram que isso depende muito da origem da cepa isolada (NAWAZ et al., 2000). Em investigações em isolados MRSA, o gene *ermA* foi prevalente em relação ao *ermC* e não se detectou o *ermB*. (JENSEN et al., 1999; WANG et al., 2008). E quando o gene *ermB* foi encontrado em *S. aureus* e SCoN é sempre em uma frequência menor (COUTINHO et al., 2010).

As bombas de efluxo da família ABC também estão ligadas à resistência aos macrolídeos e são codificadas pelos genes *msrABC*. Essas bombas são proteínas de transporte e contribuem para a multirresistência bacteriana. (WEBBER; PIDDOCK, 2003; KUMAR; SCHWEIZER, 2005). A primeira detecção do gene *msrA* em bactérias foi realizada em isolados de *S. epidermidis* e posterior também encontraram os genes *msrA* e B em *S. aureus* (LEVY, 1992; WANG et al., 2008). O mecanismo de efluxo é caracterizado como o fenótipo MS_B , codificado pelo gene *msrA*, que confere resistência apenas aos macrolídeos (MATSUOKA et al., 2002; DAVID et al., 2005).

No que se refere à detecção da resistência MLS_B , ela pode ser realizada através da DD de antimicrobianos das classes dos macrolídeos e das lincosamidas, bem como através de pesquisas moleculares dos genes responsáveis pela resistência. Na DD se o isolado apresentar resistência à eritromicina e à clindamicina, detecta-se o fenótipo $cMLS_B$, no entanto, se apresentar resistência apenas à eritromicina faz-se necessária a realização do teste de indução por disco-aproximação (D-teste) (OPLUSTIL et al., 2004). Se o D-teste for positivo, caracterizado pelo achatamento do halo do antimicrobiano clindamicina, deve-se reportar que a clindamicina também é resistente, devido a presença do fenótipo $iMLS_B$, que é codificada pelo gene *erm*. Logo, nenhum macrolídeo ou lincosamida deve ser usado como opção terapêutica. Porém, se o D-teste for negativo, deve-se reportar clindamicina como suscetível e relata-se a presença do fenótipo MS_B , em que os macrolídeos não devem ser usados como opção terapêutica e é codificado pelo gene *msrA* (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

1.9 Justificativa

O Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) é o centro de referência ao atendimento à oncologia da 4ª Coordenadoria Regional da Saúde. Nesse nosocômio são efetuados transplantes de medula óssea, tratamentos de leucemias no setor de Hematologia-Oncologia, além de cirurgias de grande porte, urgências e emergências, gerando assim, a constante falta de CPs.

Atualmente, os hemocomponentes são triados por técnicas ultrasensíveis, entretanto, a contaminação bacteriana permanece sendo o risco mais comum relacionado à transfusão (ANDREU et al., 2002) e a subsequente bacteremia passou a assumir um papel de destaque na hemoterapia (ENGELFRIET et al., 2000). A triagem para a detecção de contaminação em todos os CPs também constitui consenso dos profissionais da saúde no HUSM, devido ao risco de reações sépticas que podem ser ocasionadas pela transfusão de CPs contaminados. Em particular, os CPs são considerados, entre os hemocomponentes transfundidos, a principal causa de contaminação bacteriana e são responsáveis pela maioria das reações sépticas transfusionais. Somando-se a isso, é importante destacar a alta incidência da resistência bacteriana atualmente presente, tanto no meio hospitalar como comunitário.

Sabemos que necessitamos de um método de fácil aplicação e baixo custo, porém, rápido e com boa sensibilidade para a realização do controle microbiológico, associado à necessidade que a legislação passe a recomendar a análise bacteriológica total dos hemocomponentes, a fim de minimizar a transfusão de CPs contaminados com bactérias e o

risco das reações sépticas transfusionais. Em razão de que já é de nosso conhecimento a ocorrência de reação séptica transfusional em nosso hospital, sendo evidenciada após a infusão de CPs contaminados com bactérias (MARTINI et al., 2012). Além do mais, a importância de se estudar isolados de SCoN comunitários, visto que são líderes em alguns tipos de infecções, principalmente, em pacientes imunodeprimidos sujeitos a transfusões e, também pela multirresistência observada nesse gênero bacteriano.

O presente trabalho busca a avaliação das técnicas utilizadas para a detecção bacteriana, a identificação dos micro-organismos envolvidos, bem como, a investigação da presença de mecanismos de resistência e fatores de virulência das 16 cepas de *Staphylococcus* isoladas de 691 bolsas de CPs, coletas realizadas em 2009 e 2010. A partir desse estudo na íntegra, acredita-se que ocorrerá um controle microbiológico mais adequado nos hemocomponentes, além de proporcionar um conhecimento da epidemiologia local, tanto da espécie bacteriana mais isolada, assim como, dos mecanismos de resistência e virulência dos SCoN.

1.10 Objetivos

1.10.1 Objetivo geral

Avaliar as metodologias de detecção bacteriana e de resistência dos *Staphylococcus* coagulase negativa (SCoN) isolados das bolsas de concentrados plaquetários (CPs).

1.10.2 Objetivos específicos

Determinar a prevalência da contaminação bacteriana nas bolsas de CPs investigadas;

Avaliar as metodologias para a detecção bacteriana em CPs;

Determinar a metodologia de detecção bacteriana em CPs mais viável para ser implementada em uma rotina laboratorial;

Identificar as espécies bacterianas por meio de metodologia automatizada;

Definir o perfil de suscetibilidade frente aos antimicrobianos dos isolados;

Investigar os mecanismos de resistência e os fatores de virulência apresentados pelos isolados de SCoN;

Determinar a melhor técnica de detecção do biofilme, em isolados de SCoN, para ser implementada em uma rotina laboratorial;

Comparar as técnicas de análise fenotípica com a metodologia do PCR através dos resultados obtidos de sensibilidade e especificidade.

2 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

2.1 Artigo 1 - Avaliação do Desempenho de Culturas Convencionais na Detecção da Contaminação Bacteriana em Concentrados Plaquetários em um Hospital Universitário do Sul do Brasil

2.2 Artigo 2 - Investigation of biofilm formation in coagulase-negative staphylococci isolated from bags of Platelet Concentrates

2.3 Manuscrito 1 - Antimicrobial susceptibility profile and research of *mecA* and *erm* genes in coagulase-negative *Staphylococci* isolated from bags of Platelet Concentrates

2.1 Artigo 1

Avaliação do Desempenho de Culturas Convencionais na Detecção da Contaminação Bacteriana em Concentrados Plaquetários em um Hospital Universitário do Sul do Brasil¹

Análise microbiológica de Plaquetas

Rosiéli Martini, Rosmari Hörner, Cláudia Barbisan Kempfer, Mônica de Abreu Rodrigues, Lívia Gindri, Maísa Kraulich Tizotti, Liliana Urdangarin de Sousa, Silvana Oliveira dos Santos, Jacqueline Nunes Rodrigues

¹ Artigo publicado em: Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v. 35, n. 2, p. 239-244, 2014. (Anexo D).

Avaliação do Desempenho de Culturas Convencionais na Detecção da Contaminação Bacteriana em Concentrados Plaquetários em um Hospital Universitário do Sul do Brasil

Análise microbiológica de Plaquetas

Rosiéli Martini¹, Rosmari Hörner², Cláudia Barbisan Kempfer³, Mônica de Abreu Rodrigues³, Livia Gindri³, Maísa Kraulich Tizotti³, Liliana Urdangarin de Sousa³, Silvana Oliveira dos Santos³, Jacqueline Nunes Rodrigues³

AFILIAÇÕES:

¹ Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

² Professora Adjunta do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

³ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

AUTOR CORRESPONDENTE:

Profa. Dr^a.: Rosmari Hörner, Laboratório de Bacteriologia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria (SM), Rio Grande do Sul (RS). Prédio 26, Sala 1201, Campus da UFSM, CEP: 97015-900. Telefax: (55) 3220-8751, e-mail: rosmari.ufsm@gmail.com

RESUMO

As transfusões sanguíneas retratam um suporte indispensável no tratamento de pacientes com câncer. Por outro lado, representam um sério risco de sepse bacteriana. Os concentrados plaquetários (CPs) são os hemocomponentes com a mais alta frequência de contaminação bacteriana, responsáveis pela maioria das reações sépticas transfusionais. Este estudo objetivou avaliar diferentes metodologias convencionais de cultura na detecção da contaminação bacteriana em CPs. Um total de 691 amostras de CPs (665 plaquetas randômicas e 26 plaquetaféreses), provenientes do Hemocentro do Estado do Rio Grande do Sul (HEMORGS), foi analisado. Foram empregadas técnicas de cultura qualitativa, quantitativa e de crescimento diário, com as quais evidenciamos 2,32% de contaminação bacteriana nas amostras analisadas, sendo todas provenientes de coleta pelo método randômico. A metodologia qualitativa apresentou o melhor desempenho. Esse fato nos permite reforçar a importância da realização de triagem bacteriológica pré-transfusional em todas as amostras de CPs para a redução dos riscos de sepse.

Palavras-chave: Concentratos plaquetários; bactérias; metodologias; transfusão sanguínea.

INTRODUÇÃO

A transfusão de concentrados plaquetários (CPs) é essencial para o tratamento de pacientes com doenças neoplásicas e hematológicas (Niu et al. 2006). A contaminação bacteriana das plaquetas é atualmente a complicação infecciosa mais comum, posterior à transfusão (Chang et al. 2004). Anteriormente à década de setenta as plaquetas eram estocadas a 4 °C com a finalidade de diminuir o risco da contaminação e proliferação bacteriana. No entanto em 1969, Murphy e Gardner concluíram em seus estudos, que a estocagem a 13, 20, 22 e 37 °C melhoravam a viabilidade e a funcionalidade das plaquetas (Murphy & Gardner 1969). A partir desta evidência iniciou-se essa prática, a qual é mantida até hoje e adotada mundialmente, na qual a estocagem dos CPs ocorre entre 20 a 24 °C por 5 dias (AABB 2004, Brasil 2010). No entanto, estudos atuais demonstraram que esta temperatura favorece o crescimento bacteriano (McDonald et al. 2004).

O desfecho clínico dos pacientes, os quais recebem CPs contaminados com bactérias, depende de múltiplos fatores, entre os mais importantes pode-se citar: o estado imunológico, o número de bactéria infundida, a virulência da espécie, o fato do paciente estar em uso de antimicrobiano no momento da infusão, além da capacidade da bactéria em produzir endotoxinas. Este último fator está associado a um prognóstico desfavorável (Blajchman &

Goldman 2001; Blajchman 2004). Constitui consenso que o principal mecanismo de contaminação bacteriana dos CPs é originário da pele do doador ou do sangue (Blajchman 2002). Os microrganismos mais comumente encontrados como contaminantes dos CPs são as bactérias gram positivas (GP) comensais da pele (Brecher & Hay 2005).

Nos países acreditados pela *Food and Drug Administration (FDA)*, a detecção da contaminação nos CPs é realizada através de exames bacteriológicos em todas as unidades de CPs como triagem pré-transfusional (AABB 2004). Já no Brasil, a regulamentação dos serviços de hemoterapia é realizada pela Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 57, de 16 de dezembro de 2010, que não preconiza a cultura em todas as amostras como triagem pré-transfusional, mas em apenas 1% da produção mensal ou 10 unidades por mês (Brasil 2010).

Várias técnicas têm sido sugeridas para a triagem da contaminação bacteriana em CPs (Krishnan & Brecher 1995, Goldman & Blajchman 2000), as quais vão desde a realização de um extenso questionário ao doador, melhoramento no processo de desinfecção da pele e diminuição do tempo de estocagem das bolsas (Grossman et al. 1991, Blajchman & Goldman 2001), testes de marcadores metabólicos como a medida do pH e do nível de glicose (Martini et al. 2010) e coloração de Gram.

Na década passada a introdução de testes para a detecção de anticorpos e amplificação dos ácidos nucleicos contribuiu para diminuir os riscos (Canellini et al. 2010). Porém, o diagnóstico para a avaliação da esterilidade das amostras de CPs depende diretamente da qualidade do teste bacteriológico (Canellini et al. 2010) a qual requer tempo para que os microrganismos proliferem e sejam passíveis de detecção (Ribeiro & Kutner 2003). Atualmente contamos com metodologias de cultura aprovadas para a detecção da contaminação bacteriana em plaquetas (Canellini et al. 2010), porém nenhuma delas padronizada como o “gold standard”. O fato de nenhuma técnica atender a requisitos como alta sensibilidade e especificidade, curto intervalo de tempo para a detecção da contaminação, custo acessível e fácil padronização para uso rotineiro geram preocupação nos sistemas de hemovigilância utilizados (Mitchel & Brecher 1999). A investigação da presença de contaminantes em CPs necessita ser rápida, sensível e principalmente de fácil manejo (Dreier et al. 2004).

Atualmente o método mais utilizado para a detecção de contaminação bacteriana em hemocomponentes é a cultura automatizada (Cunha, 2006). Existem várias estratégias para reduzir a transfusão de hemocomponentes contaminados com bactérias (Brecher & Hay, 2005). Dentre as metodologias descritas na literatura para o controle microbiológico de hemoderivados pode-se citar: a avaliação dos parâmetros metabólicos, na qual são utilizadas

fitas reagentes para verificar a concentração de glicose e o valor do pH (Hay & Brecher, 2004); o exame microscópico, que tem sido proposto como triagem de bactérias em CPs, sendo que, normalmente são utilizados os corantes de Gram e de Laranja de Acridina (Mitchell & Brecher, 1999); os métodos baseados na detecção de DNA/RNA, os quais são amplamente empregados e possuem como vantagem a rapidez e a sensibilidade na triagem de bactérias em CPs (Sen, 2000); métodos como *pan genera detection (PGD)* (Hall et al., 2004) e *Fluorescence-activated cell sorting analysis (FACS)* (Schmidt et al., 2006) e os métodos de cultura automatizados que foram aprovados pelo *FDA* para a detecção de contaminação bacteriana em CPs. Os testes são: *BacT/Alert®* e o sistema de detecção bacteriana aprimorado não automatizado - *enhanced bacterial detection system – (eBDS)* (FDA, 2004).

Este estudo, realizado no Hemocentro do Estado do Rio Grande do Sul (HEMORGS) localizado em Santa Maria (SM) no Rio Grande do Sul (RS), objetivou avaliar diferentes ensaios convencionais de detecção da contaminação bacteriana em CPs, com o intuito de eleger uma metodologia que fosse ao mesmo tempo sensível, de baixo custo e de fácil execução para ser implementada na rotina desse hemocentro. Os CPs coletados no HEMORGS, em quase sua totalidade, são utilizados pelos pacientes hemato-oncológicos do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), um hospital universitário, terciário, que presta atendimento especializado a 30 municípios satélites de pequeno porte. A detecção dos CPs contaminados reverte na diminuição do sério risco da sepse bacteriana, a qual aumenta o período de internação, custos hospitalares, morbidade e mortalidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Analisou-se um total de 691 CPs, dos quais 665 foram obtidos pela centrifugação do sangue total e 26 pelo método de aférese. Todas as amostras foram coletadas no HEMORGS durante os anos de 2009 e 2010, as culturas foram realizadas a partir da porção tubular das bolsas de plaquetas, correspondente a aproximadamente 10 cm, da qual foram retiradas alíquotas equivalentes a um volume médio de 100µL e de 200µL dos CPs.

Após a coleta, as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT) do Centro de Ciências da Saúde (CCS). Os diferentes ensaios para detecção da contaminação bacteriana em CPs foram realizados em Cabine de Segurança Biológica II, exaustão total, com desinfecção da porção

tubular da bolsa de plaquetas com álcool 70%, por aproximadamente 1 minuto. Posteriormente, foram realizados os diferentes ensaios de detecção bacteriana.

Ensaio

Qualitativo

O ensaio qualitativo foi realizado, em 612 amostras, de acordo com o descrito por Cunha e colaboradores (Cunha et al. 2008). Aproximadamente 200µL dos CPs foram semeados em 2 mL de caldo Mueller Hinton (CMH) e incubados por 5 dias a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, em ar ambiente. Após, 10µL desse caldo foram repicados em Ágar Sangue (AS), com 5% de sangue de carneiro. As amostras que em 48h não demonstraram nenhum crescimento bacteriano no AS foram consideradas negativas. Já as que apresentaram desenvolvimento de Unidades formadoras de colônias (UFC) foram consideradas positivas, sendo que novo repique do caldo foi realizado, para exclusão de uma possível contaminação.

Quantitativo

Este ensaio, descrito primeiramente por Yomtovian e colaboradores (Yomtovian et al. 2006), foi realizado em 292 amostras deste estudo. Uma alíquota de 100µL de cada CP foi semeada em AS e incubada a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ em atmosfera de microaerofilia, por 24 - 48h. Posteriormente, era efetuada a análise das placas e a contagem das UFC por mililitro de CPs (UFC/mL). As amostras que apresentaram crescimento bacteriano, independente do número de colônias desenvolvidas, foram consideradas positivas (utilizou-se o fator de multiplicação 10 para obter-se o número de UFC/mL).

Crescimento diário

Realizou-se a técnica qualitativa (Cunha et al. 2008) em 79 amostras desta pesquisa, seguida da quantitativa (Yomtovian et al. 2006), no entanto com algumas modificações, a qual se nomeou de ensaio do Crescimento Diário. A cada 24 h de incubação no caldo Mueller Hinton, 10µL do caldo contendo a amostra eram repicados em AS, com o auxílio de pipeta automática, e as placas incubadas em estufa bacteriológica ($35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ com 5 % de CO_2 por 24 – 48 h). Subsequentemente realizaram-se as sementeiras até o quinto dia de incubação, com intervalo de 24 h em cada análise. No total foram realizadas 4 sementeiras, e as leituras feitas em 24, 48, 72 e 96 h após a primeira incubação.

As amostras que em 48 h não demonstraram crescimento de colônias foram liberadas como negativas, e as com crescimento, consideradas positivas; estas últimas foram repicadas novamente, para exclusão de uma possível contaminação durante a manipulação das mesmas.

Identificação bacteriana

As amostras confirmadas como positivas, ou seja, contaminadas por bactérias, foram submetidas aos seguintes testes para identificação bacteriana: coloração de Gram, identificação fenotípica convencional (Koneman et al. 2008).

Conceitos éticos

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), sob o número 0285.0.243.000-09.

RESULTADOS

Das 691 amostras de CPs investigadas, 16 (2,32%) apresentaram crescimento bacteriano. Na Figura 1 pode-se observar a distribuição das amostras positivas de acordo com a técnica utilizada.

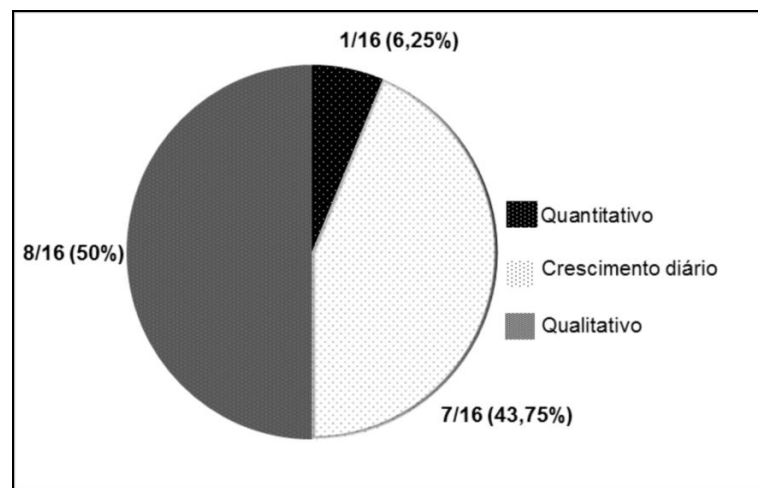


Figura 1 – Distribuição das amostras positivas de acordo com a técnica de detecção bacteriana utilizada.

A amostra positiva pelo método quantitativo apresentou 10^2 UFC/mL. Através da metodologia de crescimento diário foi possível observar o desenvolvimento de colônias bacterianas em diferentes dias de semeadura em AS, o que pode ser visualizado na Tabela I.

Todas as amostras que apresentaram crescimento bacteriano, independente do dia do repique, demonstraram também nos subsequentes repiques presença de bactérias, confirmando a contaminação bacteriana.

Tabela I – Distribuição dos índices de contaminação bacteriana em amostras de plaquetas de acordo com o dia de incubação no CMH, pela técnica do crescimento diário.

	PERÍODO DE INCUBAÇÃO			
	24 h	48 h	72 h	96 h
Amostras Contaminadas	3/7	1/7	1/7	2/7
Índice de Contaminação	42,86%	14,28%	14,28%	28,58%

Todos os isolados foram identificados como *Staphylococcus* Coagulase Negativo (SCoN). A avaliação do perfil de sensibilidade destes isolados, assim como a investigação de mecanismos de resistência por testes fenotípicos e genotípicos estão sendo realizados por nosso grupo de pesquisa, e constituirão objeto de posterior relato.

DISCUSSÃO

Os testes de detecção bacteriana utilizados neste estudo demonstraram que 2,32% das amostras de CPs analisadas, oriundas do HEMORGS, estavam contaminadas por bactérias. Essa porcentagem pode ser considerada elevada, quando comparada à encontrada em outros estudos brasileiros e internacionais. Em estudo realizado em Goiânia, Brasil, Cunha e colaboradores encontraram uma taxa de 0,4% de contaminação nos CPs (Cunha et al. 2008). Outras pesquisas, realizadas recentemente em outros países também demonstraram baixos níveis de contaminação, tais como os obtidos por Hsueh e colaboradores no Taiwan, Martínez e colaboradores em Houston e de Walther-Wenke e colaboradores na Alemanha e Baviera, nos quais os autores relataram taxas variando entre 0,3 a 0,34% de contaminação bacteriana nos CPs (Hsueh et al. 2009, Martínez et al. 2010, Walther-Wenke et al. 2010).

As amostras de CPs positivas detectadas nesse estudo representam um grande risco para os receptores, uma vez que todas foram obtidas de plaquetas randômicas, as quais são transfundidas na forma de pool (em torno de 7 unidades agrupadas em uma única bolsa), para obtenção da dose ideal para uma transfusão. Dessa maneira, o risco de receber uma bolsa de CPs com uma elevada carga bacteriana se torna grande, estando diretamente relacionada à reação séptica transfusional.

Todos os microrganismos isolados nas amostras de CPs do nosso estudo foram GP, identificados como SCoN, resultado idêntico ao encontrado por outros autores (Hsueh et al. 2009, Walther-Wenke et al. 2010). No entanto, não identificamos nenhuma contaminação por bactérias gram negativas (GN), contrapondo-se ao estudo realizado por Cunha e colaboradores, que descreveram uma taxa de 62,5% de contaminação de CPs por bactérias GN, e apenas 37,5% por GP (Cunha et al. 2008).

Sabe-se que SCoN, principalmente o *Staphylococcus epidermidis*, é um significativo patógeno que está relacionado à endocardite bacteriana. Dessa maneira, é importante que o isolamento em CPs contaminados seja considerado como fator de risco para a endocardite (Hsueh et al. 2009). Pesquisas recentes relatam a formação de biofilme, mecanismo de resistência, durante a estocagem das plaquetas. Isso que indica que a temperatura de armazenamento desses hemoderivados (temperatura ambiente) contribui para a expressão desta virulência, e intensifique o risco potencial desta espécie de patógeno ocasionar reação séptica transfusional (Greco et al. 2007).

A virulência do microrganismo, citado acima, somada a deficiência do sistema imunológico, expõe esses pacientes receptores a complicações clínicas severas, principalmente os pacientes oncológicos, em especial os trombocitopênicos e neutropênicos (Hsueh et al. 2009). Além disso, o uso indiscriminado de antimicrobianos aliado à utilização dos caracterizados como de amplo espectro favorece a seleção de bactérias resistentes e mutantes, as quais requerem a utilização de antibióticos mais potentes, gerando um círculo vicioso de resistência bacteriana (Gales et al. 2012).

No que se refere ao desempenho metodológico de cultura observado em nosso estudo, a maior detecção da contaminação bacteriana em CPs ocorreu com o método qualitativo, seguido pelo de crescimento diário, com pouca diferença na detecção. Esta última metodologia, devido ao grande número de repiques, inviabiliza sua utilização na rotina deste hemocentro, aliado ao elevado número de amostras coletadas diariamente no HEMORGS.

Neste atual cenário da clínica médica, a qualidade e a rapidez dos resultados podem representar a salvação da vida dos pacientes, sendo que na microbiologia esta realidade é mais evidente. Em relação à cultura convencional, os processos automatizados garantem a rapidez na obtenção dos resultados, porém com a mesma restrição de falsos negativos nos primeiros dias de armazenamento (Brecher et al. 2002). Em bacteriologia, o principal teste para a avaliação da esterilidade é a cultura. As metodologias convencionais ainda possuem considerável utilização, especialmente no Brasil. Isto se deve, em grande parte, pela sua

simplicidade, custo acessível, fácil execução e pela excelente acurácia, quando realizadas de maneira adequada.

A evolução tecnológica ocorrida na medicina transfusional considera mandatória a eliminação dos riscos que a transfusão de CPs contaminados com bactérias pode ocasionar. Assim, estudos com maiores amostragens são necessários, a fim de promover a segurança do paciente para eliminar o risco de sepse decorrente da transfusão desses hemocomponentes contaminados com bactérias provenientes, em sua grande maioria, da flora cutânea do doador.

O desenvolvimento de um método adequado para detectar bactérias em CPs para uso na rotina dos bancos de sangue continua sendo um desafio. Necessita-se que no Brasil a triagem bacteriológica seja efetuada em todas as bolsas de plaquetas, desde que a metodologia empregada seja sensível e de fácil execução. A triagem bacteriológica em todas as amostras de CPs conferirá maior segurança ao paciente, reduzindo assim a morbidade e mortalidade dos receptores. Esse estudo continua em andamento e métodos automatizados de detecção bacteriana estão sendo testados.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a toda a equipe de funcionários do HEMORGS de SM, RS, em especial aos farmacêuticos Zanoni Segala e Ms. Viviane Ratzlaff. Bem como, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram que não houve conflito de interesse na elaboração deste manuscrito.

ABSTRACT**Performance Assessment of Crops in Conventional Detection of Bacterial Contamination in Platelet Concentrates in a University Hospital South of Brazil**

Microbiological analysis of Platelet

The blood transfusions are an indispensable support in the treatment of cancer patients. On the other hand, represent a serious risk of bacterial sepsis. The platelet concentrates (PCs) are the blood components with the highest frequency of bacterial contamination, responsible for most reactions septic transfusion. This study evaluated different methodologies conventional culture for detection of bacterial contamination in PCs. A total of 691 samples of PCs (665 random donor platelets and 26 platelet apheresis), from the Blood Center of the State of Rio Grande do Sul (HEMORGS), was analyzed. Was employed culture techniques qualitative, quantitative, and daily growth, which evidenced 2,32% of bacterial contamination in samples analyzed, all of random donor platelets. Qualitative methodology showed the best performance. This fact allows us to reinforce the importance of performing pre-transfusion bacteriological screening in all samples of PCs to reduce the risk of sepsis.

Key words: Platelets Concentrates, bacteria, methodology, blood transfusion.

REFERÊNCIAS

AABB - American Association of Blood Banks. Guidance on implementation of new bacteria and reduction standard. Bulletin 04-07. Bethesda, MD. 2004.

Blajchman MA, Goldman M. Bacterial contamination of platelet concentrates: incidence, significance, and prevention. *Semin Hematol.* 2001; 38(Suppl 11):20-26.

Blajchman MA. Incidence and significance of the bacterial contamination of blood components. *Dev Biol.* 2002; 108:59-67.

Blajchman MA. Bacterial contamination of cellular blood components: risks, sources and control. *Vox Sang.* 2004; 87(Suppl 1)98-103.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 57, de 16 de dezembro de 2010. Determina o Regulamento Sanitário para Serviços que desenvolvem atividades relacionadas ao ciclo produtivo do sangue humano e componentes e procedimentos transfusionais. *Diário Oficial da União; Poder Executivo, Brasília, DF, nº 241 – Seção 1, p. 119, 17 dez. 2010.* Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/anexo/anexo_res0057_16_12_2010.pdf>. Acesso em: 10 abril 2012.

Brecher ME, Heath DG, Hay SN, Rothemberg SJ, Stutzman LC. Evaluation of a new generation of culture bottle using an automated bacterial culture system for detecting nine common contaminating organisms found in platelet components. *Transfusion.* 2002; 42(6):774-779.

Brecher ME, Hay SN. Bacterial contamination of blood components. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18(1):195-204.

Canellini G, Waldvogel S, Anderegg K, Tissot JD. Bacterial Contamination of Platelet Concentrates: Perspectives for the Future. *Labmedicine.* 2010; 41(5):301-305.

Chang AH, Kirsch CM, Mobashery N, Johnson N, Levitt LJ. Streptococcus bovis Septic Shock Due to Contaminated Transfused Platelets. Am J Hematol. 2004; 77(3):282-286.

Cunha GS. Prevalência da contaminação bacteriana em concentrados de plaquetas do serviço de hemoterapia de um hospital universitário em Goiânia-GO. 2006. 75 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2006.

Cunha GS, Leão L, Pimenta F. Bacterial contamination of random-donor platelets in a university hospital in the midwestern region of Brazil. Transfusion. 2008; 48(2):282-285.

Dreier J, Störmer M, Kleesiek K. Two novel real-time reverse transcriptase PCR assays for rapid detection of bacterial contamination in platelet concentrates. J Clin Microbiol 2004; 42(10):4759-4764.

FDA. *Food and Drug Administration*. EUA, 2004. Disponível em: < <http://www.fda.org/>>. Acesso em: 30 mar. 2013.

Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008–2010). Diagn Microbiol Infect Dis. 2012; 73(4):354–360.

Goldman M, Blajchman MA. Bacterial contamination of platelets. In: Seghatchian J, Snyder EL, Krailadsiri P, editors. Platelet therapy. Current status and future trends. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science B.V. 2000;401-414.

Greco C, Martincic I, Gusinjac A, Kalab M, Yang AF, Ramírez-Arcos S. *Staphylococcus epidermidis* forms biofilms under simulated platelet storage conditions. Transfusion. 2007; 47(7):1143-1153.

Grossman BJ, Kollins P, Lau PM, Perreten JL, Bowman RJ, Malcolm S, Palko WM. Screening blood donors for gastrointestinal illness: a strategy to eliminate carriers of *Yersinia enterocolitica*. Transfusion. 1991; 31(6):500-501.

Hay SN, Brecher ME. Validation of pH and glucose determination for bacteria detection screening in platelet concentrates stored in the Terumo Teruflux XT612 platelet container. *Transfusion*. 2004 ; 44(9):1395.

Hsueh JC, Ho CF, Chang SH, Pan FZ, Chen SC, Shi MD, Chien ST. Blood surveillance and detection on platelet bacterial contamination associated with septic events. *Transf Med*. 2009; 19(6):350-356.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC. *Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. Tradução de Eiler Fritsch Toros. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

Krishnan LG, Brecher ME. Transfusion-transmitted bacterial infection. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1995; 9(1):167-185.

Martínez F, Tarrand J, Lichtiger B. Impact on Patient Outcome Following Transfusion of Bacterially Contaminated Platelets. *Am J Clin Pathol*. 2010; 134(2):207-212.

Martini R, Rodrigues MA, Soares AOE, Gindri L, Tizotti MK, Kempfer CB, Roehrs MCSC, Mayer LE, Ratzlaff V, Horner R. Avaliação da detecção de contaminação bacteriana em Concentrados Plaquetários utilizando bacteriológico quantitativo e redução da concentração de glicose e do pH. *Revista Saúde (Santa Maria)*. 2010; 36(2):29-37.

McDonald CP, Roy A, Mahajan P, Smith R, Charlett A, Barbara JA. Relative values of the intervention of diversion and improvement of donor-arm disinfection to reduce the bacterial risk from blood transfusion. *Vox Sang*. 2004; 86(3):178-182.

Mitchell KM, Brecher ME. Approaches to the detection of bacterial contamination in cellular blood products. *Transfus Med Rev*. 1999; 13(2):132-144.

Murphy S, Gardner FH. Effect of storage temperature on maintenance of platelet viability-deleterious effect of refrigerated storage. *N Engl J Med*. 1969; 280(20):1094-1098.

Niu MT, Knippen M, Simmons L, Holness LG. Transfusion-transmitted *Klebsiella pneumoniae* fatalities, 1995 to 2004. *Transfus Med Rev*. 2006; 20(2):149-157.

Ribeiro AAF, Kutner JM. Prevenindo a contaminação bacteriana de componentes sanguíneos. *Rev Einstein*. 2003; 1:126-128.

Schmidt M. et al. FACS technology used in a new rapid bacterial detection method. *Transfusion Med*. 2006; 16(5):355-361.

Sen K. Rapid identification of *Yersinia enterocolitica* in blood by the 5_nuclease PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(5):1953–1958.

Walther-Wenke G, et al. Screening of platelet concentrates for bacterial contamination: spectrum of bacteria detected, proportion of transfused units, and clinical followup. *Ann Hematol*. 2010; 89(1):83-91.

Yomtovian RA, Palavecino EL, Dysktra AH, Downes KA, Morrissey AM, Bajaksouzian S, Pokorny MA, Lazarus HM, Jacobs MR. Evolution of surveillance methods for detection of bacterial contamination of platelets in a university hospital, 1991 through 2004. *Transfusion*. 2006; 46(5):719-730.

2.2 Artigo 2

Investigation of biofilm formation in coagulase-negative staphylococci isolated from bags of Platelet Concentrates¹

Presence of biofilm in bacterial contaminants of PCs

Martini Rosiéli¹, Hörner Rosmari^{1*}, Rampelotto Roberta Filipini¹, Garzon Litiéri Razia¹,
Nunes Melise Silveira¹, Teixeira Mayza Dalcin², Graichen Daniel Ângelo Sganzerla²

¹ Artigo aceito para publicação no *Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine* em 07 de abril de 2015 (Anexo E).

Investigation of biofilm formation in coagulase-negative staphylococci isolated from bags of Platelet Concentrates

Presence of biofilm in bacterial contaminants of PCs

Martini Rosiéli¹, Hörner Rosmari^{1*}, Rampelotto Roberta Filipini¹, Garzon Litiérri Razia¹, Nunes Melise Silveira¹, Teixeira Mayza Dalcin², Graichen Daniel Ângelo Sganzerla²

Martini Rosiéli¹ (rosifarma@gmail.com)

Hörner Rosmari^{1*} (rosmari.ufsm@gmail.com)

Rampelotto Roberta Filipini¹ (robertarampelotto@gmail.com)

Garzon Litiérri Razia¹ (liti_razia@msn.com)

Nunes Melise Silveira¹ (melisenunes@hotmail.com)

Teixeira Mayza Dalcin² (teixeira.mayza@gmail.com)

Graichen Daniel Ângelo Sganzerla² (das.graichen@ufsm.br)

¹Laboratory of Bacteriology and Department of Clinical and Toxicology Analysis of Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

²Laboratory of Evolutionary Genetics of Centro de Educação Superior Norte (CESNORS), Palmeira das Missões, Rio Grande do Sul, Brazil.

* Corresponding author for reprint requests: Prof. Dr. Rosmari Horner.

- Postal Address: Laboratory of Bacteriology and Department of Clinical and Toxicology Analysis of Universidade Federal de Santa Maria. Building 26, Room 1201, Campus of UFSM, Zip code: 97015-900 - Santa Maria, RS.

- Telephone number: (55) 3220-8751

- E-mail address: rosmari.ufsm@gmail.com

Investigation of biofilm formation in coagulase-negative staphylococci isolated from bags of Platelet Concentrates

Presence of biofilm in bacterial contaminants of PCs

Abstract: Platelet Concentrates (PCs) are the blood components with the highest rate of bacterial contamination, and coagulase-negative staphylococci (CoNS) are the most frequently isolated contaminants. This study investigated the biofilm formation of 16 contaminated units out of 691 PCs tested by phenotypic and genotypic methods. Adhesion in Borosilicate Tube (ABT) and Congo Red Agar (CRA) tests were used to assess the presence of biofilm. The presence of *icaADC* genes was assessed with the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. With VITEK® 2, *Staphylococcus haemolyticus* was considered the prevalent CoNS (31.25%). The CRA characterized 43.8% as probable biofilm producers, and for the ABT test, 37.5%. The *icaADC* genes were identified in seven samples with the PCR. The ABT technique showed 85.7% sensitivity and 100% specificity when compared to the reference method (PCR), and presented high agreement ($k=0.8$). This study shows that species identified as PCs contaminants are considered inhabitants of the normal skin flora and they might become an important pathogen. The results also lead to the recommendation of ABT use in laboratory routine for detecting biofilm in CoNS contaminants of PCs.

Keywords: Biofilm, staphylococci, Platelet Concentrates, Transfusion, Microbiology.

Investigação de formação de biofilme em *Staphylococcus coagulase negativa* isolados de bolsas de Concentrados Plaquetários

Presença de biofilme em contaminantes bacterianos de CPs

Resumo: Concentrados plaquetários (CPs) são os componentes do sangue com a maior taxa de contaminação bacteriana e os *Staphylococcus coagulase negativa* (SCoN) são os contaminantes mais frequentemente isolados. Este estudo investigou a formação de biofilme de 16 isolados de SCoN oriundos de uma análise microbiológica de 691 bolsas de CPs por métodos fenotípicos e genotípicos. Adesão em Tubo de Borossilicato (ATB) e Ágar Vermelho Congo (AVC) foram os testes utilizados para avaliar a presença do biofilme. A presença dos genes *icaADC* foi avaliada através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (RCP). Com o VITEK® 2, o *Staphylococcus haemolyticus* foi considerado o SCoNs prevalente (31,25%). O AVC caracterizou 43,8% como prováveis produtores de biofilme e o teste ATB, 37,5%. Os genes *icaADC* foram identificados em sete amostras, através da RCP. A técnica de ATB mostrou 85,7% de sensibilidade e 100% de especificidade, quando comparado com a metodologia considerada referência (RCP) e mostrou uma concordância elevada ($k=0,8$). Este estudo demonstra que as espécies identificadas como contaminantes dos CPs são considerados habitantes da flora normal da pele e eles podem tornar-se importantes patógenos. Estes resultados também levam a recomendação da ATB na rotina laboratorial para a detecção de biofilme em SCoN contaminantes de CPs.

Palavra-chave: Biofilme, *Staphylococcus*, Concentrados Plaquetários, Transfusão, Microbiologia.

1 Introduction

Platelet Concentrates (PCs) are blood components widely used in patients with neoplastic diseases who are undergoing chemotherapy as a way to reduce the risk of bleeding²⁷. However, such components are the ones with the highest rate of bacterial contamination, being considered responsible for almost all septic transfusion reactions¹³.

According to the Brazilian Ministry of Health, approximately 3.5 million blood donations are annually held in the country⁸. The Brazilian Hemotherapy Service consists of a vast network that offers about 2.332 providing service units⁹. This scenario reveals the great national physical infrastructure necessary to meet the demand for blood components in the country.

While Gram-positive bacteria (GP) are responsible for the highest rates of contamination in PCs (60%), the less frequent Gram-negative (GN) may present the greatest number of fatal septic reactions¹⁶. Among the GP, coagulase-negative staphylococci (CoNS) stand out and *Staphylococcus epidermidis* is the most frequently involved species^{11,33}, and their capacity to adhere to polymer surfaces and consequent biofilm production are virulence factors of this species⁴³.

In recent years, CoNS have emerged as important nosocomial pathogens, especially for immunocompromised patients, due to their ease in incorporating different genes resistant to antimicrobials favored by the biofilm environment in the exchange of genetic material. This virulence factor has been considered one of the most significant risks to patients. The difficulty of a clinical treatment of infections associated with biofilms has direct and indirect consequences (longer hospitalization, cost of antibiotics and complementary medicines, and diagnostic procedures) on clinical outcome and quality of life of the patient^{20,45,52}.

Biofilm is defined as a sessile microbial community surrounded by a polymeric extracellular matrix produced by the bacteria¹⁷. An important component in biofilm accumulation of *S. epidermidis* is the polysaccharide intercellular adhesin (PIA) and its production is mediated by the gene *ica* (intercellular gene cluster adhesion), an operon that contains the *icaRADBC*^{12,35,40,41}, four biosynthetic genes (*icaADBC*) and one regulation gene (*icaR*). The PIA is a linear homopolymer composed by approximately 130 residuals of N-acetylglucosamine connected by β -1,6 links, of which 15 to 20% are deacetylated³⁵.

The enzymes IcaA and IcaD, when co-expressed, will show better activity for the assembly of β (1-6)-linked glucosaminoglycans that comprise PIA. The absence of IcaD is associated with a decrease in PIA production²⁶, the likely IcaC functions in the extrusion of PIA from the bacterial cell⁴⁴, whereas the IcaB appears to function as a deacetylase⁵⁵.

Although the expression of the *icaA* gene might promote a low production of PIA, the expression of *icaAD* or *icaADC* genes stimulates an increased production of biofilm^{21,26,28,53}. Many factors influence the biofilm formation under physiological conditions. It is known that biofilm formation is subject to environmental conditions such as sub-inhibitory concentrations of antimicrobials, temperature rise, anaerobiosis, osmolarity, thus leading to the change between the positive and the negative phenotypes of biofilm¹².

Some studies have reported that several genes are directly or indirectly involved in the molecular mechanisms of biofilm formation in *S. epidermidis*, and the most outstanding are the *atlE* gene which encodes the AtlE autolysin that is responsible for the ability to directly connect to the polymeric surface³¹; the *agr* gene which controls biofilm formation, whose non-functionality facilitates the primary attachment of the pathogen to the surface⁵⁴; the *luxS* gene, with a significant impact on biofilm formation, and whose deletion leads to an increase in the transcription regulation of *icaADBC*, resulting in an increase in the PIA synthesis^{36,57}; and the *icaR* gene, which is very important for biofilm formation, as it is considered a negative regulator of transcription of *icaADBC*, essential in the production of PIA²⁸. Besides these genes, the proteins *Aap* (accumulation-associated protein)⁴⁵ and *Bap* (biofilm-associated protein)⁵¹ are directly associated with biofilm formation. Therefore, it becomes increasingly clear that the potential virulence of a bacterium does not depend exclusively on a single factor.

Biofilms are highly hydrated structures containing channels that allow the internal diffusion of nutrients and oxygen, and their formation protects against the innate defense mechanisms of the host and the influx of antimicrobials, hindering the drug diffusion in tissues²², thus facilitating the development of chronic infections¹⁸. It is a consensus in the literature that the *icaA*, C and D genes are responsible for encoding biofilm-forming enzymes, evidenced in most of the CoNS^{2,43}.

This study assessed 16 bacteria isolated from 691 bags of PCs from the Blood Bank of the State of Rio Grande do Sul in Santa Maria (HEMORGS/SM, RS), in order to detect biofilm formation in these contaminants, by means of phenotypic and genotypic methods.

2 Materials and methods

2.1 Inclusion criteria for bacterial isolates

A total of 691 PCs were analyzed, considering that 665 were obtained by centrifugation of whole blood and 26 by apheresis. All samples were collected at HEMORGS between 2009 and 2010, and the cultures were prepared from the tubular portion of the bags

of platelets. After collection, the samples were sent to the Laboratory of Bacteriology, Department of Clinical and Toxicological Analysis of the Health Sciences Center of Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). The tests for the detection of bacterial contamination in PCs were performed in a type II biosafety cabinet, totally exhausted. The sterilization of the tubular portion of the bags of PCs was performed with 70% alcohol, for approximately 1 minute. Bacterial investigation of these PCs bags is described in detail by Martini et al.³⁹.

Since the opening of HEMORGS - Santa Maria in May 2008, bacteriological control has been conducted in whole blood-derived platelets (10 monthly samples) and apheresis platelets (10 monthly samples)³⁸. The technique used for routine bacteriological screening at HEMORGS is described by Cunha et al.¹⁹: approximately 300 microliters (μL) are removed from the platelet bag tubing, cultured in 2 millilitre (mL) of Mueller Hinton broth (MHB), and incubated at 35 ± 2 °C in ambient temperature. After 5 days of incubation, 10 μL of the broth containing the PC sample are sub-cultured in sheep blood agar 5% (BA), and the plates incubated in the same conditions. The samples that show bacterial growth within 24-48 hours (h) are subcultured from initial MHB to new plates of BA, and incubated in the same conditions, in order to exclude false positives. The samples are considered "true positive" after the culture repetition and confirmation with the isolation of bacteria obtained from the first culture³⁸. This quality control follows the norms recommended by the legislation, which does not propose the culture in all samples as pre-transfusion screening, but either 1% of the monthly production or 10 units per month^{6,7}.

Currently, the Ordinance No. 2.712 of November 12, 2013, redefines the technical regulation for hemotherapeutic procedures. It describes that the bacteriological control of PCs remains the same as reported by the current Resolution of the Collegiate Board of Directors (RDC) No. 34 of June 11, 2014, as well as the previous RDC No. 57 of December 16, 2010^{6,7}. Nevertheless, with the inclusion of the paragraph 8 (§ 8) of Article 116, which describes that "*Pelo alto risco de contaminação microbiológica dos concentrados de plaquetas pela sua condição de armazenamento, recomenda-se realização de avaliação de contaminação microbiológica em 100% desta produção*" ("Due to the high risk of microbiological contamination of platelet concentrates regarding their storage conditions, it is recommended to perform the microbiological contamination assessment of 100% of this production")¹⁰.

2.1.1 Assays for bacterial detection in PCs³⁹

The qualitative assay was performed in 612 samples, according to Cunha *et al.*¹⁹. Samples that did not show any bacterial growth on BA in 48 hours were considered negative. The ones that showed development of Colony-Forming Units (CFU) were considered positive, and a new subculture was performed to exclude a possible contamination.

The quantitative assay was performed in 292 samples, as described by Yomtovian *et al.*⁵⁸. The samples that showed bacterial growth regardless of the number of colonies developed, were considered positive; the multiplication factor 10 was used to obtain the number of CFU/ml.

Both the qualitative¹⁹ and the quantitative⁵⁸ techniques were used in 79 samples, with some modifications, and named *Teste do Crescimento Diário* (Daily Growth Test). At every 24 h of incubation in MHB, 10µl of the broth containing the sample were subcultured in BA, with an automatic pipette, and plates were incubated in a bacteriological incubator (35 ± 2 °C with 5% of CO₂ for 24 – 48 h). Subsequent sowings were performed, with an interval of 24 h in each analysis. Four sowings were performed altogether, and readings taken at 24, 48, 72 and 96 h after the first incubation. The samples that showed no colony growth in 48 h were considered negative, and the ones with growth were considered positive. All cultures were performed in duplicate tests, with the purpose of excluding possible contamination during handling.

2.2 Bacterial isolates of the 691 PCs

A total of 16 isolates of CoNS were obtained through an investigation of bacterial contamination in 691 bags of PCs, which constituted the research sample of this study. The following international reference standard strains (*American Type Culture Collection-ATCC*) were used as controls in the genotypic and phenotypic tests: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 negative control biofilm and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 positive control.

2.3 Phenotypic identification

The isolates were tested for phenotypic identification through automation, with VITEK® 2 (bioMérieux, Marcy L'Étoile, France), and the technique was performed in duplicate.

2.4 Sample preparation

In order to perform the phenotypic tests, the strains stored in Trypticase Soy Broth plus 15% of glycerol were subcultured in petri plates containing Mueller Hinton ágar, and incubated at 35 ± 2 °C for 24 h. For the genotypic test, the process of extraction of

deoxyribonucleic acid (DNA) was performed by thermal analysis^{1,24,42,48}. Besides, it should be noted that the subsequent tests were performed in duplicate.

2.5 Amplification of the gene 16S of ribosomal RNA (RNAr)

After extraction, each sample was submitted to electrophoresis in 1.0% agarose gel to verify the presence of DNA in the extracted material. The 16S RNAr was amplified by the Polymerase Chain Reaction (PCR).

2.6 Phenotypic methods for the research of biofilm production

2.6.1 Adhesion in borosilicate tube (ABT)

This assay was performed according to Christensen *et al.*¹⁵. Positivity was indicated by the presence of a layer of stained material adhered to the inner wall of the tubes.

2.6.2 Congo red agar (CRA)

The test was carried out according to Freeman *et al.*²³. The plates of CRA were inoculated and incubated in ambient temperature for 24 h, at 35 ± 2 °C. It was positive (biofilm-producing) when black colonies were observed, with shiny or dry/opaque aspect. On the other hand, non-biofilm producers formed pink (P), red (R) or burgundy (B) colonies.

2.7 Genotypic method for the research of biofilm production

In order to determine the genes *icaA*, *icaC* and *icaD*, the following pairs of primers were used: *icaA*_F ACA GTC GCT ACG AAA AGA AA e *icaA*_R GGA AAT GCC ATA ATG AGA AC; *icaC*_F TAA CTT TAG GCG CAT ATG TTT e *icaC*_R TTC CAG TTA GGC TGG TAT TG; *icaD*_F ATG GTC AAG CCC AGA CAG AG e *icaD*_R CGT GTT TTC AAC ATT TAA TGC AA (Ludwig Biotec®). The sequence of primers and the technique were followed according to Arciola *et al.*⁴. A sample was considered biofilm-producing when the presence of genes *icaAD* or *icaADC* was detected. When only one of these genes was found, the sample was considered negative for the production of biofilm⁴³.

2.8 Statistical analysis

The assessment of sensitivity and specificity was based on the comparison between the phenotypic methods tested with the PCR technique, which was considered a standard. The Kappa index (k) was also calculated in order to verify the agreement between the results obtained by the different methods^{4,5,43}.

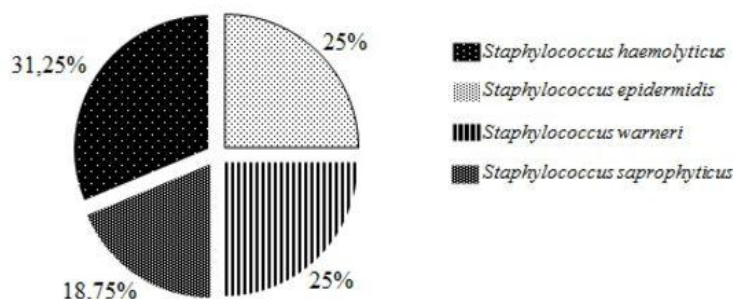
2.9 Ethical considerations

This study was approved by the Research Ethics Committee (CEP) of UFSM, under the number 0285.0.243.000-09.

3 Results

A total of 16 isolates of CoNS were obtained through an investigation of bacterial contamination in 691 PCs from HEMORGS: 5 *Staphylococcus haemolyticus* (31.25%), 4 *Staphylococcus epidermidis* (25%), 4 *Staphylococcus warneri* (25%) and 3 *Staphylococcus saprophyticus* (18.75%). The bacterial species isolated from contaminated bags of PCs were identified by the automated system VITEK® 2, described in Figure 1.

Figure 1: Distribution of the 16 species of coagulase-negative staphylococci isolated from 691 bags of Platelet Concentrates.



Through research of the *gene 16S of ribosomal RNA (RNAr)* in the samples of this study, we found that they all had great quality of extracted DNA, thus allowing the investigation of single genes. The research of the biofilm, performed with CRA, was positive in seven (43.75%) out of the 16 samples of CoNS, with the black color of the colonies evidencing probable biofilm-producing bacteria. The other strains showed other colors (B and R), indicating the absence of biofilm production. With the ABT technique, six samples (37.5%) were characterized as adherent, in other words, probable biofilm producers (Table 1).

The genotypic analysis, carried out by PCR, investigated the presence of the genes *icaA*, C and D, so we considered probable biofilm-forming the samples in which the genes *icaAD* or *icaADC*⁴³ were found. The result of this analysis is detailed in Table 1. Seven out of the 16 samples (43.75%) presented the genes *icaAD* and/or *icaADC*, concomitantly.

Comparing the results of this study, the phenotypic method of ABT and the genotypic method in biofilm production, 85.7% sensitivity and 100% specificity were obtained, showing high agreement ($k=0.87$). When CRA and PCR techniques were compared, 71% of sensitivity and 78% of specificity were obtained. We also verified an agreement index $k = 0.49$, considering the PCR as the standard method.

Table 1: Results regarding the research of genes *icaA*, C and D in the 16 samples of coagulase-negative staphylococci isolates from Platelet Concentrates, by the Polymerase Chain Reaction technique and the phenotypic tests for biofilm production.

Samples	Species	Genes			Biofilm-positive		Slime Production	
		<i>icaA</i>	<i>icaC</i>	<i>icaD</i>	<i>icaAD</i>	<i>icaADC</i>	CRA	ABT
1	<i>S. epidermidis</i>	+	+	+	+	+	-	+
2	<i>S. epidermidis</i>	+	+	+	+	+	+	+
3	<i>S. saprophyticus</i>	+	+	+	+	+	+	+
4	<i>S. haemolyticus</i>	-	+	-	-	-	+	-
5	<i>S. saprophyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-
6	<i>S. haemolyticus</i>	+	+	+	+	+	+	-
7	<i>S. saprophyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-
8	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	-
9	<i>S. warneri</i>	-	-	-	-	-	-	-
10	<i>S. haemolyticus</i>	-	+	-	-	-	+	-
11	<i>S. haemolyticus</i>	+	+	+	+	+	+	+
12	<i>S. warneri</i>	-	-	-	-	-	-	-
13	<i>S. haemolyticus</i>	+	+	+	+	+	+	+
14	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	-
15	<i>S. warneri</i>	-	-	-	-	-	-	-
16	<i>S. warneri</i>	+	+	+	+	+	-	+

CRA = Congo red agar; ABT= Adhesion in borosilicate tube; “-“ = absence; “+” = presence

4 Discussion

In our study, all organisms isolated in the samples of contaminated PCs were also CoNS, similar to the results found by other authors^{32,37,56}. However, no contamination was identified by GN bacteria, different from the findings of Cunha *et al.*, in which 62.5% of the PCs were contaminated by GN bacteria and 37.5% by GP¹⁹. Regarding bacterial species, there was a predominance of *Staphylococcus haemolyticus* (31.25%), followed by *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus warneri* at a rate of 25.0% each.

A study by Greco²⁹ reported that 13 contaminant CoNS strains were isolated during a routine screening of PCs by Canadian Blood Services, between January 2006 and May 2007, being *S. epidermidis* (53.8%) the predominant species, followed by *S. capitis* and *S. hominis*, 15.4% each. Moreover, Rood *et al.*⁴⁶ described that 35.8% of contamination in PCs was caused by *S. epidermidis*, 17.9% by *S. capitis* and 14.9% by *S. saccharolyticus*. The species *S. haemolyticus* was not reported in these two recent studies, however, the only Brazilian study regarding bacterial contamination of PCs demonstrated that *S. haemolyticus* and *S. hominis* have been responsible for an individual rate of 12.5% of bacterial contamination¹⁹.

CoNS are natural colonizers of human skin and mucosa. However, they have recently been acknowledged as important nosocomial pathogens due to their ability to form biofilm⁴⁴. Currently, the increase of antibiotic resistance in some clinical isolates may be related to their ability to form biofilm, because the acquisition of some resistance traits is possible within biofilm, through gene transfer⁴⁹.

S. epidermidis are the most isolated⁵⁰ from blood cultures among CoNS, *S. haemolyticus* the second, and *S. haemolyticus* have the highest rates of resistance to antimicrobials¹⁴. This species can cause septicemia, peritonitis, otitis and urinary tract infections. *S. epidermidis* and *S. haemolyticus* are opportunistic human pathogens, and difficult to be eradicated because of their resistance to antibiotics⁵⁰. In contrast to *S. epidermidis*, the molecular basis of virulence of *S. haemolyticus* is in general largely unknown; however, biofilm formation is a common clinical phenotype²⁵. Furthermore, *S. haemolyticus* have the highest level of antimicrobial resistance of all CoNS and their heteroresistance to glycopeptides¹⁴ is very common. Thus, it limits the therapeutic options and makes an *S. haemolyticus* infection a serious threat²⁵. Therefore, the presence of bacterial contaminants in PCs such as *S. epidermidis* and *S. haemolyticus*, considered potentially resistant, generates a major preoccupation due to the virulence of these strains being directly linked to their ability to cause septic transfusion reactions and influence the clinical outcome of the receiver.

Regarding the detection values obtained in this study for the CRA method, results similar to ours have been reported by Arciola *et al.*, Cafiso *et al.* and Lazzaratto *et al.*, Greco found 57.5%, 57%, 37.5%, 54% and 30.8%, respectively^{3,4,12,29,34}. Ruzicka *et al.* detected 43.5% of biofilm production in *S. epidermidis* isolated from blood cultures and 21.1% of isolates of skin. However, another research performed by Oliveira and Cunha, in another Brazilian state, demonstrated that 73% of the CoNS were producers of biofilm when subcultured in CRA. For the ABT test, Ruzicka *et al.* found 53.7% and 22.4% in blood cultures and skin, respectively. Oliveira and Cunha also reported a higher rate for ABT, 82%^{43,47}.

The results obtained by the PCR are similar to the ones found by Cafiso *et al.*, who detected the genes *icaAD* and *icaADC* in 45% of the isolates. Arciola *et al.* reported the presence of the same genes in 59% of the samples. Oliveira and Cunha verified 82% of genes *icaAD* and *icaADC* and Greco, 23.1% of *icaD*^{4,12,29,43}.

In a recent study, Ali *et al.*, while studying *S. epidermidis* isolated from bags of contaminated PCs, reported its ability to convert to a positive phenotype of biofilm when

cultured under similar conditions to the PCs bags, with or without the presence of the *ica* genes. It happens because *S. epidermidis* are able to form biofilms that adhere to the plastic of platelet storage bags and platelet aggregates², as already reported by Greco-Stewart *et al.* in strains of *Serratia marcescens*³⁰. Bacteria with slower growth create a larger amount of biofilm, what makes their detection more difficult in automated culture media².

According to the literature, the rates of 100% sensitivity and specificity are found with ABT, and 89% sensitivity and 100% specificity with CRA, when comparing to PCR⁴³. For the CRA test, Greco reports 100% of sensitivity and 90% of specificity²⁹. In our study, the ABT method was the phenotypic test with a better performance than CRA in biofilm detection, a result in agreement with Oliveira and Cunha⁴³.

Positive samples found in the genotypic and phenotypic tests were discussed in this study, and the presence of *icaADC* genes was observed in seven samples: six showed biofilm formation through the ABT technique and five through CRA. Two samples showed biofilm formation only through the CRA method and did not present the *icaADC* genes. Samples were considered biofilm-producing only when *icaAD* or *icaADC* genes were detected⁴³. We believe that tested samples were negative to CRA and positive to ABT and PCR (table 1) due to the low specificity of the CRA technique. Research tests of biofilm formation reported in the literature have shown that between the ABT and CRA techniques, the latter is considered to be less specific when compared with the standard PCR methodology. We know that the role of the *icaR* gene is to regulate biofilm formation and that it may influence when present. The presence of only one of the *icaABDC* genes does not exclude the possibility of biofilm formation, perhaps to a lesser extent. Moreover, we must point out that phenotypic tests do not show 100% specificity and sensitivity.

The results show that the origin of the isolated bacterial species of PCs in this study is probably the skin. The phenotypic tests for the detection of biofilm production indicated good sensitivity and specificity when compared to the reference technique, particularly with the method of ABT that showed high agreement. Thus, these results allow us to suggest this technique for the routine detection of CoNS strains able to produce biofilm in clinical microbiology laboratories. This is due to its easy application, low cost, high sensitivity and specificity, which ensure reliable results.

5 Acknowledgments

The authors would like to thank the team of the Blood Bank of the State of Rio Grande do Sul in Santa Maria, Rio Grande do Sul (HEMORGS – SM, RS), especially the chemists

Zanoni Segala and Viviane Ratzlaff. Also, thanks to chemists of the Microbiology Laboratory of the University Hospital of Santa Maria (HUSM).

6 Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

7 References

1. Aguilar MAP. **Caracterização molecular da resistência aos carbapenêmicos em Enterobactérias isoladas em hospitais brasileiros**. 133f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) - Universidade de São Paulo, USP, 2009.
2. Ali H, Greco-Stewart VS, Jacobs MR, Yomtovian RA, Rood IGH, De Korte D et al. Characterization of the growth dynamics and biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from contaminated platelet units. *J Med Microbiol*. 2014; 63, 884-891.
3. Arciola CR, Campoccia D, Gamberini G, Cervellati M, Donati E, Montanaro L. Detection of slime production by means of an optimized Congo red agar plate based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus. *Biomaterials*. 2002; 23, 4233-4239.
4. Arciola CR, Gamberini S, Campoccia D, Visai L, Speziale P, Baldassarri L. A multiplex PCR method for the detection of all five individual genes of *ica* locus in *Staphylococcus epidermidis*. A survey on 400 clinical isolates from prosthesis-associated infections. *J Biomed Mater Res A*. 2005; 75, 408-413.
5. Bonita R, Beaglehole R, Kjellström T. **Epidemiologia Básica**. 2. ed. - São Paulo, SP. Santos, 2010.
6. Brasil - Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 57, de 16 de dezembro de 2010. Determina o Regulamento Sanitário para Serviços que desenvolvem atividades relacionadas ao ciclo produtivo do sangue humano e componentes e procedimentos transfusionais. *Diário Oficial da União; Poder Executivo, Brasília, DF, nº 241 – Seção 1, 17 de dezembro de 2010*.
7. Brasil - Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) nº 34, de 11 de junho de 2014. Dispõe sobre as Boas Práticas no Ciclo do Sangue. *Diário Oficial da União, Brasília, DF - Seção 1, 2 de junho de 2014*.

8. Brasil - Ministério da Saúde. Caderno de Informação - **Sangue e Hemoderivados**. Brasília – DF, 2011.
9. Brasil - Agência Nacional da Vigilância Sanitária. **Relatório Anual da Avaliação Sanitária Dos Serviços De Hemoterapia**. Brasília – DF, 2012.
10. Brasil - Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 2.712, de 12 de Novembro de 2013. Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. Diário Oficial da União; Poder Executivo, Brasília, DF - Seção 1, 13 de novembro de 2013.
11. Brecher ME, Hay SN. Bacterial contamination of blood components. Clin Microbiol Rev. 2005; 18, 195-204.
12. Cafiso VT, Bertuccio T, Santagati M, Campanile F, Amicosante G, Perilli MG 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.
13. Chang AH, Kirsch CM, Mobashery N, Johnson N, Levitt LJ. *Streptococcus bovis* Septic Shock Due to Contaminated Transfused Platelets. Am J Hematol. 2004; 77, 282-286.
14. Chiew YF, Charles M, Johnstone MC, Thompson KM, Parnell KD, Penno EC. Detection of vancomycin heteroresistant *Staphylococcus haemolyticus* and vancomycin intermediate resistant *Staphylococcus epidermidis* by means of vancomycin screening agar. Pathology. 2007; 39: 375-377.
51. Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. Infect Immun. 1982; 37, 318-326.
16. Corash L. Bacterial contamination of platelet components: potential solutions to prevent transfusion-related sepsis. Expert Rev Hematol. 2011; 4, 509-525.
17. Costerton J W. "Introduction to biofilm." Int J Antimicrob Agents 1999, 11: 217-221.
18. Cramton SE, Gotz F. Biofilm development in *Staphylococcus*. In: Ghannoum M, Ohlsen K, editors. Microbial biofilms. Washington (DC): ASM Press. 2003; 64-84.
19. Cunha GS, Leão L, Pimenta F. Bacterial contamination of random-donor platelets in a university hospital in the midwestern region of Brazil. Transfusion. 2008; 48, 282-285.
20. De Araújo GL, Coelho LR, De Carvalho CB, Maciel RM, Coronado AZ, Rozenbaum R et al. Commensal isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* are also well equipped to produce biofilm on polystyrene surfaces. J Antimicrob Chemother. 2006; 57, 855-864.

21. Dobinski S, Bartscht K, Mack D. Influence of Tn917 insertion of transcription of the *icaADBC* operon in six biofilm-negative transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis*. *Plasmid*. 2002; 47, 10-17.
22. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002; 8, 881-890.
23. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative *staphylococci*. *J Clin Pathol*. 1989; 42, 872-874.
24. Freschi CR. Comparison of DNA-extraction methods and selective enrichment broths on the detection of *Salmonella typhimurium* in swine feces by Polymerase Chain reaction (PCR). *Braz J Microbiol*. 2005; 36, 363-367.
25. Fredheim EGA, Klingenberg C, Rohde H, Frankenberger S, Gaustad P, Flaegstad T et al. Biofilm Formation by *Staphylococcus haemolyticus*. *J Clin Microbiol*. 2009; 47, 1172-1180.
26. Gerke C, Kraft A, Süßmuth R, Schweitzer O, Götz F. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesion. *J Biol Chem*. 1998; 273, 18586-18593.
27. Gomes EFP, Albiero AL. Transfusão de plaquetas. Manual de transfusão sanguínea. 1. ed. São Paulo: Roca 2001; 5, 53-65.
28. Gotz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol*. 2002; 43, 1367-1378.
29. Greco CA. **Growth and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* and other relevant contaminant bacteria during storage of platelet concentrates.** 241f. Tese (Faculdade de Graduação e Pós-doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de Ottawa, 2011.
30. Greco-Stewart VS, Brown EE, Parr C, Kalab M, Jacobs MR, Yomtovian RA et al. *Serratia marcescens* strains implicated in adverse transfusion reactions form biofilms in platelet concentrates and demonstrate reduced detection by automated culture. *Vox Sang*. 2012; 102, 212-220.
31. Heilmann C, Hussain M, Peters G, Gotz F. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol Microbiol* 1997; 24: 1013-1024.
32. Hsueh JC, Ho CF, Chang SH, Pan FZ, Chen SC, Shi MD et al. Blood surveillance and detection on platelet bacterial contamination associated with septic events. *Transfus Med*. 2009; 19, 350-356.
33. Larsen CP, Ezligini F, Hermansen NO, Kjeldsen-Kragh EJ. Six years' experience of using the BacT/ALERT system to screen all platelet concentrates, and additional testing of outdated

platelet concentrates to estimate the frequency of false-negative results. *Vox Sang.* 2005; 88, 93-97.

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

35. Mack D, Fischer W, Krokotsch A, Leopold K, Hartmann R, Egge H et al. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol.* 1996, 178: 175-183.

36. Mack D, Rohde H, Harris LG, Davies AP, Horstkotte MA, Knobloch JK. Biofilm formation in medical device-related infection. *Int J Artif Organs.* 2006; 29: 343-359.

37. Martínez F, Tarrand J, Lichtiger B. Impact on Patient Outcome Following Transfusion of Bacterially Contaminated Platelets. *Am J Clin Pathol.* 2010; 134, 207-212.

38. Martini R, Hörner R, Rodrigues M de A, Kempfer CB, Tizotti MK, Ratzlaff V. Bacteriological analysis of platelets and cases of septic reactions associated with transfusion of contaminated samples. *Transfus Apher Sci.* 2012; 47: 313-318.

39. Martini R, Hörner R, Kempfer CB, Rodrigues MA, Gindri L, Tizotti MK et al., 2014. Avaliação do Desempenho de Culturas Convencionais na Detecção da Contaminação Bacteriana em Concentrados Plaquetários em um Hospital Universitário do Sul do Brasil. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2014; 35: 239-244.

40. Morales M, Méndez-Alvarez S, Martín-López JV, Marrero C, Freytes CO. Biofilm: the microbial “bunker” for intravascular catheter-related infection. *Support Care Cancer.* 2004; 12, 701-707.

41. Nilsson-Augustínsson A, Claesson C, Lindgren PE, Lundqvist-Gustafsson H, Öhman L. 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.

42. Nogueira CAM, Momesso CAS, Machado RLD, De Almeida MTG, Rossit ARB. Desempenho de kits comerciais e protocolos laboratoriais para a extração de DNA genômico bacteriano. *Revista Panamericana de Infectología.* 2004; 6, 35-38.

43. Oliveira A, Cunha MLRS. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. *BMC Res Notes.* 2010; 3, 260.

44. Otto M. *Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen. *Nat Rev Microbiol.* 2009; 7, 555-567.
45. Rohde H, Burdelski C, Bartscht K, Hussain M, Buck F, Horstkotte MA et al. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol Microbiol.* 2005; 55, 1883-1895.
46. Rood IGH, De Korte D, Ramírez-Arcos SM, Savelkoul PHM, Pettersson A. Distribution, origin and contamination risk of coagulase-negative *staphylococci* from platelet concentrates. *J Med Microbiol.* 2011; 60, 592-599.
47. Ruzicka F, Holá V, Votava M, Tejkalová R, Horvát R, Heroldová M et al. Biofilm detection and the clinical significance of *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Folia Microbiol.* 2004; 49, 596-600.
48. Scheffer MC. **Genotipagem e pesquisa de metalo-beta-lactamases em Isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos.** 117f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia - Setor de Ciências Biológicas e da Saúde). Universidade Federal do Paraná (UFPR), 2008.
49. Subramanian P, Shanmugam N, Sivaraman U, Kumar S, Selvaraj S. Antibiotic resistance pattern of biofilm-forming uropathogens isolated from catheterised patients in Pondicherry, India. *Australas Med J.* 2012; 5, 344-348.
50. Takeuchi F, Watanabe S, Baba T, Yuzawa H, Ito T, Morimoto Y et al. Whole-genome sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* uncovers the extreme plasticity of its genome and the evolution of human-colonizing staphylococcal species. *J Bacteriol.* 2005; 187: 7292–7308.
51. Tormo MA, Knecht E, Gotz F, Lasa I, Penades JR. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology.* 2005; 151: 2465-2475.
52. Vadyvaloo V, Otto M. Molecular genetics of *Staphylococcus epidermidis* biofilms on indwelling medical devices. *Int J of Artif Organs.* 2005; 28, 1069-1078.
53. Von Eiff C, Peters G, Heilmann C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect Dis.* 2002; 2, 677-685.
54. Vuong C, Saenz HL, Gotz F, Otto M. Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis.* 2000; 182: 1688-1693.
55. Vuong C, Kocianova S, Voyich JM, Yao Y, Fischer ER, DeLeo FR et al. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem.* 2004; 279: 54881-54886.

56. Walther-Wenke G, Schrezenmeier H, Deitenbeck R, Geis G, Burkhart J, Höchsmann B et al. Screening of platelet concentrates for bacterial contamination: spectrum of bacteria detected, proportion of transfused units, and clinical followup. *Ann Hematol.* 2010; 89, 83-91.
57. Xu L, Li H, Vuong C, Vadyvaloo V, Wang J, Yao Y et al. Role of the *luxS* quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun.* 2006; 74: 488-496.
58. Yomtovian RA, Palavecino EL, Dysktra AH, Downes KA, Morrissey AM, Bajaksouzian S et al. Evolution of surveillance methods for detection of bacterial contamination of platelets in a university hospital, 1991 through 2004. *Transfusion.* 2006; 46, 719-730.

2.3 Manuscrito 1

Antimicrobial susceptibility profile and research of *mecA* and *erm* genes in coagulase-negative *Staphylococci* isolated from bags of Platelet Concentrates¹

Bacterial contaminants of PCs

Martini Rosiéli¹, Hörner Rosmari^{1*}, Rampelotto Roberta Filipini¹, Garzon Litiéri Razia¹,
Nunes Melise Silveira¹, Graichen Daniel Ângelo Sganzerla²

¹ Manuscrito será submetido para publicação na revista The Brazilian Journal of Infectious Diseases.

Antimicrobial susceptibility profile and research of *mecA* and *erm* genes in coagulase-negative *Staphylococci* isolated from bags of Platelet Concentrates

Bacterial contaminants of PCs

Martini Rosieli¹, Hörner Rosmari^{1*}, Rampelotto Roberta Filipini¹, Garzon Litiéri Razia¹,
Nunes Melise Silveira¹, Graichen Daniel Ângelo Sganzerla²

¹Laboratory of Bacteriology and Department of Clinical and Toxicology Analysis of Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

²Laboratory of Evolutionary Genetics of Centro de Educação Superior Norte (CESNORS), Palmeira das Missões, Rio Grande do Sul, Brazil.

* Corresponding author for reprint requests: Prof. Dr. Rosmari Horner.

- Postal Address: Laboratory of Bacteriology and Department of Clinical and Toxicology Analysis of Universidade Federal de Santa Maria.

- Building 26, Room 1201, Campus of UFSM, Zip code: 97015-900 - Santa Maria, RS.

- Telephone number: (55) 3220-8751

- E-mail address: rosmari.ufsm@gmail.com

Abstract: In recent years, several studies have described the clinical impact of bacterial infection associated with transfusion of Platelet Concentrates (PCs). These are the blood components with the highest rate of bacterial contamination and most commonly responsible for septic transfusion reactions. Moreover, coagulase-negative *Staphylococci* (CoNS) are the most frequent contaminants. This study aimed to assess the susceptibility profile against antimicrobial agents and to investigate the resistance to methicillin (MRCoNS) and to macrolides, lincosamides and streptogramins B (MLS_B) of 16 CoNS isolates of 691 bags of PCs, by phenotypic and genotypic methods. All samples of CoNS were resistant to penicillin and benzylpenicillin, and susceptible to vancomycin. The conventional phenotypic tests characterized 18.8% as MRCoNS and 50% as MLS_B, and the automatized system (VITEK[®] 2), 6.3% and 37.5%, respectively. The presence of *mecA* and *ermABC* genes was detected in 18.8% of the total. The results obtained in this study emphasize the importance to know the types of resistance of microorganisms isolated of PCs particularly related to the *mecA* gene. In addition, it may be an incentive for the search of homologous genes to *mecA*, in order to correlate with the treatment and the clinical evolution of patients infected by bacteria that have this gene.

Keywords: *Staphylococci*, Platelet Concentrates, Bacterial Resistance, *mecA*, *ermABC*.

1 Introduction

Bacterial contamination of blood components was probably the first transfusion-transmitted disease. The transfusion-associated bacterial sepsis has been known for a long time, although it remains a serious health problem¹. The Platelet Concentrates (PCs) are the blood components with the highest rate of bacterial contamination and commonly responsible for most of the septic transfusion reactions². The prevalence of bacterial contamination due to infusion of PCs is much higher than other types of transfusion-transmitted infections³⁻⁴.

Gram-positive cocci are the most common contaminants of PCs and coagulase-negative Staphylococci (CoNS) are the main cause of septic transfusion reactions⁶. They are frequently associated with nosocomial infections, especially among immunocompromised patients⁷. CoNS are part of the normal microbiota of humans although they are acknowledged as important pathogens and cause a number of infections. Moreover, they are isolated from skin and soft tissue infections, respiratory and lower urinary tract infections and especially blood infections/sepsis⁸.

The indiscriminate use of antibiotics has led to the selection of populations of bacteria, making them resistant to certain antibiotics. The antimicrobial Oxacillin is one of the most widely used in Brazil for the treatment of infections caused by *Staphylococcus* spp., although it is not currently effective due to the high prevalence of resistant strains⁹. It is well known that CoNS have a significant mechanism of resistance to methicillin (MRCoNS), encoded by the *mecA* gene that gives resistance to all beta-lactam agents. Studies show that there has been a steady increase in isolation rates of MRCoNS in nosocomial infections including Brazil, where the resistance rates are between 50-80%, depending on the species and regions¹⁰⁻¹³.

CoNS can also be resistant to type B macrolides, lincosamides and streptogramins agents (MLS_B), and this resistance may be constitutive or inducible. In the constitutive expression, resistance to erythromycin and clindamycin is detected in normal antibiogram; however, in the inducible form, there may be resistance to erythromycin and false susceptibility to clindamycin, since the "in vivo" use of this agent could easily induce resistance. Phenotypic detection of such inducible resistance can be made by the D-test¹⁴. MLS_B resistance can be caused by several mechanisms, but the predominant form is the modification of the target, which is mediated by *ermABC* genes^{15,16}.

According to a study published by our research group, in present days, it is very important, although complex, to identify sepsis transfusion in patients, especially the immunocompromised, once bacterial sepsis associated with platelet transfusion is today the most frequent infectious complication of transfusion medicine. Furthermore, the authors

concluded that most isolates from platelets contaminants are CoNS, therefore, the present study seeks to identify the resistance of these isolates to elucidate what genes are present in bacteria of community origin, in order to assist in the treatment of possible Transfusion-Transmitted Infections (TTI)¹⁷. In addition, the treatment of CoNS infections is a therapeutic problem once many clinical isolates develop resistance to various antibiotics and can act as a reservoir of resistance genes when present in the hospital environment¹⁸. Under these circumstances, this study analyzed 16 bacteria isolated from 691 bags of PCs, collected during 2009/2010 from the Blood Bank of the State of Rio Grande do Sul in Santa Maria (HEMORGS/SM, RS), in order to assess the susceptibility testing against antimicrobial agents, and to investigate the main mechanisms of resistance of these contaminants, by phenotypic and genotypic methods.

2 Materials and methods

2.1 Inclusion criteria for bacterial isolates

A total of 16 isolates of CoNS were obtained through an investigation of bacterial contamination in 691 PCs. The following international reference standard strains (American Type Culture Collection-ATCC) were used as controls in the genotypic and phenotypic tests: *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, 25923, BAA977, BAA976 and 29213.

2.2 Susceptibility testing against antimicrobial agents by disk diffusion and VITEK[®] 2; and determination of minimum inhibitory concentration of vancomycin

The susceptibility test against antimicrobials was performed using the disk diffusion (DD) technique, following the breakpoints recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), and the minimum inhibitory concentration (MIC) methodology through the automated methodology, according to the manufacturer's standards. Vancomycin MIC tests were carried out in duplicate¹⁴.

2.3 Phenotypic and genotypic analyses of genes of resistance

In order to perform phenotypic tests, the strains stored in Trypticase Soy Broth plus 15% of glycerol were subcultured in petri dishes containing Muller Hinton agar and then incubated at 35 ± 2 °C for 24 hours. For the genotypic test, the extraction process of deoxyribonucleic acid (DNA) was carried out by thermal analysis, also known as heat shock, in which the bacterial isolates were grown in Trypticase Soy Agar (TSA) and incubated at 35 ± 2 °C from 18 to 24 hours. A dense bacterial suspension of 4 to 5 isolated colonies was subsequently prepared in an "ependorff" microtube containing 500µL Milli Q autoclaved water. The suspension was stirred on a vortex mixer and placed in a tube immersed in a water

bath at 100 °C for 15 minutes. The microtube was submitted to a heat shock (on ice) for 5 minutes and centrifuged for 20 minutes, at 11000 revolutions per minute (rpm). The supernatant containing DNA was transferred into another microtube and frozen at -20 °C¹⁹⁻²².

2.4 Amplification of 16S of ribosomal RNA (RNAr)

After extraction, each sample was submitted to electrophoresis in 1.0% agarose gel to verify the presence of DNA in the extracted material. The 16S RNAr was amplified by the Polymerase Chain Reaction (PCR) and primers 5'-GTAGTCCACGCCGTAAAC-3' and 5'-TAAACCACATGCTCCACC-3 were used²³.

2.5 Identification of MRCoNS

A cefoxitin disk containing 30 µg was used and the results were interpreted according to the criteria established by CLSI, 2014. For identification of the *mecA* gene presence, the sequences *mecA_F* AGT TAG ATT GGG ATC ATA GCG and *mecA_R* CGA TGC CTA TCT CAT ATG CTG (Ludwig Biotec®) were used. The primers used for the *mecA* gene test were designed using the structure of the PBP2a protein, developed at the Laboratory of Molecular Biology and Sequencing^{23,24}. The best template region for primer design is the non-variable portion of PBP2a - between amino acids 27 and 326 - which are, in base pairs, correspondent to the region between nucleotides 81 and 978. The GU301106 reference sequence of GenBank was used for the selection of primers. The size of the amplicons generated by amplification using these primers is 145 bp, and they were verified in agarose gel 0.8%. The identification of MRCoNS was followed as suggested by Kearns et al.²⁵.

2.6 Resistance detection of macrolides, lincosamides and streptogramins of group B

D-test or double disk test was performed using the DD technique, following the standards recommended by CLSI¹⁴. The *ermABC* genes were determined according to Coutinho et al., and the primers sequence was *ermA_F* 5'-GTT CAA GAA CAA TCA ATA CAG AG-3' and *ermA_R* 5'-GGA TCA GGA AAA GGA CAT TTT AC-3'; *ermB_F* 5'-CCG TTT ACG AAA TTG GAA CAG GTA AAG GGC-3' and *ermB_R* '5-GAA TCG AGA CTT GAG TGT GC-3'; *ermC_F* 5'-GCT AAT ATT GTT TAA ATC GTC AAT TCC-3' and *ermC_R* 5'-GGA TCA GGA AAA GGA CAT TTT AC-3'²⁶.

2.7 Statistical analysis

The assessment of susceptibility and specificity was based on the comparison between the phenotypic and genotypic methods tested in the detection of each resistance mechanism²⁷.

2.8 Ethical considerations

This study was approved by the Research Ethics Committee (CEP) of UFSM, under the number 0285.0.243.000-09.

3 Results and Discussion

A total of 16 isolates of CoNS were obtained through an investigation of bacterial contamination in 691 PCs from HEMORGS: 5 *Staphylococcus haemolyticus* (31.25%), 4 *Staphylococcus epidermidis* (25%), 4 *Staphylococcus warneri* (25%) and 3 *Staphylococcus saprophyticus* (18.75%). The identification of bacterial species isolated from contaminated bags of PCs was performed by system VITEK® 2. The subsequent extraction of DNA by heat shock was confirmed by amplification of 16S RNAr, resulting in a high quality DNA.

Through the conventional method (DD), only sample number 3 showed a highly resistant profile to the antimicrobials tested and an intermediate profile to nitrofurantoin. However, by automation, this sample showed resistance only to benzylpenicillin, clindamycin and erythromycin. Thus, it is also possible to observe a large discrepancy between the methods regarding the profiles of gentamicin, norfloxacin, rifampicin and sulfamethoxazole/trimethoprim, which showed resistance in DD and susceptibility in automation. The antimicrobial susceptibility profile is fully described in Table 1.

According to our study, when comparing the conventional with the automated methods, it is possible to observe slightly divergent results of susceptibility; three isolates showed exactly the same susceptibility profile (No. 11, 12, 14). Paim et al. found different comparison profiles between the methods VITEK® 2 and DD (standard method): very major error (VME), major error (ME) and minor error (MiE), with prevalence of the VME profile²⁸. Considering these three profiles, it is possible to observe in our study the prevalence of the VME profile, which is determined by the resistance when using the standard method although susceptible by the other method. Furthermore, Sapino et al. reported in their research that DD showed no VME when compared to the automated systems²⁹.

All samples of CoNS were resistant to penicillin and benzylpenicillin and, by DD 62.5% showed resistance to clindamycin and erythromycin, against 31.25% and 43.75% by the automated method, respectively. Studies have been reporting high resistance levels of CoNS to penicillin, clindamycin and erythromycin³⁰⁻³². All samples were vancomycin-susceptible by the conventional (microdilution in broth) and automated methods, similarly to the results found in the studies above cited. In this study, only the broth microdilution was made for the MIC of vancomycin, and the values obtained were between 0.5 µg/mL to 2.0 µg/mL.

Table 1 – Comparison of the susceptibility profile of the 16 isolates of coagulase-negative *Staphylococci* from Platelet Concentrates, using the qualitative methodologies of Disk Diffusion and VITEK® 2, according to the criteria of CLSI¹⁴.

(continua)

		Fusidic acid	Amox/ Clav	Ampi/Sulb	Azithromycin	Benzylpenicillin	Cefoxitin	Ciprofloxacin	Clindamycin	Ceftriaxone	Erythromycin	Gentamicin	Imipenem	Linezolid	Meropenem	Moxifloxacin	Nitrofurantoin	Norfloxacin	Penicillin	Rifampicin	Sulfa/ Trim	Teicoplanin	Tetracycline	Tigecycline	Vancomycin.	
1	<i>S. epidermidis</i>	DD	-	S	S	R	-	S	S	R	S	R	S	S	-	S	-	S	S	R	-	R	-	S	-	-
	VITEK® 2	S	-	-	-	R	-	S	S	-	R	S	-	S	-	S	-	S	-	S	R	S	-	S	S	
2	<i>S. epidermidis</i>	DD	-	S	S	R	-	S	S	R	S	R	S	S	-	S	-	S	S	R	-	R	-	S	-	-
	VITEK® 2	S	-	-	-	R	-	S	I	-	R	S	-	S	-	S	-	S	-	S	R	S	-	S	S	
3	<i>S. saprophyticus</i>	DD	-	R	R	R	-	R	R	R	R	R	R	R	-	R	-	I	R	R	-	R	-	R	-	-
	VITEK® 2	I	-	-	-	R	-	S	R	-	R	S	-	S	-	S	-	S	-	S	S	S	-	S	S	
4	<i>S. haemolyticus</i>	DD	-	S	S	S	-	S	S	R	I	S	S	S	-	S	-	S	S	R	-	S	-	S	-	-
	VITEK® 2	S	-	-	-	R	-	S	S	-	S	S	-	S	-	S	-	S	-	S	S	S	-	S	S	
5	<i>S. saprophyticus</i>	DD	-	S	S	R	-	S	S	R	I	R	S	S	-	S	-	S	S	R	-	R	-	R	-	-
	VITEK® 2	I	-	-	-	R	-	S	R	-	R	S	-	S	-	S	-	S	-	S	S	S	-	S	S	
6	<i>S. haemolyticus</i>	DD	-	S	S	S	-	S	S	I	I	R	I	S	v	S	-	R	S	R	-	S	-	R	-	-
	VITEK® 2	S	-	-	-	R	-	S	S	-	S	S	-	S	-	S	-	S	-	S	S	S	-	S	S	
7	<i>S. saprophyticus</i>	DD	-	S	S	R	-	R	S	I	I	R	S	S	-	S	-	S	S	R	-	S	-	S	-	-
	VITEK® 2	I	-	-	-	R	-	S	R	-	R	S	-	S	-	S	-	S	-	S	S	S	-	S	S	
8	<i>S. epidermidis</i>	DD	-	S	S	R	-	S	S	R	I	R	S	S	v	S	-	S	S	R	-	R	-	S	-	-
	VITEK® 2	S	-	-	-	R	-	S	R	-	R	S	-	S	-	S	-	S	-	S	S	S	-	S	S	
9	<i>S. warneri</i>	DD	-	S	S	I	-	R	S	R	R	I	S	S	-	S	-	R	S	R	-	R	-	S	-	-
	VITEK® 2	S	-	-	-	R	-	S	S	-	S	S	-	S	-	S	-	S	-	S	S	S	-	S	S	

Table 1 – Comparison of the susceptibility profile of the 16 isolates of coagulase-negative *Staphylococci* from Platelet Concentrates, using the qualitative methodologies of Disk Diffusion and VITEK® 2, according to the criteria of CLSI¹⁴.

(conclusão)

10	<i>S. haemolyticus</i>	DD	-	S	S	S	-	S	S	S	I	S	S	S	-	S	-	S	S	R	-	R	-	S	-	-
		VITEK® 2	S	-	-	-	R	-	S	S	-	S	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S	S	-	S
11	<i>S. haemolyticus</i>	DD	-	S	S	S	-	S	S	S	I	S	S	S	-	S	-	S	S	R	-	S	-	S	-	-
		VITEK® 2	S	-	-	-	R	-	S	S	-	S	S	-	S	-	S	-	S	-	S	S	S	-	S	S
12	<i>S. warneri</i>	DD	-	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S	-	S	-	S	S	R	-	S	-	S	-	-	
		VITEK® 2	S	-	-	-	R	-	S	S	-	S	S	-	S	-	S	-	S	-	S	S	S	-	S	S
13	<i>S. haemolyticus</i>	DD	-	S	S	R	-	S	S	R	I	R	S	S	-	S	-	S	S	R	-	S	-	R	-	-
		VITEK® 2	S	-	-	-	R	-	S	S	-	S	S	-	S	-	S	-	S	-	S	S	S	-	S	S
14	<i>S. epidermidis</i>	DD	-	S	S	R	-	S	S	R	S	R	S	S	-	S	-	S	S	R	-	S	-	S	-	-
		VITEK® 2	S	-	-	-	R	-	S	R	-	R	S	-	S	-	S	-	S	-	S	S	S	-	S	S
15	<i>S. warneri</i>	DD	-	S	S	R	-	S	S	R	S	R	S	S	-	S	-	S	S	R	-	S	-	S	-	-
		VITEK® 2	S	-	-	-	R	-	S	S	-	S	S	-	S	-	S	-	S	-	S	S	S	-	S	S
16	<i>S. warneri</i>	DD	-	S	S	I	-	S	S	I	R	I	S	S	-	S	-	R	S	R	-	R	-	S	-	-
		VITEK® 2	S	-	-	-	R	-	S	S	-	S	S	-	S	-	S	-	S	-	S	S	S	-	S	S

Amox/ Clav = Amoxicillin/Clavulanic; Amp/Sulb = Ampicillin/Sulbactam; Sulfa/ Trim = Sulfamethoxazole/ Trimethoprim; DD = Qualitative methodology of disk diffusion; Vitek= Automated methodology VITEK® 2; S = Susceptible; I = Intermediate; R = Resistant; “-“ = Non tested.

Three samples (18.75%) were resistant to ceftazidime (DD), being thus considered MRCoNS. By VITEK[®] 2, only sample was methicillin resistant. According to CLSI, the standardized tests to report MRCoNS strains for CoNS are agar dilution, DD technique and microdilution in broth¹⁴, however, only the DD technique was used in this study, except for vancomycin. There was a difference between the phenotypic methods in this study; a strain of MRCoNS was characterized by the two methodologies, demonstrating low susceptibility. A study developed by John et al. showed that for *Staphylococcus aureus* and for most of the CoNS, VITEK[®] 2 might not detect methicillin resistance³³.

Several authors consider the PCR method a standard for comparing with phenotypic assays³⁴⁻³⁶. In this study, the *mecA* gene was detected in three samples (18.75%) that were susceptible to ceftazidime in DD and in VITEK[®] 2 (Table 2).

Studies show that resistance to methicillin in *Staphylococcus* spp. occurs especially due to the production of modified Penicillin Binding Protein (PBP2a) encoded by the *mecA* gene and, less commonly, through the hyperproduction of beta-lactamases, which can be inactivation of oxacillin resulting in partial hydrolysis of the beta-lactam ring (borderline oxacillin-resistant - BORSA) and presence of other PBP with low affinity to oxacillin (MODSA)³⁷⁻³⁹. Thus, certain bacterial population resistant to methicillin may or may not carry the *mecA* gene⁴⁰.

In this study it is possible to suggest the identification of three strains with probable resistance by hyperproduction of the beta-lactamase enzyme, which is less common and occurs when strains of *Staphylococcus* spp. show resistance in DD and do not have the *mecA* gene. It is important to emphasize that for the treatment of infections caused by bacteria characterized as MRCoNS the treatment of choice is linezolid, teicoplanin and vancomycin, as well as alternative drugs such as macrolides, clindamycin and sulfamethoxazole/trimethoprim, regardless the sensitivity to the antimicrobial, and the treatment of a strain characterized as MRSCoN may not be effected with beta-lactams³⁹.

The inducible oxacillin resistance and the hyperproduction of beta-lactamases are the main causes of discordant results between phenotypic and genotypic tests for the detection of MRCoNS⁴¹. Determining the resistance to methicillin in CoNS by phenotypic methods can be complex due to the heterogeneous expression of many strains, which may also be affected by growth conditions and the nature of the beta-lactam agents used⁴². Moreover, the difference between the inhibitions zones of the isolates in DD with or without the *mecA* gene is very narrow, a disadvantage of this method⁴³.

Table 2 – Analysis of MRCoNS of the 16 coagulase-negative *Staphylococcus* isolates from Platelet Concentrates through the phenotypic tests of Cefoxitin Disk Diffusion, screening of cefoxitin by VITEK® 2, research of the gene *mecA* by the Polymerase Chain Reaction technique.

Samples	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Species	<i>S. eidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. warneri</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. warneri</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. warneri</i>	<i>S. warneri</i>
CFO (DD)	S	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Screening of CFO	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>mecA</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+

*Research conducted only in strains that showed phenotypic resistance to methicillin; CFO = Cefoxitin; DD = Qualitative methodology of disk diffusion; S = Susceptible; I = Intermediate; R = Resistant; “-“= absence; “+“= presence.

Recent studies have detected a rare gene homologous to *mecA* in strains of *S. aureus* isolated from human beings who showed phenotypic resistance to methicillin, but they were negative in the research of the *mecA* gene. This gene was called *mecA*_{LGA251} and is not identified by PCR with primers specific for *mecA*⁴⁴⁻⁴⁵.

Conventional phenotypic analysis of resistance against the class of MLS_B antimicrobials performed with the disk approximation test (D-test) was positive in six samples (37.5%), characterizing the inducible phenotype iMLS_B. Two samples (12.5%) showed the constitutive phenotype cMLS_B, and the phenotype MS_B was not detected (Table 3). While analyzing CoNS by the DD method, Coutinho et al. found three different phenotypes distributed as 46.7% of cMLS_B and 3.3% for the two other phenotypes²⁷. The indices differ from those found in our study. As for automation, our study has detected 31.25% of iMLS_B and 6.25% of MS_B (Table 3).

CLSI recommends that the detection of inducible resistance to clindamycin be effected by D-test, DD or microdilution by broth¹⁴. In this study, MIC was carried out by automation. Based on the results, it is estimated that there is a margin of error regarding automated tests. Thus, in this case, it is ideal to concomitantly use the data of both tests, allowing the

microbiologist to analyze each case individually, releasing results that exclude the possibility of VME.

Table 3 – Analysis of resistance of the 16 isolates of coagulase-negative *Staphylococcus* of Platelet Concentrates against the antimicrobials of the MLS class of group B through the phenotypic tests of disk diffusion, *screening* of inducible/constitutive resistance of clindamycin by VITEK[®] 2, and the research of the genes *ermA*, *B* and *C* by Polymerase Chain Reaction technique.

Samples	Species	D-Test	DD CLI/ERI	Phenotype DD	Screening of CLI	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>
1	<i>S. epidermidis</i>	+	R/R	iMLS _B	MS _B	-	-	-
2	<i>S. epidermidis</i>	-	R/R	cMLS _B	-	-	-	-
3	<i>S. saprophyticus</i>	-	R/R	cMLS _B	iMLS _B	-	-	-
4	<i>S. haemolyticus</i>	-	R/S	-	-	-	-	-
5	<i>S. saprophyticus</i>	+	R/R	iMLS _B	iMLS _B	-	-	-
6	<i>S. haemolyticus</i>	-	I/R	-	-	-	-	-
7	<i>S. saprophyticus</i>	-	I/R	-	iMLS _B	-	-	-
8	<i>S. epidermidis</i>	+	R/R	iMLS _B	iMLS _B	-	-	+
9	<i>S. warneri</i>	-	R/I	-	-	-	-	+
10	<i>S. haemolyticus</i>	-	S/S	-	-	-	-	-
11	<i>S. haemolyticus</i>	-	S/S	-	-	-	-	-
12	<i>S. warneri</i>	-	S/S	-	-	-	-	-
13	<i>S. haemolyticus</i>	+	R/R	iMLS _B	-	+	-	-
14	<i>S. epidermidis</i>	+	R/R	iMLS _B	iMLS _B	-	-	+
15	<i>S. warneri</i>	+	R/R	iMLS _B	-	-	-	+
16	<i>S. warneri</i>	-	I/I	-	-	-	-	-

S = Susceptible; I = Intermediate; R = Resistant; “-“= absence; “+“= presence; Cli = Clindamycin; Eri = Erythromycin; D-Test Negative = cMLS_B (resistant to CLI and ERI); D-Test Negative = MS_B (susceptible CLI and resistant ERI); D-Test Positive = iMLS_B (resistant to CLI and ERI).

Phenotypically analyzing the DD technique, no sample showed the efflux mechanism, phenotype MS_B, encoded by the *msrA* gene that gives resistance only to macrolides⁴⁶. Nonetheless, with VITEK[®] 2 one of the samples showed this phenotype, indicating once again the necessity of concomitant observation of the two results. Analyzing the results obtained by PCR, five samples studied (31.25%) showed the presence of the *erm* genes. The *ermA* was reported in 6.25% and the *ermC* in 25%; the *ermB* gene was not found in any sample;

Coutinho et al.²⁷ identified the presence of the *ermA* gene in 29.6%. Regarding the genotypic testing, our indices showed 67% sensibility and 86% specificity when compared to D-test, which was considered a standard in this research.

Lavallée et al.⁴⁷ carried out a study comparing detection methodologies of inducible resistance to clindamycin, with the same phenotypic tests of this study and detection of the mentioned genes through PCR. The authors reported 93% and 100% specificity and sensibility, respectively, with VITEK®2 and concluded that the automation failed to detect inducible clindamycin resistance in 10 strains, resulting in a Negative Predictive Value (NPV) of 74%. In this study, the same comparison showed a high similarity, and we observed a NPV of 73%.

With the data for inducible clindamycin resistance, the authors concluded that analyzing this resistance in CoNS strains with the D-test technique remains the most simple and reliable detection. Data in the literature describe that dilution in agar and VITEK® 2 are good for CoNS strains, but not as susceptible as the D-test at 24 hours⁴⁷.

The discrepancy between the results evidenced by the different methods, namely the gene inhibition in DD and the absence of the gene in PCR, can be justified by the presence of another gene, *ermY*, which was not subject of this research, however, there are reports of its presence in *Staphylococcus* spp. Other reasons why strains with phenotype iMLS_B are not carriers of the *erm* gene is not yet clear¹⁵, although it is speculated that there are possible mutations in the target sites of the primers for these genes⁴⁷.

Regarding resistance genes presented by the different species studied here, it was found that one *S. epidermidis* and one *S. warneri* showed the *mecA* as well the *erm* genes. Moreover, these species also showed the highest rate of MRSCoN. Through the antibiotic susceptibility profile obtained by the DD technique, approximately 50% of the strains were characterized as multiple drug resistance (MDR), resistant to more than three antimicrobial class.

In Brazil, resistance to oxacillin is higher in *S. epidermidis* and studies report that this resistance varies between 70% and 80%⁴⁸⁻⁴⁹. The resistance of MRCoNS is usually together with resistance to multiple antimicrobial agents, increasing the use of glycopeptides in therapy. Besides, it is known that there is a potential transmission of glycopeptide resistance among species, thus evidencing the need to restrict the use of these antimicrobials⁵⁰.

This is the first study conducted in Brazil that investigates the susceptibility profile and the possible mechanisms of resistance in bacterial isolates from PCs. Thus, in view of the results obtained in this study, we feel responsible for alerting about the importance of

knowing the types of resistance of microorganisms isolated from PCs, especially in relation to the *mecA* gene. This study also provided a future interest in relation to the development of a more extensive and complex research regarding the presence of the gene homologous to *mecA* (^{*mecA*}_{LGA251}) in isolates of *Staphylococcus* spp. at our hospital.

4 Acknowledgments

The authors would like to thank the team of the Blood Bank of the State of Rio Grande do Sul in Santa Maria, Rio Grande do Sul (HEMORGS – SM, RS), especially the chemists Zanoni Segala and Viviane Ratzlaff. Also, thanks to chemists of the Microbiology Laboratory of the University Hospital of Santa Maria (HUSM) and the Laboratory of Evolutionary Genetics (GenEvo-CESNORS), especially the biologist Mayza Dalcin Teixeira.

5 Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

6 References

1. Blajchman MA (1995) Bacterial contamination of blood products and the value of pre-transfusion testing. *Immunol Invest* 24:163-170.
2. Chang AH, Kirsch CM, Mobashery N, Johnson N, Levitt LJ (2004) *Streptococcus bovis* Septic Shock Due to Contaminated Transfused Platelets. *Am J Hematol* 77:282-286.
3. Jacobs MR, Palavecino E, Yomtovian R (2001) Don't bug me: the problem of bacterial contamination of blood components challenges and solutions. *Transfusion* 41:1331-1334.
4. Goodnough LT, Sander A, Brecher ME (2003) Transfusion medicine: looking to the future. *Lancet* 361:161-169.
5. Vasconcelos E, Seghatchian J (2004) Bacterial contamination in blood components and preventative strategies: an overview. *Transf Apher Sci* 31:155-163.
6. Greco C, Mastronardi C, Pagotto F, Mack D, Ramirez-Arcos S (2008) Assessment of biofilm-forming ability of coagulase-negative staphylococci isolated from contaminated platelet preparations in Canada. *Transfusion* 48:969-977.
7. Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL (2002) Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatric* 110:285-291.

8. Landrum ML, Neumann C, Cook C, Chukwuma U, Ellis MW, Hospenthal DR, Murray CK (2012) Epidemiology of *Staphylococcus aureus* blood and skin and soft tissue infections in the US military health system, 2005-2010. *JAMA* 308:50-59.
9. Chambers HF, Harman BJ, Tomasz A (1985). Increased amounts of a novel penicillin-binding protein in a strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* exposed to nafcillin. *J Clin Invest* 76:325-331.
10. Marshall SA, Wilke WW, Pfaller MA, Jones RN (1998) *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from blood stream infections: frequency of occurrence, antimicrobial susceptibility, and molecular (*mecA*) characterization of oxacillin resistance in the SCOPE program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 30:205-214.
11. Hussain Z, Stoakes L, Massey V, Diagre D, Fitzgerald V, El Sayed S, Lannigan R (2000) Correlation of oxacillin MIC with *mecA* gene carriage in coagulase negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 38:752-754.
12. Ferreira R, Iorio N, Malvar K, Nunes A, Fonseca L, Bastos C, Santos KRN (2003) Coagulase-negative Staphylococci: comparison of phenotypic and genotypic oxacillin susceptibility tests and evaluation of the Agar screening test by using different concentration of oxacillin. *J Clin Microbiol* 41:3609-3614.
13. Palazzo ICV, Darini ALC (2006) Evaluation of methods for detecting oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci including cefoxitin disc diffusion. *FEMS Microbiol Lett* 257:299-305.
14. CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (2014). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-fourth Informational Supplement Approved Standard M100-S24. CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA.
15. Roberts MC, Sutcliffe J, Courvalin P, Jensen LB, Rood J, Seppala H (1999) Nomenclature for macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother* 4:2823-2830.
16. Leclercq R (2002) Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: Nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis* 34:482-492.
17. Martini R, Horner R, Rodrigues MA, Kempfer CA, Tizotti MK, Rayzlaff V (2012) Bacteriological analysis of platelets and cases of septic reactions associated with transfusion of contaminated samples. *Transfus Apher Sci* 47:313-318.
18. Monsen T, Rönmark KM, Olofsson C, Wiström J (1998) An Inexpensive and Reliable Method for Routine Identification of Staphylococcal Species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17:327-335.

19. Nogueira CAM, Momesso CAS, Machado RLD, De Almeida, MTG, Rossit ARB (2004) Desempenho de *kits* comerciais e protocolos laboratoriais para a extração de DNA genômico bacteriano. *Revista Panamericana de Infectología* 6:35-38.
20. Freschi CR (2005) Comparison of DNA-extraction methods and selective enrichment broths on the detection of *Salmonella typhimurium* in swine feces by Polymerase Chain reaction (PCR). *Braz J Microbiol* 36:363-367.
21. Scheffer MC (2008) Genotipagem e pesquisa de metalo-beta-lactamases em Isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos. 2008. 117f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia - Setor de Ciências Biológicas e da Saúde). Universidade Federal do Paraná (UFPR).
22. Aguilar MAP (2009) Caracterização molecular da resistência aos carbapenêmicos em Enterobactérias isoladas em hospitais brasileiros. 2009. 133f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) - Universidade de São Paulo, USP.
23. Li W, Liu L, Chen H, Zhou R (2009) Identification of *Streptococcus suis* genes preferentially expressed under iron starvation by selective capture of transcribed sequences. *FEMS Microbiol Lett* 292:123-33.
24. Lim D, Strynadka NCJ (2002) Structural basis for the beta lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Struct Biol* 9:870-876.
25. Kearns AM, Seiders PR, Wheeler J, Freeman R, Steward M (1999) Rapid detection of methicillin-resistant *staphylococci* by multiplex PCR. *J Hosp Infect* 43:33-37.
26. Coutinho VLS, Paiva RM, Reiter KC, De Paris F, Barth AL, Machado ABMP (2010) Distribution of *erm* genes and low prevalence of inducible resistance to clindamycin among *staphylococci* isolates. *Braz J Infect Dis* 14:564-568.
27. Bonita R, Beaglehole R, Kjellström T (2010) *Epidemiologia Básica*. 2. ed. - São Paulo, SP. Santos.
28. Paim TGS, Cantarelli VV, D'azevedo PA (2014) Performance of the Vitek 2 system software version 5.03 in the bacterial identification and antimicrobial susceptibility test: evaluation study of clinical and reference strains of Gram-positive cocci. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 47:377-381.
29. Sapino B, Mazzucato S, Solinas M, Gion M, Grandess S (2012) Comparison of different methods for determining beta-lactam susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. *New Microbiol* 35:491-494.

30. Bernardi ACA, Pizzolitto EL, Pizzolitto AC (2007) Detecção da produção de slime por estafilococos coagulase-negativa isolados de cateter venoso central. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* 28:57-66.
31. Melo MAC, Monteiro RCS, Vieira ABR, Brazão MAB, Vieira JMS (2007) Bactérias Isoladas de Ponta de Cateter Venoso Central e Suscetibilidade Antimicrobiana em um Hospital Público de Belém-PA. *Revista Brasileira de Análises Clínicas* 39:115-118.
32. Rigatti F, Tizoti MK, Hörner R, Domingues VO, Martini R, Mayer LE, Khun FT, De França CA, Da Costa MM (2010) Bacteremias por *Staphylococcus* coagulase negativos oxacilina resistentes em um hospital escola na cidade de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 43:686-690.
33. John MA, Burden J, Stuart JI, Reyes RC, Lannigan R, Milburn S, Diagre D, Wilson B, Hussain Z (2009) Comparison of three phenotypic techniques for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus* spp. reveals a species-dependent performance. *J Antimicrob Chemother* 63:493-496.
34. Cafiso VT, Bertuccio T, Santagati M, Campanile F, Amicosante G, Perilli MG, Selan L, Artini M, Nicoletti G, Stefani S (2004) Presence of the *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. *Clin Microbiol Infect* 10:1081-1088.
35. Ruzicka F, Holá V, Votava M, Tejkalová R, Horvát R, Heroldová M, Woznicová V (2004) Biofilm detection and the clinical significance of *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Folia Microbiol* 49:596-600.
36. Gad GFM, El-Feky MA, El-Rehewy MS, Hassan MA, Abolella H, El-Baky RMA (2009) Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. *J Infect Dev Ctries* 3:342-351.
37. Tomasz A, Druegeon HB, Lencastre HM, Jabes D, McDougal L, Bille J (1989) New mechanism for methicillin-resistance in *S. aureus*: clinical isolates that lack the PBP2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 1869-1874.
38. Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K (2003) Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist Updat* 6:41-52.
39. Rossi F, Andreazzi DB (2005) Resistência bacteriana: Interpretando o antibiograma. São Paulo: Atheneu.

40. Mohanasoundaram KM, Lalitha MK (2008) Comparison of phenotypic versus genotypic methods in the detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Indian J Med Res 127:78-84.
41. Ghoshal U, Prasad KN, Tiwari MSDP, Ayyagari A (2004) A comparative evaluation of phenotypic and molecular methods for the detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci. J Infect Chemother 10:86-89.
42. Chambers HF (1997) Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev 10:781-791.
43. Skov R, Smyth R, Clausen M, Larsen AR, Frimodt-Moller N, Olsson-Liljequist B, Kahlmeter G (2003) Evaluation of a cefoxitin 30 microg disc on Iso-Sensitest agar for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 46:879-881.
44. Cuny C, Layer F, Strommenger B, Witte W (2011) Rare occurrence of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* CC130 with a novel *mecA* homologue in humans in Germany. PLoS One 6:e2436.
45. Shore AC, Deasy EC, Slickers P, Brennan G, O'Connell B, Monecke S, Ehricht R, Coleman DC (2011) Detection of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type XI Carrying Highly Divergent *mecA*, *mecI*, *mecRI*, *blaZ*, and *ccr* Genes in Human Clinical Isolates of Clonal Complex 130 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 55:3765-3773.
46. David J, Pimentel JC, Freire RPA (2005) Aspecto fenotípico da resistência dos Estafilococos à Clindamicina e Eritromicina. NewsLab 70.
47. Lavallée C, Rouleau D, Gaudreau C, Roger M, Tsimiklis C, Locas MC, Gagnon S, Delorme J, Labbé AC (2010) Performance of an Agar Dilution Method and a Vitek 2 Card for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus* spp. J Clin Microbiol 48:1354-1357.
48. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, Beach M, SENTRY Participants Group 2001 (2001) Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. Clin Infect Dis 32 Suppl 2:S114-32.
49. Pinheiro L, Brito CI, Pereira VC, Oliveira A de, Camargo CH, Cunha M de L (2014) Reduced susceptibility to vancomycin and biofilm formation in methicillin-resistant

Staphylococcus epidermidis isolated from blood cultures. Mem Inst Oswaldo Cruz 109:871-878.

50. De Giusti M, Pacifico L, Tufi D, Panero A, Boccia A, Chiesa C (1999) Phenotypic detection of nosocomial mecA-positive coagulase-negative staphylococci from neonates. J Infect Chemother 44:351-358.

3 DISCUSSÃO

A infusão de hemocomponentes contaminados por bactérias é uma das principais causas de morbidade e mortalidade entre os receptores de CPs. Este fato representa um considerável problema de saúde pública, especialmente no Brasil (CUNHA, 2006). Os CPs são os hemocomponentes com o maior índice de contaminação bacteriana e esses são a principal causa de reações sépticas transfusionais (RAMIREZ-ARCOS; GOLDMAN, 2012). Dados indicam que, provavelmente, a desinfecção da pele não é totalmente eficaz, visto que, grande parte da microflora da pele é produtora de biofilme, o qual pode ocasionar a redução da eficiência dos desinfetantes na pele dos doadores (TAHA et al., 2014).

Foram investigadas 691 amostras de bolsas de CPs, no seu primeiro dia de armazenamento, por diferentes métodos de detecção bacteriana (**Artigo 1**), dentre essas amostras 2,32% estavam contaminadas por alguma bactéria. Uma porcentagem considerada elevada quando comparada a outras pesquisas que analisaram esses hemocomponentes. No Brasil, foi possível contrapor os resultados apenas a outro estudo realizado em Goiânia, o qual reportou 0,4% de contaminação (CUNHA et al., 2008). Outras pesquisas, efetuadas em outros países, relataram taxas entre 0,3 a 0,34% (HSUEH et al., 2009, MARTÍNEZ et al., 2010, WALTHER-WENKE et al., 2010).

As amostras de CPs consideradas positivas representam um grande risco para os receptores, pois todas eram plaquetas randômicas, as quais necessitam, na maioria das vezes, ser agrupadas em *pool* a fim de se obter a dose ideal para a transfusão. Dessa forma, há uma grande possibilidade de ser infundida uma carga elevada de micro-organismos, um dos fatores que pode desencadear uma reação séptica transfusional (BLAJCHMAN, 2004). Como já foi reportado em um dos nossos estudos, uma das três reações transfusionais ocorreu posterior à infusão de um *pool* de CPs, composto por cinco bolsas, sendo que duas estavam contaminadas (MARTINI et al., 2012). Assim, torna-se imprescindível a identificação e a notificação das reações sépticas transfusionais. E que toda a equipe transfusional tenha treinamentos periódicos sobre os efeitos secundários relacionados às transfusões e saiba a necessidade do acompanhamento do paciente por um período adequado para que seja possível minimizar a sepse, uma vez que a reação séptica pode ser aguda ou tardia.

Em relação à cultura convencional, os processos automatizados garantem melhor rapidez na obtenção dos resultados, porém, com a mesma restrição de falsos negativos nos

primeiros dias de armazenamento (BRECHER et al., 2002). Nesse estudo (**Artigo 1**) a metodologia qualitativa apresentou bom desempenho e foi eleita como a mais viável para ser instituída em uma rotina laboratorial de um Banco de Sangue, além disso, detectou o maior número de bolsas de CPs contaminadas. Entretanto, sabemos que essa técnica carece de um grande intervalo de tempo para ter uma boa sensibilidade, pois necessita de um período de proliferação bacteriana, para que as bactérias se tornem passíveis de detecção em um pequeno volume de amostra. Sendo assim, conhecer o crescimento característico das bactérias prevalentes nos hemocomponentes é essencial antes de se estabelecer uma estratégia de detecção (BRECHER e HAY, 2005).

Neste contexto, podemos afirmar que a melhor metodologia seria a combinação de métodos de cultura, realizadas no início do período de armazenamento, pois quanto maior o tempo de armazenamento maior a possibilidade de proliferação bacteriana, e o acompanhamento até a transfusão. Uma associação das metodologias qualitativa e quantitativa poderia ser testada na prática laboratorial. Dessa maneira, os riscos de transfusões de CPs contaminados poderiam ser reduzidos e as reações sépticas transfusionais evitadas, pois as bolsas de CPs com carga bacteriana elevada poderiam ser detectadas e descartadas.

A triagem bacteriológica em todas as amostras de CPs confere uma maior segurança ao paciente. No início do nosso estudo, a RDC nº 57 (16.12.2010) regulamentava as atividades hemoterápicas e em 2014 foi atualizada pela RDC nº 34 (16.06.2014) (BRASIL, 2010a e 2014). A comprovação da importância deste estudo ocorreu em 2013, quando foi implementada a Portaria nº 2.712 (12.11.2013), a qual redefine o regulamento técnico dos procedimentos hemoterápicos e passou a recomendar a realização do controle microbiológico em 100% da produção dos CPs. Mudança justificada pelo alto risco de contaminação por micro-organismos apresentado pelos CPs, devido às suas condições de armazenamento (BRASIL, 2013).

Todos os micro-organismos isolados nessas amostras de CPs (**Artigo 1**) foram caracterizados como SCoN. Inicialmente, realizaram-se as identificações presuntivas fenotípicas através de métodos convencionais, que na maioria das vezes não levou a uma identificação precisa. Mas, posteriormente, efetuou-se a identificação por automação dessas espécies, através do VITEK® 2 (**Artigo 2**). Nossos resultados são semelhantes aos encontrados por outros autores (HSUEH et al., 2009; MARTÍNEZ et al., 2010; WALTHER-WENKE et al., 2010). Todavia, não foi identificada nenhuma contaminação por bactérias gram negativas (GN) diferente dos achados de Cunha et al., no qual 62,5% dos CPs estavam contaminados por bactérias GN e 37,5% por GP (CUNHA et al., 2008).

Quanto às espécies bacterianas identificadas (**Artigo 2**) houve a predominância do *S. haemolyticus*, correspondente a 31,25%. Seguido do *S. epidermidis* e *S. warneri*, com uma taxa de 25,0% para cada espécie. Em dois estudos recentes os autores relataram que a espécie predominante em CPs foi o *S. epidermidis* (GRECO, 2011; ROOD et al., 2011). O *S. haemolyticus* não foi relatado nesses dois estudos, no entanto, o estudo brasileiro demonstrou que o *S. haemolyticus* e o *S. hominis* têm sido responsáveis por uma taxa individual de 12,5% de contaminação (CUNHA et al., 2008).

Os resultados desse estudo (**Artigo 2**) mostram que a origem das espécies bacterianas foi, provavelmente, a pele do doador. Um grande número de contaminações e infecções ocorre no momento da coleta ou da punção, por micro-organismos que são oriundos da flora cutânea, na grande maioria os SCoN (WEINSTEIN et al., 1998). Este problema se torna preocupante, pois as medidas preventivas de descontaminação da pele nem sempre são aplicadas adequadamente. A evolução tecnológica que ocorre na medicina transfusional considera mandatória a eliminação dos riscos que a transfusão de CPs contaminados com bactérias pode ocasionar, bem como, a importância do uso de bolsas com sítio coletor para eliminar os primeiros mL de sangue, os quais tem a maior probabilidade de contaminação bacteriana.

Entre os SCoN, os *S. epidermidis* são os líderes em isolamentos de culturas de sangue, seguidos dos *S. haemolyticus* (TAKEUCHI et al., 2005) e têm as maiores taxas de resistência aos antimicrobianos (CHIEW et al., 2007). Além de serem potencialmente causadores de septicemia, peritonite, otites e infecções do trato urinário, e esses micro-organismos são patógenos oportunistas dos seres humanos e possuem diferentes mecanismos de resistência (TAKEUCHI et al., 2005). Sabemos que o aumento da resistência aos antimicrobianos, em alguns isolados clínicos, pode estar relacionado com a sua capacidade de formar biofilme, pois a aquisição de alguns traços de resistência é possível através da transferência de gene (SUBRAMANIAN et al., 2012).

Frequentemente observamos estudos que são efetuados em isolados de SCoN, devido que, rotineiramente, os laboratórios clínicos se encontram diante de grandes obstáculos. Especialmente relacionados à diferenciação das espécies de SCoN, à caracterização da resistência à meticilina, à definição de fatores de virulência como o biofilme e à avaliação da importância clínica do isolado, principalmente, quando for oriundo de pacientes imunocomprometidos e pertencente a flora do ser humano. Os SCoN já possuem resistência a vários antimicrobianos como à eritromicina, à clindamicina, os aminoglicosídeos, os β -

lactâmicos e, eventualmente, às quinolonas (SANTOS et al., 1997), além da possibilidade de serem produtores de biofilme.

A formação de biofilme é um fenótipo clínico existente entre os SCoN (FREDHEIM et al., 2009) e os *S. haemolyticus* têm o maior nível de resistência aos antimicrobianos e a heterorresistência aos glicopeptídeos é muito comum (CHIEW et al., 2007). Este fato que limita as opções terapêuticas e faz com que essas infecções sejam uma grave ameaça (FREDHEIM et al., 2009). Sendo assim, bactérias contaminantes de CPs como *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* geram uma grande preocupação clínica e influenciam na evolução dos receptores, devido à ligação entre a virulência e a capacidade de causar reações sépticas transfusionais. Além disso, é importante lembrar que o *S. epidermidis* está relacionado à endocardite bacteriana e o seu isolamento em CPs também pode ser considerado um fator de risco para essa doença infecciosa (HSUEH et al., 2009).

O processo de formação do biofilme é influenciado por diferentes fatores e moléculas e apresenta diferentes formas de funcionamento e regulação. Atualmente, o biofilme é considerado uma temática muito discutida em diversas áreas da saúde e as dúvidas relacionadas à sua formação e ao tratamento ainda são pouco esclarecidas pela comunidade científica e clínica. Pesquisas recentes relatam a formação do biofilme durante a estocagem das plaquetas, isso indica que o armazenamento contribui para a expressão da virulência e intensifica o risco potencial em ocasionar reação séptica transfusional (GRECO et al., 2007).

Esse estudo (**Artigo 2**) utilizou três diferentes metodologias para investigar se as bactérias oriundas da flora normal e contaminantes de CPs são produtoras de biofilme. O método de detecção do biofilme CRA demonstrou que 43,75% dos isolados foram produtores de biofilme e o método de ABT, 37,5%, resultados semelhantes a vários outros estudos (ARCIOLA et al., 2002 e 2005; CAFISO et al., 2004; LAZZARATTO et al., 2010; GRECO, 2011). Já em relação à investigação dos genes de resistência responsáveis pela formação do biofilme, 43,75% dos nossos isolados apresentaram os genes *icaAD* ou *icaADC* (**Artigo 2**), nossos dados também foram semelhantes a alguns estudos (ARCIOLA et al., 2005; CAFISO et al., 2004). Através da realização dos testes fenotípicos (CRA e ABT) foi possível verificar a sensibilidade e a especificidade com a metodologia padrão (PCR). O método de ABT apresentou o melhor desempenho, com 85,7% de sensibilidade e 100% de especificidade (**Artigo 2**), outro estudo brasileiro também considerou a técnica de ABT mais sensível e específica (OLIVEIRA; CUNHA, 2010). Esses resultados nos permitem sugerir a adoção da técnica da ABT na rotina para a detecção de cepas de SCoN produtoras de biofilme em

laboratórios clínicos. A técnica foi considerada de fácil aplicação e baixo custo, além de fornecer elevada sensibilidade e especificidade.

A presença dos genes *icaADC* foi observada em sete amostras e dessas, seis apresentaram biofilme pela ABT e cinco pelo CRA. Duas amostras apresentaram formação de biofilme apenas pelo método de CRA e não apresentaram os genes responsáveis, essas podem ser possíveis falso-positivos (baixa sensibilidade) ou tiveram influência de algum mecanismo *ica*-independente. Acreditamos que o fato de que as amostras que apresentaram CRA negativo e ABT e PCR positivos pode ser devido à baixa especificidade da técnica CRA. Sabemos que a função do gene *icaR* é a regulação da formação do biofilme e este pode influenciar quando presente. Não obstante, testes fenotípicos não apresentam 100% de especificidade e de sensibilidade quando comparados ao PCR.

O biofilme, além de conferir uma resistência contra as defesas inatas e adaptativas do hospedeiro, torna as bactérias mais hábeis de persistirem em concentração de antimicrobianos superior quando comparadas às mesmas bactérias em estado planctônico (STEWART; COSTERTON, 2001; WOLCOTT; EHRLICH, 2008). Bactérias produtoras de biofilme necessitam uma concentração de antimicrobiano de 100 a 1000 vezes maior, devido a grande dificuldade de difusão dos antimicrobianos através da camada polissacarídica ou pelo fato de que as células dentro do biofilme podem diferir fisiologicamente das células planctônicas (STEWART; COSTERTON 2001; FRANK; PATEL 2007; LAZZAROTTO, 2010).

Como já relatado anteriormente, a grande maioria dos antimicrobianos é mais eficiente quando as células bacterianas estão em crescimento e no biofilme a taxa de crescimento está reduzida. Mas existem estudos que evidenciam a classe dos antimicrobianos fluoroquinolonas como sendo capazes de infiltrar os biofilmes, levando a crer que outros mecanismos de resistência, além da própria defesa dos biofilmes, estão ativos (LEWIS, 2001; MELCHIOR et al., 2009). Ainda não está bem esclarecido, mas acredita-se que o próprio ataque do antimicrobiano capaz de atravessar a barreira do biofilme acaba criando uma população de células distintas que são preservadas pela presença do antimicrobiano (LEWIS, 2001). Ou, que para cada antimicrobiano que ataca a célula bacteriana um tipo diferente de biofilme possa ser produzido (MAH; O' TOOLE; 2001).

A partir desses resultados de biofilme (**Artigo 2**) se torna importante acrescentar que pode haver conversão de fenótipos na bolsa de CPs, como já reportado em um estudo com *S. epidermidis*. Os autores relataram a conversão de um fenótipo positivo de biofilme de um modo independente ao gene *ica*, quando as bactérias foram cultivadas em meio semelhante ao da bolsa de CPs (ALI et al., 2014). Essa mudança também ocorreu em outro contaminante de

plaquetas, o *Staphylococcus capitis* (GRECO-STEWART et al., 2013). Demonstrando assim, que a conversão de um fenótipo biofilme negativo a um positivo é normal nos SCoN, pois são capazes de formar biofilmes que se aderem ao plástico das bolsas de CPs e aos agregados de plaquetas. E também, já foi constatado que cepas com crescimento mais lento formam maior quantidade de biofilme e se tornam mais difíceis de serem detectadas em meios de cultura (ALI et al., 2014).

Elucidar os diferentes mecanismos que contribuem para a formação de biofilme é de suma importância, pois a partir disso, novas estratégias de prevenção podem ser desenvolvidas. Principalmente, as relacionadas com a produção de biomateriais resistentes à formação do biofilme ou impregnados com antimicrobianos, além da introdução de novas medidas preventivas ou terapêuticas como, vacinas ou estratégias de silenciamento dos genes de virulência (COSTERTON et al., 2009; LAZZAROTTO, 2010).

Além da investigação do biofilme realizou-se a verificação do perfil de suscetibilidade através do teste de disco-difusão (DD) e da automação (VITEK® 2) (**Manuscrito 1**). Por meio do DD apenas uma amostra mostrou suscetibilidade somente à linezolida. Mas, pela automação essa amostra apresentou resistência apenas à benzilpenicilina, à clindamicina e à eritromicina. Três isolados demonstraram exatamente o mesmo perfil de suscetibilidade, quando comparado o método convencional (DD) ao automatizado. Em sua pesquisa Paim et al., encontraram diferentes perfis de comparação entre o método do VITEK® 2 e a DD, essa considerada método referência pelo CLSI: erro muito maior (VME), erro maior (ME) e o erro menor (MiE), a prevalência foi do perfil VME (PAIM et al., 2014). Assim, em nosso estudo também observamos que houve o predomínio do perfil VME, o que é caracterizado pela suscetibilidade do método em estudo e a resistência pelo método considerado referência.

Todas as amostras foram suscetíveis à vancomicina e apresentaram resistência à penicilina e à benzilpenicilina e 62,5% apresentaram resistência à clindamicina e à eritromicina (**Manuscrito 1**). Estudos têm reportado altos níveis de resistência dos SCoN à penicilina, clindamicina e eritromicina (BERNARDI et al., 2007; MELO et al., 2007; RIGATTI et al., 2010). Além disso, aproximadamente 50% dos isolados foram caracterizados com resistência a múltiplas drogas (MDR - resistentes a mais de três classes diferentes de antimicrobianos). Resultado preocupante, principalmente, em relação aos macrolídeos, os quais são a primeira escolha para os pacientes alérgicos aos derivados de penicilina, assim como, na ocorrência da resistência aos beta-lactâmicos.

Entre as amostras analisadas, três foram resistentes à cefoxitina por DD, já pelo VITEK® 2 apenas uma amostra foi resistente. De acordo com o CLSI, para SCoN, os testes

padronizados para reportar cepas MRSCoN são: diluição em ágar, técnica de DD e a microdiluição em caldo (CLSI, 2014). No presente estudo houve uma divergência entre os métodos fenotípicos, apenas uma cepa foi caracterizada como MRSCoN pelas duas metodologias. O que é justificado pela dificuldade que a automação tem em detectar a resistência à meticilina na maioria dos SCoN, conforme reportado por John et al. quando analisou isolados de *S. aureus* e SCoN (JOHN et al., 2008).

Detectamos a presença do gene *mecA* (**Manuscrito 1**) em três amostras, mas essas foram suscetíveis à cefoxitina pela DD e também pelo VITEK® 2. O método da PCR é considerado por vários autores referência para comparação com ensaios fenotípicos (CAFISO et al., 2004; RUZICKA et al., 2004; GAD et al., 2009). Estudos mostram que a resistência à meticilina pode ocorrer pela presença do gene *mecA* ou pela hiperprodução de beta-lactamases (TOMASZ et al., 1989, ITO et al., 2003, ROSSI; ANDREAZZI, 2005), então certa população bacteriana resistente à meticilina pode ou não carrear o gene *mecA* (MOHANASOUNDARAM; LALITHA, 2008). Com base nos dados obtidos, e nas repetições efetuadas, é possível sugerir a identificação de três cepas com provável resistência por hiperprodução de beta-lactamase, o que é mais raro, mas ocorre quando as cepas de *Staphylococcus* mostram resistência em DD e não possuem o gene *mecA*.

No Brasil, a resistência à meticilina é maior em *S. epidermidis* e estudos relatam que varia entre 70% a 80% (DIEKEMA et al., 2001; PINHEIRO et al., 2014). A resistência de MRSCoN é geralmente acompanhada de resistência a múltiplos agentes antimicrobianos, aumentando assim o uso dos glicopeptídeos na terapia. No mais, sabe-se que existe um potencial de transmissão de resistência aos glicopeptídeos entre as espécies, demonstrando assim a necessidade de restringir o uso destes agentes antimicrobianos (DE GIUSTI et al., 1999).

A determinação da resistência à meticilina em SCoN por métodos fenotípicos é complexa devido à expressão heterogênea de muitas cepas, as quais também podem ser influenciadas pelas condições de crescimento e a natureza dos agentes beta-lactâmicos utilizados (CHAMBERS, 1997). A hiperprodução de beta-lactamases é a principal causa de resultados discordantes entre testes fenotípicos e genotípicos para a detecção de MRSCoN (GHOSHAL et al., 2004). Além disso, a diferença entre as zonas de inibição dos isolados em DD, com ou sem o gene *mecA* é muito estreita, podendo ser uma desvantagem deste método (SKOV et al., 2003). Salientamos que já existem pesquisas que revelam a detecção de um raro gene, homólogo ao *mecA*, em *Staphylococcus* que apresentaram resistência fenotípica à

meticilina mas não o gene *mecA*. Denominado ^{mecA}_{LGA251} ele não é identificado através da PCR com primers específicos para o *mecA* (CUNY et al., 2011; SHORE et al., 2011).

É importante lembrar que para infecções causadas por bactérias MRSCoN o tratamento de escolha é a linezolida, teicoplanina e vancomicina, além de medicamentos alternativos, tais como os macrólídeos, clindamicina e sulfametoxazol/trimetoprim. Independentemente da suscetibilidade antimicrobiana demonstrada, o tratamento de um cepa MRSCoN não deve ser efetuado com nenhuma classe de beta-lactâmicos (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

A análise fenotípica da resistência à classe dos antimicrobianos MLS_B foi efetuada através do Teste D, um dos métodos considerados padrão para a detecção da resistência induzível à clindamicina, bem como, a CIM (CLSI, 2014). Seis amostras foram caracterizadas com o fenótipo iMLS_B e duas com o cMLS_B, o MS_B não foi detectado (**Manuscrito 1**). Uma pesquisa que analisou SCoN demonstrou que o fenótipo prevalente foi o cMLS_B (COUTINHO et al., 2010), dado divergente ao encontrado pelo nosso estudo. E, pela análise da CIM, realizada por automação, o fenótipo iMLS_B também foi predominante, no entanto, uma cepa foi caracterizada como MS_B e nenhuma como cMLS_B.

Lavallée et al. realizaram um estudo comparando metodologias de detecção da resistência induzível à clindamicina e concluíram que a automação falhou em detectar essa resistência em dez cepas, resultando em um valor preditivo negativo (VPN) de 74%. Efetuamos a mesma comparação e obtivemos um VPN semelhante, 73%, demonstrando uma baixa sensibilidade (LAVALLÉE et al., 2010). Ainda, os autores descreveram que para os SCoN a diluição em ágar e o VITEK® 2 são eficazes, mas não são sensíveis como o Teste D (LAVALLÉE et al., 2010). Por meio dos resultados obtidos estima-se que existe uma considerável margem de erro nos testes automatizados, devido às falhas apresentadas na detecção da resistência induzível. Sendo assim, concluímos que o Teste D é a detecção mais simples e confiável para investigar essa resistência em SCoN isolados de CPs.

Analisando os resultados da PCR (**Manuscrito 1**), em cinco amostras foi evidenciada a presença do gene *erm*, prevalecendo o gene *ermC*. Em relação ao teste genotípico, nossos índices mostraram 67% de sensibilidade e 86% de especificidade, quando comparado ao Teste D, o qual foi considerado referência nessa pesquisa. A prevalência dos genes *ermABC* é muito variável e depende muito da origem da cepa (NAWAZ et al., 2000). Existem estudos que reportam a prevalência do gene *ermA* e outros do *ermC*, no entanto, o *ermB* quando encontrado é sempre em uma frequência menor (JENSEN et al., 1999; WANG et al., 2008; COUTINHO et al., 2010).

Já a discrepância entre os resultados fenotípicos e a detecção dos genes *erm*, pode ser justificada pela presença de outro gene que não foi investigado no estudo, o gene *ermY*, assim como, pode ser influenciada pela inativação dos macrolídeos ou por mutações. Não são raros os casos de cepas com fenótipo iMLS_B não serem portadoras do gene *erm*, no entanto, alguns mecanismos ainda não estão claros, mas especula-se que haja possíveis mutações nos locais-alvos dos *primers* para esses genes (ROBERTS et al., 1999; MATSUOKA et al., 2002; LAVALLÉE et al., 2010; MURRAY et al., 2014). A PCR é um método genotípico rápido, sensível e específico utilizado na pesquisa (VANNUFFEL et al., 1995). Entretanto, sabe-se que não é um método viável para os laboratórios clínicos de rotina, pois apresenta custo elevado e necessita de espaço físico e equipamentos especiais (JARLOV et al., 1997; HORSTKOTTE et al., 2001).

Sabemos que um dos mais significativos fatores que predispõem à resistência dos micro-organismos é o uso indiscriminado e inadequado dos antimicrobianos. Dessa forma, uma importante medida adotada no Brasil foi a implementação da RDC nº 44 (26.10.2010), que dispõe sobre o controle de antimicrobianos, de uso apenas sob prescrição médica (BRASIL, 2010c). Aliado a isso, o uso cauteloso, a adequada combinação dos antimicrobianos, a realização completa da antibioticoterapia e o monitoramento constante da disseminação da resistência são considerados avanços muito importantes. Assim como, os estudos constantes sobre a elucidação dos mecanismos de resistência e a investigação de novas estratégias terapêuticas são bastante promissores (COSTERTON et al., 2009).

Este é o primeiro estudo realizado no Brasil com o intuito de investigar o perfil de suscetibilidade, a formação do biofilme e possíveis mecanismos de resistência apresentados por bactérias isoladas de CPs. Diante das circunstâncias expostas nesse estudo nos sentimos responsáveis em alertar sobre a importância do conhecimento das resistências apresentadas por micro-organismos isolados de CPs. Além de nos proporcionar um interesse futuro na realização de uma pesquisa mais extensa em isolados clínicos de *Staphylococcus* presentes em nosso hospital, relacionada, principalmente, à produção de biofilme. Espera-se ainda, estimularmos novas pesquisas nessa área, já que no Brasil carece de estudo a respeito.

4 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados apresentados nesta tese, em forma de artigos, podemos concluir que:

- Detecção da contaminação dos CPs:

a) foi detectada uma elevada contaminação bacteriana nas amostras de CPs analisadas, índice de 2,32%;

b) o método de detecção mais viável para uma rotina laboratorial é a associação das metodologias quantitativa e qualitativa.

- Contaminantes das bolsas de CPs:

a) todos os contaminantes dos CPs foram caracterizados como SCoN;

b) *S. haemolyticus* foi a espécie predominante (31,25%);

c) todas as espécies identificadas são habitantes da microbiota normal da pele.

- Perfil de suscetibilidade apresentado pelos isolados:

a) todas as amostras de SCoN apresentaram resistência à penicilina e a benzilpenicilina;

b) obtenção de dados preocupantes sobre a resistência à clindamicina e à eritromicina apresentada pelos isolados, cerca de 62,5%;

c) aproximadamente 50% dos isolados foram caracterizadas como cepas MDR;

d) todos os isolados foram suscetíveis à vancomicina pelos métodos convencionais e automatizado.

- Avaliando os fatores de virulência e os mecanismos de resistência, podemos detectar:

a) formação do biofilme;

b) presença dos genes responsáveis pela formação do biofilme, *icaACD*;

c) cepas com resistência à metilina – MRSCoN;

d) presença do gene responsável pelos MRSCoN, *mecA*;

e) teste D positivo caracterizando cepas com fenótipo iMLS_B;

f) presença dos genes responsáveis pelo fenótipo iMLS_B, *ermAC*.

- Quando comparamos as metodologias convencionais com o método do PCR podemos informar:

a) o teste ABT possui uma elevada sensibilidade e especificidade, recomenda-se a sua utilização para a detecção da formação do biofilme em isolados de SCoN nos laboratórios clínicos;

b) o Teste D é a detecção mais simples e confiável para investigar a resistência iMLS_B em SCoN;

c) a determinação da resistência à metilina em SCoN por métodos fenotípicos é complexa, sendo assim nenhum teste foi eleito como melhor. No entanto, acreditamos que a metodologia de DD seja a melhor;

- A implementação da Portaria nº 2.712, de 12 de dezembro de 2013, a qual redefiniu o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos e passou a recomendar a realização de avaliação de contaminação microbiológica em 100% da produção de CPs.

REFERÊNCIAS

AABB - American Association of Blood Banks. **Guidance on implementation of new bacteria and reduction standard**. Bulletin 04-07. Bethesda, MD, 2004.

AABB - American Association of Blood Banks. **Bacterial Contamination of Platelets: Summary for Clinicians on Potential Management Issues Related to Transfusion Recipients and Blood Donors**; AABB Bacterial Contamination Task Force, 2005.

ALCARÁZ, L. E. et al. Species identification, slime production and oxacillin susceptibility in coagulase-negative staphylococci isolated from nosocomial specimens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 45-51, 2003.

ALI, H. et al. Characterization of the growth dynamics and biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from contaminated platelet units. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63, p. 884-891, 2014.

ALTOPARLAK, U. et al. Slime factor positivity in coagulase negative staphylococci isolated from nasal samples of haemodialysis patients. **International Journal of Clinical Practice**, v. 58, p. 1112-1114, 2004.

ANDREU, G. et al. Hemovigilance network in France: organization and analysis of immediate transfusion incident reports from 1994 to 1998. **Transfusion**, v. 42, n.10, p.1356-1364, 2002.

ANGUERA, I. et al. *Staphylococcus lugdunensis* infective endocarditis: description of 10 cases and analysis of native valve, prosthetic valve, and pacemaker lead endocarditis clinical profiles. **Heart**, v. 91, p. 1-7, 2005.

ARCHER, L. G. *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci. In: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, Dolin R editors. **Principles and practice of infectious diseases**, 5th ed. New York: Churchill Livingstone. p. 2092-100, 2000.

ARCIOLA, C. R. et al. In catheter infections by *Staphylococcus epidermidis* the intercellular adhesion (ica) locus is a molecular marker of the virulent slime-producing strains. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 59, n. 3, p. 557-562, 2002.

ARCIOLA, C. R. et al. A multiplex PCR method for the detection of all five individual genes of *ica* locus in *Staphylococcus epidermidis*. A survey on 400 clinical isolates from prosthesis-associated infections. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 75, p. 408-413, 2005.

ARCIOLA, C. R. 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. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 76, n. 2, p. 425-430, 2006.

ÁSTER, R. H.; JANDL, P. H. Platelet sequestration in man. I. Methods. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 43, n. 5, p. 843-855, 1964.

AUBUCHON, J. P. et al. Experience with universal bacterial culturing to detect contamination of apheresis platelet units in a hospital transfusion service. **Transfusion**, v. 42, n. 7, p. 855-861, 2002.

BAIRD-PARKER, A. C. The Staphylococci: an introduction. **Journal for Applied Bacteriology Symposium Supplement**, p. 1-8, 1990.

BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: Murray PR, Jorgensen EJ, Tenover JC, Tenover FC, editors. **Manual of Clinical Microbiology**, ASM, Washington. 2003.

BANNERMAN T. L.; PEACOCK. S. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase-positive cocci. In: **Manual of Clinical Microbiology**. Murray PR, Baron EJ, Jorgeman JH, Landy ML, Pfaller JMA (eds). 9th ed. Washington DC, ASM Press., p. 390- 411, 2007.

BÉMER, P. et al. Correlation of agar dilution and VITEK2 system for detection of resistance to macrolides, lincosamides and pristinamycin among *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*: association with genotypes. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, n. 8, p. 656-661, 2005.

BERGER-BÄCHI, B; ROHRER, S. Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. **Archives of Microbiology**, v. 178, n. 3, p. 165-171, 2002.

BERKOW, R. et al. **Manual merck de informação médica: saúde para família**, cap. 153, seção 14, 2003.

BERNARDI, A. C. A. et al. Detecção da produção de slime por estafilococos coagulase-negativa isolados de cateter venoso central. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, p. 57-66, 2007.

BLAJCHMAN, M. A. Incidence and significance of the bacterial contamination of blood components. **Developmental Biology**, v. 108, p. 59-67, 2002.

BLAJCHMAN, M. A. Bacterial contamination of cellular blood components: risks, sources and control. **Vox Sanguinis**, v. 87, n. 1, p. 98-103, 2004.

BLAJCHMAN, M. A.; GOLDMAN, M. Bacterial contamination of platelet concentrates: incidence, significance, and prevention. **Seminars in Hematology**, v. 38, n. 4, p. 20-26, 2001.

BLAJCHMAN, M. A. et al. Improving the bacteriological safety of platelet transfusions. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 18, n. 1, p. 11-24, 2004.

BLOOD-BOOK, 2003. **The history of blood transfusion and blood transfusion medicine**. Blood transfusion history, in date order - links to blood transfusion information. Acesso em: 20 de março de 2015.

BOISSON, K. et al. Characterisation of coagulase-negative staphylococci isolated from blood infections: incidence, susceptibility to glycopeptides, and molecular epidemiology. **European Journal of Clinical Microbiology e Infectious Diseases**, v. 21, p. 660-665, 2002.

BONE, R. C. et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. **Chest**, v. 101, n. 6, p. 1644-1655, 1992.

BORDEN, C. W.; HALL, W. H. Fatal Transfusion Reactions from Massive Bacterial Contamination of Blood. **The New England Journal of Medicine**, n. 245, p. 760, 1951.

BRASIL - Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Coordenação Nacional de DST e Aids. Preparação de hemocomponentes**. Brasília, 1998. (Série TELELAB). Acesso em: 20 de março de 2015.

BRASIL - Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**. Edição Comemorativa para o IX Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar Salvador, 30 de agosto a 3 de setembro de 2004, 2004. Acesso em: 20 de março de 2015.

BRASIL - Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Hemovigilância: Manual técnico para investigação das reações transfusionais imediatas e tardias não infecciosas 2007**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2007. Acesso em: 20 de março de 2015.

BRASIL - Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 57, de 16 de dezembro de 2010**. Determina o Regulamento Sanitário para Serviços que desenvolvem atividades relacionadas ao ciclo produtivo do sangue humano e componentes e procedimentos transfusionais. Diário Oficial da União; Poder Executivo, Brasília, DF, nº 241 – Seção 1, 17 de dezembro de 2010a. Acesso em: 20 de março de 2015.

BRASIL - Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para o Uso de Hemocomponentes 2010**. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2010b. Acesso em: 20 de março de 2015.

BRASIL - Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 44 de outubro de 2010**. Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição médica, isoladas ou em associação e dá outras providências. Diário Oficial da União; Poder Executivo, Brasília, DF - Seção 1, 9 de maio de 2011, 2010c. Acesso em: 20 de março de 2015.

BRASIL - Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 2.712, de 12 de Novembro de 2013**. Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. Diário Oficial da União; Poder Executivo, Brasília, DF - Seção 1, 13 de novembro de 2013, 2013. Acesso em: 20 de março de 2015.

BRASIL - Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 34, de 11 de junho de 2014**. Dispõe sobre as Boas Práticas no Ciclo do Sangue. Diário Oficial da União, Brasília, DF - Seção 1, 2 de junho de 2014, 2014. Acesso em: 20 de março de 2015.

BRECHER, M. E.; HAY, S. N. Bacterial contamination of blood components. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 1, p. 195-204, 2005.

BRECHER, M. E. et al. Evaluation of a new generation of culture bottle using an automated bacterial culture system for detecting nine common contaminating organisms found in platelet components. **Transfusion**, v. 42, n. 6, p. 774-779, 2002.

BROWN, D. F. J. Detection of methicillin/oxacillin resistance in staphylococci. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.48, p.65-70, 2001.

BRUNTON, L. L. et al. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica - GOODMAN & GILMAN**. 11^aed. Rio de Janeiro: Editora McGrawHill, 2006.

BURNS, K. H.; WERCH, J. B. Bacterial contamination of platelet units: a case report and literature survey with review of upcoming american association of blood banks requirements. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 128, n. 3, p. 279-281, 2004.

CAFISO, V. et al. Presence of the ica operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n12, p. 1081-1088, 2004.

CAMPOCCIA, D. et al. Current methods for molecular epidemiology studies of implant infections. **The International journal of Artificial Organs**, v. 32, n. 9, p. 642-654, 2009.

CARBON, C. MRSA and MRSE: is there an answer? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 6, suplem. 2, p. 17-22, 2000.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Interim guidelines for prevention and control of Staphylococcal infection associated with reduced susceptibility to vancomycin. **Morbidity and Mortality Weekly Report – MMWR**, v. 46, n. 27, p. 626-8,635. 1997.

CHAMBERS, H. F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 4, p. 781-791, 1997.

CHANEY, R. et al. Direct detection of bacteria in cellular blood products using bacterial ribosomal RNA-directed probes coupled to electrochemiluminescence. **Transfusion Medicine**, v. 9, n. 3, p. 177-188, 1999.

CHANG, S. et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 14, p. 1342-1347, 2003.

CHIEW, Y. F. et al. Detection of vancomycin heteroresistant *Staphylococcus haemolyticus* and vancomycin intermediate resistant *Staphylococcus epidermidis* by means of vancomycin screening agar. **Pathology**, v. 39, p. 375-377, 2007.

CHRISTENSEN, G. D. et al. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. **Infection and Immunity**, v. 37, n.1, p. 318-326, 1982.

CHRISTENSEN, G. D. et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 996-1006, 1985.

CHRISTNER, M. et al. The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. **Molecular Microbiology**, v. 75, n. 1, p. 187-207, 2010.

CIRAJ, A. M. et al. Inducible clindamycin resistance among clinical isolates of staphylococci. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 49-51, 2009.

CLAWSON, C. C.; WHITE, J. G. Platelet interaction with bacteria. I. Reaction phases and effects of inhibitors. **American Journal of Pathology**, v. 65, n. 2, p. 367-380, 1971.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. Ninth informational supplement, M100-S09. CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA, 1999.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. Fourteenth informational supplement, M100-S14. CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA, 2004.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**: Twenty-fourth Informational Supplement Approved Standard M100-S24. CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA, 2014.

CONLON, K. M. et al. Inactivations of *rsbU* and *sarA* by IS256 represent novel mechanisms of biofilm phenotypic variation in *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Bacteriology**, v.186, n. 18, p. 6208-6219, 2004.

CORASH, L. Bacterial contamination of platelet components: potential solutions to prevent transfusion-related sepsis. **Expert Review of Hematology**, n. 4, p. 509-525, 2011.

COSTERTON, J. W. Introduction to biofilm. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 11, n. 3-4, p. 217-221, 1999.

COSTERTON, J. W. et al. How bacteria stick. **Scientific American**, v. 238, p. 86-95, 1978.

COSTERTON, J. W. et al. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 711-745, 1995.

COSTERTON, J. W. et al. Prospecting gene therapy of implant infections. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 32, n. 9, p. 689-695, 2009.

COUTINHO, V. L. S. et al. Distribution of *erm* genes and low prevalence of inducible resistance to clindamycin among *staphylococci* isolates. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 6, p. 564-568, 2010.

CUEVAS, O. et al. Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. in Spain: five nationwide prevalence studies, 1986 to 2002. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 4240-4245, 2004.

CUNHA, G. S. **Prevalência da contaminação bacteriana em concentrados de plaquetas do serviço de hemoterapia de um hospital universitário em Goiânia - GO**. 2006. 75 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2006.

CUNHA, G. S. et al. Bacterial contamination of random-donor platelets in a university hospital in the midwestern region of Brazil. **Transfusion**, v.48, n. 2, p. 282-285, 2008.

CUNY, C. et al. Rare occurrence of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* CC130 with a novel *mecA* homologue in humans in Germany. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e24360, 2011.

DAVID, J. et al. Aspecto fenotípico da resistência dos Estafilococos à Clindamicina e Eritromicina. **NewsLab**, ed. 70, 2005.

DE ARAUJO, G. L. et al. Commensal isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* are also well equipped to produce biofilm on polystyrene surfaces. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 855-864, 2006.

DE GIUSTI, M. et al. Phenotypic detection of nosocomial *mecA*-positive coagulase-negative staphylococci from neonates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, n. 3, p. 351-358, 1999.

DE KORTE, D. et al. Diversion of first blood volume results in a reduction of bacterial contamination for whole-blood collections. **Vox Sanguinis**, v. 83, n. 1, p. 13-16, 2002.

DE KORTE, D. et al. Effects of skin disinfection method, eviation bag, and bacterial screening on clinical safety of platelet transfusions in the Netherlands. **Transfusion**, v. 46, n. 3, p. 476-485, 2006.

DE SILVA, G. D. I. et al. The *ica* Operon and Biofilm Production in Coagulase-Negative Staphylococci Associated with Carriage and Disease in a Neonatal Intensive Care Unit. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 382-388, 2002.

DEIGHTON, M. A. et al. Methods for studying biofilms produced by *Staphylococcus epidermidis*. **Methods in Enzymology**, v. 336, p. 177-195, 2001.

DIEKEMA, D. J. et al. Survey of infections due to Staphylococcus species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. **Clinical Infectious Diseases**, v. 15, n. 32, suppl 2, p. S114-132, 2001.

DOBINSKY, S. et al. Glucose-related dissociation between *icaADBC* transcription and biofilm expression by *Staphylococcus epidermidis*: evidence for an additional factor required for polysaccharide intercellular adhesin synthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 9, p. 2879-2886, 2003.

DODD, R. Y. Bacterial contamination and transfusion safety: experience in the United States. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 10, n. 1, p. 6-9, 2003.

DOMARACHI, B. E. et al. Increased oxacillin activity associated with glycopeptides in coagulase-negative staphylococci. **European Journal of Clinical Microbiology**, v. 17, p. 143-150, 1998.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881-890, 2002.

DONLAN, R. M; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n 2, p. 167-193, 2002.

DUMONT, L. J. et al. Screening of single-donor apheresis platelets for bacterial contamination: the passport study results. **Transfusion**, v. 50, p. 589 - 599, 2010.

ENGELFRIET, C. P. et al. Bacterial contamination of blood components. **Vox Sanguinis**, v. 78, n. 1, p. 59-67, 2000.

FDA. **Food and Drug Administration**. EUA, 2004. Acesso em: 20 de março de 2015.

FLEMMING, H. C. et al. The EPS Matrix: The “House of Biofilm Cells” (Guest comentary). **Journal of Bacteriology**, p. 7945–7947, 2007.

FRANK, K. L.; PATEL, R. Activity of sodium metabisulfite against planktonic and biofilm *Staphylococcus* species. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 57, n. 4, p. 355-359, 2007.

FREDHEIM, E. G. A. et al. Biofilm Formation by *Staphylococcus haemolyticus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, p. 1172-1180, 2009.

FREEMAN, D. J. et al. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal of Clinical Pathology**, v. 42, p. 872-874, 1989.

FRIGATTO, E. A. et al. Is the cefoxitin disk test reliable enough to detect oxacillin resistance in coagulase negative staphylococci? **Journal Clinical Microbiology**, v. 43, p. 2028-2029, 2005.

GAD, G. F. M. et al. Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 3, p. 342-351, 2009.

GARCIA-ERCE, J. A. et al. Bacterial contamination of blood components due to *Burkholderia cepacia* contamination from chlorhexidine bottles. **Vox Sanguinis**, v. 83, n. 1, p. 70-71, 2000.

GERKE, C, et al. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesion. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 18586-18593, 1998.

GHOSHAL, U. et al. A comparative evaluation of phenotypic and molecular methods for the detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 10, p.86-89, 2004.

GIBSON, T.; NORRIS, W. Skin fragments removed by injection needles. **The Lancet**, v. 2, n. 7054, p. 983-985, 1958.

GOLDMAN, M. Bacterial contamination of platelet concentrates: where are we today? **Vox Sanguinis**, v. 87, n. 2, p. 90-92, 2004.

GOMES, E. F. P.; ALBIERO, A. L. Transfusão de plaquetas. **Manual de transfusão sanguínea**. 1. ed. São Paulo: Roca, cap. 5, p. 53-65, 2001.

GOTZ, F. *Staphylococcus* and biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 1367-1378, 2002.

GRECO, C. A. **Growth and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* and other relevant contaminant bacteria during storage of platelet concentrates**. 2011. 241f. Tese (Faculdade de Graduação e Pós-doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de Ottawa, 2011.

GRECO, C. et al. *Staphylococcus epidermidis* forms biofilms under simulated platelet storage conditions. **Transfusion**, v. 47, n. 7, p. 1143-1153, 2007.

GRECO-STEWART, V. S. et al. Biofilm formation by *Staphylococcus capitis* strains isolated from contaminated platelet concentrates. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 1051-1059, 2013.

HALL, J. et al. The use of platelet PGD test for determination of bacterial contamination of cell therapy culture systems, **AABB**, 2004.

HAUSCHILD, T. et al. Characterization of a novel type of MLSB resistance plasmid from *Staphylococcus saprophyticus* carrying a constitutively expressed *erm(C)* gene. **Veterinary Microbiology**, v.115, p.258-263, 2006.

HAY, S. N.; BRECHER, M. E. Validation of pH and glucose determination for bacteria detection screening in platelet concentrates stored in the Terumo Teruflux XT612 platelet container. **Transfusion**, v. 44, n. 9, p.1395, 2004.

HEIKENS, E. et al. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2286-2290, 2005.

HEILMANN, C. et al. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. **Molecular Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 1083-1091, 1996.

HEILMANN, C. et al. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. **Molecular Microbiology**, v. 24, n.5, p.1013-1024, 1997.

HELTBERG, O. et al. Nosocomial epidemic of *Serratia marcescens* septicaemia ascribed to contaminated blood transfusion bags. **Transfusion**, v. 33, n. 3, p. 221-227, 1993.

HENRICI, A. T. Studies of freshwater bacteria: a direct microscopic technique. **Journal of Bacteriology**, v. 25, n. 3, p. 277-287, 1933.

HENZE, U. et al. Influence of *femB* on methicillin resistance and peptidoglycan metabolism in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 6, p. 1612-1620, 1993.

HIGUCHI, W. et al. Extensive multidrug resistance of coagulase-negative staphylococci in medical students. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 13, p. 63-66, 2007.

HILLYER, C. D. et al. Bacterial contamination of blood components: risks, strategies, and regulation. **Hematology**, p. 575-589, 2003.

HIRAMATSU, K. et al. Molecular genetics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 292, n. 2, p. 67-74, 2002.

HIRAMATSU, K. et al. Genetic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Vaccine**, v. 6; 22 Suppl, n. 1, p. S5-8, 2004.

HORSTKOTTE, M. A. et al. Rapid detection of methicillin resistance in coagulase negative staphylococci by a penicillin-binding protein 2a-specific latex agglutination test. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p. 3700-3702, 2002.

HSUEH, J. C. et al. Blood surveillance and detection on platelet bacterial contamination associated with septic events. **Transfusion Medicine**, v. 19, n. 6, p. 350-356, 2009.

HUANG, R. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* survival on hospital fomites. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 27, p. 1267-1268, 2006.

HUEBNER, J.; GOLDMANN, D. A. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. **The Annual Review of Medicine**, v. 50, p. 223-236, 1999.

HUSSAIN, M. et al. A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 2, p. 519-524, 1997.

HUSSAIN, M. et al. Detection of methicillin resistance in primary blood culture isolates of coagulase-negative staphylococci by PCR, slide agglutination, disk diffusion, and a commercial method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 2251-2253, 2002.

ITO, T. et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 5, p. 1323-1336, 2001.

ITO, T. et al. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. **Drug Resistance Updates**, v. 6, n. 1, p. 41-52, 2003.

JAFARI, M. et al. *Salmonella* sepsis caused by a platelet transfusion from a donor with a pet snake. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 14, p. 1075-1078, 2002.

JARLOV, J. O. et al. Evaluation of different methods for the detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.40, p. 241-249, 1997.

JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm? **FEMS Microbiology Letters**, v. 236, n. 2, p. 163-173, 2004.

JENSEN, L. B. Presence of *erm* gene classes in Gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. **FEMS Microbiology Letters**, 170: 151-158, 1999.

JOHN, M. A. et al. Comparison of three phenotypic techniques for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus* spp. reveals a species-dependent performance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 493-496, 2007.

KATAYAMA, Y. et al. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 6, p. 549-1555, 2000.

KATAYAMA, Y. et al. Identification in methicillin-susceptible *Staphylococcus hominis* of an active primordial mobile genetic element for the staphylococcal cassette chromosome *mec* of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 9, p. 2711-2722, 2003.

KLOOS, W. E.; BANNERMAN, T. L. Update on clinical significance of coagulase-negative *staphylococci*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, p. 117-140, 1994.

KOGAN, G. et al. Biofilms of clinical strains of *Staphylococcus* that do not contain polysaccharide intercellular adhesin. **FEMS Microbiology Letters**, v. 255, n. 1, p. 11-16, 2006.

KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido**. 6th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. Tradução de Eiler Fritsch Toros. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KRAUSE, R. et al. Molecular typing of coagulase-negative staphylococcal blood and skin culture isolates to differentiate between bacteremia and contamination. **European Journal of Clinical Microbiology e Infectious Diseases**, v. 22, p.760-763, 2003.

KREUTER, J. D.; HAGAN, J. B. Blood, blood components, plasma and plasma products. **Side Effects of Drugs Annual. A worldwide yearly survey of new data in adverse drug reactions**, cap. 33, p. 483-502, 2014.

KUEHNERT, M. J. et al. Transfusion-transmitted bacterial infections in the United States, 1998 through 2000. **Transfusion**, v. 41, n. 12, p. 1493-1499, 2001.

KUMAR, A.; SCHWEIZER, H. P. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1486-1513, 2005.

LAMBERT, P. A. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1471-1485, 2005.

LAVALLÉE, C. et al. Performance of an Agar Dilution Method and a Vitek 2 Card for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 1354-1357, 2010.

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

LECLERCQ, R.; COURVALIN, P. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 7, p. 1267- 1272, 1991.

LEE, C. K. et al. Impact of donor arm skin disinfection on the bacterial contamination rate of platelet concentrates. **Vox Sanguinis**, v. 83, n. 3, p. 204-208, 2002.

LEVY, S. B. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n. 4, p. 695-703, 1992.

LEVY, C. E. Métodos Clássicos e de Biologia Molecular Aplicados ao Controle de Infecções Hospitalares. In: Fernandes AT, Fernandes MOV, Ribeiro Filho N, editores. **Infecção Hospitalar e suas Interfaces na Área da Saúde**. São Paulo: Atheneu; p. 1600-1609, 2000.

LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 999–1007, 2001.

LIM, D; STRYNADKA, N. C. Structural basis for the beta lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 9, n. 11, p. 870-876, 2002.

LOUIE, L. et al. Evaluation of a latex agglutination test (MRSA-screen) for detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 11, p. 4149-4151, 2001.

LYYTIKÄINEN, O. et al. Increased resistance among *Staphylococcus epidermidis* isolates in a large teaching hospital over a 12-year period. **European Journal of Clinical Microbiology**, v. 15, n. 2, p.133-138, 1996.

MACK, D. Molecular mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. **Journal of Hospital Infection**, v. 43, p. 13-25, 1999.

MACK, D. et al. Biofilm formation in medical device-related infection. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 29, n 4, p. 343-359, 2006.

MACK, D. et al. Microbial interactions in *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, n. 2, p. 399-408, 2007.

MAH, T. C.; O'TOOLE, G. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v.9, n.1, p.34-39, 2001.

MARTINEAU, F. et al. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 2, p. 231-238, 2000.

MARTÍNEZ, F. et al. Impact on Patient Outcome Following Transfusion of Bacterially Contaminated Platelets. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 134, p. 207-212, 2010.

MARTINI, R. et al. Bacteriological analysis of platelets and cases of septic reactions associated with transfusion of contaminated samples. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 3, n. 47, p. 313-318, 2012.

MATSUOKA, M. et al. Cloning and sequences of inducible and constitutive macrolide resistance genes in *Staphylococcus aureus* that correspond to an ABC transporter. **FEMS Microbiology Letters**, v. 181, p. 91-100, 1999.

MATSUOKA, M. et al. New *erm* Gene in *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 1, p. 211-215, 2002.

MCDONALD, C. P. et al. Relative values of the intervention of diversion and improvement of donor-arm disinfection to reduce the bacterial risk from blood transfusion. **Vox Sanguinis**, v. 86, n. 3, p. 178-182, 2004.

MELCHIOR, M. B. et al. Biofilm formation and genotyping of *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: evidence for lack of penicillin-resistance in Agr-type II strains. **Veterinary Microbiology**, v.137, p.83-89, 2009.

MELO, M. A. C. et al. Bactérias Isoladas de Ponta de Cateter Venoso Central e Suscetibilidade Antimicrobiana em um Hospital Público de Belém-PA. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, p. 115-118, 2007.

MITCHELL, K. M.; BRECHER, M. E. Approaches to the detection of bacterial contamination in cellular blood products. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 13, n. 2, p. 132-144, 1999.

MOHAMMADI, T. **Bacterial Contamination of Platelet Concentrates: Molecular Tools and Applications**. 2006. 140f. Tese (Doutorado em Medicina) - Universidade Livre de Amsterdã, Amsterdã, Holanda, 2006.

MOHANASOUNDARAM, K. M.; LALITHA, M. K. Comparison of phenotypic versus genotypic methods in the detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Indian Journal of Medical Research**, v. 127, p. 78-84, 2008.

MOHR, H. et al. Basics of flow cytometry-based sterility testing of platelet concentrates. **Transfusion**, v. 46, n. 1, p. 41-49, 2006.

MOLLISON, P. L. et al. **Blood transfusion in clinical medicine**. Oxford: Blackwell Scientific Publications (New York). 9th ed., 1993.

MONTANARO, L. et al. Advancements in molecular epidemiology of implant infections and future perspectives. **Biomaterials**, v. 28, n. 34, p. 5155-5168, 2007.

MURRAY, P. R. et al. **Microbiologia médica**. 6. ed. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier; 2010.

MURRAY, P. R. et al. **Microbiologia médica**. 7. ed. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier; 2014.

NAKAJIMA, Y. Mechanisms of bacterial resistance to macrolide antibiotics. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 5, p. 61-74, 1999.

NAWAZ, M. S. et al. Comparative molecular analysis of erythromycin-resistance determinants in staphylococcal isolates of poultry and human origin. **Molecular and Cellular Probes**, v. 14, p. 311-319, 2000.

NESS, P. et al. Single-donor platelets reduce the risk of septic platelet transfusion reactions. **Transfusion**, v. 41, p. 857-861, 2001.

NIU, M. T. et al. Transfusion-transmitted *Klebsiella pneumoniae* fatalities, 1995 to 2004. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 20, n. 2, p. 149-157, 2006.

NOVAK, M. Preservation of stored blood with sulfanilamide. **Journal of the American Medical Association**, v. 113, n. 25, p. 2227-2229, 1939.

O'GARA, J. P. *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiology Letter**, v. 270, p.179 - 188, 2007.

OLIVEIRA, A.; CUNHA, M. L. R. S. Comparasion of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. **BMC Research Notes**, v. 3, p. 260, 2010.

OPLUSTIL, C. P. **Procedimentos básicos em Microbiologia Clínica**. 2 ed. São Paulo, SP: Sarvier; 2004.

OTTO, M. Staphylococcal biofilms. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 322, p. 207-228, 2008.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis*-the 'accidental' pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, 7, n. 8, p. 555-567, 2009.

OTTO, M. et al. Structure of the pheromone peptide of the *Staphylococcus epidermidis* agr system. **FEBS Letters**, v. 424, p. 89-94, 1998.

ODD, L. et al. Role of blood culture systems in the evaluation of epidemiological features of coagulase-negative staphylococcal bloodstream infection in critically ill patients. **European Journal of Clinical Microbiology e Infectious Diseases**, v. 18, p. 899-901, 1999.

PAIM, T. G. S. et al. Performance of the Vitek 2 system software version 5.03 in the bacterial identification and antimicrobial susceptibility test: evaluation study of clinical and reference strains of Gram-positive cocci. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, p.377-381, 2014.

PATRICK, C. C. Coagulase-negative staphylococci: pathogens with increasing clinical significance. **The Journal of Pediatrics**, v. 116, n. 4, p. 497-507, 1990.

PFALLER, M. A. et al. Bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infection: frequencies of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY antimicrobial surveillance program (United States and Canada, 1997). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 7, p. 1762-1770, 1998.

PFALLER, M. A. et al. Survey of blood stream infections attributable to gram-positive cocci: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and Latin America from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. SENTRY Participants Group. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 33, n. 4, p. 283-297, 1999.

PIETERSZ, R. N. I. et al. Detection of bacterial contamination of platelet concentrates. **Vox Sanguinis**, v. 93, n. 3, p. 260-277, 2007.

PIETERSZ, R. N. I. et al. Bacterial contamination in platelet concentrates. **Vox Sanguinis**, n. 106, p. 256–283, 2014.

PINHEIRO, L. et al. Reduced susceptibility to vancomycin and biofilm formation in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolated from blood cultures. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, p. 871-878, 2014.

PUNSALANG, A. et al. Growth of Gram positive and Gram negative bacteria in platelet concentrates. **Transfusion**, v. 29, n. , p. 596-599, 1989.

QUINN, P. J. et al. Bacterial genetics and mechanisms of genetic variation and gene database. In: **Veterinary microbiology and microbial disease**. 2.ed. Wiley-Blackwell, cap. 9, p. 129-142, 2011

RAMIREZ-ARCOS, S., GOLDMAN, M. Bacterial contamination. In: Popovsky MA, editor. **Transfusion reactions**. 4th ed. Bethesda (MD): **American Association of Blood Banks**, p. 153-189, 2012.

RICE, L. B. Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. **American Journal of Infection Control**, v. 34 (5 Suppl 1), p. S11-9; discussion S64-73, 2006.

RIGATTI, F. et al. Bacteremias por *Staphylococcus* coagulase negativos oxacilina resistentes em um hospital escola na cidade de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p. 686-690, 2010.

ROBERTS, M. C. et al. Nomenclature for macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 4, p. 2823-2830, 1999.

ROHDE, H. et al. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. **Molecular Microbiology**, v. 55, p. 1883-1895, 2005.

ROHDE, H. et al. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. **Biomaterials**, v. 28, n. 9, p. 1711-1720, 2007.

ROHDE, H. et al. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. **European Journal of Cell Biology**, v. 89, n.1, p. 103-111, 2010.

ROOD, I. **Detection and origin of bacteria in platelet concentrates**. 2011. 133f. Tese (Doutorado em Medicina) - Universidade Livre de Amsterdã, Amsterdã, Holanda, 2011.

ROOD, I. G. H. et al. Distribution, origin and contamination risk of coagulase-negative *staphylococci* from platelet concentrates. **Journal of Medical Microbiology**, v 60, p. 592-599, 2011.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma**. São Paulo: Atheneu; 2005.

RUZICKA, F. et al. Biofilm detection and the clinical significance of *Staphylococcus epidermidis* isolates. **Folia Microbiologica**, v. 49, p. 596-600, 2004.

SADER, H. S. et al. Results of the 1997 SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in Three Brazilian Medical Centers. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 3, n. 2, p. 63-79, 1999.

SADER, H. S. et al. Pathogen frequency and resistance patterns in brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 5, n.4, p. 200-214, 2001.

SADER, H. S. et al. SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p. 25-79, 2004.

SADERI, H. et al. Phenotypic and genotypic study of macrolide, lincosamide and streptogramin B (MLSB) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. **Medical Science Monitor**, v. 17, n. 2, p. 48-53, 2011.

SAGINUR, R. et al. Multiple combination bactericidal testing of staphylococcal biofilms from implant-associated infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 55-61, 2006.

SAKAI, H. et al. Simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci in positive blood cultures by real-time PCR with two fluorescence resonance energy transfer probe sets. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5739-5744, 2004.

SANTOS, K. R. et al. Surgical site infection: rates, etiology and resistance patterns to antimicrobials among strains isolated at Rio de Janeiro University Hospital. **Infection**, v. 25, n. 4, p. 217-220, 1997.

SANTOS, M. Q. et al. Avaliação do processo anti-séptico em sitio de punção venosa de doadores de sangue. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, n. 4, p. 293-295, 2008.

SCHITO, G. C. The Importance of the Development of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, Suppl 1, p. 3-8, 2006.

SCHWALBE, R. S. et al. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. **The New England Journal of Medicine**, v. 316, n. 15, p. 927-931, 1987.

SEAVER, M. et al. First results using automated epifluorescence microscopy to detect *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis* in WBC-reduced platelet concentrates. **Transfusion**, v. 41, n. 11, p. 1351-1355, 2001.

SELLMAN, B. R. et al. Expression of *Staphylococcus epidermidis* SdrG increases following exposure to an in vivo environment. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 7, p. 2950-2957, 2008.

SEN, K. Rapid identification of *Yersinia enterocolitica* in blood by the 5_{nuclease} PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 1953-1958, 2000.

SHINEFIELD, H. R.; RUFF, N. L. Staphylococcal infections: a historical perspective. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 23, p. 1, p.1-15, 2009.

SHORE, A. C. et al. Detection of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type XI Carrying Highly Divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* Genes in Human Clinical Isolates of Clonal Complex 130 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n.8, p. 3765-3773, 2011.

SHOT - Serious hazards of transfusion, **SHOT Annual Report, 2002**. Acesso em: 20 de março de 2015.

SIERADZKI, K. et al. Inactivation of the methicillin resistance gene *mecA* in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Microbial Drug Resistance**, v. 5, n. 4, p. 253-257, 1999.

SILVA, H. L. et al. Nosocomial coagulase negative Staphylococci bacteremia: five years prospective data collection. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 4, n. 6, p. 271-274, 2000.

SILVA, G. D. I. et al. The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 382-388, 2002.

SKOV, R. et al. Evaluation of a cefoxitin 30 microg disc on Iso-Sensitest agar for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 204-207, 2003.

SOUZA, M. V. et al. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 1, p. 27-36, 2005.

STAINSBY, D. et al. Serious hazards of transfusion. (SHOT). **SHOT Annual Report**. p. 1-88, 2003.

STEPANOVIC, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica**, v. 115, n. 8, p. 891-819, 2007.

STEWART, P. S.; COSTERTON, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **Lancet**, v. 358, n. 9276, p. 135-138, 2001.

STOODLEY, P. et al. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**, v.56, p. 187–209, 2002.

STORMER, M. et al. High-volume extraction of nucleic acids by magnetic bead technology for ultrasensitive detection of bacteria in blood components. **Clinical Chemistry**, v. 53, n. 1, p. 104-110, 2007.

SUBRAMANIAN, P. et al. Antibiotic resistance pattern of biofilm-forming uropathogens isolated from catheterised patients in Pondicherry, India. **Australasian Medical Journal**, v. 5, p. 344-348, 2012.

SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial Environment. **Trends in Microbiology**, v. 9, n.5, p. 222-227, 2001.

SVAOOR, A. et al. The Intercept blood system for platelets inactivates anaerobic bacteria. **AABB**, 2002.

TAHA, M. et al. Biofilm-forming skin microflora bacteria are resistant to the bactericidal action of disinfectants used during blood donation. **Transfusion**, v. 54, n. 11, p. 2974-2982, 2014.

TAKEUCHI, F. et al. Whole-genome sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* uncovers the extreme plasticity of its genome and the evolution of human-colonizing staphylococcal species. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 7292–7308, 2005.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos**. 3ª edição, Editora Atheneu, São Paulo, 2001.

TENOVER, F. C. et al. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, p. 327-332, 2001.

TIPPLE, M. A. et al. Sepsis associated with transfusion of red cells contaminated with *Yersinia enterocolitica*. **Transfusion**, v. 30, n. 3, p. 207-213, 1990.

TOMASZ, A. et al. New mechanism for methicillin-resistance in *S. aureus*: clinical isolates that lack the PBP2a gene and contain normal penicilin-binding proteins with modified penicilin-binding capacity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 33, p. 1869-1874, 1989.

TORMO, M. A. et al. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? **Microbiology**, v. 151, n. 7, p. 2465-2475, 2005.

TRABULSI, I. R.; ALTHERTHUM, F. **Microbiologia**. 5ª ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

UHC - University Health System Consortium. **UHC technology assessment: Platelet transfusion guidelines**, 1998. Acesso em: 20 de março de 2015.

VACHEETHASANEE, K. et al. Bacterial surface properties of clinically isolated *Staphylococcus epidermidis* strains determine adhesion on polyethylene. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 42, n. 3, p. 425-432, 1998.

VADYVALOO, V.; OTTO, M. Molecular genetics of *Staphylococcus epidermidis* biofilms on indwelling medical devices. **The International journal of Artificial Organs**, v. 28, n 11, p. 1069-1078, 2005.

VANNUFFEL, P. et al. Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 11, p. 2864- 2867, 1995.

VASSALLO, R. R.; MURPHY, S. A critical comparison of platelet preparation methods. **Current Opinion in Hematology**, v. 13, n. 5, p. 323-330, 2006

VITALI, L A. et al. Diversity of antibiotic resistance genes and staphylococcal cassette chromosome *mec* elements in faecal isolates of coagulase-negative staphylococci from Nigeria. **BMC Microbiology**, v. 14, p. 106, 2014.

VON EIFF, C. et al. New aspects in the molecular basis of polymer-associated infections due to staphylococci. **European Journal of Clinical Microbiology e Infectious Diseases**, v. 18, p. 843-846, 1999.

VON EIFF, C. et al. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 677-85, 2002.

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

VUONG, C. et al. Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 182, n. 6, p. 1688-1693, 2000.

VUONG, C. et al. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 52, p. 54881-54886, 2004.

WAGNER, S. J. et al. Transfusion-Associated Bacterial Sepsis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, n. 7, p. 290-302, 1994.

WAGNER, S. Transfusion related bacterial sepsis. **Current Opinion in Hematology**, v. 4, n. 6, p. 464-469, 1997.

WALTHER-WENKE, G. et al. Screening of platelet concentrates for bacterial contamination: spectrum of bacteria detected, proportion of transfused units, and clinical followup. **Annals of Hematology**, v. 89, p. 83-91, 2010.

WANG, Y. et al. Macrolide-lincosamide-resistant phenotypes and genotypes of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.130, p.118-125, 2008.

WEBBER, M. A.; PIDDOCK, L. J. V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.51, p. 9-11, 2003.

WEINSTEIN, M. P. et al. Clinical importance of identifying coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures: evaluation of MicroScan rapid and dried overnight gram-positive panels versus a conventional reference method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 7, p. 2089-2092, 1998.

WENKE-WALTHER, G. Incidence of bacterial transmission and transfusion reactions by blood components. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 46, n. 7, p. 919-925, 2008.

WERCH, J. B. et al. Detecting bacteria in platelet concentrates by use of reagent strips. **Transfusion**, v. 42, n. 8, p. 1027-1031, 2002.

WISPLINGHOFF, H. et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 3, p. 309-317, 2004.

WOLCOTT, R. D.; EHRLICH, G. D. Biofilms and chronic infections. **The Journal of the American Medical Association**, v. 299, n. 22, p. 2682-2684, 2008.

WONG, P. Y. et al. Validation and assessment of a blood-donor arm disinfectant containing chlorhexidine and alcohol. **Transfusion**, v. 44, n. 8, p. 1238-1242, 2004.

XU, L. et al. Role of the luxS quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 1, p. 488-496, 2006.

YAO, Y. et al. Factors Characterizing *Staphylococcus epidermidis* Invasiveness Determined by Comparative Genomics. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 3, p. 1856-1860, 2005.

YOMTOVIAN, R. Bacterial contamination of blood: lessons from de past and road map for the future. **Transfusion**, v. 44, n. 3, p. 450-460, 2004.

YORK, M. K. et al. Comparison of PCR detection of *mecA* with standard susceptibility testing methods to determine methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 249-253, 1996.

ZIEBUHR, W. et al. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 3, p. 890-896, 1997.

ZIEBUHR, W. et al. A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. **Molecular Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 345-356, 1999.

ZIEBUHR, W. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*: emerging pathogens in nosocomial infections. **Contributions to Microbiology**, v. 8, p. 102-107, 2001.

ANEXOS

ANEXO A – RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA DA AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA NÚMERO 34, DE 11 DE JUNHO DE 2014. Dispõe sobre as Boas Práticas no Ciclo do Sangue.

[...]

Seção V

Controle de qualidade dos hemocomponentes

Art. 64. Todo serviço de hemoterapia que produza hemocomponentes deve realizar controle de qualidade sistemático de todos os tipos de hemocomponentes produzidos, em laboratório específico de controle de qualidade.

Parágrafo único. O serviço de hemoterapia que terceirizar o controle de qualidade de hemocomponentes deve assegurar que os serviços terceirizados sejam regularizados junto ao órgão de vigilância sanitária competente e que os procedimentos sejam realizados conforme a legislação vigente.

Art. 65. Os protocolos do controle de qualidade devem conter o tipo de controle a ser realizado em cada hemocomponente, a amostragem e os parâmetros mínimos exigidos nesta Resolução, sem prejuízo do disposto pelo Ministério da Saúde.

Parágrafo único. O método utilizado para a realização do controle de qualidade não deve comprometer a integridade do produto, a menos que este seja desprezado após ser utilizado como controle de qualidade.

Art. 66. O controle de qualidade dos concentrados de hemácias e dos concentrados de plaquetas deve ser realizado em, pelo menos, 1% da produção ou 10 (dez) unidades / mês, o que for maior, sendo realizados os testes em amostras individuais de unidades produzidas.

Parágrafo único. Na avaliação de contaminação microbiológica, todos os casos positivos devem ser devidamente investigados e adotados as medidas corretivas e preventivas, mantendo-se os respectivos registros.

[...]

ANEXO B - PORTARIA Nº 2.712, DE 12 DE NOVEMBRO DE 2013.

Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos.

[...]

Seção V**Do Controle de Qualidade dos Componentes Sanguíneos**

Art. 116. Os serviços de hemoterapia realizarão o controle de qualidade sistemático de todos os tipos de componentes sanguíneos que produzirem.

§ 1º O controle de qualidade dos concentrados de hemácias e dos concentrados de plaquetas deve ser realizado em, pelo menos, 1% da produção ou 10 (dez) unidades por mês (o que for maior).

§ 2º O controle de qualidade dos plasmas e dos crioprecipitados deve ser feito em amostragem definida no Anexo VI a esta Portaria.

§ 3º O serviço de hemoterapia deve ter protocolos escritos, definindo:

I - o tipo de controle a ser feito em cada componente sanguíneo;

II - a amostragem; e

III - os parâmetros mínimos esperados para cada item controlado.

§ 4º Cada item verificado pelo controle de qualidade deve apresentar um percentual de conformidade igual ou superior a 75%.

§ 5º Com relação à produção de concentrado de plaquetas por aférese e contagem de leucócitos em componentes celulares desleucocitados a conformidade considerada deve ser igual ou superior a 90%.

§ 6º A avaliação da contaminação microbiológica dos componentes sanguíneos celulares será realizada utilizando-se amostragem igual ou superior a 1% da produção ou 10 (dez) unidades por mês (o que for maior).

§ 7º Na hipótese do § 6º, todos os casos positivos devem ser devidamente investigados na busca de uma causa corrigível.



§ 8º Pelo alto risco de contaminação microbiológica dos concentrados de plaquetas pela sua condição de armazenamento, recomenda-se realização de avaliação de contaminação microbiológica em 100% desta produção.

§ 9º Serão observados os parâmetros mínimos a serem verificados em cada componente sanguíneo, nos termos do Anexo VI a esta Portaria.

Art. 117. Os serviços de hemoterapia realizarão avaliações periódicas dos resultados do controle de qualidade, de forma que tais resultados sejam revisados e analisados, e ações corretivas sejam propostas para as não conformidades observadas.

[...]

ANEXO C – Registro no Comitê de Ética em Pesquisa

	<p>MINISTÉRIO DA SAÚDE Conselho Nacional de Saúde Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)</p>	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa Comitê de Ética em Pesquisa - CEP- UFSM REGISTRO CONEP: 243</p>	
---	--	---	---

CARTA DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa – UFSM, reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – (CONEP/MS) analisou o protocolo de pesquisa:

Título: Proposta de metodologia para controle bacteriológico das amostras de concentrados plaquetários obtidas pelo HEMORGS de Santa Maria - RS

Número do processo: 23081.015516/2009-48

CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética): 0285.0.243.000-09

Pesquisador Responsável: Rosmari Horner

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes estabelecidas na Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê. O pesquisador deve apresentar ao CEP:

Janeiro/2011 - Relatório parcial

Janeiro/2012 - Relatório final

Os membros do CEP-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.



DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO: 22/12/2009

Santa Maria, 23 de Dezembro de 2009.



Elisete Medianeira Tomazetti

Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-UFSM
Registro CONEP N. 243.

 <p>MINISTÉRIO DA SAÚDE Conselho Nacional de Saúde Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)</p>	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa Comitê de Ética em Pesquisa - CEP- UFSM REGISTRO CONEP: 243</p> 
---	--

PARECER PROTOCOLO DE PESQUISA

Protocolo CEP-UFSM: 23081.015516/2009-48 **CAAE:** 0285.0.243.000-09
Data entrada CEP: 27/11/2009 **Data do parecer CEP:** 11/04/2012
Data encaminhamento CONEP (caso necessário): / /

IDENTIFICAÇÃO

Título do Projeto: Proposta de metodologia para controle bacteriológico das amostras de concentrados plaquetários obtidas pelo HEMORGS de Santa Maria - RS
Pesquisador Responsável: Rosmari Horner
Instituição: Universidade Federal de Santa Maria
Unidade/Órgão: Dep. de Análises Clínicas e Toxicológicas
Área Temática: III - Projeto fora das áreas temáticas especiais

OBJETIVOS DO PROJETO (Descrever os objetivos e metas do projeto)

Este estudo tem como objetivo propor uma metodologia de triagem eficiente e de fácil execução para o Controle Bacteriológico de amostras de plaquetas randômicas e de plaquetaféreses obtidas pelo Hemocentro do Estado do Rio Grande do Sul (HEMORGS) localizado em Santa Maria (SM) – Rio Grande do Sul (RS).



Os objetivos específicos são:

- Identificar a proporção de CPs contaminados com bactérias no HEMORGS de SM/RS;
- Identificar a carga bacteriana, ou seja, as Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC/mL), e caracterizar os isolados bacterianos envolvidos;
- Comunicar ao HEMORGS, sempre que possível, a presença de contaminação bacteriana dos CPs analisados, evitando a transfusão e os riscos ao paciente. Assim, somente aquelas transfusões que eventualmente ocorram antes dos resultados da cultura serão avaliadas, pois existem pequena disponibilidades de CPs;
- Avaliar a reação transfusional dos receptores dos CPs dos quais foram isoladas bactérias, quando ocorreu a transfusão.

RESUMO (Descrever o objeto de pesquisa, justificativa, condições de realização, aspectos metodológicos, cronograma, orçamento e financiamento)

Os concentrados plaquetários (CPs) são os componentes sangüíneos com maior freqüência de contaminação bacteriana e com maior probabilidade de provocar reações transfusionais relacionadas a essa contaminação. O objetivo deste trabalho é comparar métodos de realização de triagem pré-transfusional para a detecção da contaminação bacteriana plaquetária (meio líquido e meio sólido).

Amostras plaquetárias de (em torno de 600 amostras) serão coletadas no Hemocentro do Rio Grande do Sul (HEMORGS), após o recebimento da Carta de Aprovação do projeto pelo Comitê Ético em Pesquisas (CEP). Serão coletadas todas as amostras obtidas durante o dia num determinado intervalo de tempo, no qual o número das amostras obtidas se aproxime de 600 unidades, devido que o número de bolsas de CPs varia de um dia para outro. As amostras serão encaminhadas para o Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT) do Centro de Ciências da Saúde (CCS), onde será efetuada a pesquisa da

 <p style="text-align: center;">MINISTÉRIO DA SAÚDE Conselho Nacional de Saúde Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)</p>	<p style="text-align: center;">UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa Comitê de Ética em Pesquisa - CEP- UFSM REGISTRO CONEP: 243</p> 
---	--

presença de bactérias nestas amostras biológicas. Serão utilizadas duas metodologias de cultura: Semeadura em Caldo Mueller Hinton, sem contagem e Semeadura em Placa de AS de Carneiro, com contagem. As metodologias serão comparadas estatisticamente e após o melhor método poderá ser implementado no Controle Bacteriológico das amostras de plaquetas randômicas e de plaquetaféreses obtidas pelo HEMORGS localizado em SM/RS.

O projeto apresenta cronograma com início da coleta de dados em janeiro de 2010 e defesa de dissertação em dezembro de 2011

O orçamento discriminado será custeado com recursos da parcela da taxa de bancada do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do CCS, UFSM, referente à parte pertinente à orientadora do projeto.

CONSIDERAÇÕES (Comentários gerais sobre o projeto: coerência dos objetivos, experiência dos autores, fundamentação teórica, amostragem, sujeitos, métodos, riscos e benefícios, privacidade e confidencialidade dos dados, TCLE. Apresentar as ponderações e recomendações.)

O presente projeto apresenta bem escrito e justificado. Todos os documentos referentes à autorização institucional e confidencialidade dos dados encontram-se presentes.

ATENDIMENTO ÀS PENDÊNCIAS (Em caso de protocolo Pendente, apontar a data do parecer e comentar o atendimento as questões recomendadas.)

Sua solicitação de Emenda foi avaliada e obteve parecer favorável em 10/04/2012.

PARECER	
SITUAÇÃO	Aprovado

OBSERVAÇÕES FINAIS

1 - De acordo com a Resolução CNS 196/96, as pendências devem ser respondidas pelo pesquisador responsável no prazo máximo de 60 (sessenta) dias, a partir da data de envio do parecer pelo CEP. Após este prazo o protocolo será considerado retirado e havendo interesse deve-se reiniciar o processo de registro de um novo protocolo.

2 – O pesquisador deve apresentar ao CEP:

- Janeiro/2013- Relatório parcial**
- Janeiro/2014 - Relatório parcial**
- Janeiro de 2015 - Relatório final**

ANEXO D – Publicação do Artigo 1



Revista de Ciências
Farmacéuticas
Básica e Aplicada

Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences

Rev Ciênc Farm Básica Apl, 2014,35(2):239-244
ISSN 1808-4532

Avaliação do Desempenho de Culturas Convencionais na Detecção da Contaminação Bacteriana em Concentrados Plaquetários em um Hospital Universitário do Sul do Brasil

Rosiéli Martini¹; Rosmari Hörner^{1*}; Cláudia Barbisan Kempfer¹; Mônica de Abreu Rodrigues¹; Livia Gindri¹; Máisa Kräulich Tizotti¹; Lúliana Urdangarin de Sousa¹; Silvana Oliveira dos Santos¹; Jacqueline Nunes Rodrigues¹

¹ Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

RESUMO

As transfusões sanguíneas retratam um suporte indispensável no tratamento de pacientes com câncer. Por outro lado, representam um sério risco de sepsé bacteriana. Os concentrados plaquetários (CPs) são os hemocomponentes com a mais alta frequência de contaminação bacteriana, responsáveis pela maioria das reações sépticas transfusionais. Este estudo objetivou avaliar diferentes metodologias convencionais de cultura na detecção da contaminação bacteriana em CPs. Um total de 691 amostras de CPs (665 plaquetas randômicas e 26 plaquetaféreses), provenientes do Hemocentro do Estado do Rio Grande do Sul (HEMORGS), foi analisado. Foram empregadas técnicas de cultura qualitativa, quantitativa e de crescimento diário, com as quais evidenciamos 2,32% de contaminação bacteriana nas amostras analisadas, sendo todas provenientes de coleta pelo método randômico. A metodologia qualitativa apresentou o melhor desempenho. Esse fato nos permite reforçar a importância da realização de triagem bacteriológica pré-transfusional em todas as amostras de CPs para a redução dos riscos de sepsé.

Palavras-chave: Concentrados plaquetários. Bactérias. Metodologias. Transfusão sanguínea.

INTRODUÇÃO

A transfusão de concentrados plaquetários (CPs) é essencial para o tratamento de pacientes com doenças neoplásicas e hematológicas (Niu et al., 2006). A contaminação bacteriana das plaquetas é atualmente a complicação infecciosa mais comum, posterior à transfusão (Chang et al., 2004). Anteriormente à década de setenta, as plaquetas eram estocadas a 4 °C com a finalidade de diminuir o risco da contaminação e proliferação bacteriana. No entanto em 1969, Murphy e Gardner concluíram em seus estudos, que a estocagem a 13, 20, 22 e 37 °C melhoravam a viabilidade e a funcionalidade das plaquetas (Murphy & Gardner 1969). A partir desta evidência iniciou-se essa prática, a qual é mantida até hoje e adotada mundialmente, na qual a estocagem dos CPs ocorre entre 20 a 24 °C por 5 dias (AABB, 2004; Brasil, 2010). No entanto, estudos atuais demonstraram que esta temperatura favorece o crescimento bacteriano (McDonald et al., 2004).

O desfecho clínico dos pacientes, os quais recebem CPs contaminados com bactérias, depende de múltiplos fatores, entre os mais importantes pode-se citar: o estado imunológico, o número de bactérias infundidas, a virulência da espécie, o fato do paciente estar em uso de antimicrobiano no momento da infusão, além da capacidade da bactéria em produzir endotoxinas. Este último fator está associado a um prognóstico desfavorável (Blajchman & Goldman, 2001; Blajchman, 2004). Constitui um consenso em que o principal mecanismo de contaminação bacteriana dos CPs é originário da pele do doador ou do sangue (Blajchman, 2002). Os microrganismos mais encontrados como contaminantes dos CPs são as bactérias gram positivas (GP) comensais da pele (Brecher & Hay, 2005).

Nos países acreditados pela Food and Drug Administration (FDA), a detecção da contaminação nos CPs é realizada através de exames bacteriológicos em todas as unidades de CPs como triagem pré-transfusional (AABB, 2004). Já no Brasil, a regulamentação dos serviços de hemoterapia é realizada pela Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 57, de 16 de dezembro de 2010, que não preconiza a cultura em todas as amostras como triagem pré-transfusional, mas em apenas 1% da produção mensal ou 10 unidades por mês (Brasil, 2010).

Autor correspondente: Rosmari Hörner. Laboratório de Bacteriologia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria (SM), Rio Grande do Sul (RS). Prédio 26, Sala 1201, Campus da UFSM, CEP: 97015-900. E-mail: rosmari.ufsm@gmail.com

ANEXO E – Carta de Aceite do Artigo 2

Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

Preview

From: thalesdebrito.revimtsp@gmail.com

To: rosifarma@gmail.com

CC:

Subject: Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - Decision on Manuscript ID RIMTSP-2014-0205.R2

Body: 07-Apr-2015

Dear Ms. Martini:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Investigation of biofilm formation in coagulase-negative staphylococci isolated from bags of Platelet Concentrates" in its current form for publication in the Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. The comments of the reviewers who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

From 2016 on, the Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine) will be published only on-line, free access.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
 Prof. Thales de Brito
 Editor-in-Chief, Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
 thalesdebrito.revimtsp@gmail.com

Entire Scoresheet:

Reviewer: 2

Recommendation: Accept

Comments:

no comments on this new revision

Additional Questions:

Does the manuscript contain new and significant information to justify publication?: Yes

Does the Abstract (Summary) clearly and accurately describe the content of the article?: Yes

Is the problem significant and concisely stated?: Yes

Are the methods described comprehensively?: Yes

Are the interpretations and conclusions justified by the results?: Yes

Is adequate reference made to other work in the field?: Yes

Is the language acceptable?: Yes

Please rate the priority for publishing this article (1 is the highest priority, 10 is the lowest priority): 7

Please state any conflict(s) of interest that you have in relation to the review of this paper (state "none" if this is not applicable): none

Rating:

Interest: 2. Good

Quality: 2. Good

Originality: 3. Average

Overall: 2. Good

Reviewer: 1

Recommendation: Accept

Comments:

The authors have satisfactorily addressed my comments.

Additional Questions:

Does the manuscript contain new and significant information to justify publication?:
Yes

Does the Abstract (Summary) clearly and accurately describe the content of the
article?: Yes

Is the problem significant and concisely stated?: Yes

Are the methods described comprehensively?: Yes

Are the interpretations and conclusions justified by the results?: Yes

Is adequate reference made to other work in the field?: Yes

Is the language acceptable?: Yes

Please rate the priority for publishing this article (1 is the highest priority, 10 is the
lowest priority): 3

Please state any conflict(s) of interest that you have in relation to the review of this
paper (state "none" if this is not applicable).: Not applicable

Rating:

Interest: 2. Good

Quality: 2. Good

Originality: 3. Average

Overall: 2. Good

Date Sent: 07-Apr-2015

 Close Window

APÊNDICES

APÊNDICE A – Resultados do Alinhamento genético – Artigo 2

```

epidermidi: TTTGAAATCTCGAATTTGTTACATACTAGTTACAAAATTTATTTTTTAAAAATACATTTAACAGTGAATATA: 73
haemolytic: -----ATCTCGAATTTGTTACATACTAGTTACAAAATTTATTTTTTAAAAATACATTTAACAGTGAATATA: 67

epidermidi: CTTGGTCTTTAAAACGGTTTTTACTGTCCTCAATAATCCCGAATTTTTGTGAAAAGGAGGCTCTAAAATACCA: 146
haemolytic: CTTGGTCTTTAAAACGGTTTTTACTGTCCTCAATAACCCCGAATTTTTGTGAAAAGGAGGCTCTAAAATACCA: 140

epidermidi: AGTCTCANGAAAAAGAAATTAAGTTTATAAAGTCTCTTTATCCAAAGCGATGTGGGTAGGATCATANTAC: 219
haemolytic: AGTCTCANGAAAAAGAAATTAAGTTTATAAAGTCTCTTTATCCAAAGCGATGTGGGTAGGATCATANTAC: 213

epidermidi: TTTATCAATTCATCAITGAAGGTAGTATTAATTTCTTGAAGATGGTGTGGTTGATTTCTGAATTCAGTCTCTCG: 292
haemolytic: TTTATCAATTCATCAITGAAGGTAGTATTAATTTCTTGAAGATGGTGTGGTTGATTTCTGAATTCAGTCTCTCG: 286

epidermidi: GAGCACTAGTAAATGAACATATAATTTAATATATCTCTCATCAACGTCGATATTAATTTGAATAAAACCTG: 365
haemolytic: GAGCACTAGTAAATGAACATATAATTTAATATATCTCTCATCAACGTCGATATTAATTTGAATAAAACCTG: 359

epidermidi: GTAAAGTCCGTCATGGAAATAATTCATCATGTTCCCTAAGCAAAAAATCTATAAAGTAATTTGAACAATTC: 438
haemolytic: GTAAAGTCCGTCATGGAAATAATTCATCATGTTCCCTAAGCAAAAAATCTATAAAGTAATTTGAACAATTC: 432

1

epidermidi: TCACACATTTTTTCGATATATTTCTTCCITATTAICGTAATGATAATATAGACTAGCCITTTTTATATTTACAC: 511
haemolytic: TCACACATTTTTTCGATATATTTCTTCCITATTAICGTAATGATAATATAGACTAGCCITTTTTATATTTACAC: 505

epidermidi: TTTTAGAAATATCATCAAGTGTAGTACCATCCCTTTTCGGAAAAAAGGTTATTGCGTTATCAATAAT: 584
haemolytic: TTTTAGAAATATCATCAAGTGTAGTACCATCCCTTTTCGGAAAAAAGGTTATTGCGTTATCAATAAT: 578

epidermidi: CTTTCTTTCAATTCATAAATCTCCCTTATTCAATTTTCTAAAAATATATTACAGAAAAATTAAGTAAAA: 657
haemolytic: CTTTCTTTCAATTCATAAATCTCCCTTATTCAATTTTCTAAAAATATATTACAGAAAAATTAAGTAAAA: 651

epidermidi: TTACAAATATTACTGTTTCAGTATAACCAACATTCATTGCAAAATGAAATACTTTTCGATTAGCATATGCTTTA: 730
haemolytic: TTACAAATATTACTGTTTCAGTATAACCAACATTCATTGCAAAATGAAATACTTTTCGATTAGCATATGCTTTG: 724

epidermidi: CAACCTAATCAACGAAAGGTAGGTGAAAAATGCAATTTTAACTTTTACTTTTCTATCCAAATTTTATGT: 803
haemolytic: CAACCTAATCAACGAAAGGTAGGTGAAAAATGCAATTTTAACTTTTACTTTTCTATCCAAATTTTATGT: 797

epidermidi: CAATTTACTGGATAGTAGGATCGATTTACTATTTTTTTATTAAGAAAAACCCITTAATCGATCATGTTAGT: 876
haemolytic: CAATTTACTGGATAGTAGGATCGATTTACTATTTTTTTATTAAGAAAAACCCITTAATCGATCATGTTAGT: 870

2

epidermidi: AAAATCTGACATCAACAAGTTGAAAGGCATCTCCTTTTTATTAGCTTGCTACAATGAAAGTGAACAGTTCAA: 949
haemolytic: AAAATCTGACATCAACAAGTTGAAAGGCATCTCCTTTTTATTAGCTTGCTACAATGAAAGTGAACAGTTCAA: 943

epidermidi: GACACGCTTTCTAGTGTTTTACTCTAGAAATCTCTGAAAAAAGAAATATCATTTATCAATGATGGAAGTTCTG: 1022
haemolytic: GACACGCTTTCTAGTGTTTTACTCTAGAAATCTCTGAAAAAAGAAATATCATTTATCAATGATGGAAGTTCTG: 1016

epidermidi: ATAATACTGCTGAAATCATCTATGACTTCAAGAAAAATCATGATTTTAAATTTGTTGACCTCGAAGTCAATAG: 1095
haemolytic: ATAATACTGCTGAAATCATCTATGAAATCAAGAAAAATCATGATTTTAAATTTGTTGACCTCGAAGTCAATAG: 1089

epidermidi: AGGTAAAGCTAATGCACATCAATGAGGGAATCAAAACAGCATCTTACGAAATATGTTATGTTAGTGTCTGAC: 1168
haemolytic: AGGTAAAGCTAATGCACATCAATGAGGGAATCAAAACAGCATCTTACGAAATATGTTATGTTAGTGTCTGAC: 1162

epidermidi: ACTGTCATTGATGACGATGCGCTTTTTATATGATTGAAGACTTTAAAAGAAATCCAAAATTAAGCGCAGTTA: 1241
haemolytic: ACTGTCATTGATGACGATGCGCTTTTTATATGATTGAAGACTTTAAAAGAAATCCAAAATTAAGCGCAGTTA: 1235

epidermidi: CAGGTAATCCACGTAATCGTAATAAAGTTCTATTTTAGGAAAAATACAGACCATTTGAATATGCAAGTATAT: 1314
haemolytic: CAGGTAATCCACGTAATCGTAATAAAGTTCTATTTTAGGAAAAATACAGACCATTTGAATATGCAAGTATAT: 1308

3

```

1320 * 1340 * 1360 * 1380
epidermidi: TGGTTGTATCANGCGAAGTCAATCTCTTGCAGGAGCAATCAATACTATTTTCAGGTGTTTTACACACTATTTAAA: 1387
haemolytic: TGGTTGTATCANGCGAAGTCAATCTCTAGCAGGAGCAATCAATACTATTTTCAGGTGTTTTACACACTATTTAAA: 1381

* 1400 * 1420 * 1440 * 1460
epidermidi: AAAAGTGCACCTCAAAGATGTAGGTTATTGGGATCTGACATGATTACTGAGGATATTGCTGTTTTCATGGAAAC: 1460
haemolytic: AAAAGTGCACCTCAAAGATGTAGGTTATTGGGATCTGACATGATTACTGAGGATATCGCTGTTTTCATGGAAAC: 1454

* 1480 * 1500 * 1520 *
epidermidi: TCCATCTTTTTGATTACGAAATTAAGTACGAACCCAGCTCTATGCTGGATGTTAGTGCCGAAACTATAGG: 1533
haemolytic: TCCATCTTTTTGATTACGAAATTAAGTACGAACCCAGCGCCTTTGCTGGATGTTGGTGCCGAAACTATAGG: 1527

1540 * 1560 * 1580 * 1600
epidermidi: TGGTTTATGGAAACAAAGGGTTCGATGGGCTCAAGGCGGGCATGANGTACTTTTAAGAGACTTTTGGCCAACA: 1606
haemolytic: TGGTTTATGGAAACAAAGGGTTCGATGGGCTCAAGGCGGGCATGANGTACTTTTAAGAGACTTTTGGTCAACA: 1600

* 1620 * 1640 * 1660 * 168
epidermidi: ATTAAAACCAAGAAATTAATCACTATATATTTAATGTTTGAACAAATCGCATCGATTACATGGGCTACATCG: 1679
haemolytic: ATTAAAACCAAGAAATTAATCACTATATATTTAATGTTTGAACAAATCGCATCTATTACATGGGCTACATCG: 1673

0 * 1700 * 1720 * 1740 *
epidermidi: TACTATGTTATTTATCTTTTTTAGTAATCACAGCCCAACATCTTAGATTACACATATTTAAAATATAGTTTTTC: 1752
haemolytic: TAAATGTTATTTATCTTTTTTAGTAATCACAGCCCAACATCTTAGATTACACATATTTAAAATATAGTTTTTC: 1746

4

1760 * 1780 * 1800 * 1820
epidermidi: AATCTTTTTTTCATCCCTTACGATGACCTTTAACAATATCAATCCAAATTACAGTTGCCTTATTTATTTGAC: 1825
haemolytic: AATCTTTTTTTCATCCCTTACGATGACCTTTAACAATATCAATCCAAATTACAGTTGCCTTATTTATTTGAC: 1819

* 1840 * 1860 * 1880 * 19
epidermidi: **AGTCGCTACGAAAGAAATAATAGTTGGGCTGATATTTTAAAGTTGGTATCCCAACGTTATACCTGGGTTATCA:** 1898
haemolytic: **AGTCGCTACGAAAGAAATAATAGTTGGGCTGATATTTTAAAGTTGGTATCCCAACGTTATACCTGGGTTATCA:** 1892

00 * 1920 * 1940 * 1960 *
epidermidi: **ATGCCGCAATTGTCATTATGGCATTTC**TAAGCATTAAAAGAAAGAAAGGTGGCTATGCTAC**ATGGTCAAG:** 1971
haemolytic: **ATGCCGCAATTGTCATTATGGCATTTC**TAAGCATTAAAAGAAAGAAAGGTGGCTATGCTAC**ATGGTCAAG:** 1965

1980 * 2000 * 2020 * 2040
epidermidi: **CCCAGACGAGGCAATATCCACGGTAACCTCTTATTTAAATATAGTTAGGGAGAGCCTTATTTACTATAT:** 2044
haemolytic: **CCCAGACGAGGCAATATCCACGGTAACCTCTTATTTAAATATAGTTAGGGAGAGCCTTATTTACTATAT:** 2038

* 2060 * 2080 * 2100 * 2
epidermidi: **CCGGATTTTTGGATGATTTGATCGTTGTGTGATGTTTATATAGGAACCTTATCAATCTCAAAATGGA:** 2117
haemolytic: **CCGGATTTTTGGATGATTTGATCGTTGTGTGATGTTTATATAGGAACCTTATCAATCTCAAAATGGA:** 2111

120 * 2140 * 2160 * 2180 *
epidermidi: **AGTGTATACAAATACGTTTGCATTAAATGTTGAAACACG**GAAATTTACAAATTTTCGGATGGATGAGT: 2190
haemolytic: **AGTGTATACAAATACGTTTGCATTAAATGTTGAAACACG**GAAATTTACAAATTTTCGGATGGATGAGT: 2184

5

2200 * 2220 * 2240 * 2260
epidermidi: TTGTTTGTACTTATATATTTATCTTTTTTACATTTAGTCTCGCGTTTCAAAAATATAAGAAAGGTCGTGACA: 2263
haemolytic: TTGTTTGTACTTATATATTTATCTTTTTTACATTTAGTCTCGCGTTTCAAAAATATAAGAAAGGTCGTGACA: 2257

* 2280 * 2300 * 2320 *
epidermidi: TATGAAACCTTCAAAATTAATCTTTTATAGCGCATTGATGATATTAATGACGAATGCAACCAATATCA: 2336
haemolytic: TATGAAACCTTCAAAATTAATCTTTTATAGCGCATTGATGATATTAATGACGAATGCAACCAATATCA: 2330

2340 * 2360 * 2380 * 2400
epidermidi: CACCTGAATGCTCAAGCTAATGAAGAAAACARGAAGTTAAAGTACGAAAAAATAGCCGACTCGCGTTAAACT: 2409
haemolytic: CACCTGAATGCTCAAGCTAATGAAGAAAACARGAAGTTAAAGTACGAAAAAATAGCCGACTCGCGTTAAACT: 2403

* 2420 * 2440 * 2460 * 2480
epidermidi: ATCACAGATTAAGAAAAAGGATCCCTTGAATGACTTTATATCATTACTATCTGGGAGTAAGGAAATTA AAAA: 2482
haemolytic: ATCACAGATTAAGAAAAAGGATCCCTTGAATGACTTTATATCATTACTATCTGGGAGTAAGGAAATTA AAAA: 2476

* 2500 * 2520 * 2540 *
epidermidi: TTATAGTGTCACTGATCARGAATTTAATCAAAATCAATGGCTTAAAGCACACGACGCAAGTTTTTAACT: 2555
haemolytic: TTATAGTGTCACTGATCARGAATTTAATCAAAATCAATGGCTTAAAGCACACGACGCAAGTTTTTAACT: 2549

2560 * 2580 * 2600 * 2620
epidermidi: TTGAAGAAITTTAATAATAAAGAAAAAGGTAATTTCCATAAAGAAAGTGTGGATTAACTTTGATGATA: 2628
haemolytic: TTGAAGAAITTTAATAATAAAGAAAAAGGTAATTTCCATAAAGAAAGTGTGGATTAACTTTGATGATA: 2622

6

```

epidermidi: * 2640 * 2660 * 2680 * 2700
haemolytic: TGGATCAACCGATTTATGCAATGCCTTTCCTGTTTTGAAAAATATCATATTCAGCAACAGGTTTTCTTAT: 2701
TGGATCAACCGATTTATGCAATGCCTTTCCTGTTTTGAAAAATATCATATTCAGCAACAGGTTTTCTTAT: 2695

epidermidi: * 2720 * 2740 * 2760 *
haemolytic: TACGAACACATTTGGTTCTACCAATTTTCATAATTTAAATTTACTTTCAAAAAAGCAATTAGATGAATGTAT: 2774
TACGAACACATTTGGTTCTACCAATTTTCATAATTTAAATTTACTTTCAAAAAAGCAATTAGATGAATGTAT: 2768

epidermidi: * 2780 * 2800 * 2820 * 2840
haemolytic: GAAACAGGCTTATGGGACTTTGANTCTCATACTCATGATTTACACGCTCTTAAGAAAGGCAATAAATCGAAGT: 2847
GAAACAGGCTTATGGGACTTTGANTCTCATACTCATGATTTACACGCTCTTAAGAAAGGCAATAAATCGAAGT: 2841

epidermidi: * 2860 * 2880 * 2900 * 2920
haemolytic: TTTTAGATTGCTCTCAATCTGTGCTAGTAAAGATATTAATAAAGGCAACACTATTTAAATAAAAACTACC: 2920
TTTAGATTGCTCTCAATCTGTGCTAGTAAAGATATTAATAAAGGCAACACTATTTAAATAAAAACTACC: 2914

epidermidi: * 2940 * 2960 * 2980 *
haemolytic: AAAAAATGAACGGGCACTTGCTTACCCATACGGATTAATTAATGACGACAAAATAAAGCTATGAAAAAAT: 2993
AAAAAATGAACGGGCACTTGCTTACCCATACGGATTAATTAATGACGACAAAATAAAGCTATGAAAAAAT: 2987

epidermidi: * 3000 * 3020 * 3040 * 3060
haemolytic: GGAATTCATATGGGTTTACACTTCAGGAAAAGCTGTCACACCAGATGCCGATAACTATAGAATTCACAGTA: 3066
GGAATTCATATGGGTTTACACTTCAGGAAAAGCTGTCACACCAGATGCCGATAACTATAGAATTCACAGTA: 3060

```

7

```

epidermidi: * 3080 * 3100 * 3120 * 314
haemolytic: TTTTAGTAAAGTAAATGATGCTTTTGAACGCTAATAAAGGAATGGGACGGATTTCGATGAAGAAAAATAAATTC: 3139
TTTAGTAAAGTAAATGATGCTTTTGAACGCTAATAAAGGAATGGGACGGATTTCGATGAAGAAAAATAAATTC: 3133

epidermidi: 0 * 3160 * 3180 * 3200 *
haemolytic: AATTAGTGTATTTACGTCGCTTTATTTGTGTCATAATCATCGTGACACACTTACTAACGCAAACTACTTAGA: 3212
AATTAGTGTATTTACGTCGCTTTATTTGTGTCATAATCATCGTGACACACTTACTAACGCAAACTACTTAGA: 3206

epidermidi: * 3220 * 3240 * 3260 * 3280
haemolytic: AAATGAACAGATGCTGATAGTTCCTCATATTGCAATATTATATACGCAATATTTTTATTTTCGGCACCCCT: 3285
AAATGAACAGATGCTGATAGTTCCTCATATTGCAATATTATATACGCAATATTTTTATTTTCGGCACCCCT: 3279

epidermidi: * 3300 * 3320 * 3340 * 33
haemolytic: AGTTTTATAATATGCTCAATTTAACAACATTAATTAAGCAATCGTAACATAAATATCTTTTTTCAA: 3358
AGTTTTATAATATGCTCAATTTAACAACATTAATTAAGCAATCGTAACATAAATATCTTTTTTCAA: 3352

epidermidi: 60 * 3380 * 3400 * 3420 *
haemolytic: GATTTAAGTATATTTTTATTCATATCTTTAATCGGCTTGTTCATAGTTATAGTGAATCACTTATCACCGC: 3431
GATTTAAGTATATTTTTATTCATATCTTTAATCGGCTTGTTCATAGTTATAGTGAATCACTTATCACCGC: 3425

epidermidi: * 3440 * 3460 * 3480 * 3500
haemolytic: TTCCTTTTTAAAAAGCAGTTTATCGAAAATGTTGTTTTAGGACAAATGGTATGGCTATTTTCATTATCATAAT: 3504
TTCCTTTTTAAAAAGCAGTTTATCGAAAATGTTGTTTTAGGACAAATGGTATGGCTATTTTCATTATCATAAT: 3498

```

8

```

epidermidi: * 3520 * 3540 * 3560 * 3
haemolytic: ATGCAGTTCITTTGTTCTATCTTATATCATTTACAAAATTAATTTAGATTGTTCAATAGTAAAATTTGCTGC: 3577
ATGCAGTTCITTTGTTCTATCTTATATCATTTACAAAATTAATTTAGATTGTTCAATAGTAAAATTTGCTGC: 3571

epidermidi: 580 * 3600 * 3620 * 3640 *
haemolytic: TTTTAGCATTATAGTCCAACAATCTTATCTACATTTTTTTGAATAATGACACTTTTCATCAATTCATGAC: 3650
TTTAGCATTATAGTCCAACAATCTTATCTACATTTTTTTGAATAATGACACTTTTCATCAATTCATGAC: 3644

epidermidi: * 3660 * 3680 * 3700 * 3720
haemolytic: TCATTATTATCCATTAAAGCAAAAATCAATGATATTAGGATGGATATTTCTACTTTTTCTTAGGTTGTTACATT: 3723
TCATTATTATCCATTAAAGCAAAAATCAATGATATTAGGATGGATATTTCTACTTTTTCTTAGGTTGTTACATT: 3717

epidermidi: * 3740 * 3760 * 3780 *
haemolytic: GGCTATAATATGAAAAAATATTATCTTTCTTAGAAAAATATTTAATTTATAGTTATTATGTAACTTTAGGC: 3796
GGCTATAATATGAAAAAATATTATCTTTCTTAGAAAAATATTTAATTTATAGTTATTATGTAACTTTAGGC: 3790

epidermidi: * 3800 * 3820 * 3840 * 3860
haemolytic: CATAGTTTATTATCGCTGTTTCCGGTAGTGATTTGGAAATGTCACAGCTTTACTTATACGTTTACATT: 3869
CATAGTTTATTATCGCTGTTTCCGGTAGTGATTTGGAAATGTCACAGCTTTACTTATACGTTTACATT: 3863

epidermidi: * 3880 * 3900 * 3920 * 3940
haemolytic: ATATAATAGTGCATGTTCTTCTTATCTAGGAGTCTGATGCACTTTAAAACATATGTTATTAATAACTATT: 3942
ATATAATAGTGCATGTTCTTCTTATCTAGGAGTCTGATGCACTTTAAAACATATGTTATTAATAACTATT: 3936

```

9

```

          *      3960      *      3980      *      4000      *
epidermidi: AAAGCTATTAGTGCATTTTCCCTTTTCATTATTATTGGTGGCACCCCAATTATCTTAGATTCTCTTTTGGCTTACA: 4015
haemolytic: AAAGCTATTAGTGCATTTTCCCTTTTCATTATTATTGGTGGCACCCCAATTATCTTAGATTCTCTTTTGGCTTACA: 4009

          4020      *      4040      *      4060      *      4080
epidermidi: CCACATATTTGAAGATAATAACAATTGTTTTCTTGGCCGATTCACCTTTTAATGATTCTAGGAATTTGTATAGG: 4088
haemolytic: CCACATATTTGAAGATAATAACAATTGTTTTCTTGGCCGATTCACCTTTTAATGATTCTAGGAATTTGTATAGG: 4082

          *      4100      *      4120      *      4140      *      4160
epidermidi: CCGCGAATGATGTTAAGAGAGTTTTATATATTCAGATTGTAATTGGAAAACAACCGTACAAAGTTACAATTT: 4161
haemolytic: CCGCGAATGATGTTAAGAGAGTTTTATATATTCAGATTGTAATTGGAAAACAACCGTACAAAGTTACAATTT: 4155

          *      4180      *      4200      *      4220      *
epidermidi: GACCAATACCAGCCTAAGTGGAAATTAATAAAAAAAGTCCCTTATTCAGCTATGGCTTATGTATGTGCTTGAA: 4224
haemolytic: GACCAATACCAGCCTAAGTGGAAATTAATAAAAAAAGTCCCTTATTCAGCTATGGCTTATGTATGTGCTTGAA: 4228

          4240      *      4260      *      4280      *      4300
epidermidi: TAAGGGATTTTATCTTACTATAGTTTCACATTTATGAAAATAAATTTTTTAATAITCTGTATAAAGAGCCTAAT: 4307
haemolytic: TAAGGGATTTTATCTTACTATAGTTTCACATTTATGAAAATAAATTTTTTAATAITCTGTATAAAGAGCCTAAT: 4301

          *      4320      *      4340      *      4360      *      4380
epidermidi: AATTGAARGAAATCACCCGTGTCATGTATCTCACCTCCATCTATATAAGATTACGTTAGGTTTATACCCATATC: 4380
haemolytic: AATTGAARGAAATCACCCGTGTCATGTATCTCACCTCCATCTATATAAGAT-----: 4380

                                     10

          *      4400      *      4420      *      4440      *
epidermidi: ATTTTATTTATTGTTGATGTTAATTGTTCACTTTGTAATAATCATCAGCAGACCATGCCAAAACCTGTGC: 4458
haemolytic: -----: -

          4460      *      4480      *      4500
epidermidi: AATTCATCTCTAGTACGTTTTGTATCTGTACTGTCTTGTCTTACAAA: 4500
haemolytic: -----: -

```

Alinhamento do Operon *ica* de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*: As seqüências foram baixadas do GenBank e alinhadas utilizando o programa ClustalX. Pode-se ver em cinza o amplicon esperado pelo PCR de cada conjunto de *primer*. As regiões dos primers são marcadas em Verde (*icaA*), Amarelo (*icaC*) e Azul (*icaD*) e não apresentam diferenças entre a seqüência de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*. Conclui-se que nossos primers baseados na seqüência de *S. epidermidis* alinham com 100% de identidade com a seqüência de *S. haemolyticus*. Os códigos das seqüências utilizadas no alinhamento são DQ149646.1 para *S. epidermidis* e FJ472951.2 para *S. haemolyticus*. Podemos ver claramente que não há em nenhuma incompatibilidade na região do *primer*.

APÊNDICE B – Técnica da Microdiluição em Caldo – Vancomicina – Manuscrito 1

Utilizou-se a técnica de microdiluição em caldo de acordo com o documento M7-A6- NCCLS/CLSI 2003 para o antimicrobiano vancomicina. Para esta técnica empregaram-se placas de 96 poços onde foram distribuídos 100 µL de caldo Mueller Hinton (Himedia®) em cada poço e 20µL do antimicrobiano foi dispensado no primeiro poço, onde se obteve a concentração de 512µL/mL. Nos poços subsequentes realizaram-se diluições para a obtenção das seguintes concentrações: 256µL, 128µL, 64µL, 32µL, 16µL, 8µL, 4µL, 2µL, 1µL e 0,5µL/mL.

O inóculo bacteriano correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland foi lido em espectrofotômetro a 625 nanômetros, obtendo-se uma absorbância entre 0,08 e 0,1. Após o ajuste do inóculo, 100µL do mesmo foram dispensados em cada poço.

Após o período de incubação de 24 horas a 35 2 °C, dispensou-se em cada poço 15µL do corante 2,3,5-trifeniltetrazólio (CTT) 1% para facilitar a leitura visual da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Este corante é incolor e quando reduzido torna-se vermelho pela formação do trifenilformazam indicando que há crescimento bacteriano, a ausência de crescimento bacteriano caracteriza a CIM. O teste foi realizado em triplicata.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
Caldo MH (µL)	180	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Antimicrobiano 1024µL/mL (µL)	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diluição anterior (µL)	Retira 100 para o 2º	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100 retira 100
Inóculo (µL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Volume final (µL)	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Concentração final (µg/mL)	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25

Quadro 1 - Representação da técnica de microdiluição em caldo utilizada para a determinação da CIM do antimicrobiano vancomicina.