

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

Roberta Filipini Rampelotto

***Staphylococcus* COAGULASE NEGATIVOS ISOLADOS DE
HEMOCULTURAS DE RECÉM-NASCIDOS E EFEITO
ANTIBACTERIANO SINÉRGICO *in vitro* DE ESTATINAS COM UM
COMPOSTO TRIAZENO**

Santa Maria, RS
2019

Roberta Filipini Rampelotto

***Staphylococcus* COAGULASE NEGATIVOS ISOLADOS DE HEMOCULTURAS DE
RECÉM-NASCIDOS E EFEITO ANTIBACTERIANO SINÉRGICO *in vitro* DE
ESTATINAS COM UM COMPOSTO TRIAZENO**

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

Santa Maria, RS
2019

Rampelotto, Roberta

Staphylococcus COAGULASE NEGATIVOS ISOLADOS DE
HEMOCULTURAS DE RECÉM-NASCIDOS E EFEITO ANTIBACTERIANO
SINÉRGICO in vitro DE ESTATINAS COM UM COMPOSTO TRIAZENO
/ Roberta Rampelotto.- 2019.

198 p.; 30 cm

Orientador: Rosmari Hörner

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2019

1. Staphylococcus epidermidis 2. Sepsis neonatal 3.
Atorvastatina 4. Simvastatina 5. Triazenos I. Hörner,
Rosmari II. Título.

Roberta Filipini Rampelotto

***Staphylococcus* COAGULASE NEGATIVOS ISOLADOS DE HEMOCULTURAS DE
RECÉM-NASCIDOS E EFEITO ANTIBACTERIANO SINÉRGICO *in vitro* DE
ESTATINAS COM UM COMPOSTO TRIAZENO**

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**.

Aprovado em 16 de agosto de 2019:

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

Amanda de Souza da Motta, PhD. (UFRGS) - Parecer

Daniela Fernandes Ramos, PhD. (FURG)

Maria Miragaia, PhD. (NOVA)

Simone Ulrich Picoli, Dr^a. (FEEVALE)

Santa Maria, RS
2019

*Dedico este trabalho aos meus pais
Ana e Geraldo,
obrigada por todo amor a mim dedicado.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, a São Bento e ao meu anjo da guarda por terem permitido que eu tivesse força para chegar até aqui. “Ninguém nunca vai entender o que você sente até passar pela mesma situação”;

A minha família, especialmente aos meus pais pelo apoio incondicional. A minha mãe Ana, obrigada por me divertir e estar sempre disposta a me consolar com palavras de carinho e motivação para continuar; ao meu pai Geraldo, por me dar apoio e incentivo nesta caminhada e também por cuidar dos meus filhos de quatro patas quando estive distante;

A minha orientadora, professora Dra. Rosmari Hörner, obrigada por me acolher, me entender, me ajudar, e por ser esta pessoa maravilhosa. Sou grata por todos os ensinamentos, pela paciência em me guiar desde o trabalho de conclusão de curso, e por me fazer crescer imenso durante todo este percurso;

A professora Dra. Maria Miragaia agradeço por ter permitido a realização de um sonho que eu acreditava ser impossível, por me aceitar para fazer parte de meu doutorado no exterior, pela paciência, compreensão e por todos os ensinamentos;

Ao professor Dr. Nuno Faria, agradeço por toda a ajuda, pela disponibilidade, paciência e ensinamentos. Obrigada por todo o auxílio prestado a mim, tanto na teoria quanto na prática, dos trabalhos desenvolvidos no exterior;

Ao professor Dr. Manfredo Hörner pelo conhecimento transmitido, especialmente pelos momentos que esteve disposto a explicar a parte química, síntese dos compostos e por tornar este trabalho possível;

Aos meus primos e grandes amigos, especialmente a minha prima Bruna, obrigada por me apoiar e estar sempre ao meu lado em todos os momentos;

A minha afilhada Julinha, que compreendeu que muitas vezes não pude estar presente devido aos momentos dedicados aos estudos;

Aos meus filhos de quatro patas, Yoda e Filomena, agradeço por terem sido grandes amigos e companheiros, alegrando os meus dias;

Aos colegas e amigos do Laboratório de Bacteriologia do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Maria, em especial a “Silvaninha” por toda a ajuda disponibilizada na realização dos experimentos, risadas, brincadeiras e por estar sempre disposta a me ouvir. Agradeço também a Danielly e ao Vinicius que se tornaram grandes

amigos e que além dos trabalhos elaborados em conjunto, também me divertiram diariamente. Sem a ajuda de vocês este trabalho não poderia ser realizado;

Aos colegas do Laboratório de Evolução Bacteriana do Instituto de Tecnologia e Química António Xavier da Universidade Nova de Lisboa, agradeço pela companhia, acolhimento e por toda a ajuda disponibilizada;

A toda a equipe do Hospital Universitário de Santa Maria, especialmente os setores do arquivo, recepção, e Laboratório de Análises Clínicas;

A Universidade Federal de Santa Maria, ao programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde e ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas;

A Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Tecnologia e Química António Xavier onde eu pude vivenciar uma ótima experiência para o meu crescimento profissional;

A CAPES e ao programa de doutorado sanduiche no exterior (PDSE/CAPES) pelo suporte financeiro;

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado;

Muito obrigada a todos por esta conquista.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito”*

Martin Luther King

RESUMO

***Staphylococcus* COAGULASE NEGATIVOS ISOLADOS DE HEMOCULTURAS DE RECÉM-NASCIDOS E EFEITO ANTIBACTERIANO SINÉRGICO *in vitro* DE ESTATINAS COM UM COMPOSTO TRIAZENO**

AUTORA: Roberta Filipini Rampelotto
ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Rosmari Hörner

Infecções de corrente sanguínea (ICS) estão entre as complicações infecciosas mais frequentes e graves relacionadas às infecções neonatais, responsáveis por elevadas taxas de morbimortalidade. *Staphylococcus* coagulase negativos (SCoN) são os microrganismos mais isolados, sendo *Staphylococcus epidermidis* o prevalente. SCoN apresentam importantes fatores de virulência, como a formação de biofilme e a resistência bacteriana, demonstrando a necessidade da pesquisa por novos fármacos com atividade antibacteriana, ou até mesmo o reposicionamento de drogas. Os triazenos (TZC) e as estatinas constituem uma alternativa promissora, devido a expressiva atividade biológica. O objetivo deste estudo foi avaliar SCoN isolados de hemoculturas de recém-nascidos (RN) admitidos no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) no período de dois anos (2014; 2016/2017), além da investigação do efeito antibacteriano sinérgico *in vitro* de estatinas e de um composto TZC inédito, {[1-(4-bromofenil)-3-feniltriazenido N₃-óxido-κ² N¹, O⁴](dimetilbenzilamina-κ² C¹, N⁴)paládio(II)} (Pd(dmba)LBr), frente cepas bacterianas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) e a dez SCoN (2014). Os SCoN foram identificados e tiveram o perfil de suscetibilidade realizados através do Vitek®2, e a concentração inibitória mínima (CIM) da linezolida, tigeciclina e vancomicina efetuadas pelo método da microdiluição em caldo; assim como a atividade antibacteriana do TZC e das estatinas. Também foram avaliados alguns parâmetros clínicos dos RN e as taxas de mortalidade. A produção de biofilme (2014) foi verificada através de três metodologias fenotípicas, além da presença dos genes *icaACD*. Isolados de *S. epidermidis* (2016/2017) foram caracterizados em nível de epidemiologia molecular pela sequenciação total do genoma (WGS). Em 2014, de 131 RN, foram isolados 176 SCoN; e em 2016/2017, 79 e 120, respectivamente, sendo *S. epidermidis* o prevalente, na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTI-RN). Observou-se um aumento nos índices de resistência quando comparados os anos de 2014 e 2016/2017, destacando-se os antimicrobianos penicilina (71,26%; 99,17%) e oxacilina (76%; 84,17%). Verificou-se 100% de suscetibilidade frente a linezolida, tigeciclina e vancomicina. Em relação à significância clínica, em 2014, 53,44% dos RN foram tratados, e em 2016/2017, 78,48%, sendo a maioria dos casos relacionada ao uso de cateter. Quanto às taxas de mortalidade, 15,71% dos RN foram a óbito em 2014 e 17,74% em 2016/2017. Em relação à formação de biofilme, 30,11% mostraram os genes *icaACD* concomitantemente e 11,36% *icaAC*. Através do ágar vermelho congo (CRA), aderência ao tubo de borossilicato (TM) e técnica quantitativa da microplaca (TCP), 42,04%, 38,64% e 40,91% dos isolados produziram biofilme, respectivamente. Quando comparados ao padrão-ouro (presença dos genes), CRA e TM apresentaram baixa sensibilidade e especificidade. A TCP apresentou 99% de sensibilidade e 100% de especificidade; e pode-se inferir que a produção de biofilme está relacionada a resistência aos antimicrobianos. Dos isolados confirmados como *S. epidermidis* (2016/2017), 83,64% foram resistentes a metilicina (MRSE), estando a maioria relacionada ao *sequence type* (ST) 2, associados ao cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) III e a IVa. Em relação à atividade antibacteriana, tanto as cepas ATCC quanto os isolados clínicos apresentaram CIM ≤ 528 µg/mL frente ao TZC e as estatinas, sendo que a atividade aumentou quando o TZC foi associado à sinvastatina, mostrando sinergismo (FICI ≤ 0,5). Neste estudo, *S. epidermidis* foi o prevalente, estando associado à utilização de cateter, sendo que as taxas de resistência aumentaram com o passar dos anos, evidenciando a importância de intensificar medidas de controle e prevenção neste hospital. Ainda, os SCoN foram importantes patógenos na sepse neonatal, responsáveis por significativas taxas de mortalidade. Em relação a produção de biofilme, CRA e TM demonstraram baixa sensibilidade e especificidade quando comparados a presença dos genes, já a TCP, apesar de ser uma técnica demorada, é um método quantitativo que poderia ser utilizado para verificar a produção de biofilme em isolados clínicos. Em relação a atividade antibacteriana, o TZC quando associado a sinvastatina demonstrou sinergismo.

Palavras-chave: *Staphylococcus epidermidis*. Sepse neonatal. Atorvastatina. Sinvastatina. Triazenos.

ABSTRACT

COAGULASE-NEGATIVE STAPHYLOCOCCI ISOLATED OF NEWBORN BLOOD CULTURES AND SYNERGISTIC ANTIBACTERIAL EFFECT *in vitro* OF STATINS WITH A TRIAZENE COMPOUND

AUTHOR: Roberta Filipini Rampelotto

ADVISOR: Prof^a. Dr^a. Rosmari Hörner

Bloodstream infections (BSI) are among the most frequent and serious infectious complications related to neonatal infections, responsible for high morbidity and mortality rates. Coagulase-negative staphylococci (CoNS) are the most isolated microorganisms, being *Staphylococcus epidermidis* the prevalent. CoNS have important virulence factors, such as biofilm formation and bacterial resistance, demonstrating the need for research on new drugs with antibacterial activity, or even drug repositioning. Triazenes (TZC) and statins are a promising alternative, due to significant biological activity. The objective of this study was to evaluate CoNS isolated from blood cultures of newborns (NB) admitted in the Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) in two years (2014, 2016/2017), and also the investigation of the *in vitro* synergistic antibacterial effect of statins and an inedited TZC compound $\{[1-(4\text{-bromophenyl})\text{-}3\text{-phenyltriazene } N_3\text{-oxide-}\kappa^2 N^1, O^4](\text{dimethylbenzylamine-}\kappa^2 C^1, N^4)\text{palladium(II)}\}$ against standard American Type Culture Collection (ATCC) and ten CoNS (2014). CoNS were identified and had the susceptibility profile done through Vitek®2, and the minimum inhibitory concentration (MIC) of linezolid, tigecycline and vancomycin were determined by the broth microdilution method as well as the antibacterial activity of TZC and statins. Some clinical parameters of the newborns and the mortality rates were also evaluated. The biofilm production (2014) was verified through three phenotypic methodologies, in addition to the presence of *icaACD* genes. Isolates of *S. epidermidis* (2016/2017) were characterized in molecular epidemiology by whole genome sequencing (WGS). In 2014, of 131 NB, 176 CoNS were isolated; and in 2016/2017, 79 and 120, respectively, being *S. epidermidis* the prevalent in the Neonatal Intensive Care Unit (NICU). An increase in resistance indices was observed when compared the years 2014 and 2016/2017, especially to penicillin (71.26%, 99.17%) and oxacillin (76%, 84.17%). There was 100% susceptibility to linezolid, tigecycline and vancomycin. Regarding clinical significance, in 2014, 53.44% of the newborns were treated, and in 2016/2017, 78.48%, and the majority of cases were related to the use of a catheter. Regarding mortality rates, 15.71% of NB died in 2014 and 17.74% in 2016/2017. Regarding biofilm formation, 30.11% showed the *icaACD* genes concomitantly and 11.36% *icaAC*. Through congo red agar (CRA), adherence to the borosilicate tube (TM) and quantitative microplate technique (TCP), 42.04%, 38.64% and 40.91% of the isolates produced biofilm, respectively. When compared to the gold standard (presence of genes), CRA and TM presented low sensitivity and specificity. TCP had 99% sensitivity and 100% specificity; and it can be inferred that biofilm production is related to antimicrobial resistance. Of the isolates confirmed as *S. epidermidis* (2016/2017), 83.64% were resistant to methicillin (MRSE), most of them related to sequence type (ST) 2, associated with the staphylococcal chromosomal cassette *mec* (SCC*mec*) III and IVa. Regarding antibacterial activity, both ATCC strains and clinical isolates had MIC $\leq 528 \mu\text{g/mL}$ against TZC and statins, and the activity increased when TZC was associated with simvastatin, showing synergism (FICI ≤ 0.5). In this study, *S. epidermidis* was the prevalent, being associated with the use of catheter, and resistance rates increased over the years, evidencing the importance of intensifying control and prevention measures in this hospital. Still, CoNS were important pathogens in neonatal sepsis, responsible for significant mortality rates. In relation to biofilm production, CRA and TM showed low sensitivity and specificity when compared to the presence of the genes, whereas TCP, although a time-consuming technique, is a quantitative method that could be used to verify biofilm production in clinical isolates. In relation to antibacterial activity, TZC when associated with simvastatin demonstrated synergism.

Keywords: *Staphylococcus epidermidis*. Neonatal sepsis. Atorvastatin. Simvastatin. Triazenes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 – <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 na coloração de Gram	39
Figura 2 – Etapas da formação de biofilme	43
Figura 3 – Características genéticas dos elementos <i>SCCmec</i> do tipo I ao XIII	50
Figura 4 – Estrutura química da atorvastatina	56
Figura 5 – Estrutura química da sinvastatina.....	56
Figura 6 – Estrutura molecular do composto 1,3- <i>bis</i> (fenil)-triazeno.	57

RESULTADOS

Artigo 1

Figura 1 – Presence of genes <i>icaA</i> , <i>icaC</i> and <i>icaD</i> in CoNS samples isolated from newborn blood cultures	115
Figure 2 – Biofilm production with Congo Red Agar method (CRA) in CoNS samples isolated from newborn blood cultures, from left to right: biofilm producing samples and non biofilm producing samples.	116
Figure 3 – Biofilm production with Tube Method (TM) in CoNS samples from newborn blood cultures, from left to right: biofilm producing samples and non biofilm producing samples.....	117

Manuscrito 2

Figura 1 – Árvore filogenética representando o agrupamento com base na contagem de SNPs, demonstrando a relação dos <i>sequence types</i> (ST) dos <i>S. epidermidis</i> isolados de hemoculturas de recém-nascidos, além da evolução em relação ao aparecimento destes isolados com o decorrer do tempo	141
Figura 2 – Árvore filogenética com base na contagem de SNPs representando apenas o grupo de ST2, associados ao tipo de <i>SCCmec</i>	142
Figura 3 – Árvore filogenética com base na contagem de SNPs representando apenas o grupo de ST2, associados ao tipo de <i>ccr</i>	142

Artigo 2

Scheme 1 – Reaction scheme of the synthesis of the ligand HLBr	159
Scheme 2 – Reaction scheme of the synthesis of the complex Pd(dmba)LBr from the ligand HLBr and the complex [Pd(dmba)Cl]₂ as precursors.	160

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 – Genes presentes em <i>Staphylococcus</i> coagulase negativos e sua respectiva função nestes microrganismos	45
---	----

MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 2 – Perfil de suscetibilidade dos dez isolados de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativos (SCoN) (2014) em que foram testados atorvastatina, sinvastatina, o composto triazeno, seus ligantes e precursores	71
--	----

RESULTADOS

Manuscrito 1

Table 1 – Distribution of coagulase-negative staphylococci (CoNS) species isolated from blood cultures of newborns in 2014 and 2016/2017 in a tertiary hospital in southern Brazil	92
Table 2 – Distribution of blood cultures in which there was the isolation of coagulase-negative staphylococci (CoNS) and respective hospitalization units, in 2014 and 2016/2017, in a tertiary hospital in the southern region of Brazil	93
Table 3 – Antimicrobial susceptibility profile of the 176 and 120 coagulase-negative staphylococci (CoNS) samples isolated from blood cultures in 2014 and 2016/2017, respectively, in a tertiary hospital in the southern region of Brazil	94

Artigo 1

Table 1 – <i>Primers</i> used in the execution of PCR	118
Table 2 – Biofilm producing CoNS species (n) according to the techniques used in samples isolated from newborn blood cultures	118
Table 3 – Percentages of biofilm-forming and non-biofilm-forming* CoNS isolates from newborn blood cultures showing resistance to tested antimicrobials.....	119

Manuscrito 2

Tabela 1 – <i>Staphylococcus epidermidis</i> isolados de hemoculturas de recém-nascidos coletadas no período de um ano (2016/2017) em um hospital terciário do sul do Brasil.	138
Tabela 2 – Genes de resistência encontrados nos isolados de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	139
Tabela 3 – Genes de virulência encontrados nos isolados de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	140
Tabela 4 – Características dos isolados de <i>Staphylococcus epidermidis</i> em que os neonatos foram a óbito	140

Artigo 2

Table 1 –	Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) of ligands, precursor and complex, associated or not with statins against standard bacteria.....	161
Table 2 –	Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) of ligands, precursor and complex, associated or not with statins against CoNS..	162

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACME - *Arginine catabolic mobile element*
ASP - *Antimicrobial Stewardship Program*
ATCC - *American Type Culture Collection*
BGN-NF - Bacilos Gram-negativos não fermentadores da glicose
CCIH - Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CCS – Centro de Ciências da Saúde
CDC - *Centers for Disease Control*
CEP – Comitê de Ética e Pesquisa
CIM – Concentração Inibitória Mínima
CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*
CRA – *Congo red agar*, ágar vermelho congo
DACT – Departamento de Ciências Toxicológicas
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA - *Deoxyribonucleic acid*, ácido desoxirribonucléico
DO - Densidade ótica
FICI – *Fractional inhibitory concentration index*, índice de concentração inibitória fracionária
GN - Gram-negativos
GP - Gram-positivos
h - horas
HUSM - Hospital Universitário de Santa Maria
ICS - Infecções de corrente sanguínea
IDSA - Sociedade Americana de Doenças Infecciosas
IH – Infecções hospitalares
ITQB - Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier
LAC – Laboratório de Análises Clínicas
MDR – *Multidrug-resistant organisms*, isolados multirresistentes
min – minutos
MLST - *Multilocus sequence typing*
MRSE - *Staphylococcus epidermidis* resistentes a metilina
NOVA - Universidade Nova de Lisboa
OMS - Organização Mundial de Saúde
PBS - Tampão salina fosfato
PCR – Reação em cadeia da polimerase
Pd – Paládio
PFGE - *Pulsed field gel electrophoresis*, eletroforese em gel de campo pulsado
PGA - *Poly-γ-glutamic acid*, ácido poli-gama-DL-glutâmico
PIA – *Polysaccharide intercellular adhesin*, polissacarídeo de adesão intercelular
PSM - *Phenol-soluble modulín*
RN - Recém-nascidos
s - segundos
SCCmec - *Staphylococcal cassette chromosome mec*, Cassete cromossômico estafilocócico
mec
SCoN - *Staphylococcus coagulase negativos*
SIM - Sistema de Informações sobre Mortalidade
ST - *Sequence type*

SUS - Sistema Único de Saúde

TCP - *Quantitative microplate technique*, técnica quantitativa da microplaca

TM - *Borosilicate tube*, aderência ao tubo de borossilicato

TSA - *Trypticase soy agar* ágar triptona de soja

TSB - *Tryptic soy broth*, caldo soja tripticaseína

TZC – Triazenos

UFMS – Universidade Federal de Santa Maria

UTI - Unidade de Terapia Intensiva Adulto

UTI-RN - Unidade de Terapia Intensiva Neonatal

WGS – *Whole genome sequencing*, sequenciação total do genoma

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	24
1 INTRODUÇÃO	26
1.1 JUSTIFICATIVA	28
2 OBJETIVOS	30
2.1 OBJETIVO GERAL	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3 REVISÃO DA LITERATURA	32
3.1 SEPSE NEONATAL	32
3.1.1 Diagnóstico	34
3.1.2 Biomarcadores em sepse	35
3.1.3 Perfil etiológico	36
3.2 <i>Staphylococcus</i> COAGULASE NEGATIVOS (SCoN)	38
3.2.1 Identificação	39
3.2.2 Biofilme	41
3.2.3 Outros genes descritos em <i>Staphylococcus spp.</i>	43
3.3 PERFIL DE SUSCETIBILIDADE	45
3.4 RESISTÊNCIA BACTERIANA	46
3.4.1 Resistência à penicilina	48
3.4.2 Resistência à meticilina	48
3.4.2.1 <i>Sequence type (ST)</i>	51
3.5 SURTOS HOSPITALARES	52
3.6 TAXAS DE MORTALIDADE	53
3.7 REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS	54
3.7.1 Estatinas	55
3.8 COMPOSTOS TRIAZENOS (TZC)	56
3.8.1 Associação de triazenos (TZC) com metais	58
3.8.1.1 <i>Paládio (Pd)</i>	58
4 MATERIAIS E MÉTODOS	59
4.1 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS	59
4.2 PERFIL DE SUSCETIBILIDADE	60
4.2.1 Metodologia automatizada	60
4.2.2 Método da microdiluição em caldo	60
4.3 BIOMARCADORES EM SEPSE	61
4.3.1 Hemograma	61
4.3.2 Proteína C reativa	61
4.4 SIGNIFICÂNCIA CLÍNICA E TAXAS DE MORTALIDADE	61
4.5 TESTES FENOTÍPICOS	62
4.5.1 Ágar vermelho congo (CRA)	62
4.5.2 Aderência ao tubo de borossilicato (TM)	62
4.5.3 Técnica quantitativa da microplaca (TCP)	63
4.6 TESTES GENOTÍPICOS	64
4.6.1 Extração do ácido desoxirribonucleico (DNA)	64
4.6.2 Amplificação do 16S RNAr	64
4.6.3 Teste para detecção dos genes <i>icaA</i>, <i>icaC</i> e <i>icaD</i>	65
4.6.4 Análise dos produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR)	65
4.7 SEQUENCIAÇÃO TOTAL DO GENOMA (WGS)	66

4.7.1 Isolados bacterianos.....	66
4.7.2 Extração do ácido desoxirribonucleico (DNA).....	67
4.7.3 Quantificação do ácido desoxirribonucleico (DNA).....	67
4.7.4 Confirmação das espécies em <i>Staphylococcus epidermidis</i>	68
4.7.5 Teste genotípico para detecção do gene <i>tuf</i>	68
4.7.6 Análise dos produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR).....	68
4.7.7 Purificação do produto da PCR (Reação em cadeia da polimerase).....	69
4.7.8 Sequenciamento de Sanger.....	69
4.7.9 Diluição, quantificação e qualidade do ácido desoxirribonucleico (DNA).....	69
4.7.10 Sequenciação total do genoma (WGS).....	70
4.8 EFEITO ANTIBACTERIANO <i>in vitro</i>	70
4.8.1 Atividade antibacteriana.....	71
4.8.2 Triazenos (TZC).....	72
4.8.3 Estatinas.....	72
4.8.4 Diluição dos compostos.....	72
4.8.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	72
4.9 EFEITO ANTIBIOFILME <i>in vitro</i>	73
4.9.1 Estatinas.....	73
4.9.2 Diluição dos compostos.....	73
4.9.3 Ativação da sinvastatina.....	74
4.9.4 Atividade antibiofilme.....	74
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	75
4.11 CONCEITOS ÉTICOS.....	75
5 RESULTADOS.....	76
5.1 MANUSCRITO 1.....	77
5.2 ARTIGO 1.....	95
5.3 MANUSCRITO 2.....	120
5.4 ARTIGO 2.....	143
5.5 RESULTADOS ADICIONAIS.....	163
5.5.1 Identificação dos isolados pelo gene <i>tuf</i>	163
5.5.2 Concentração inibitória mínima (CIM) das estatinas.....	163
5.5.3 Atividade antibiofilme das estatinas frente a <i>Staphylococcus epidermidis</i>	163
6 DISCUSSÃO GERAL.....	165
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	172
REFERÊNCIAS.....	176

APRESENTAÇÃO

Esta tese de doutorado está estruturada na seguinte forma: **INTRODUÇÃO, OBJETIVOS, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO GERAL, CONSIDERAÇÕES FINAIS e REFERÊNCIAS;**

Os **RESULTADOS** foram redigidos na forma de publicações científicas, composto por dois manuscritos, dois artigos e resultados adicionais. O item **REFERÊNCIAS** refere-se somente às citações que aparecem na **INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, MATERIAIS E MÉTODOS e DISCUSSÃO GERAL.**

1 INTRODUÇÃO

Infecções hospitalares (IH) constituem um sério problema de saúde pública em todo o mundo, devido a sua frequência, morbimortalidade e custos de tratamento (ALVARES et al., 2019; HEGGENDORNN et al., 2016). As taxas de incidência destas infecções são variáveis e possuem relação com as características de cada unidade de internação dos pacientes, sendo que no Brasil há poucos dados sobre o assunto, especialmente em pacientes pediátricos (DENG et al., 2011; ROSENTHAL et al., 2016). IH nas unidades neonatais nos países desenvolvidos variam entre 8,4 a 26%, sendo que nos países em desenvolvimento possuem taxas superiores, 18,9 a 57,7%, e essa diferença provavelmente ocorre devido às condições de trabalho e estrutura física das unidades neonatais (PINHEIRO et al., 2009).

Infecções de corrente sanguínea (ICS) estão entre as complicações infecciosas mais frequentes e graves relacionadas às infecções neonatais, podendo ocasionar o prolongamento do período de hospitalização dos recém-nascidos (RN) (AGARWAL; BHAT, 2015; FJALSTAD et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2012). Segundo estimativa do Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM), aproximadamente 70% da mortalidade infantil no Brasil ocorre no período neonatal, sendo a sepse considerada uma das principais causas (DATASUS, 2017).

Globalmente, a sepse neonatal é responsável por um índice significativo de morbimortalidade, com um número estimado de mais de 400.000 mortes anuais no mundo (ARAYICI et al., 2019; FJALSTAD et al., 2016; LIU et al., 2017; YADAV et al., 2018). Assim, a sepse é responsável por um elevado número de óbitos nos RN, especialmente aqueles admitidos em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTI-RN) (AGARWAL; BHAT, 2015; FJALSTAD et al., 2016).

Nas primeiras semanas de vida ocorre a colonização microbiana na mucosa da orofaringe e na pele por *Staphylococcus* coagulase negativos (SCoN), os quais são responsáveis por cerca de 60% dos isolamentos nas ICS, sendo o *Staphylococcus epidermidis* a espécie prevalente, com índices de até 80% (CANTEY et al., 2018; DONG et al., 2018; NAMVAR et al., 2017; PEREIRA; CUNHA, 2013). Durante o período neonatal o risco de infecção por estes patógenos é maior, especialmente devido ao sistema imune imaturo do RN e também pela utilização de dispositivos invasivos (ERTUGRUL et al., 2016; HEILMANN et al., 2018).

Quando um processo infeccioso se instala na corrente sanguínea, a detecção do agente patogênico ocorre por meio da coleta de hemoculturas (ANVISA, 2017a; ARAYICI et al., 2019; KASPER; FAUCI, 2015; MEMAR et al., 2017). Para obtenção destas amostras, devem ser utilizadas técnicas padronizadas; recomenda-se que seja realizada a assepsia correta da pele, além da coleta de ao menos duas amostras por episódio infeccioso, de acessos vasculares distintos, pois devido a presença de bactérias residentes na pele, como os SCoN, a interpretação destas hemoculturas torna-se difícil, pois podem ocorrer contaminações, gerando resultados falso-positivos (ANVISA, 2017a; ARAÚJO, 2012; ARAYICI et al., 2019; MEMAR et al., 2017; MILLER et al., 2018; RHODES et al., 2017; VIANA et al., 2011). Ainda, como o quadro clínico sugestivo de sepse neonatal é de difícil diagnóstico, além da coleta das culturas de sangue é importante a utilização de biomarcadores em sepse, como o lactato e proteína C reativa, melhorando o diagnóstico e a conduta terapêutica dessas infecções (ANVISA, 2017a; DAL-PIZZOL; RITTER, 2012; TZIALLA et al., 2015; VIANA et al., 2011).

A capacidade dos SCoN se aderirem a superfícies e consequentemente a produção de biofilme são os principais fatores de virulência destes microrganismos (BATISTÃO et al., 2016; ÖCAL et al., 2017; PEDROSO et al., 2016; PUJA et al., 2015; ZALIPOUR et al., 2016). A produção de biofilme pode facilitar o desenvolvimento de infecções, provocar recidivas, comprometer o sistema imune e ocasionar falha nas opções terapêuticas (BATISTÃO et al., 2016; ÖCAL et al., 2017; PEDROSO et al., 2016; PUJA et al., 2015; ZALIPOUR et al., 2016).

Além da formação do biofilme, a resistência bacteriana aumentou drasticamente nos últimos anos, que aliada a surtos hospitalares representa uma ameaça para a saúde pública, inviabilizando o uso de diversos agentes antimicrobianos (HAGHIGHATPANAH et al., 2016; KARAM et al., 2016; MIRÓ-CANTURRI et al., 2019; THANGAMANI et al., 2015; TZIALLA et al., 2015; ZHENG et al., 2017). E apesar deste aumento, o desenvolvimento de novos antimicrobianos tem diminuído ao longo dos últimos anos (BONNET et al., 2019; KARAM et al., 2016; ZHENG et al., 2018). Assim, a busca por novos fármacos ou o redirecionamento de medicamentos com propriedade antibacteriana é uma abordagem promissora para o tratamento destas infecções (CHANG et al., 2013; SERAFIN et al., 2019; SERAFIN; HÖRNER, 2018; ZHENG et al., 2018).

Uma classe de fármacos já conhecida que tem demonstrado atividade antibacteriana frente a diversas espécies bacterianas são as estatinas, as quais são utilizadas para a redução de lipídios em pacientes com elevados níveis de colesterol (ALLA et al., 2013; KOZAROV et al., 2014; LÓPEZ-CORTÉS et al., 2013; THANGAMANI et al., 2015). Pesquisadores mostram que as estatinas possuem atividade antibacteriana frente a microrganismos, especialmente os Gram-positivos (GP), com efeito sinérgico quando associado a antimicrobianos (BERGMAN et al., 2011; GRAZIANO et al., 2015; KOZAROV et al., 2014; LÓPEZ-CORTÉS et al., 2013).

Ainda, outras substâncias que merecem destaque são os triazenos (TZC), caracterizados por conterem uma cadeia alifática constituída de três átomos de nitrogênio interligados em sequência (N=N-N), responsável por suas propriedades biológicas (BONMASSAR et al., 2013; MOORE; ROBINSON, 1986). Estes apresentam ampla versatilidade farmacológica, tais como atividade antifúngica, antileucêmica e antibacteriana, tornando-os foco de inúmeros estudos (DOMINGUES et al., 2010; HÖRNER et al., 2008; MOHAMMADI, 2014; NUNES et al., 2014; PARAGINSKI et al., 2014; TIZOTTI et al., 2016).

1.1 JUSTIFICATIVA

O Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) é um órgão integrante da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), fundado em 1970, atuando como um hospital-escola. Está localizado na cidade de Santa Maria-RS e é considerado um hospital de referência em saúde regional, integrante do sistema único de saúde (SUS), que oferece serviços para até 42 cidades vizinhas, com atendimento ambulatorial e internações em diversas especialidades. Nesse nosocômio, nosso grupo de pesquisa já relatou alguns mecanismos de resistência aos antimicrobianos, causados por diversos microrganismos, entre eles, *Staphylococcus aureus*, SCoN, família *Enterobacteriaceae* e Bacilos Gram-negativos não fermentadores da glicose (BGN-NF) (LORENZONI et al., 2018; RAMPELOTTO et al., 2015; RODRIGUES et al., 2015; SANTOS et al., 2016; SEIBERT et al., 2014; SILVA et al., 2017).

Entre estes, os SCoN são os microrganismos mais isolados nas ICS de pacientes pediátricos no HUSM, especialmente na UTI-RN, assim como em outros nosocômios,

nacionais e internacionais; sendo estas infecções responsáveis por elevados índices de morbimortalidade. A significância destes microrganismos é fortalecida por estes patógenos apresentarem importantes fatores de virulência, sendo o principal deles a formação de biofilme, que associado a resistência bacteriana, torna o tratamento destas infecções pouco eficazes, o que conduz a necessidade da pesquisa por novos medicamentos visando a atividade antibacteriana. Outra alternativa é a descoberta de novas atividades biológicas de medicamentos já utilizados na prática clínica, chamado de redirecionamento de fármacos.

Uma classe de medicamentos que têm evidenciado atividade antibacteriana são as estatinas, as quais são frequentemente utilizadas para redução do colesterol. Os TZC são compostos já estudados por nosso grupo de pesquisa, os quais têm demonstrado potencial atividade antileucêmica e antibacteriana, especialmente quando associados a metais.

A prevalência dos patógenos, o perfil de suscetibilidade, as regiões demográficas e a prestação de cuidados hospitalares podem afetar a epidemiologia das ICS, portanto, monitorar continuamente a microbiologia dos microrganismos frequentes em ICS é de extrema importância, bem como a análise em diferentes períodos, para posterior comparação. Além disso, a semelhança e características moleculares dos isolados podem auxiliar no diagnóstico precoce e preciso, diferenciando uma colonização de infecção, detectando possíveis surtos hospitalares.

Dessa forma, acredita-se que será possível conhecer a epidemiologia local, detectar possíveis surtos hospitalares, verificar se houve colonização ou infecção, minimizar a resistência bacteriana, as taxas de morbimortalidade e custos hospitalares.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar SCoN isolados de hemoculturas de RN admitidos no HUSM, além de investigar o efeito antibacteriano sinérgico *in vitro* das estatinas e de um composto TZC.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar o número de SCoN isolados no período de estudo (janeiro a dezembro de 2014 e julho de 2016 a julho de 2017), assim como a prevalência das espécies isoladas, caracterizando as respectivas unidades de internação;
- Avaliar o perfil de suscetibilidade frente aos antimicrobianos tanto em 2014 quanto em 2016/2017, utilizando metodologia automatizada Vitek®2, assim como determinar a concentração inibitória mínima (CIM) frente à linezolida, tigeciclina e vancomicina através da metodologia da microdiluição em caldo para posterior comparação;
- Comparar o perfil de suscetibilidade das amostras de SCoN nos diferentes anos de estudo;
- Avaliar os biomarcadores em sepse hemograma e proteína C reativa dos RN em que houve isolamento de SCoN (2014 e 2016/2017);
- Analisar a significância clínica dos SCoN, bem como a investigação das taxas de mortalidade dos RN nos diferentes anos de estudo;
- Determinar fenotipicamente e genotipicamente (*icaACD*) a presença da formação de biofilme nos isolados de 2014;
- Confirmar a espécie dos isolados de *S. epidermidis* (2016/2017) através da presença do gene *tuf* e sequenciamento de Sanger;
- Caracterizar a epidemiologia molecular dos *S. epidermidis* (2016/2017);
- Determinar o *sequence type* (ST) e o tipo de elemento cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) dos *S. epidermidis* (2016/2017) pelo *whole genome sequencing* (sequenciação total do genoma (WGS));
- Verificar através da WGS a presença dos genes que conferem resistência ao ácido fusídico (*fusB*), aos aminoglicosídeos (*aac(6')-aph(2'')*), *aad(6)*, *aadD*, *ant(6)-Ia*,

ant(4')-Ib, *ant(9)*-Ia e *aph(3')*-III), penicilina (PC1*blaZ*, *blaZ*(133), *blaZ*(138), *blaZ*(29), *blaZ*(49) e *blaZ*(78)), a meticilina (*mecA*), ao cloranfenicol (*cat*(pC221)), a fosfomicina (*fosB*(3) e *fosB*(4)), aos macrolídeos (*erm*(A), *erm*(C), *mph*(C)), as estreptograminas (*vat*(B), *vga*(A) e *vga*(B)), as lincosamidas (*lnu*(A)), aos os macrolídeos, estreptograminas e lincosamidas (*msr*(A)), as tetraciclina (*tet*(33) e *tet*(K)) e a trimetoprima (*dfrC* e *dfrG*) nos *S. epidermidis* (2016/2017);

- Detectar pela WGS determinados fatores de virulência nos *S. epidermidis* (2016/2017): aumento da capacidade em colonizar a pele e mucosas (ACME); produção de toxinas (*psm_mec*, *psm_beta*, *psm_alpha*, *h1D*); proteção, sobrevivência e persistência das infecções (*capA*); presença de proteases, exoenzimas e proteínas extracelulares (*gehC*, *gehD*, *sspA*, *sspB*); resistência a peptídeos (*graR*, *dltB*, *mprF*); produção de biofilme (*icaA*, *aap*, *embp* e *altE*); e proteínas de superfície (*sdrF*, *sdrG*, *sdrH*);
- Avaliar o efeito antibacteriano sinérgico *in vitro* da atorvastatina e sinvastatina, e de um composto TZC inédito, {[1-(4-bromofenil)-3-feniltriazenido N₃-óxido-κ² N¹, O⁴](dimetilbenzilamina-κ² C¹, N⁴)paládio(II)} (Pd(dmba)LBr), seus ligantes dimetilbenzilamina (dmba), 1-fenil-3-(4-bromofenil)triazeno N1-hidróxido (HLBr) e precursor ([Pd(dmba)(μ-Cl)]₂) frente a cepas *American Type Culture Collection* (ATCC) e a dez isolados clínicos de SCoN (2014);
- Avaliar através da CIM a atividade antibacteriana da atorvastatina e sinvastatina frente aos SCoN isolados em 2014 e 2016/2017;
- Investigar a ação antibiofilme da atorvastatina e sinvastatina em *S. epidermidis* isolados de infecção e colonização de diferentes espécimes clínicos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 SEPSE NEONATAL

O sangue circulante é estéril, mas na presença de doenças infecciosas pode ocorrer o aparecimento de microrganismos na corrente sanguínea, caracterizando assim uma ICS (ARAÚJO, 2012; FERNANDES et al., 2011). Estas infecções, especialmente no período neonatal são caracterizadas por sinais e sintomas inespecíficos. De acordo com o Consenso Internacional da Sepse Pediátrica, a sepse consiste em uma resposta inflamatória sistêmica a uma infecção. Esta pode ser causada por bactérias, fungos ou vírus e ocorre quando o microrganismo circulante no sangue multiplica-se numa taxa que excede a eliminação pelos fagócitos, resultando de uma complexa interação entre o microrganismo infectante e a resposta imune do hospedeiro, sendo de etiologia e níveis de comprometimentos bem variados (GOLDSTEIN et al., 2005; HOTCHKISS; KARL, 2003; PINHEIRO, 2008; RUSSEL, 2006; SHANE et al., 2017; WYNN et al., 2014; WYNN, 2016).

A sepse neonatal é responsável por um elevado índice de morbimortalidade, além de representar uma das mais significativas complicações, podendo prolongar o período de hospitalização e aumentar os custos com o tratamento (AGARWAL; BHAT, 2015; ARAYICI et al., 2019; FJALSTAD et al., 2016; LIU et al., 2017; YADAV et al., 2018). Sua incidência varia de acordo com as diversas regiões geográficas, refletindo as diferenças em recursos, fatores de risco maternos e infantis e estratégias de prevenção, sendo que representa uma das doenças neonatais mais comuns, mesmo em países com elevados índices de desenvolvimento (SHANE et al., 2017).

Entre os fatores que aumentam a probabilidade de infecção nos RN estão os fatores que a mãe apresenta, como parto prematuro, ruptura prolongada da membrana e infecção urinária; fatores do próprio RN, como prematuridade, baixo peso ao nascer e defeitos congênitos; e fatores ambientais como hospitalização prolongada e uso de dispositivos invasivos (MARTINS, 2001; SHANE et al., 2017). Em sua maioria, as infecções ocorrem através da transmissão dos pais/acompanhantes e da equipe médica para o RN (REMINGTON et al., 2011).

Os RN, que estão iniciando o desenvolvimento de seu sistema de defesa, associados ao ambiente hospitalar, tornam-se mais suscetíveis a manifestar ICS, as quais são mais

frequentes e normalmente mais severas do que em qualquer outra época da vida (ANVISA, 2017a; VIANA et al., 2011). Logo após o nascimento, os RN começam a ser colonizados por SCoN, aumentando os riscos de infecções por estes patógenos, especialmente àqueles que se expõe a procedimentos invasivos na pele e mucosas (HEALY et al., 2013; HORNIK et al., 2012; SHANE et al., 2017).

A sepse neonatal pode ser classificada como precoce e tardia. Percebe-se que há divergência na literatura no que se refere ao número de dias que separam um quadro do outro. Alguns autores consideram que a sepse precoce acomete os RN nas primeiras 48 h, e outros em até 72 h. Já a sepse tardia ocorre após 48 h, 72 h ou até mesmo sete dias após o nascimento. Assim, é consenso que se a sepse se manifestar nas primeiras 48 h, será considerada precoce, e após sete dias, tardia (BENTLIN et al., 2015; CAMACHO-GONZALEZ et al., 2013; ENGEL et al., 2016; REMINGTON et al., 2011; SHANE et al., 2017; SHANE; STOLL, 2014). Entretanto, se sabe que a infecção ocorre por motivos diferentes: a primeira está relacionada a fatores de risco maternos, já que os patógenos estão presentes no canal do parto, entre eles estreptococos do grupo B e *Escherichia coli*. Já a segunda, que é a mais frequente, está associada aos RN admitidos na UTI-RN, onde os microrganismos envolvidos têm origem hospitalar, causada especialmente por cocos GP, bactérias GN e fungos (BENTLIN et al., 2015; CAMACHO-GONZALEZ et al., 2013; ENGEL et al., 2016; REMINGTON et al., 2011; SHANE et al., 2017; SHANE; STOLL, 2014).

O quadro clínico sugestivo de sepse neonatal, como sinais e sintomas, é de difícil diagnóstico, podendo ser confundido com outras patologias próprias dessa idade (ANVISA, 2017a; DAL-PIZZOL; RITTER, 2012; TZIALLA et al., 2015). Dessa forma, é importante a avaliação clínica e o apoio laboratorial, incluindo a coleta de hemoculturas, bem como a utilização de biomarcadores em sepse, melhorando o diagnóstico e a conduta terapêutica dessas infecções, além de facilitar o início precoce do tratamento antibacteriano (ANVISA, 2017a; CALDAS et al. 2008; DAL-PIZZOL; RITTER, 2012; MILLER et al., 2018; VIANA et al., 2011).

3.1.1 Diagnóstico

Quando um processo infeccioso se instala na corrente sanguínea, a detecção do agente patogênico deve ser realizada no início do quadro, evitando que o RN evolua para o choque séptico e óbito (AGARWAL; BHAT, 2015; DIAMENT et al., 2011). A identificação precisa da sepse neonatal é um desafio, já que os sinais e sintomas não são específicos, podendo ser confundidos com outras patologias da própria idade e estar relacionados a etiologias não infecciosas (ANVISA, 2017a; ARAYICI et al., 2019; HOOVEN; POLIN, 2018; MEMAR et al., 2017).

A hemocultura é considerada o padrão-ouro para identificação da sepse. Seu resultado possibilita a identificação do agente etiológico envolvido e contribui para a determinação da conduta terapêutica específica (ANVISA, 2017a; ARAYICI et al., 2019; KASPER; FAUCI, 2015; MEMAR et al., 2017; MILLER et al., 2018; SHANE et al., 2017). Porém, a hemocultura possui algumas limitações para o diagnóstico precoce, como o tempo de positividade, levando entre 48 a 72 horas (h), podendo ser influenciada pelo volume de sangue, administração de antimicrobianos, entre outros fatores (ARAYICI et al., 2019; MEMAR et al., 2017; MILLER et al., 2018). Assim, além das manifestações clínicas que o RN apresenta, devem-se levar em conta outros exames laboratoriais para confirmação (ARAYICI et al., 2019; BENTLIN et al., 2015; ESCHBORN; WEITKAMP, 2019; MEMAR et al., 2017; WALKER et al., 2019).

Ainda, devido a presença de bactérias residentes na pele, como os SCoN, a interpretação de hemoculturas em RN se torna difícil, pois podem ocorrer contaminações durante a coleta, gerando resultados falso-positivos (VIANA et al., 2011). Por este motivo, torna-se importante que sejam adotados alguns cuidados durante a coleta, como a coleta de duas hemoculturas de sítios diferentes, com assepsia validada pela Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH), com volume entre 1 a 3 mL, sendo realizada antes do início da antibioticoterapia ou anterior a administração da próxima dose. Quando o RN fizer uso de cateter central, uma amostra poderá ser coletada através do dispositivo e a outra de punção periférica (ANVISA, 2017a; HEALY et al., 2013; RHODES et al., 2017).

Para que uma infecção seja definida como sepse, no caso do isolamento de microrganismos presentes na pele, o RN deve apresentar pelo menos um dos sinais e sintomas sem outra causa não reconhecida: instabilidade térmica, bradicardia, apneia, intolerância

alimentar, piora do desconforto respiratório, intolerância à glicose, instabilidade hemodinâmica e hipoatividade/letargia, além do isolamento em pelo menos duas hemoculturas isoladas de sítios diferentes, com intervalo máximo de 48 h entre as coletas; ou a presença do microrganismo em uma hemocultura periférica daqueles RN que utilizam cateter vascular central. Nos dois casos, para que o isolado seja considerado como o agente da infecção, o tempo de positividade da hemocultura deve ser menor do que 48h (ANVISA, 2017a; HEALY et al., 2013; RHODES et al., 2017).

Quando os SCoN se desenvolvem em apenas uma amostra de cultura de sangue periférico, dentro de 48h, estima-se que aproximadamente 6% sejam contaminantes. Caso ocorra o crescimento dessas bactérias em duas amostras ou mais, a probabilidade de contaminação é de menos de 0,01%. Portanto, a coleta de mais de uma amostra deve ser incentivada, juntamente da avaliação clínica do paciente (ANVISA, 2017a; DIAMENT et al., 2011).

3.1.2 Biomarcadores em sepse

A utilização de marcadores de sepse permite a determinação precisa do seu diagnóstico, além da sua caracterização adequada, facilitando o início precoce do tratamento antibacteriano e melhorando o prognóstico dos neonatos (ARAYICI et al., 2019; DALPIZZOL; RITTER, 2012; MEMAR et al., 2017). Entre estes biomarcadores podemos citar a proteína C reativa, o lactato e a procalcitonina, os quais, durante a Conferência Internacional sobre definições de sepse em 2001, foram inseridos como marcadores para complementar o diagnóstico das infecções bacterianas (DE AZEVEDO et al., 2012; DELLINGER et al., 2013; LONDOÑO et al., 2014; VINCENT et al., 2011).

A proteína C reativa é uma proteína sintetizada pelo fígado e liberada rapidamente após o início de um processo inflamatório, e vem sendo utilizada para monitorar doenças inflamatórias e infecciosas (LOBO, 2012; ORATI et al., 2013; PERRONE et al., 2017). Este biomarcador quando utilizado para o prognóstico da sepse possui baixa especificidade, uma vez que seus níveis podem encontrar-se elevados em outros processos inflamatórios (LEVY et al., 2003; PERRONE et al., 2017; VINCENT et al., 2011).

O lactato é considerado um importante biomarcador em pacientes com sepse, sendo que o seu aumento instantâneo é uma consequência, entre outras causas, da hipoperfusão dos

tecidos, e ocorre proporcionalmente a gravidade do choque (LONDOÑO et al., 2014; MIKKELSEN et al., 2009). Ainda, estudos sugerem que sempre que houver suspeita de sepse seja realizada a avaliação inicial do lactato com fins prognósticos (ANVISA, 2017a; DELLINGER et al., 2013; JANSEN et al., 2008; MIKKELSEN et al., 2009).

Outro biomarcador bastante específico para as infecções bacterianas é a procalcitonina (pró-hormônio da calcitonina), que se apresenta em concentrações muito baixas em indivíduos saudáveis e seus níveis aumentam significativamente na sepse bacteriana, especialmente no choque séptico (DE AZEVEDO et al., 2012; LEE, 2013; MEISNER, 2014; WACKER et al., 2013). A procalcitonina aparece 2 a 4 h após o início da sepse, apresentando valores acima de 3 ng/mL, enquanto no choque séptico os valores são superiores a 100 ng/mL, sendo que em indivíduos saudáveis seus níveis são indetectáveis (DE AZEVEDO et al., 2012; MEISNER, 2014; VAN DEN BERGHE et al., 2001). Este biomarcador também pode ser utilizado com fins de prognóstico, pois a observação dos valores dosados 24 e 48 h após o início do tratamento prediz o desfecho de pacientes com sepse grave ou choque séptico, permitindo assim intervenções e alterações de conduta durante o tratamento (DE AZEVEDO et al., 2012; MEISNER, 2014; VAN DEN BERGHE et al., 2001).

Além disto, buscando melhorar o diagnóstico, o hemograma também deve ser considerado para avaliação da sepse neonatal. Rodwell et al. (1988) desenvolveram um escore hematológico para RN, porém o mesmo não identifica todos aqueles pacientes com ICS. Os critérios são que os RN apresentem leucocitose ou leucopenia, $\geq 25.000/\text{mm}^3$ ao nascimento ou $\geq 30.000/\text{mm}^3$ entre 12 e 24 h, ou acima de $21.000/\text{mm}^3 \geq 48$ h, ou $\leq 5.000/\text{mm}^3$; neutrofilia ou neutropenia; elevação dos neutrófilos imaturos; índice neutrofílico aumentado; razão dos neutrófilos imaturos sobre os segmentados $\geq 0,3/\text{mm}^3$; alterações degenerativas nos neutrófilos com vacuolização e granulação tóxica; e plaquetopenia ($<150.000/\text{mm}^3$).

3.1.3 Perfil etiológico

Dados do *National Healthcare Safety Network* mostraram que na última década ocorreu uma mudança no que se refere às bactérias mais isoladas na sepse, e entre os agentes identificados em hemoculturas, a maioria são microrganismos GP, seguidos dos Gram-negativos (GN) (DELLINGER et al., 2013; SIEVERT et al., 2013). Entre os GP, destacam-se

os *S. aureus*, SCoN e *Enterococcus* spp. (PUJA et al., 2015; SIEVERT et al., 2013; VIANA et al., 2011).

Um estudo realizado por Viana et al. (2011), que avaliou hemoculturas de RN em um hospital da rede privada em Campina Grande (Paraíba), demonstrou o predomínio de bactérias GP, destacando-se *S. epidermidis* (60%), *S. aureus* (20%) e *Enterococcus* spp. (6,7%). Já entre as GN, *Pseudomonas aeruginosa* (6,7%) e *Klebsiella* spp. (6,7%) foram as prevalentes.

Os SCoN estão entre os principais agentes de infecção no período neonatal, no qual o *S. epidermidis* é isolado em 50% a 80% dos casos (CANTEY et al., 2018; DONG et al., 2018; NAMVAR et al., 2017). SCoN, especialmente *S. epidermidis* estão presentes na pele, assim, é possível que ocorra a migração destes microrganismos para a corrente sanguínea, que pode ser facilitada pelo uso de dispositivos invasivos (AKU et al., 2018; BERLAK et al., 2018; SHANE et al., 2017).

Uma pesquisa realizada por nosso grupo de estudo, no qual foram avaliadas hemoculturas coletadas no período de um ano (2014) de todos os pacientes admitidos no HUSM, a pediatria e a UTI-RN foram as unidades onde ocorreram o maior número de isolamentos, sendo os SCoN os prevalentes (RAMPELOTTO et al., 2015). Em relação as espécies, foi verificado o predomínio de *S. epidermidis* (24%), seguido de 6,8% de *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus hominis* (RAMPELOTTO et al., 2015).

Oliveira e Cunha (2010) ao analisarem SCoN de amostras clínicas de RN e de fossas nasais de pessoas saudáveis encontraram o *S. epidermidis* como a espécie prevalente (81%), seguido de *Staphylococcus cohnii* (4%), *Staphylococcus saprophyticus* (4%), *Staphylococcus warneri* (4%), entre outros. Ehlersson et al. (2017), avaliaram SCoN em hemoculturas de pacientes neonatais no Hospital da Universidade de Örebro, Suécia, entre 1987 a 2014, e identificaram *S. epidermidis* como o microrganismo predominante (67,4%), seguido de *S. haemolyticus* (10,5%) e *Staphylococcus capitis* (9,6%). Dong et al. (2017), avaliaram 96 casos de sepse neonatal na UTI-RN de um Hospital na China entre janeiro/2010 a agosto/2014, e demonstraram que em 70,10% das hemoculturas ocorreu o desenvolvimento de SCoN, entre os quais, *S. epidermidis* foi responsável por 44,3% dos casos, seguido de *S. haemolyticus* (14,4%) e *S. hominis* (8,2%). Ertugrul et al. (2016) realizaram um estudo com hemoculturas na UTI-RN em um hospital na Turquia e SCoN também foram os prevalentes, 34,07%, sendo *S. epidermidis* (60,87%) o mais isolado.

3.2 *Staphylococcus* COAGULASE NEGATIVOS (SCoN)

Staphylococcus spp. caracterizam-se por serem cocos GP que medem de 0,5 a 1,5 μm de diâmetro e apresentam-se isolados ou em arranjos irregulares, lembrando cachos de uva (Figura 1); são imóveis, não formadores de esporos, geralmente catalase positivos, anaeróbios facultativos e não possuem cápsula (EUZÉBY, 2013; GARRITY et al., 2001; MURRAY et al., 2009; VUONG; OTTO, 2002). São microrganismos capazes de causar graves infecções, principalmente em pacientes com o sistema imune debilitado, e atuam como reservatórios de diversos genes de virulência podendo piorar quadros clínicos, dificultando a resposta imune do hospedeiro e prolongando o período de hospitalização (RIBOLI, 2018). Este gênero pode ser classificado em dois grupos de acordo com a capacidade de sintetizar a enzima coagulase: *Staphylococcus* coagulase positivos, no qual *S. aureus* é o principal representante; e SCoN, representado principalmente pelo *S. epidermidis* (EUZÉBY, 2013; MURRAY et al., 2009; VUONG, OTTO, 2002).

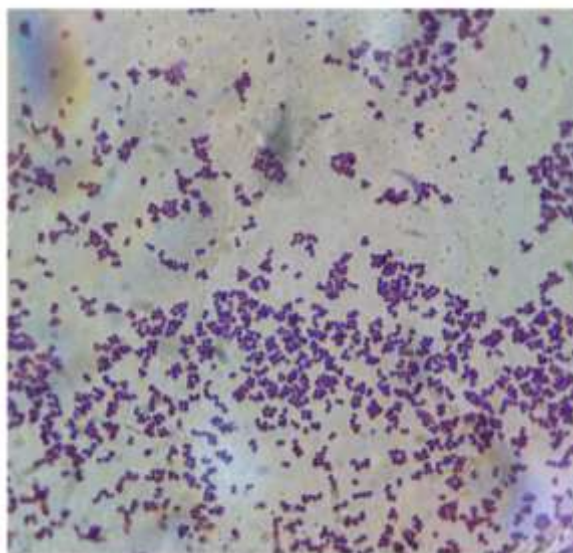
Os SCoN estão presentes na microbiota normal da pele, considerados colonizadores primários e estão entre os patógenos mais isolados nas ICS (BECKER et al., 2014; MARTÍNEZ-MELÉNDEZ et al., 2016; MITT et al., 2014; OLIVEIRA; CUNHA, 2010; PEDROSO et al., 2016). Dentre as espécies mais comuns envolvidas nestas infecções estão *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. lugdunensis*, *S. saprophyticus* e *S. cohnii* (EUZÉBY, 2013; SILVA et al., 2006; VUONG; OTTO, 2002). *S. epidermidis* é o mais frequente, destacando-se por ser o prevalente na microbiota da pele, podendo migrar para a corrente sanguínea (ERTUGRUL et al., 2016; HEILMANN et al., 2018; RESENDE et al., 2015).

Antigamente, estas bactérias eram consideradas contaminantes, porém, com o avanço da medicina, a expectativa de vida da população cresceu, juntamente com o número de doenças debilitantes, tornando o homem um hospedeiro vulnerável a desenvolver infecções por estes microrganismos (DE OLIVEIRA, 2013; OTTO, 2009; PAZZINI, 2010; RIBOLI, 2018). Assim, com o passar do tempo, tornaram-se agentes oportunistas e passaram a ter um significado importante como agentes etiológicos nas IH, capazes de causar septicemia em pacientes com o sistema imune debilitado (LAZZAROTTO, 2010; OTTO, 2009; SHANE et al., 2017; VIANA et al., 2011). Os RN, que possuem o sistema imune imaturo e a pele mais

finas, estão mais propensos a adquirirem infecções por estes patógenos, especialmente os prematuros (RESENDE et al., 2015; SHANE et al., 2017).

O fato dos SCoN apresentarem significantes fatores de virulência e tendo em vista sua capacidade de transferência de genes, cepas endêmicas podem permanecer por décadas no ambiente hospitalar, disseminadas, inclusive, entre diversos países. Estes achados reforçam a importância do conhecimento da epidemiologia das infecções por estes microrganismos, para que haja o controle da sua disseminação (RIBOLI, 2018).

Figura 1 - *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 na coloração de Gram.



Fonte: (URIBE-ALVAREZ et al., 2015).

3.2.1 Identificação

A identificação da espécie dos microrganismos é baseada em uma variedade de características fenotípicas, geralmente realizada através de testes bioquímicos convencionais. Atualmente, métodos automatizados são empregados para identificação de espécies e para a realização do perfil de suscetibilidade, principalmente devido ao elevado número de amostras que são enviados aos laboratórios clínicos (PRASAD et al., 2012; VANDAMME, 2011).

Estes métodos utilizam placas de microtitulação ou painéis em forma de cartões, os quais são inseridos no aparelho e ficam incubados a 35 ± 37 °C por um período inferior a 5 h.

Durante esse processo, ocorre o crescimento dos microrganismos e a identificação é realizada através de substratos cromogênicos ou fluorogênicos através de um sistema ótico automatizado. Após, o aparelho gera um perfil bioquímico, e compara o isolado em análise com dados armazenados no sistema, os quais são baseados em cepas padrões de referência; sendo que uma classificação de confiança em porcentagem é atribuída para a identificação do microrganismo (PRASAD et al., 2012; VANDAMME, 2011).

Entre os sistemas automatizados estão o VITEK®2-bioMérieux, França, Sistema automatizado Phoenix (BectonDickinson Diagnostic Systems, EUA) e Microscan (Siemens Healthcare, Alemanha) (JIN et al., 2011; ROBERTS, 2014). Jin et al. (2011) compararam estes três aparelhos de identificação, utilizando o gene *tuf* como referência, em microrganismos GP, e a melhor identificação das espécies ocorreu pelo VITEK®2-bioMérieux (100%), seguido do Phoenix (96%) e do Microscan (81,5%); sendo que a precisão através destas metodologias pode variar devido a dependência da expressão fenotípica, a qualidade e o tamanho do banco de dados.

Paim et al (2014) avaliaram o desempenho do VITEK®2-bioMérieux na identificação de cocos GP e evidenciaram que este sistema identificou corretamente 77,9% e 97,1% dos isolados em níveis de espécie e gênero, respectivamente. Deste modo, apesar dos aparelhos automatizados facilitarem o fluxo de trabalho e fornecerem resultados mais rápidos do que métodos convencionais, eles podem conferir problemas na identificação dos microrganismos (D'AZEVEDO et al., 2009).

Ainda, sistemas de identificação como o MALDI-TOF utilizam a espectrometria de massa; o qual se baseia em métodos de ionização e detecção biomolecular que realizam a identificação bacteriana através da análise de perfil de proteínas bacterianas em vez de diferenciação física, bioquímica e metabólica (SANTOS et al., 2013). Métodos moleculares também são empregados para identificação de microrganismos, como a amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e o sequenciamento de genes, permitindo a identificação genética em nível de gênero e de espécie (FEIL, 2015; THOMAS; ROBINSON, 2014).

Outra técnica utilizada para identificação de bactérias é a WGS, que se baseia em leituras de sequências que estão alinhadas com bancos de dados de sequencias genômicas, fornecendo informações genéticas máximas sobre um microrganismo. No entanto, seu uso é limitado, pois é um método laborioso, demorado e possui elevado custo, não sendo viável seu

uso na rotina laboratorial; porém, é uma técnica extremamente importante em estudos de estrutura populacional e epidemiologia (FEIL, 2015; THOMAS; ROBINSON, 2014).

3.2.2 Biofilme

Staphylococcus spp. estão entre os principais patógenos associados aos cuidados de saúde e ao uso de dispositivos médicos invasivos, e apresentam importantes fatores de virulência, sendo que seu principal mecanismo patogênico é a formação de biofilme (ARCIOLA et al., 2015; BATISTÃO et al., 2016; JIANG et al., 2019; ÖCAL et al., 2017; OLIVEIRA; CUNHA, 2010; PEDROSO et al., 2016; PINHEIRO et al., 2016a; PUJA et al., 2015). O biofilme é uma associação de bactérias aderidas sobre uma superfície, organizada em multicamadas finas, envolvidas por uma matriz polimérica, produzida pelo próprio microrganismo (FEY; OLSON, 2010; ROHDE et al., 2010). Também podem ter como componentes principais, além dos polissacarídeos, DNA extracelular (eDNA) e proteínas (CHRISTNER et al., 2012).

Este fator de virulência pode facilitar o desenvolvimento das infecções, comprometer o sistema imune, ocasionar a falha nas opções terapêuticas, provocar infecções recidivantes e possibilitar o surgimento de *Multidrug-resistant organisms* (isolados multirresistentes (MDR)) (BATISTÃO et al., 2016; ÖCAL et al., 2017; OLIVEIRA; CUNHA, 2010; PEDROSO et al., 2016; PUJA et al., 2015; ZALIPOUR et al., 2016). Sua ocorrência associada a resistência antimicrobiana é um mecanismo importante para a sobrevivência de bactérias, representando um desafio na prática clínica (BATISTÃO et al., 2016; ÖCAL et al., 2017; OLIVEIRA; CUNHA, 2010; PEDROSO et al., 2016; ZALIPOUR et al., 2016).

Microrganismos produtores de biofilme quando comparados aos não produtores geralmente demonstram maior resistência aos antimicrobianos. Entre os fatores que contribuem para este fato estão a penetração limitada dos antimicrobianos, que acabam não atingindo a bactéria; além da presença dos genes formadores de biofilme, sendo que em bactérias produtoras deste fator de virulência a resistência aos antimicrobianos pode ser até mil vezes maior quando comparado aos isolados não produtores (DRENKARD, 2003; HASSAN et al., 2011; PLOUFFE, 2000; SAUER et al., 2002; WHITELEY et al., 2001).

Estudos sugerem que a produção de biofilme é um processo complexo e multifatorial, sendo composta por três fatores específicos: aderência, acumulação/maturação e

desprendimento (Figura 2), os quais ocorrem em três etapas de formação: adesão das bactérias a um biomaterial ou superfície artificial; acumulação e maturação através da formação de um *slime* extracelular; e expansão da comunidade bacteriana (ARCIOLA et al., 2015; OTTO, 2013; PEDROSO et al., 2016; ROHDE et al., 2010).

O componente principal para formação deste fator de virulência em *Staphylococcus* spp. é o polissacarídeo de adesão intercelular (PIA), composto por um polímero beta1,6-N-acetilglucosamina sintetizado por uma enzima N-acetilglucosamina transferase, que permite a aderência entre as bactérias (FEY; OLSON, 2010; ÖCAL et al., 2017; ROHDE et al., 2010; SOLATI et al., 2015). Este é mediado por produtos do gene cromossomal *ica* (*intercelular adhesion*) arranjados em uma estrutura *operon*, o qual possui quatro genes de biossíntese (*icaABCD*) e um gene regulatório *icaR* (ARCIOLA et al., 2015; FEY; OLSON, 2010; LAZZAROTTO, 2010; ÖCAL et al., 2017; OLIVEIRA; CUNHA, 2010; ROHDE et al., 2010).

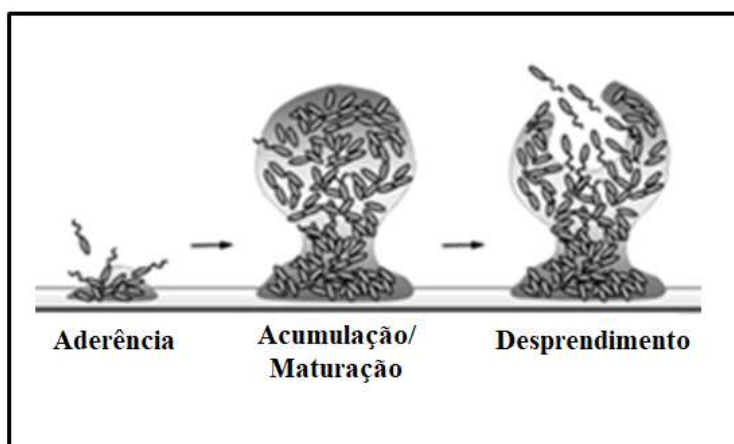
O gene *icaA* é o primeiro a ser transcrito, induzindo pouca atividade enzimática; o *icaD* favorece a formação do PIA e maiores quantidades são produzidas na presença do gene *icaC*; já o *icaB* participa como um catalizador da diacetilação do polissacarídeo. Quando presentes concomitantemente *icaAD* ou *icaACD* há um aumento na formação do biofilme. Assim, os genes *icaA* e *icaD* são essenciais para a produção do PIA, e os genes *icaC* e *icaB* auxiliam sua produção, estando envolvidos na biossíntese deste polissacarídeo (ARCIOLA et al., 2015; CAFISO et al., 2004; FEY; OLSON, 2010; MATHUR et al., 2006; O’GARA, 2007; OTTO, 2008).

Sabe-se que a produção de biofilme também pode ser induzida através de uma adesão protéica mediada por proteínas de superfície como a *Bap* (Proteína associada ao biofilme) e sua proteína homóloga *Bhp*, *Aap* (Proteína associada a acumulação), *Embp* (Proteína de ligação extracelular da matriz), mecanismos de aderência e acumulação celulares independentes do *operon ica* (CHRISTNER et al., 2010; O’GARA, 2007; TORMO et al., 2005; VON EIFF et al. 2002; WANG et al., 2008). Ainda, alguns estudos mostram que o gene *atlE*, o eDNA, e ácidos teicóicos (*tagF*) também contribuem para a formação deste mecanismo de virulência (CHRISTNER et al., 2012; HEILMANN et al., 1996; SADOVSKAYA et al., 2005; OTTO, 2014).

Alguns métodos vêm sendo analisados para detecção de biofilme, entre eles destacam-se a técnica quantitativa da microplaca (TCP), método de aderência em tubo de borossilicato

(TM), cultura em ágar vermelho congo (CRA), ensaios bioluminescentes, exames microscópicos fluorescentes, e a verificação da presença dos genes formadores de biofilme através da técnica da PCR (HASSAN et al., 2011; OLIVEIRA; CUNHA, 2010). Em relação aos genes, sabe-se que, mesmo na sua presença, o isolado pode não formar biofilme *in vitro*, e isto ocorre devido a não expressão desses genes. Por outro lado, alguns isolados podem produzir biofilme, mesmo na ausência dos genes formadores de biofilme (RAMPELOTTO et al., 2018a).

Figura 2 - Etapas da formação de biofilme.



Fonte: Adaptado de <http://www.usp.br/agen/?p=226558>. Acesso em: 29/06/2019.

3.2.3 Outros genes descritos em *Staphylococcus* spp.

Além da formação do biofilme, outros genes de virulência já foram descritos em *Staphylococcus* spp. (CHEUNG et al., 2014; LEE et al., 2016). Sabe-se que o genoma completo do *S. epidermidis* compreende entre 2558 a 2653 genes e o genoma varia em tamanho de aproximadamente 2,5 a 2,8 milhões de pares de bases (Mb) (GILL et al., 2005; LEE et al., 2016; ZHANG et al., 2003). Duas cepas padrão de referência já foram totalmente sequenciadas com a intenção de mostrar os fatores de virulência presentes (GILL et al., 2005; ZHANG et al., 2003). Zhang et al. (2003) sequenciaram o *S. epidermidis* ATCC 12228, que mostrou aproximadamente 2,5 Mb, com a escassez de genes da toxina estafilocócica conhecidos; e Gill et al. (2005) sequenciaram o *S. epidermidis* ATCC 35984, conhecido como RP62A, cepa produtora de biofilme, e detectaram um genoma de aproximadamente 2,6 Mb.

O “*arginine catabolic mobile element*” (ACME), frequentemente encontrado em *S. epidermidis* é um *operon* que está ligado ao aumento da capacidade desta espécie em colonizar a pele e mucosas; sendo que contém dois conjuntos de genes, *arc* e *opp-3*, determinantes de virulência em microrganismos (DIEP et al., 2006; DU et al., 2013; GRANSLO et al., 2010; HELLMARK et al., 2013a; MIRAGAIA et al., 2009; TOLO et al., 2016). O ácido poli-gama-DL-glutâmico (PGA) e o *capA*, também está presente nos *Staphylococcus* spp., e contribui para a proteção, sobrevivência e persistência das infecções (KOCIANOVA et al., 2005).

As toxinas que estes microrganismos são capazes de produzir constituem um importante fator de virulência, e em *S. epidermidis* ocorrem especialmente devido a um grupo de peptídeos chamado *phenol-soluble modulins* (PSM) (CHEUNG et al., 2014; GILL et al., 2005; ZHANG et al., 2003). Os PSM produzidos por esta espécie incluem PSMa, PSMd, PSMe, d-toxina, PSM-*mec* (tipo A), PSMb1 e PSMb2; além do gene *hld*, os quais podem contribuir com sua patogenicidade de várias maneiras (CHEUNG et al., 2014; GILL et al., 2005).

Alguns PSM possuem propriedades semelhantes a surfactantes, podendo auxiliar na maturação do biofilme, facilitando a dispersão bacteriana (LE et al., 2014). Outros, podem atuar como potentes agentes citolíticos, desempenhando um papel importante na patogênese de ICS e também em infecções disseminadas, como o PSMd, PSMe, PSM-*mec* e PSMb1 que também são agentes pró-inflamatórios (CHEUNG et al., 2010; CHEUNG et al., 2012; QUECK et al., 2009; WANG et al., 2011). Em um modelo experimental de sepse neonatal, utilizando ratos, o PSM-*mec* esteve relacionado a um aumento da mortalidade, demonstrando ser importante na patogênese da sepse causada por *S. epidermidis* (QIN et al., 2017).

Já genes codificadores de proteínas de superfície, presentes em *S. epidermidis* como *sdrF*, *sdrG*, *sdrH*, *sesB*, *sesC*, *sesF* e *sesI*, por alguns pesquisadores diferenciam infecção de colonização (CHRISTNER et al., 2012; DEPLANO et al., 2016; GILL et al., 2005; GORDEEV et al., 2017; OTTO, 2014; PEERAYEH et al., 2016; RAHIMI; KARIMI, 2016). Ainda, outros fatores que podem contribuir para a virulência destes microrganismos são a presença de proteases, exoenzimas e proteínas extracelulares, mediadas pelos genes *gehC*, *gehD*, *sspA*, *sspB*; além da resistência a peptídeos, marcados pela presença dos genes *graR*, *dltB* e *mprF* (DUBLIN et al., 2001; GILL et al., 2005; LI et al., 2007; OHARA-NEMOTO et

al., 2002). Na Tabela 1 estão descritos alguns dos genes presentes em *S. epidermidis*, mostrando suas respectivas funções de acordo com a literatura.

Tabela 1 – Genes presentes em *Staphylococcus epidermidis* e sua respectiva função nestes microrganismos.

Gene	Função	Referência
<i>aap</i> <i>atlE</i> <i>Bap</i> <i>EmbP</i> <i>tagF</i>	Produção de biofilme independente do PIA	Christner et al., 2010 O'gara, 2007 Otto, 2014 Sadovskaya et al., 2005 Tormo et al., 2005 Von Eiff et al., 2002
ACME	Aumento da capacidade em colonizar a pele e mucosas	Du et al., 2013
<i>capA</i> PGA	Proteção, sobrevivência e persistência das infecções	Kocianova et al., 2005
<i>dltB</i> <i>graR</i> <i>mprF</i>	Resistência a peptídeos	Li et al., 2007
<i>gehC</i> <i>gehD</i> <i>sspA</i> <i>sspB</i>	Presença de proteases, exoenzimas e proteínas extracelulares	Dubin et al., 2001 Gill et al., 2005 Ohara-nemoto et al., 2002
<i>hld</i> PSM	Produção de toxinas	Gill et al., 2005 Zhang et al., 2003
<i>ica</i> operon	Codifica a adesina intercelular do PIA	Arciola et al., 2015
<i>sdrF</i> <i>sdrG</i> <i>sdrH</i> <i>sesB</i> <i>sesC</i> <i>sesF</i> <i>sesI</i>	Proteínas de superfície de <i>S. epidermidis</i>	Christner et al., 2012

PIA = Polissacarídeo de adesão intercelular

3.3 PERFIL DE SUSCETIBILIDADE

Após a identificação do agente etiológico causador da sepse neonatal, deve-se investigar o perfil de suscetibilidade frente aos antimicrobianos, com o objetivo de indicar a sensibilidade do microrganismo frente aos antibióticos disponíveis para o tratamento, permitindo identificar a sensibilidade, resistência e o fenótipo intermediário (AGUIAR, 2010; HARBARTH et al., 2003; TZIALLA et al., 2015).

As diretrizes internacionais para a gestão de sepse e choque séptico evidenciam que a administração de antimicrobianos em RN que demonstram sinais e sintomas de sepse deve ser realizada o mais breve possível, anterior ao resultado da hemocultura (RHODES et al., 2017). A rapidez na instituição da antibioticoterapia é fundamental, já que seu atraso está associado a um aumento na mortalidade (FERRER et al., 2014; RHODES et al., 2017). Recomenda-se que seja realizada a terapia com antimicrobianos de amplo espectro, associados ou não, abrangendo todos os possíveis agentes patogênicos, a qual deve ser modificada, se necessário, quando houver a identificação do microrganismo, bem como seu perfil de suscetibilidade (RHODES et al., 2017).

3.4 RESISTÊNCIA BACTERIANA

A resistência frente aos antimicrobianos vem aumentando progressivamente e constitui uma preocupação crescente para a saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento (HAGHIGHATPANAH et al., 2016; KARAM et al., 2016; MIRÓ-CANTURRI et al., 2019; TZIALLA et al., 2015). Microrganismos que eram considerados inofensivos, como os SCoN, atualmente são considerados importantes patógenos devido aos mecanismos de resistência que são capazes de adquirir (JIANG et al., 2019; KARAM et al., 2016; NAMVAR et al., 2017; TZIALLA et al., 2015).

O fenômeno da resistência bacteriana caracteriza-se pela capacidade dos microrganismos resistirem à ação inibitória ou bactericida de uma ou mais classes de agentes antimicrobianos. Vários são os fatores que contribuem para esta resistência, entre eles o uso indiscriminado de antibióticos (AZEVEDO; SILVA, 2012; KARAM et al., 2016). Como consequência, ocorre uma redução significativa do arsenal terapêutico disponível para o tratamento, além do aumento no tempo de internação e custos de tratamento, aumentando os índices de morbimortalidade dos pacientes (BONNET et al., 2019; O'CONNELL et al., 2013).

A incidência da resistência bacteriana varia entre os hospitais, sendo que o crescimento progressivo de isolados MDR foi recentemente relatado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (O'NEILL, 2016; TACCONELLI et al., 2018; WHO, 2018). Normalmente as infecções por SCoN são adquiridas no ambiente hospitalar, e as unidades neonatais são locais comuns para o desenvolvimento e a transmissão de isolados MDR, onde

os antimicrobianos estão entre os medicamentos mais prescritos (CAILES et al., 2015; TZIALLA et al., 2015).

O uso de antibióticos nas UTI-RN não está associado apenas ao desenvolvimento de isolados MDR, mas também a sua persistência, os quais são capazes de permanecer durante décadas no mesmo local, favorecendo a transmissão entre os RN (RUSSEL et al., 2012). A compreensão dos mecanismos de desenvolvimento da resistência é fundamental para alertar a sua disseminação, possibilitando a implementação de estratégias de prevenção; sendo que o uso de tecnologias de WGS em microrganismos proporcionou um progresso considerável na identificação de etapas que levam ao desenvolvimento e disseminação da resistência aos antibacterianos (MIRAGAIA, 2018; PAMMI; WEISMAN, 2015).

Além disso, a antibioticoterapia inadequada aumenta o risco de infecções por patógenos oportunistas e a resistência bacteriana, contribuindo na elevação da morbimortalidade, fazendo com que seja necessário a adoção de novas estratégias para redução destes índices (AGARWAL; BHAT, 2015; O'NEILL, 2016). O controle na utilização de agentes de estreito espectro pode limitar o aparecimento de isolados MDR. O combate a estes microrganismos em hospitais pode ser realizado através do conhecimento da microbiota local e a atuação das comissões de controle de infecção hospitalar. Uma vez que a resistência bacteriana é extremamente variável, estudos que permitam conhecer o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e a origem (hospitalar ou comunitária) dos isolados devem ser realizados (KASPER; FAUCI, 2015).

Assim, para combater o problema da resistência bacteriana, o *Centers for Disease Control* (CDC/EUA) mostrou que uma das principais medidas a serem adotadas é a melhoria nos mecanismos de controle do uso destes medicamentos, através da adoção de programas de gerenciamento, como o “*Antimicrobial Stewardship Program (ASP)*”, definido no Protocolo da Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA) (CDC, 2014; IDSA, 2016; MILLER et al., 2018). O ASP, em conjunto com as medidas de controle e prevenção de infecções, auxilia na prevenção ou consegue retardar o aparecimento de isolados resistentes, além de reduzir custos, sem prejudicar a qualidade dos serviços (ANVISA, 2017b).

Ainda, o termo “*Stewardship*” vem sendo inserido na atualidade como um conceito da gestão envolvida na dispensação/administração de antimicrobianos, e tem como objetivo priorizar atividades realizadas por uma equipe multidisciplinar, auxiliando na segurança do paciente (CDC, 2014; NATHWANI; SNEDDON, 2013). Baseado nestes dados, a Agencia

Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em 2017, também propôs que sejam realizados este tipo de programa nos serviços de saúde, com a finalidade de prevenir isolados MDR e reduzir os custos na assistência (ANVISA, 2017b).

3.4.1 Resistência à penicilina

Uma nova era no tratamento de doenças infecciosas, que até então eram consideradas incuráveis, foi anunciada com a descoberta da penicilina por Alexander Flemming em 1928, revolucionando a história da medicina. Este composto passou a ser utilizado com frequência e, conseqüentemente os índices de morbimortalidade associadas a estas infecções reduziram consideravelmente; porém, logo começaram a surgir microrganismos resistentes à nova classe de medicamentos (BONNET et al., 2019; O'CONNELL et al., 2013).

Esta resistência inicialmente foi relacionada a produção de penicilinases, que atualmente são chamadas beta-lactamases. Esta enzima é sintetizada pelos *Staphylococcus* spp. após exposição aos beta-lactâmicos, que hidrolisa o anel beta-lactâmico e inativa o antimicrobiano; a mesma é codificada pelo gene *blaZ*, sendo regulada pelos genes regulatórios *blaR1* e *blaI* (SHORE et al., 2011). Em 1960, começaram a aparecer isolados resistentes a penicilina, e devido a este fato ocorreu a descoberta do beta-lactâmico sintético meticilina, uma vez que era resistente à ação das beta-lactamases (LOWY, 1998).

3.4.2 Resistência à meticilina

A resistência a meticilina é a que mais ocorre em SCoN, podendo conferir resistência a todos os antimicrobianos beta-lactâmicos, restando poucas alternativas para o tratamento, entre elas a vancomicina. Como consequência, isolados com este perfil podem levar ao surgimento de microrganismos com susceptibilidade reduzida e resistentes a vancomicina (DE OLIVEIRA, 2013; GU et al., 2013; MIRAGAIA, 2018; NAMVAR et al., 2017; PINHEIRO et al., 2016b).

A incidência de *Staphylococcus* spp. resistente à meticilina varia entre os hospitais, e segundo um levantamento realizado pelo SENTRY entre 1997 a 2001, estes índices foram de 76 a 80% nos isolados de hemoculturas em hospitais brasileiros e da América Latina (SADER et al., 2004). Uma atualização deste estudo, envolvendo centros de países da América do

Norte, América Latina, Europa e Ásia, entre 1997 a 2016, mostrou que este tipo de resistência em ICS aumentou até 2005–2008, porém, posteriormente declinou em todas as regiões (DIEKEMA et al., 2019). Ainda, estudos de vigilância em outros países, demonstram que a resistência a esse antimicrobiano varia entre 75 a 85% em SCoN (MAY et al., 2014; ZHAO et al., 2012).

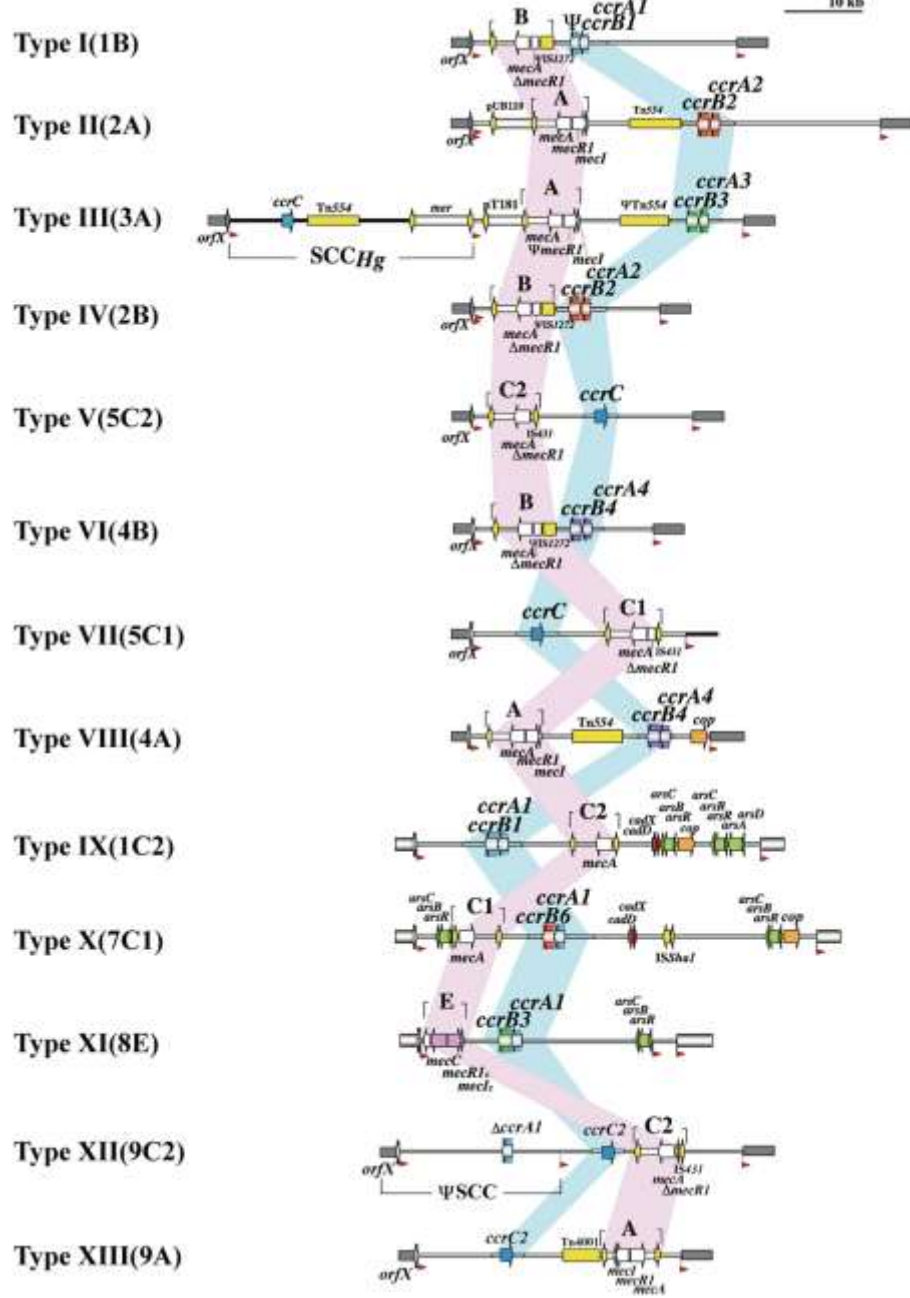
Em uma pesquisa realizada por nosso grupo de estudo, 42,31% dos *Staphylococcus* isolados de hemoculturas no HUSM foram caracterizados fenotipicamente como SCoN resistentes à meticilina (RAMPELOTTO et al., 2015). Essa resistência deve-se à presença do gene *mecA*, o qual é carregado em um elemento genético móvel denominado SCC*mec*, encontrado em isolados de *Staphylococcus* spp. resistente à meticilina (FIGUEIREDO; FERREIRA, 2014; IORIO et al., 2012; ITO, 2009; MIRZAEI et al., 2017).

A organização estrutural e o conteúdo genético dos elementos SCC*mec* são variados, sendo que, até o momento, treze tipos de SCC*mec* (I-XIII) foram caracterizados (<http://www.sccmec.org>), os quais se diferenciam em relação ao tamanho e estrutura (Figura 3) (BAIG et al., 2018; ZONG et al., 2011). Os elementos do SCC*mec* são classificados em tipos e subtipos, baseados em combinações da classe do complexo do gene *mec* e do tipo de complexo do gene *ccr* (Figura 3) (ITO et al., 2001; ITO, 2009). Atualmente, uma mudança epidemiológica vem sendo observada no Brasil. No início da década passada, o *S. aureus* *Brazilian Endemic Clone* (BEC, ST239 - SCC*mec* III) era o mais encontrado em infecções, e atualmente, vem sendo substituído por amostras SCC*mec* IV e SCC *mec* II (CHAMON et al., 2017; DA SILVEIRA et al., 2018; MACHADO et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2018).

O complexo do gene *mec* contém os genes *mecA*, seus reguladores *mecR1* e *mecI*, e sequências de inserção associadas, podendo estar disposto em diferentes condições, variando de classe (BAIG et al., 2018; <http://www.sccmec.org>; KATAYAMA et al., 2000). O SCC*mec* também carrega o chamado complexo gene *ccr*, o qual codifica recombinases responsáveis pela mobilidade, sendo que em *Staphylococcus* spp. é composto por três genes *ccr* (*ccrA*, *ccrB* e *ccrC*) (FIGUEIREDO; FERREIRA, 2014; <http://www.sccmec.org>; ITO, 2009). Além dos complexos de genes *mec* e *ccr*, o SCC*mec* também contém três regiões “J”, que constituem componentes não essenciais do cassete. Estas regiões podem ter determinantes adicionais de resistência antimicrobiana, as quais são utilizadas para definir os subtipos dos SCC*mec* (<http://www.sccmec.org>; MILHEIRIÇO et al., 2007).

Ainda, uma característica comum entre *Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina é a natureza clonal, sendo que cepas pertencentes ao mesmo clone tem sido detectadas em diferentes regiões do mundo (FIGUEIREDO; FERREIRA, 2014). Um dos marcadores utilizados para rastrear a clonalidade de *Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina é o tipo de *SCCmec*, em conjunto com outras técnicas moleculares, como o *Multilocus sequence typing* (MLST) (FIGUEIREDO; FERREIRA, 2014).

Figura 3 - Características genéticas dos elementos *SCCmec* do tipo I ao XIII.



Fonte: (BAIG et al., 2018).

3.4.2.1 Sequence type (ST)

A detecção de cepas pode ajudar no diagnóstico precoce das infecções, auxiliando no diagnóstico preciso, fundamental para o tratamento dos pacientes (RIBOLI, 2018). Diferentes métodos de tipagem epidemiológica têm sido usados em estudos com SCoN. O uso de novas tecnologias baseadas no ácido desoxirribonucleico (DNA) pode facilitar um rápido diagnóstico e a identificação da susceptibilidade aos antimicrobianos mais facilmente (RAIMUNDO et al., 2002).

Um método molecular como MLST é considerado de escolha no estudo epidemiológico entre populações bacterianas, caracterizando os isolados bacterianos com base na comparação de sequências de DNA dos fragmentos internos de sete genes *housekeeping* (*arcC*, *aroE*, *gtr*, *mutS*, *yqiL*, *tpiA* e *pyr*), representando o genoma dos *Staphylococcus* spp.. Estes genes são parcialmente sequenciados e comparados com sequências conhecidas e traduzidos em números alélicos pela base de dados do MLST (<http://www.pubmlst.org>), originando o ST correspondente, permitindo que os usuários comparem ST locais com ST globais (ENRIGHT et al., 2000; FIGUEIREDO; FERREIRA, 2014; MIRAGAIA et al., 2007; MIRAGAIA et al., 2008; THOMAS; ROBINSON, 2014; WIDERSTRÖM et al., 2012).

O tipo clonal nosocomial prevalente em diversos estudos no mundo todo entre os *S. epidermidis* é o ST2 (BISPO et al., 2014; DEPLANO et al., 2016; HELLMARK et al., 2013b; IORIO et al., 2012; MARTÍNEZ-MELÉNDEZ et al., 2016; MIRAGAIA et al., 2007; SPRINGER-VERLAG et al., 2012; THOMAS et al., 2014). Riboli (2018), avaliando SCoN de hemoculturas de RN admitidos no Hospital das Clínicas de Botucatu, São Paulo, caracterizou os isolados por eletroforese em gel de campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*-PFGE) e encontrou dois *clusters* de *S. epidermidis* majoritários, os quais foram caracterizados como ST2 e ST59. Widerström et al. (2016) realizaram a pesquisa dos ST para investigar os possíveis reservatórios de *Staphylococcus epidermidis* resistentes a meticilina (MRSE) em uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI) de um hospital na Suíça, e encontraram ST2 e ST215 como os prevalentes. Oliveira et al. (2016) avaliaram SCoN isolados de hemoculturas e evidenciaram que o ST prevalente foi o ST2, seguido de ST6, ST59 e ST23. Destes, ST2 e ST6 estavam relacionados ao SCCmec III e o ST59 ao SCCmec III e IVa (OLIVEIRA et al., 2016).

Uma vantagem da utilização do MLST, é que este método fornece informações filogenéticas e evolucionárias das bactérias estudadas, sendo que isolados com ST idênticos são considerados como descendentes de um ancestral comum; porém esta técnica não fornece dados de elementos genéticos móveis, sendo menos discriminatório e, menos aplicável que o PFGE na investigação de surtos hospitalares (LI et al., 2009; TURNER; FEIL, 2007). No entanto, mais recentemente, foi desenvolvida a técnica de WGS, que, ainda mais discriminatória, tem demonstrado ser extremamente útil no controle de infecção hospitalar em diversos países. Adicionalmente, esta técnica permite caracterizar na totalidade os isolados, quanto ao seu conteúdo em genes resistência e de virulência, além dos tipos de ST (MIRAGAIA, 2018).

3.5 SURTOS HOSPITALARES

O crescente aumento de isolados MDR, aliado aos surtos hospitalares tornou-se um problema de saúde pública global, os quais podem ocorrer devido à disseminação de uma estirpe num mesmo ambiente (CHANG et al., 2013; KAVAILINE et al., 2012; ZHENG et al., 2017). Isolados de *S. epidermidis* podem persistir em um ambiente por décadas, sendo capazes de se disseminar entre os hospitais e até mesmo entre os países (AHLSTRAND et al., 2014; GORDON et al., 2012; KLINGENBERG et al., 2007; WIDERSTROM et al., 2009). Portanto, para fazer o controle de infecção hospitalar é essencial identificar possíveis reservatórios e vias de disseminação, assim como caracterizar a nível molecular os isolados (CHANG et al., 2013; KAVAILINE et al., 2012; ZHENG et al., 2017).

A genotipagem de isolados é de extrema importância, a fim de verificar se os microrganismos envolvidos em surtos hospitalares ou em eventos de transmissão cruzada possuem possível relação clonal (SLOOS et al., 2000). A técnica de PFGE foi por muito tempo considerada padrão-ouro para estudos epidemiológicos para detectar surtos, devido ao seu elevado poder discriminatório (KREISWIRTH et al., 1993; LIU et al., 1999; SLOOS et al., 2000; PUSCH et al., 2013; TENOVER et al., 1995). Porém, com a utilização de novas tecnologias como WGS, foi possível alcançar um progresso considerável na identificação de etapas que levam ao desenvolvimento e disseminação da resistência aos antibacterianos (MIRAGAIA, 2018; RIBOLI, 2018).

O controle da disseminação de isolados MDR, especialmente em RN, utilizando técnicas de tipagem molecular, associado a medidas preventivas, como detecção precoce de neonatos colonizados e tratamento empírico, são ferramentas fundamentais para diminuir a morbimortalidade associada a infecções por SCoN (BERGOGNE-BEREZIN et al., 1996). Ainda, a detecção do microrganismo, principalmente da cepa específica, pode auxiliar no diagnóstico precoce e preciso, fundamental para o tratamento das infecções (RIBOLI, 2018).

3.6 TAXAS DE MORTALIDADE

A sepse possui ampla importância em termos de saúde pública, com elevada incidência, ocasionando altas taxas de mortalidade nas UTI, incluindo as neonatais (DE CARVALHO et al., 2014; DIAMENT et al., 2011; TZIALLA et al., 2015). É a maior responsável pela morte de RN e a décima causa de morte nos Estados Unidos. Aproximadamente oito milhões de pessoas morrem de sepse no mundo, sendo a sepse neonatal responsável por mais de mais de 400.000 mortes (ARAYICI et al., 2019; FJALSTAD et al., 2016; GARROD et al., 2011; MARTIN et al., 2003; MATOS; VICTORINO, 2004; TZIALLA et al., 2015; YADAV et al., 2018).

De acordo com a OMS, ocorreram progressos notáveis em todo mundo em relação a morbimortalidade infantil, havendo a redução de 93 por 1000 nascidos vivos em 1990 para 41 por 1000 vivos em 2016 (WHO, 2018). No entanto, os dados mostraram que em 2016, 15.000 crianças morreram por dia, antes de atingir os cinco anos de vida. Neste mesmo ano, 2,6 milhões de RN foram a óbito, destacando-se a sepse como um dos principais motivos (LEVELS & TRENDS IN CHILD MORTALITY, 2017; WHO, 2018).

No Brasil, segundo estimativa do SIM, estima-se que 70% da mortalidade infantil ocorra no período neonatal, sendo a sepse citada entre as principais causas. Porém, estudos epidemiológicos sobre sepse são escassos, sendo que os aspectos epidemiológicos têm sido investigados (ANVISA, 2017a; DATASUS, 2017).

Cunha et al. (2002), ao avaliarem a significância clínica de SCoN isolados de hemoculturas de RN na UTI-RN do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, evidenciaram 37,0% de infecções por SCoN, e destas, 13,0% estavam associadas a mortalidade dos RN. Cordeiro (2007) demonstrou que as taxas de mortalidade devido a provável sepse foi de 26,2%, e de 10,2% por sepse confirmada por hemocultura, e entre essas,

27,7% foram causadas por SCoN. Al-taiar et al. (2013), investigaram microrganismos isolados em hemoculturas de RN na China, e mostraram que 4,8% dos RN foram a óbito devido a infecções causadas por SCoN. Cantey et al. (2018) evidenciaram que a mortalidade por SCoN na sepse neonatal foi de 1,6%, porém, na análise multivariada, esta porcentagem não foi significativa; e Lee et al. (2015) demonstraram que os índices de mortalidade por SCoN podem chegar a 9,4% em neonatos com muito baixo peso ao nascer, sendo que crianças prematuras, têm mais chances de evoluírem a sepse, com elevada morbimortalidade associada (WYNN, 2016).

3.7 REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS

O número de isolados MDR aumentou consideravelmente nas últimas décadas, e a evolução da resistência bacteriana ocorre de forma tão acelerada que não tem sido possível o acompanhamento da pesquisa por novos antimicrobianos. Fato preocupante, já que interfere na eficácia clínica com consequente redução do arsenal terapêutico disponível (KARAM et al., 2016; ZHENG et al., 2018). Sendo assim, a busca por novos fármacos com propriedade antibacteriana para o tratamento destas infecções deve ser incentivada (ZHENG et al., 2018).

Os termos “reposicionamento de drogas”, “reaproveitamento de drogas” e/ou “redirecionamento de drogas” surgiram por Ashburn e Thor (2004), o qual se refere a um processo de descoberta de novas propriedades e diferentes mecanismos de ação de medicamentos já aprovados para uso clínico, utilizados sozinhos ou em conjunto, podendo ser aplicados a uma nova indicação terapêutica (ASHBURN; THOR, 2004; CHANG et al., 2013; KAVAILINE et al., 2012; SERAFIN et al., 2019; SERAFIN; HÖRNER, 2018; ZHENG et al., 2018).

Atualmente, o redirecionamento de medicamentos constitui um método alternativo bastante empregado e promissor, que se tornou campo de pesquisa devido à rápida identificação, conhecimento prévio da farmacocinética, toxicidade e segurança dos medicamentos levando a um custo reduzido quando comparados com o processo tradicional de desenvolvimento de fármacos (MIRÓ-CANTURRI et al., 2019; ZHENG et al., 2018). Estudos tem relatado atividade antimicrobiana em diferentes classes de medicamentos não-antibióticos, como anestésicos locais, tranquilizantes, medicamentos cardiovasculares,

psicotrópicos, anti-histamínicos e anti-inflamatórios (CHAN et al., 2017; PALIT et al., 2013; RAMPELOTTO et al., 2018b; SERAFIN et al., 2019; SERAFIN; HÖRNER, 2018).

Uma classe de fármacos reposicionados, que têm demonstrado uma atividade bacteriana promissora frente a diversas espécies bacterianas são as estatinas, as quais comumente são utilizadas para a redução de lipídios em pacientes com elevados níveis de colesterol (ALLA et al., 2013; KOZAROV et al., 2014; LÓPEZ-CORTÉS et al., 2013). Ainda, outras substâncias que merecem destaque são os TZC, caracterizados por conterem uma cadeia alifática de três átomos de nitrogênio, responsável por suas propriedades biológicas (BONMASSAR et al., 2013; MOORE; ROBINSON, 1986).

3.7.1 Estatinas

As estatinas são uma classe de medicamentos amplamente utilizadas para redução de lipídios em pacientes com elevados níveis de colesterol, bem como atividade anti-inflamatória, sendo sua indicação primária na prevenção de doenças cardiovasculares (ALLA et al., 2013; KOZAROV et al., 2014; LÓPEZ-CORTÉS et al., 2013; THANGAMANI et al., 2015). Entre as diferentes estatinas, destacam-se a atorvastatina (Figura 4), a forma sintética do produto, e a pravastatina e sinvastatina (Figura 5), as formas semissintéticas (ALLA et al., 2013; MASON et al., 2005; SMITH; GRUNDY, 2014). Entre elas, a sinvastatina é a mais utilizada, por ter baixo custo (ALLA et al., 2013).

Além da sua utilização convencional, estudos *in vitro* demonstram que as estatinas apresentam atividade antibacteriana frente a diversos microrganismos, principalmente os GP, entre eles *S. aureus*, especialmente os produtores de biofilme (GRAZIANO et al., 2015; LÓPEZ-CORTÉS et al., 2013; THANGAMANI et al., 2015). Ainda, pesquisas mostraram que pacientes que utilizam estatinas, possuem uma menor incidência de sepse e mortalidade associada (JANDA et al., 2010; KOZAROV et al., 2014; LIAPPIS et al., 2001; TLEYJEH et al., 2009).

Figura 4 – Estrutura química da atorvastatina.

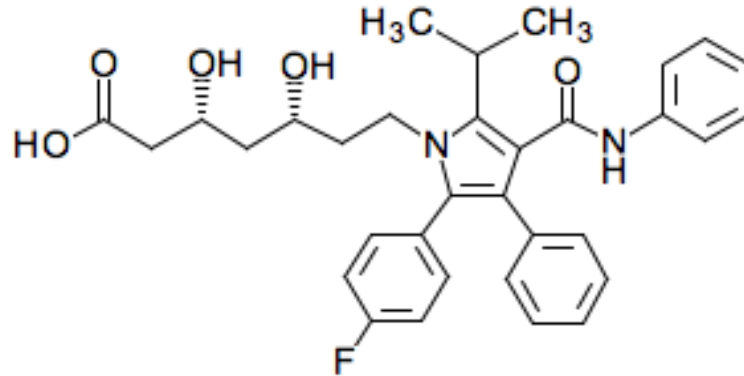
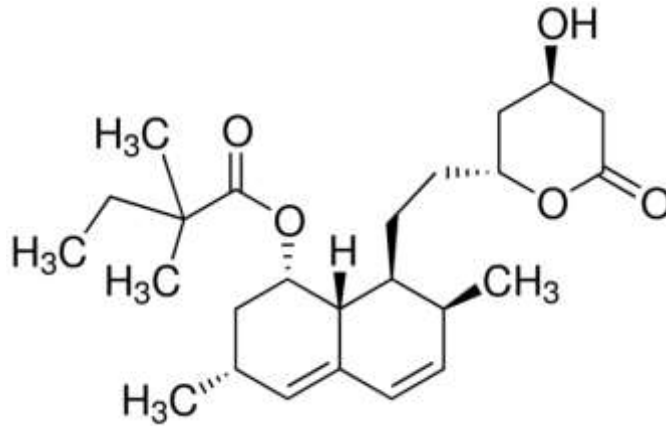


Figura 5 – Estrutura química da sinvastatina



3.8 COMPOSTOS TRIAZENOS (TZC)

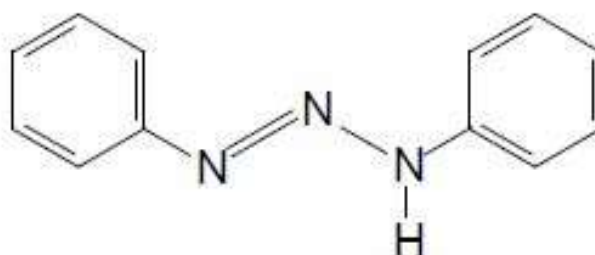
A descoberta dos TZC ocorreu devido a estudos realizados por Peter Griess, que em 1858 sintetizou o primeiro triazeno, 1,3-bis(fenil)triazeno (Figura 6) (GRIESS, 1858). Há mais de um século estes compostos vêm sendo estudados devido ao relativo interesse estrutural, às propriedades reativas e biológicas de potencial aplicação em diversas áreas (BACK et al., 2012). Estes são caracterizados por conterem uma cadeia alifática constituída de três átomos de nitrogênio interligados em sequência (N=N-N), responsável por suas propriedades biológicas (BONMASSAR et al., 2013; MOORE; ROBINSON, 1986).

Estes compostos são um dos seis principais agentes alquilantes utilizados na quimioterapia das doenças neoplásicas, como por exemplo, a dacarbazina e a temozolamida, utilizados na terapêutica (BONMASSAR et al., 2013; CHABNER et al., 2012). Os TZC apresentam ampla versatilidade farmacológica, tais como atividade antifúngica, antileucêmica e antibacteriana, tornando-os foco de inúmeros estudos (DOMINGUES et al., 2010; HÖRNER et al., 2008; NUNES et al., 2014; NUNES et al., 2017; PARAGINSKI et al., 2014; TIZOTTI et al., 2016).

Hörner et al. (2008) e Paraginski et al. (2014) demonstraram que estes compostos são capazes de inibir o crescimento de bactérias GP e GN, até mesmo em isolados MDR. Porém, outros estudos mostram que os TZC são mais ativos frente a microrganismos GP (NUNES et al., 2014; NUNES et al., 2017; TIZOTTI et al., 2016). Ainda, Nunes et al. (2014) evidenciaram pronunciada atividade antibacteriana contra SCoN produtores de biofilme. Domingues et al. (2010), avaliaram a atividade dos TZC em células de medula óssea de pacientes com leucemia mieloide aguda e demonstraram que estes compostos possuem atividade citotóxica, sendo capazes de clivar o DNA plasmidial. Já Tizotti et al. (2016) provaram que estes compostos exibiram efeitos antiproliferativos expressivos, especialmente em células de pacientes com síndrome mielodisplásica.

Em relação a atividade antibacteriana demonstrada por estes compostos, é proposto que a mesma ocorre devido à atividade quelante a íons metálicos constituintes da parede celular das bactérias, inibindo etapas da síntese bacteriana, conduzindo a morte celular (HÖRNER et al., 2008; OMBAKA et al., 2012). Ainda, visando aumentar a atividade biológica e estabilidade dos TZC nos medicamentos há um crescente interesse na associação destes compostos com metais (KARAMI et al., 2017; SREEDHARA; COWAN, 2001).

Figura 6 – Estrutura molecular do composto 1,3-bis(fenil)-triazeno.



3.8.1 Associação de triazenos (TZC) com metais

3.8.1.1 Paládio (Pd)

Os complexos organometálicos de paládio (Pd) foram descobertos na década de 1960, sendo intensamente investigados para várias aplicações (EL-SONBATI et al., 2012; GRIRRANE et al., 2013). O paládio (Pd) é um metal de transição de coloração esbranquiçada a prata, pertencente ao grupo da platina, apresentando número atômico 46 e massa molecular 106,42 u (JONES, 2002). Por ser um elemento de transição, apresenta diferentes estados de oxidação, como o II e IV, sendo o mais frequente o II (LEE, 1999).

A utilização deste metal ganhou visibilidade mundial quando pesquisadores demonstraram que compostos com Pd(II) apresentaram atividade antitumoral frente a diversas linhagens celulares, especialmente àquelas resistentes a cisplatina (MORO et al., 2009; QUIROGA et al., 1998). Estes compostos demonstram maior estabilidade e menor toxicidade quando comparados aos anticancerígenos a base de platina, devido a sua semelhança de comportamento estrutural, além de possuir baixa biotoxicidade e poucos efeitos colaterais (CAVALCANTE et al., 2008; DUPONT et al., 2005; KARAMI et al., 2017; MASSAI et al., 2016; MORO et al., 2004).

Além da atividade antitumoral, bioensaios com compostos de Pd(II) já foram realizados e resultados promissores foram descritos, especialmente no que se refere a atividade anti-inflamatória, antifúngica e antibacteriana (PRABHAKARAN et al., 2008; SHAHEEN et al., 2009). Em relação a atividade antibacteriana, este metal quando associados a tetraciclina foi capaz de potencializar significativamente a sua ação em até dezesseis vezes do que a droga livre, quando testado em cepas de *E. coli* HB101/pBR322 (GUERRA et al., 2005).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram utilizados 176 e 120 SCoN, isolados de hemoculturas de RN admitidos no HUSM, no período compreendido entre janeiro a dezembro de 2014, e entre julho de 2016 a julho de 2017, respectivamente. As amostras foram processadas de acordo com o Procedimento Operacional Padrão do Laboratório de Análises Clínicas (LAC) do referido hospital, incluindo as diretrizes do *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) (IDSA, 2016; MILLER et al., 2018).

Os isolados foram coletados prospectivamente por farmacêuticos, técnicos e médicos plantonistas por punção venosa periférica, com técnica asséptica, utilizando material estéril. As hemoculturas foram solicitadas quando havia presença de algum sinal clínico, como aumento da temperatura corporal ($> 38^{\circ}\text{C}$) ou hipotermia ($< 36^{\circ}\text{C}$), leucocitose (>10.000 leucócitos/ mm^3 , especialmente com desvio à esquerda) ou granulocitopenia absoluta (< 1000 leucócitos/ mm^3), sendo que na maioria dos casos foram requeridas no mínimo duas culturas de sangue.

Essas amostras foram processadas no LAC do HUSM através do sistema automatizado BACTEC 9240® (Becton Dickinson, Sparks, MD). Na sequência foi realizada a bacterioscopia direta do caldo de cultura (coloração pelo método de Gram) e a semeadura em placas contendo ágar sangue de carneiro. Posteriormente, as placas semeadas foram incubadas em estufa bacteriológica a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 h para o isolamento bacteriano. Os testes de identificação das bactérias isoladas e o perfil de sensibilidade foram efetuados através do sistema automatizado VITEK®2-bioMérieux no HUSM. Identificações com menos de 90% de identidade pelo sistema automatizado foram consideradas insuficientes.

Após os testes citados acima, as hemoculturas positivas, ou seja, nas quais ocorreu o crescimento de SCoN foram repassadas ao Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT) do Centro de Ciências da Saúde (CCS), prédio 26, sala 1201, onde foram repicadas em ágar triptona de soja (TSA), incubadas em estufa bacteriológica a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 h, no qual as colônias foram armazenadas em caldo soja tripticaseína (TSB) acrescido de 15% de glicerol a -80°C para posterior realização dos testes.

4.2 PERFIL DE SUSCETIBILIDADE

4.2.1 Metodologia automatizada

O perfil de sensibilidade foi realizado no avaliado pelo método automatizado VITEK® 2-bioMérieux, no HUSM. Este método automatizado possui dois cartões de suscetibilidade de acordo com o material clínico que está sendo avaliado. Nos cartões utilizados encontram-se antimicrobianos como clindamicina, ciprofloxacino, eritromicina, gentamicina, linezolida, oxacilina, penicilina, sulfametoxazol/trimetoprim, teicoplanina, tigeciclina e vancomicina. Os isolados foram classificados como sensível, intermediário e resistentes de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* vigente dos anos de estudo (CLSI, 2014, 2016, 2017).

4.2.2 Método da microdiluição em caldo

Foi utilizada a técnica da microdiluição em caldo na determinação da CIM para os antimicrobianos linezolida, tigeciclina e vancomicina de acordo com o documento M07-A9 do CLSI (2012), realizadas no Laboratório de Bacteriologia do DACT do CCS. Os antimicrobianos foram diluídos em solução fisiológica estéril na concentração de 5.120 µg/mL. Nas placas de 96 poços, fundo em “U”, foram adicionados 180 µL de caldo *Mueller Hinton* (MH) nos primeiros poços (Coluna 1, linhas A a H) e nos demais 100 µL. Após, 20 µL do composto foram adicionados nos primeiros poços (Coluna 1, linhas A a H) e realizadas sucessivas diluições nas concentrações de 256 a 0,25 µg/mL. Em seguida, foi preparado o inóculo bacteriano das amostras, em caldo MH, medidos em espectrofotômetro (625 nm), equivalentes a escala 0,5 de *McFarland* (1×10^8 UFC/mL). Posteriormente, 100 µL do inóculo foi dispensado em cada poço, exceto no controle do meio. As placas contendo os microrganismos e os compostos foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h.

A CIM foi determinada visualmente, como a menor concentração que inibiu o crescimento dos microrganismos nos poços de diluição. Os resultados foram interpretados como sensível, intermediário e resistente conforme o CLSI vigente dos anos de estudo (CLSI, 2014, 2016, 2017). A técnica foi realizada em triplicata.

4.3 BIOMARCADORES EM SEPSE

Os biomarcadores em sepse avaliados foram o hemograma e a proteína C reativa, no qual os dados foram coletados através da análise da pasta de cada RN, solicitada pelo número de identificação de cada paciente no HUSM.

4.3.1 Hemograma

O hemograma foi realizado utilizando o aparelho Sysmex XE-5000™, conforme recomendações do fabricante. O sangue total foi utilizado com EDTA, onde foi realizada a contagem automatizada de células e, quando necessário, a microscopia complementar. Esses dados foram verificados por meio da consulta dos dados dos RN no sistema do HUSM, os quais foram avaliados de acordo com o microrganismo e não por paciente, pois na mesma solicitação da hemocultura é sempre solicitado o hemograma. A interpretação foi realizada através do escore hematológico de Rodwell (1988), analisando outros fatores, como idade gestacional e peso do RN. Foi considerado hemograma normal como paciente “sem” sepse; leucocitose como “fator frequente” na sepse; leucopenia um “mau prognóstico”; e neutrofilia e desvio à esquerda, com formas jovens e granações, “gravidade da infecção”.

4.3.2 Proteína C reativa

A proteína C reativa foi realizada através do dispositivo Dimension® Xpand® Plus, de acordo com as recomendações do fabricante. Foi utilizado soro e a avaliação realizada por imunoturbidimetria (Valor de referência para processos inflamatórios: <0.30 mg/dl). Esses dados foram coletados por meio de análise observacional dos resultados obtidos nos prontuários e também foram avaliados de acordo com o microrganismo, uma vez que na solicitação de hemocultura é sempre solicitado o exame constando proteína C reativa.

4.4 SIGNIFICÂNCIA CLÍNICA E TAXAS DE MORTALIDADE

Esses dados foram coletados através da análise da pasta de cada RN, solicitada pelo número de identificação de cada paciente. Foi verificado se o isolamento dos SCoN nas

hemoculturas foram considerados colonização ou infecção, se foi relacionado ao uso de cateter e se os RN tiveram alta ou se foram a óbito.

4.5 TESTES FENOTÍPICOS

Os testes fenotípicos foram realizados para a avaliação da produção de biofilme nos 176 SCoN isolados no ano de 2014.

4.5.1 Ágar vermelho congo (CRA)

As amostras foram analisadas de acordo com o método descrito por Freeman et al. (1989). Estas, foram semeadas em ágar sangue de carneiro e foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 ± 2 °C por 24 h. Após, foram transferidas ao CRA e incubadas em estufa bacteriológica a 35 ± 2 °C por 24 h. Isolados produtores do PIA, responsável pela formação do biofilme foram caracterizadas pela formação de colônias de coloração preta, enquanto que amostras não produtoras de biofilme formaram colônias de cor vermelha, sendo esta técnica realizada em duplicata. Foram utilizados como controle positivo e negativo, *S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 12228, respectivamente.

4.5.2 Aderência ao tubo de borossilicato (TM)

As amostras foram avaliadas através do método descrito por Christensen et al. (1982), as quais foram semeadas em ágar sangue de carneiro e incubadas em estufa bacteriológica a 35 ± 2 °C por 24 h. Após, 2 a 3 colônias foram inoculadas em tubos de vidro de borossilicato, contendo 2,0 mL de TSB e incubadas a 35 ± 2 °C por 48 h. Posteriormente, todo o conteúdo foi retirado com pipeta, e foram adicionados em cada tubo 1,0 mL de solução aquosa 0,4% de azul de tripan. Em seguida, o corante foi retirado com pipeta e após um minuto foi realizada a leitura. Havendo aderência da bactéria corada na parede do tubo, o isolado foi considerado produtor de biofilme e quando o microrganismo com corante não se aderiu a parede do tubo, os mesmos foram considerados como não produtores de biofilme, sendo este método efetuado em duplicata. Também foi realizado o controle da formação do biofilme utilizando as cepas

ATCC: *S. aureus* ATCC 25923 (controle positivo) e *S. epidermidis* ATCC 12228 (controle negativo).

4.5.3 Técnica quantitativa da microplaca (TCP)

As amostras foram avaliadas através do método descrito por Christensen et al. (1985) em quadruplicata. Os isolados foram semeados em ágar sangue de carneiro e incubados em estufa bacteriológica a 35 ± 2 °C por 24 h. Posteriormente, duas a três colônias foram transferidas para tubos de ensaio contendo 2,0 mL de caldo TSB com 1% de glicose e incubadas em estufa bacteriológica a 35 ± 2 °C por 24 h. Em seguida preparou-se o inóculo da suspensão em TSB equivalentes a escala 0,5 de *McFarland* (1×10^8 UFC/mL), medidos em espectrofotômetro a 625 nm. Após, com auxílio de uma pipeta multicanal foram inoculados em cada poço de uma placa de microtitulação de poliestireno de fundo chato contendo 96 poços, 200 µL da suspensão bacteriana, sendo cada amostra inoculada em quatro poços paralelos. Posteriormente as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 ± 2 °C por 24 h. Após, foram aspirados o conteúdo de cada poço, os quais foram lavados quatro vezes com 200 µL de tampão salina fosfato (PBS) pH 7,2. A seguir, os poços foram corados com 100 µL de cristal violeta 2% por um minuto, sendo que, em seguida, o corante foi aspirado e os poços lavados com água destilada. As placas ficaram em repouso para secagem por 1h a temperatura ambiente. Então, a leitura da densidade ótica (DO) foi realizada no leitor de Elisa BioTek's Epoch™ Multi-Volume Spectrophotometer System a 570 nm.

O controle do meio foi realizado utilizando TSB estéril com 1% de glicose, no qual todo procedimento foi realizado conforme as condições citadas anteriormente, sem a adição de microrganismos. Após, a média dos valores foram calculadas, bem como o desvio padrão para cada amostra. O ponto de corte foi calculado para definir se houve ou não a formação de biofilme, multiplicando-se o desvio padrão por três, adicionando a média da DO da amostra do TSB estéril com 1% de glicose (Ponto de corte = Desvio padrão x 3 + média da DO da amostra), sendo este cálculo também utilizado para cada amostra.

Os isolados foram classificados em três categorias: Não produtores de biofilme, com DO menor ou igual ao ponto de corte ($\leq 0,116$); fracamente aderentes, com DO superior ao ponto de corte ($> 0,116$) e menor ou igual a $\leq 0,232$; e fortemente aderentes, DO $> 0,232$. O

controle da formação do biofilme foi realizado utilizando *S. aureus* ATCC 25923 (controle positivo) e *S. epidermidis* ATCC 12228 (controle negativo).

4.6 TESTES GENOTÍPICOS

Os testes genotípicos foram realizados nos 176 SCoN isolados no ano de 2014 para investigação dos genes *icaACD*. Foram utilizados como controle positivo e negativo, *S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 12228, respectivamente.

4.6.1 Extração do ácido desoxirribonucleico (DNA)

A extração do DNA foi realizada conforme Pérez-Pérez e Hanson (2002). Os isolados armazenados a -80°C em TSB com 15% de glicerol foram repicados em placas de *petri* contendo TSA, incubados em estufa bacteriológica a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Após o crescimento das colônias, com auxílio de uma alça bacteriológica, transferiu-se 2 a 5 colônias de cada isolado para tubos de *ependorf* livres de DNase/RNase de 1,5 mL contendo 100 μL de tampão TE (10 mM Tris, 1 mM de EDTA, pH 8). A seguir os tubos foram homogeneizados em agitador *vortex* durante 5 a 10 segundos (s) e aquecidos em termobloco a 100°C durante 10 minutos (min). Após atingir a temperatura ambiente, em cada *ependorf* foram adicionados 900 μL de água ultra-pura, os quais foram homogeneizados em agitador *vortex* durante 5 a 10 s. Após, os mesmos foram submetidos a centrifugação a 12000 rpm ($17,310 \times g$) durante 10 min. Separou-se então o sobrenadante, equivalente ao DNA bacteriano. As amostras permaneceram armazenadas no -80°C até a realização da técnica da PCR.

4.6.2 Amplificação do 16S RNAr

Após extração do DNA, foi realizado a pesquisa do gene 16S RNAr, de acordo com Arciola et al. (2005) e Solati et al. (2015), considerado o método de referência para verificar a presença de DNA bacteriano. A sequência do *primer* utilizada foi 5'-GTAGTCCACGCCGTA AAC-3' e 5'-TAAACCACATGCTCCACC-3, customizado por GBT Oligos[®].

O processo de amplificação consistiu em 30 ciclos sendo, desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 55°C por 30 s, extensão da cadeia de DNA a 72°C por 30 s, e 1 ciclo de extensão final a 72°C por 5 min. Para cada reação de amplificação foram incluídos 18,05 µL de água Milli-Q estéril, 2,5 µL de tampão 10x (Ludwig-Biotec®), 0,75 µL de MgCl₂ 50mM (Ludwig-Biotec®), 0,5 µL de dNTP 100 Mm (Ludwig-Biotec®), 0,5 µL F + 0,5 µL R de *primer*, 0,2 µL de TAQ 5U/mL (Ludwig-Biotec®), e 2 µL de DNA, com um volume final de 25 µL por amostra. As reações de amplificação ocorreram no termociclador modelo 2720 - Thermal Cyclor, Biosystems.

4.6.3 Teste para detecção dos genes *icaA*, *icaC* e *icaD*

A pesquisa dos genes produtores de biofilme (*icaA*, *icaC* e *icaD*), seguiram conforme o descrito por Arciola et al. (2005) e Solati et al. (2015). Os pares de *primers* foram customizados por GBT Oligos® e o acesso ao *GenBank* sob o número U43366.1. A sequencia do *primer icaA* utilizada foi 5'-ACAGTCGCTACGAAAAGAAA-3' e 5'-GGAAATGCCATAATGACAAC-3; *icaC* 5'-TAACTTTAGGCGCATATGTTTT-3' e 5'-TTCCAGTTAGGCTGGTATTG-3; e *icaD* 5'-ATGGTCAAGCCCAGACAGAG-3' e 5'-CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA-3. O processo de amplificação iniciou-se a 94 °C durante 5 min para o primeiro ciclo, seguido de 50 ciclos de desnaturação a 94 °C durante 30 s, anelamento dos *primers* a 55,5 °C durante 30s e extensão a 72 °C por 30s. Após completar os 50 ciclos a extensão final foi a 72 °C durante 1 min e resfriamento a 4 °C. Para cada reação de amplificação foram incluídos 17,05 µL de água Milli-Q estéril, 1,75 µL de tampão 10x (Ludwig-Biotec®), 0,75 µL de MgCl₂ 50mM (Ludwig-Biotec®), 2,0 µL de dNTP 100 Mm (Ludwig-Biotec®), 0,625 µL F + 0,625 µL R de *primer icaA*, *icaC* ou *icaD*, 0,2 µL de TAQ 5U/mL (Ludwig-Biotec®) e 2 µL de DNA, totalizando um volume final de 25 µL por amostra. Após, as reações de amplificação ocorreram no termociclador modelo 2720 - Thermal Cyclor, Biosystems.

4.6.4 Análise dos produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR)

A análise dos produtos da PCR ocorreu através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% (40 min, 4V/cm) em tampão TAE 1x (Tris, Acetato de Sódio, EDTA) com brometo de

etídio. Neste procedimento, foi adicionado a 8 μ L do produto da PCR, 2 μ L de corante (*loading buffer*) para comparação com o marcador de peso molecular (*ladder* de 100 pares de bases (100-1000 pb) da Ludwig (Biotec[®]). Após a corrida no gel, as bandas foram visualizadas no sistema de fotodocumentação KODAK DC 290, 1D (3.6).

4.7 SEQUENCIAÇÃO TOTAL DO GENOMA (WGS)

O WGS foi realizado no Laboratório de Evolução Bacteriana e Epidemiologia Molecular do Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier (ITQB) da Universidade Nova de Lisboa (NOVA), em Oeiras, Portugal, pelo Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE)/CAPES sob orientação no exterior da Prof^a Dr^a Maria Miragaia.

4.7.1 Isolados bacterianos

Para realização da WGS, foram selecionados isolados de *S. epidermidis* (n=80), por serem os prevalentes, coletados entre 2016/2017, por constituírem as amostras mais recentes. Estes, foram identificados através do sistema automatizado VITEK[®]2-bioMérieux e posteriormente as espécies confirmadas pelo gene *tuf* e sequenciamento de Sanger.

Os isolados foram enviados para o Laboratório de Evolução Bacteriana e Epidemiologia Molecular, ITQB-NOVA, Oeiras, Portugal em *swabs* contendo meio de *Amies*, os quais foram semeados em TSA (Becton, Dickinson & Co, New Jersey, EUA) e meio de ágar manitol. Posteriormente, foram incubados em estufa bacteriológica a 35 ± 2 °C por 48 h. Os isolados que apresentaram crescimento em TSA foram armazenados em TSB acrescido de 15% de glicerol, a -80 °C, sendo designados “culturas originais”. Os que apresentaram crescimento em manitol foram semeados para TSA, e incubados em estufa bacteriológica a 35 ± 2 °C por 48 h. O crescimento de cada placa foi conservado em TSB acrescido de 15% de glicerol a -80 °C, designados “duplicados”, e utilizados posteriormente para realização dos testes.

4.7.2 Extração do ácido desoxirribonucleico (DNA)

A extração do DNA genômico bacteriano foi realizada utilizando o kit DNeasy (Qiagen, Valencia, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram plaqueadas em TSA e incubadas em estufa bacteriológica a 35 ± 2 °C por 48 h. Em seguida, uma colônia isolada foi repassada para tubos contendo TSB, as quais ficaram sob rotação na estufa bacteriológica a 35 ± 2 °C por 16 a 20 h. Da cultura *overnight* foram retirados 500 µL da suspensão bacteriana, colocados em tubos *ependorfs* e centrifugados a 8000 rpm por 10 min. Foi removido o sobrenadante e adicionados 180 µL de tampão de lise enzimática (180 µL de LP1 (200 µL de TE 100x, 120 µL de triton, 9.680 µL de H₂O), 3 µL de RNASE (10 µL/mL), 10 µL de lisostofina (10 µL/mL), e 5 µL de lisozima (20 µL/mL)), homogeneizando a mistura no vortex. Em seguida os tubos foram incubados a 37° C por 60 min. Após a incubação, foi adicionado 25 µL de pteínase K e homogeneizou-se no vortex, seguido da adição de 200 µL de buffer AL (fornecido pelo fabricante), homogeinizando no vortex, os quais foram incubados a 56°C por 60 min. Em seguida, foram adicionados 200 µL de etanol 96%, homogeneizados no vortex.

Após, todo conteúdo dos *ependorfs* foi repassado para os tubos contendo as colunas, provenientes do kit, e centrifugados a 8000 rpm por 1 min. Descartou-se o tubo e a coluna foi repassada a um novo tubo, onde foram adicionados 500 µL de *buffer* AW1 (fornecido pelo fabricante), e centrifugados a 8000 rpm por 1 min. Em seguida, descartou-se o tubo novamente e a coluna foi repassada a um novo tubo onde foram adicionados 500 µL de *buffer* AW2, o qual foi centrifugado a 14000 rpm por 3 min. Posteriormente, a coluna foi repassada para tubos *ependorfs* de 1,5 mL (1ª passagem); adicionados 50 µL de Tris HCl 10mM, deixando a temperatura ambiente por 1 min e procedendo a centrifugação a 8000 rpm por 1 min. Este procedimento da adição de Tris HCl 10 mM foi repetido nas mesmas condições, tendo os produtos de cada uma das eluições armazenados a -20 °C para posterior quantificação do DNA.

4.7.3 Quantificação do ácido desoxirribonucleico (DNA)

O DNA foi quantificado utilizando espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.), utilizando água Milli-Q como branco. A pureza do

DNA foi verificada de acordo com os a relação 260/280 e 260/230. As amostras foram selecionadas para prosseguir para o sequenciamento quando os índices foram de 1,8 a 2,0 para relação 260/280 nm, e $\geq 1,8$ para 260/230 nm. Relações de pureza diferentes podem indicar a presença de proteínas, fenol ou outros contaminantes que absorvem fortemente em ou perto do comprimento de onda de 280 nm.

4.7.4 Confirmação das espécies em *Staphylococcus epidermidis*

A confirmação das espécies em *S. epidermidis* foi realizada através do sequenciamento do gene *tuf*, pelo método de Sanger conforme Martineau et al., 2001.

4.7.5 Teste genotípico para detecção do gene *tuf*

A pesquisa do gene *tuf* seguiu conforme o descrito por Martineau et al., 2001. O processo de amplificação iniciou a 94 °C durante 4 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C durante 30 s, anelamento dos *primers* a 37 °C durante 45s e extensão a 72 °C por 1 min. Após completar os 35 ciclos a extensão final foi a 72 °C durante 10 min e resfriamento a 16 °C. Para cada reação de amplificação foram incluídos 25,75 μ L de água Milli-Q estéril, 10 μ L de PCR *buffer* 10 x, 4 μ L de dNTP 2mM, 3 μ L de MgCl₂, 1 μ L F + 1 μ L R de *primer* 20 pmol/ μ L, 0,25 μ L de GoTaq 0,025 U/ μ L e 5 μ L de DNA (diluição 1:50), totalizando um volume final de 50 μ L por amostra. Após, as reações de amplificação ocorreram no termociclador modelo T100™ Thermal Cycler, Biorad.

4.7.6 Análise dos produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR)

A visualização dos produtos da PCR ocorreu através de eletroforese em gel de agarose a 1% (45 min, 4V/cm) em tampão TAE 1x (Tris, Acetato de Sódio, EDTA). No gel foi adicionado 2 μ L do produto da PCR e o marcador de peso molecular (Gene ruler 1Kb, Fermentas, Waltham, Massachusetts, EUA). Após a corrida no gel, as bandas foram visualizadas no sistema de fotodocumentação Gel Doc™, BioRad.

4.7.7 Purificação do produto da PCR (Reação em cadeia da polimerase)

A purificação do produto da PCR foi realizada com o kit High Pure PCR Product Purification, seguindo as recomendações do fabricante. Em tubos *eppendorfs* foram adicionados 50 μ l do produto da PCR (gene *tuf*) a 250 μ L de *binding buffer*, os quais foram homogeneizados em vortex. A mistura foi transferida para uma coluna com um tubo, onde foram centrifugados por 1 min a 13.000 rpm e a mistura descartada. Após, na mesma coluna 500 μ L de *wash buffer* foram adicionados e centrifugados por 1 min a 13.000 rpm, e a mistura descartada. O último procedimento repetiu-se com a adição de 200 μ L de *wash buffer*. Após, na coluna foram adicionados 50 μ L de *elution buffer*, e centrifugados por 1 min a 13.000 rpm. Guardou-se o produto para realização do sequenciamento de Sanger.

4.7.8 Sequenciamento de Sanger

Para o sequenciamento de Sanger foi utilizado 5 μ L do DNA purificado, juntamente de 5 μ L dos *primers* utilizados no *tuf* (*forward* e *reverse*), a uma concentração de 5 pmol. Os produtos foram sequenciados através de serviço externo pela Eurofins Genomics, Konstanz, Germany. As sequências foram analisadas através do programa *SeqMan* (DNASTAR, Madison, Wisconsin, EUA), sendo os respectivos alinhamentos submetidos à base de dados *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) para comparação.

4.7.9 Diluição, quantificação e qualidade do ácido desoxirribonucleico (DNA)

O DNA genômico foi preparado de acordo com as indicações da unidade de sequenciação. O mesmo, conforme item 4.7.3, foi quantificado através da leitura espectrofotométrica (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.). Foi verificada a pureza do DNA através da leitura dos raios, sendo que entre 1,8 a 2,0 para a razão 260/280 nm e $\geq 1,8$ para 260/230nm foram considerados puros.

Em seguida foi realizada a quantificação do DNA através da leitura no QUBIT® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.) *system*, utilizando o kit Qubit dsDNA HS Assay seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram preparadas e enviadas para a unidade de sequenciação, contendo entre 10 a 20 ng/ μ l.

Ainda, para verificar se ocorreu a degradação do DNA, foi realizado a eletroforese em gel de agarose a 1% (45 minutos, 4V/cm) em tampão TAE 1x (Tris, Acetato de Sódio, EDTA). Neste procedimento, foi adicionado a 2 µL do DNA, 2 µL de corante (*loading buffer*) para comparação com o marcador de peso molecular Gene ruler 1Kb plus (Fermentas, Waltham, Massachusetts, EUA). Após a corrida no gel, o DNA foi visualizado no sistema de fotodocumentação Gel Doc™ (BioRad, Hercules, California, U.S.A.).

4.7.10 Sequenciação total do genoma (WGS)

As bibliotecas genômicas foram preparadas empregando o kit Nextera XT (*paired end*), e a sequenciação efetuada utilizando a plataforma NexSeq da Illumina, Inc. (San Diego, California, U.S.), através de serviço externo.

As leituras de sequenciação (*reads*) foram utilizadas para a construção do genoma de cada isolado. Para esse efeito foi utilizado uma *pipeline* (INNUca) (<https://github.com/B-UMMI/INNUca>) que realizou o controle de qualidade das leituras, a construção de novo do genoma, verificação da qualidade das construções realizadas (*contigs*), e determinação do respectivo ST da espécie. Os genomas reconstruídos (*draft genomes*) foram submetidos a diferentes bases de dados para determinação do tipo de SCC*mec*, bem como do respectivo conteúdo genético em genes de resistência aos antimicrobianos e genes de virulência.

Para esta pesquisa foi utilizado um mínimo de identidade de 90% e 60% de cobertura, tendo-se recorrido às seguintes ferramentas e bases de dados: ABRicate (<https://github.com/tseemann/abricate>), empregando as bases de dados *ResFinder* (ZANKARI et al., 2012) e CARD (JIA et al., 2017) para a detecção da resistência aos antimicrobianos (data da última atualização das base de dados, 25 de Outubro de 2018); base de dados própria para pesquisa dos genes de virulência de *S. epidermidis*; SCC*mec*Finder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/SCCmecFinder/>) para determinação do elemento genético móvel responsável pelo transporte do gene *mecA*.

A determinação das relações filogenéticas entre os isolados foi realizada através do programa CSI *Phylogeny* (ROLF et al., 2014), no qual foram determinadas as diferenças (SNP, *single nucleotide polymorphism*) em relação a uma cepa padrão referência (RP62A). Os resultados da filogenia, bem como os metadados associados aos isolados, foram visualizados no programa Microreact (ARGIMÓN et al., 2016).

4.8 EFEITO ANTIBACTERIANO *in vitro*

4.8.1 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana *in vitro* foi avaliada frente a diferentes cepas ATCC, incluindo *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Enterobacter hormaechei* ATCC 700323, *Enterococcus casseliflavus* ATCC 700327, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Micrococcus luteus* ATCC 7468, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Salmonella* spp. ATCC 52117, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* BAA 1026, *S. aureus* BAA 976, *S. aureus* BAA 977, *S. epidermidis* ATCC 12228 e frente a dez isolados de SCoN, escolhidos aleatoriamente.

Os dez SCoN foram identificados com os números entre 1 a 10, sendo as espécies dos isolados 1 e 10, *S. hominis*; 2, 3, 4, 5, 7, 9, *S. epidermidis*; 6, *S. saprophyticus*; e 8, *S. capitis*. Na Tabela 2 encontra-se o perfil de suscetibilidade de cada um destes isolados.

Ainda, foi realizada a atividade antibacteriana da atorvastatina e sinvastatina frente aos demais SCoN (2014; 2016/2017).

Tabela 2 – Perfil de suscetibilidade dos dez isolados de *Staphylococcus* coagulase negativos (SCoN) (2014) em que foram testados atorvastatina, sinvastatina, o composto triazeno, seus ligantes e precursores.

Antimicrobianos testados	Isolados									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Clindamicina	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S
Ciprofloxacino	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Eritromicina	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
Gentamicina	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Linezolida	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Oxacilina	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S
Penicilina	S	R	R	R	S	S	S	S	R	S
Sulfametoxazol/trimetoprim	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S
Teicoplanina	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Tigeciclina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Vancomicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Isolado 1, 10 = *Staphylococcus hominis*; Isolado 2, 3, 4, 5, 7, 9 = *Staphylococcus epidermidis*; Isolado 6 = *Staphylococcus saprophyticus*; Isolado 8 = *Staphylococcus capitis*; R= resistente; S = sensível.

4.8.2 Triazenos (TZC)

Os compostos TZC foram previamente sintetizados e caracterizados quimicamente no Núcleo de Investigação de Triazenos e Complexos (NiTrico) da UFSM. O complexo TZC {[1-(4-bromofenil)-3-feniltriazenido N_3 -óxido- $\kappa^2 N^1, O^4$](dimetilbenzilamina- $\kappa^2 C^1, N^4$)paládio(II)} (Pd(dmba)LBr) e o ligante 1-fenil-3-(4-bromofenil)triazeno N1-hidróxido (HLBr) apresentavam-se na forma de cristais. O complexo TZC mostrando coloração amarela, peso molecular = 531,72 g/mol, solúvel em etanol, dimetilsulfóxido (DMSO) e metanol. O ligante HLBr com coloração vermelho-alaranjados, peso molecular = 292,14 g/mol, solúvel em etanol e DMSO. Já o ligante dimetilbenzilamina (dmba), transparente e líquido; e o precursor ([Pd(dmba)(μ -Cl)]₂), peso molecular: 552,14 g/mol, solúvel em etanol. Os mesmos foram testados frente a cepas *American Type Culture Collection* (ATCC) e a dez isolados clínicos de SCoN (2014).

4.8.3 Estatinas

As estatinas (atorvastatina e sinvastatina) foram adquiridas comercialmente da Sigma-Aldrich[®], padrões da farmacopeia europeia, ambas solúveis em DMSO e etanol.

4.8.4 Diluição dos compostos

Os compostos TZC e as estatinas foram diluídos em 100% de etanol na concentração 20.480 μ g/ mL e após foram realizadas sucessivas diluições nas concentrações de 1.024 a 1 μ g/mL. Também foram realizados testes utilizando somente etanol a fim de demonstrar que ele não interferiu na atividade.

4.8.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

As amostras que estavam armazenadas no glicerol 15% a temperatura de -80°C foram repicadas em placas contendo TSA e foram incubadas em estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h. Após, os testes para avaliar a CIM foram determinados de acordo com o documento M07-A9 do CLSI (CLSI, 2012).

Nas placas de 96 poços, fundo em “U”, foram adicionados 180 µL de caldo MH nos primeiros poços (Coluna 1, linhas A a H) e nos demais 100 µL. Após, 20 µL do composto foi adicionado nos primeiros poços e realizadas sucessivas diluições nas concentrações de 1.024 a 1 µg/mL. Em seguida, foi preparado o inóculo bacteriano das amostras, em caldo MH, medidos em espectrofotômetro, equivalentes a escala 0,5 de *McFarland* (1×10^8 UFC/mL). Posteriormente, 100 µL do inóculo foi dispensado em cada poço, exceto no controle do meio. As placas contendo os microrganismos e os compostos foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h. A CIM foi determinada visualmente, como a menor concentração que inibiu completamente o crescimento dos microrganismos nos poços de diluição. Para o controle e comparação determinou-se a CIM da tigeciclina (Tygacil® - Wyeth). Este antimicrobiano foi diluído em solução fisiológica estéril na concentração de 5.120 µg/mL e após foram realizadas sucessivas diluições nas concentrações de 256 a 0,25 µg/mL.

4.9 EFEITO ANTIBIOFILME *in vitro*

Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Evolução Bacteriana e Epidemiologia Molecular, ITQB-NOVA, Oeiras, Portugal.

4.9.1 Estatinas

As estatinas foram adquiridas comercialmente da Sigma-Aldrich®, padrão analítico. A atorvastatina, fórmula $C_{33}H_{34}FN_2O_5$, com grau de pureza $\geq 98\%$ (HPLC). A sinvastatina, fórmula $C_{25}H_{38}O_5$, com grau de pureza $\geq 97\%$ (HPLC), ambas solúveis em DMSO.

4.9.2 Diluição dos compostos

As estatinas foram diluídas em 100% de DMSO na concentração 1.024 µg/mL e após foram realizadas sucessivas diluições nas concentrações de 512 a 2 µg/mL. Também foram realizados testes utilizando somente DMSO a fim de demonstrar que ele não interferiu na atividade.

4.9.3 Ativação da sinvastatina

Conforme recomendação da Sigma-Aldrich[®], a sinvastatina, por ser uma pró-droga foi ativada de acordo com Sadeghi et al. (2000). Foram adicionados 150 µL de NaOH 0,1N a 390 µL de sinvastatina, já diluída em DMSO (concentração de 1.024 µg/mL). A mistura foi homogeneizada e colocada a 50°C por 2 h. O pH foi medido e ajustado a 7,0, e a concentração ajustada a 1 mL de volume final. Também foram realizados testes utilizando o material de ativação da sinvastatina com a finalidade de demonstrar que o mesmo não interferiu na atividade. Esta técnica foi realizada em triplicata.

4.9.4 Atividade antibiofilme

A atividade antibiofilme *in vitro* foi avaliada de acordo com Steven e Timothy (2010) frente a uma coleção representativa de *S. epidermidis* da Unidade de patógenos Humanos, ITQB-NOVA (Espadinha *et al.*, dados ainda não publicados) em grau decrescente da produção de biofilme. As amostras testadas para atorvastatina e sinvastatina ativada foram *S. epidermidis* isoladas de colonização e infecção, de diversos espécimes clínicos, identificados como: URU23, ICE95, 619N2, CV28, GRE41, DEN61, 619N1, DEN69, 1290N, CV20, HFA6228, GRE34, HFA6096, 790N, DEN161, 966N, AGT24, 1076NL, ITL299, DEN22, 1243N. Ainda, a atorvastatina foi testada para os isolados 148N, BUG46, JAP271 e MEX60.

As amostras que estavam armazenadas em meio TSB suplementado com glicerol 15%, a temperatura de -80°C foram repicadas em TSA e foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 ± 2°C por 24 h. Após, uma colônia foi retirada e transferida para um tubo com TSB suplementado com glicose 1%, e incubadas em estufa bacteriológica sob rotação a 35 ± 2°C por 16 h. Posteriormente, preparou-se o inóculo das suspensão em TSB e glicose 1% equivalentes a escala 0,5 de *McFarland* (1 x 10⁸ UFC/mL), medidos em espectrofotômetro. Em seguida, nas placas de fundo chato de 96 poços (Corning Costar), foram adicionados 180 µL de TSB e 1% de glicose nos primeiros poços e nos demais 100 µL. Após, 20 µL do composto (atorvastatina) foi adicionado nos primeiros poços e realizadas sucessivas diluições nas concentrações de 512 a 1 µg/mL. Em seguida, 100 µL do inóculo foi dispensado em cada poço. As placas contendo os microrganismos e os compostos foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h.

Após o tempo de incubação, foi realizada a leitura da DO do conteúdo de cada poço da placa, sem a tampa, a um comprimento de onda de 600 nm (TECAN Infinite PRO, Männedorf, Zürich, Switzerland). Posteriormente, removeu-se o conteúdo de cada poço, os quais foram lavados quatro vezes com água deionizada. A seguir, as placas foram incubadas em estufa a 60 °C por 60 min para fixação do biofilme. Após, os poços foram corados com 50 µL de cristal violeta 0,06 % por 5 min a 60 °C. Em seguida, o corante foi retirado, lavando as placas novamente em água deionizada quatro vezes. Em cada poço foi adicionado 200 µL de ácido acético a 30%, e realizado a leitura da DO a 600 nm. O controle do meio foi realizado utilizando TSB estéril com 1% de glicose, no qual todo procedimento foi realizado conforme as condições citadas anteriormente, sem a adição de microrganismos. Após, a média dos valores foram calculadas, bem como o desvio padrão para cada amostra. Para a sinvastatina devido a ativação, para manter a concentração inicial de 512 µg/mL no primeiro foram adicionados 51,2 µL da sinvastatina ativada para 148,8 µL de TSB com 1% de glicose. Esta técnica foi realizada em triplicata e também para os controles: positivo (*S. aureus* ATCC 29213) e negativo (*S. epidermidis* ATCC 12228).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O cálculo do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (FICI) foi realizado para verificar se houve sinergismo entre os TZC e as estatinas de acordo com Konaté et al. (2012) e Odds (2003). Para comparação de metodologias foi calculado a sensibilidade, especificidade e acurácia dos métodos, considerando a PCR como o padrão, bem como o valor preditivo positivo e negativo de cada método. Para a avaliação da concordância entre as metodologias foi utilizado o índice Kappa (OLIVEIRA, CUNHA, 2010; VAZ et al., 2007).

4.11 CONCEITOS ÉTICOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFSM sob o número 38850614.4.0000.5346.

5 RESULTADOS

Os resultados desta tese de doutorado estão apresentados na forma de publicações científicas: manuscritos e artigos. Para o melhor entendimento dos dados, primeiramente será apresentado o Manuscrito 1, intitulado “*Coagulase-negative staphylococci isolates from blood cultures of newborns in a tertiary hospital in southern Brazil*”, o qual teve como objetivo avaliar SCoN isolados nos anos de 2014 e 2016/2017, além de verificar alguns parâmetros clínicos dos RN em que houve o isolamento de SCoN; após, o Artigo 1 intitulado “*Assessment of different methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures of newborns*”, cujo objetivo foi avaliar a produção de biofilme através de três técnicas fenotípicas e verificar a presença dos genes *icaACD* nos SCoN isolados em 2014; em seguida o Manuscrito 2 intitulado “*Epidemiologia molecular de Staphylococcus epidermidis na sepse neonatal*”, cujo objetivo foi caracterizar a epidemiologia molecular dos *S. epidermidis* isolados no ano de 2016/2017, determinando os ST, *SCCmec*, genes de resistência e de virulência; e após o Artigo 2, intitulado “*Synergistic antibacterial effect of statins with the complex {[1-(4-bromophenyl)-3-phenyltriazene N₃-oxide-κ² N¹, O⁴](dimethylbenzylamine-κ² C¹, N⁴)palladium(II)}*”, onde foi realizada a CIM de um composto TZC, seus ligantes e precursores, associados a estatinas (atorvastatina e sinvastatina), frente a cepas ATCC e também a dez SCoN isolados em 2014.

Optou-se por esta organização entre os manuscritos e artigos para uma melhor compreensão dos resultados, sendo que, o primeiro manuscrito abrange todos os SCoN coletados para este estudo (2014, 2016/2017); o Artigo 1, isolados do ano de 2014; o Manuscrito 2, *S. epidermidis* coletados no ano de 2016/2017; e o Artigo 2 testa um composto inédito TZC e as estatinas frente a cepas ATCC e dez isolados de SCoN coletados em 2014.

Ainda, nos resultados adicionais estão os dados referentes a confirmação das espécies de *S. epidermidis* pelo gene *tuf*, os resultados da CIM das estatinas testadas separadamente em todos os SCoN (2014; 2016/2017); e atividade antibiofilme das estatinas frente a *S. epidermidis*.

5.1 MANUSCRITO 1

O manuscrito foi submetido ao periódico *The Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* (ISSN 2175-9790), qualis capes 2013-2016 B2, na forma de artigo original.e encontra-se em avaliação.

Coagulase-negative staphylococci isolates from blood cultures of newborns in a tertiary hospital in southern Brazil

Running title: Coagulase-negative staphylococci of newborns

Roberta F. Rampelotto^{1,2}, Silvana S. Coelho^{1,2}, Laísa N. Franco^{1,2}; Augusto D. da Mota^{1,2};
Luciano F. Calegari³; Rosmari Hörner^{1,2*}

¹ *Department of Clinical and Toxicological Analysis, Health Sciences Center, University Federal of Santa Maria,* ² *Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Health Sciences Center, University Federal of Santa Maria,* ³ *University Hospital of Santa Maria, University Federal of Santa Maria.*

***Correspondence:**

R. Hörner

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Avenida Roraima, número 1000 – Prédio 26 – salas 1201/1205

CEP: 97105-900 - Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

Fone: 55 3220 8751 - FAX: 55 3220 1880.

Email: rosmari.ufsm@gmail.com

Acknowledgments: We thank all the staff of the Archive and the Laboratory of Clinical Analysis of the Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM).

Financial Support: CAPES.

Coagulase-negative staphylococci isolates from blood cultures of newborns in a tertiary hospital in southern Brazil

Running title: Coagulase-negative staphylococci in neonatal sepsis

ABSTRACT

Neonatal sepsis continues to be a major cause of morbidity and mortality, being Coagulase-negative staphylococci (CoNS) the main agents isolated. The aim of this study was evaluate CoNS isolated from blood cultures of newborns (NB) in two years of study (2014, 2016/2017) in a tertiary hospital in southern Brazil. The microorganisms were identified and had the sensitivity profile performed through VITEK®2-bioMérieux, and the susceptibility to linezolid, tigecycline and vancomycin were also performed with the minimum inhibitory concentration (MIC). Clinical parameters and mortality rates of the NB were evaluated. In 2014, 176 CoNS were isolated from 131 patients; in 2016/2017 120 and 79, respectively, being *Staphylococcus epidermidis* the prevalent. Resistance rates increased when compared 2014 to 2016/2017, especially to penicillin (71.26% and 99.17%) and oxacillin (76% and 84.17%). The isolates presented 100% susceptibility to linezolid, tigecycline and vancomycin. In 2014, 53.44% of the NB received antibiotic therapy, and of these, 77.14% used catheter; already in 2016/2017 the indexes were 78.48% and 95.16% respectively. In 2014, 15.71% of the NB died and in 2016/2017, 17.74%. *S. epidermidis* was the predominant microorganism, being in most cases related to catheter use. Over the years, rates of resistance increased, evidencing the importance of adopting control and prevention measures in this hospital. CoNS were significant pathogens in neonatal sepsis, responsible for important mortality rates.

Uniterms: *Staphylococcus epidermidis*, Sepsis, Microbial Sensitivity Tests, Mortality

INTRODUCTION

Despite the advances in prenatal care, neonatal sepsis continues to be a major cause of morbidity and mortality, with an estimated of more than 400,000 deaths annually worldwide (Liu *et al.*, 2017; Arayici *et al.*, 2019). Its incidence varies by geographic region, reflecting differences in resources, maternal and child risk factors and prevention strategies, and it is one of the most common neonatal diseases, even in countries with high levels of development (Shane *et al.*, 2017).

The precise identification of neonatal sepsis is a challenge, since the signs and symptoms are not specific and can be confused with other pathologies of the own age (Tzialla *et al.*, 2015; Arayici *et al.*, 2019; Shane *et al.*, 2017). Blood culture is considered the gold standard for the identification of sepsis, but has some limitations for early diagnosis, such as the time of positivity (48 to 72 hours (h)), and may be influenced by blood volume, antimicrobial administration and other factors (Memar *et al.*, 2017; Arayici *et al.*, 2019). Thus, clinical and laboratory evaluation, including collection of blood cultures, as well as the use of biomarkers in sepsis, such as blood counts, lactate and C-reactive protein (CRP), are important, improving the diagnosis and therapeutic management of these infections (Memar *et al.*, 2017; Arayici *et al.*, 2019)

Coagulase-negative staphylococci (CoNS), which are part of the normal skin microbiota, are among the main agents isolated from blood cultures in the neonatal period, especially in Neonatal Intensive Care Units (NICU), being *Staphylococcus epidermidis* found in 50 to 80% of cases (Namvar *et al.*, 2017; Cantey *et al.*, 2018; Dong *et al.*, 2018). Infections caused by CoNS are usually associated with health care and the use of invasive medical devices, presenting important virulence factors, including bacterial resistance (Tzialla *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2019).

The capacity of CoNS to develop resistance to antibacterials has increased dramatically in recent years, representing a growing concern for public health, since treatment options are increasingly restricted because of the rapid emergence and spread of multiresistant microorganisms (MDR) (Tzialla *et al.*, 2015; Namvar *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2019). In addition, neonatal units are common sites for the development and transmission of MDR pathogens, where antimicrobials are the most prescribed drugs (Tzialla *et al.*, 2015). Among the resistance developed by CoNS, the most frequent is to methicillin/oxacillin (MRSCoN),

which may confer resistance to all beta-lactam antimicrobials. However, microorganisms with reduced susceptibility and even resistant to vancomycin and linezolid have been described, drugs used to treat MRSCoN isolates (Gu *et al.*, 2013; Pinheiro *et al.*, 2016).

The objective of this study was evaluate CoNS isolated from NB blood cultures collected between 2014 and 2016/2017 in a tertiary hospital in southern Brazil, and also the evaluation of some clinical parameters of these patients.

MATERIALS AND METHODS

PLACE AND DURATION OF STUDY

This study was conducted at Laboratório de Bacteriologia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde of Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul. Samples were isolated in a tertiary hospital in southern Brazil and obtained during a two-year period (January to December of 2014; and July 2016 to July 2017).

ISOLATES

The isolates were collected prospectively from blood cultures of NB hospitalized in a tertiary hospital located in southern Brazil, in the year 2014 (January to December) and from July 2016 to July 2017 (2016/2017). The samples were processed according to the Standard Operating Procedure of the Clinical Analysis Laboratory of the referred hospital, including the guidelines of the Infectious Diseases Society of America (IDSA) (Miller *et al.*, 2018). The isolates were processed through the automatized system BACTEC 9240® (Becton, Dickson, Spark, MD). The tests for species-level identification were performed with the automated system Vitek® 2 (bioMérieux, France).

The blood cultures in which there was the growth of CoNS were subsequently sent to Laboratório de Bacteriologia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde at UFSM, where they were sowed in *Tryptone Soya Agar* (TSA), incubated at 35 ± 2 °C for 18 to 24 h. The colonies were stored in *Tryptone Soya Broth* (TSB) with 15% glycerol and kept at -80°C for subsequent test performance.

SENSITIVITY PROFILE

AUTOMATED METHODOLOGY

The sensitivity profiles against antimicrobials were performed with the automated system Vitek® 2 (bioMérieux, France) according to the manufacturer's recommendations. The antimicrobial agents clindamycin, ciprofloxacin, erythromycin, gentamicin, linezolid, oxacillin, penicillin, sulfamethoxazole/trimethoprim, teicoplanin, tigecycline and vancomycin were tested. Clinical isolates were classified in sensitive, intermediate and resistant according to Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) that were effective at the time of the study (CLSI, 2014, 2016, 2017), being the isolates with intermediate profile considered resistant.

BROTH MICRODILUTION

A broth microdilution technique was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) for the antimicrobials tigecycline, linezolid and vancomycin according to CLSI document M07-A9 (CLSI, 2012). The results were classified in sensitive, intermediate and resistant according to CLSI that were effective at the time of the study (CLSI, 2014, 2016, 2017), being the isolates with intermediate profile considered resistant.

BIOMARKERS IN SEPSIS

BLOOD COUNT

The blood count was performed using the Sysmex XE-5000™ apparatus as recommended by the manufacturer. Total blood was used with EDTA, evaluated by automated cell counting, and when necessary, complementary microscopy was performed. These data were collected through observational analysis of results obtained in the hospital records and were evaluated according to the microorganism and not per patient, since in the same request of the blood culture always the blood count is required. The interpretation was performed through the hematological score of Rodwell (1988). We consider a normal blood

count as “without” sepsis; leukocytosis as a “frequent factor” in sepsis; leucopenia a “poor prognosis”; neutrophilia and left deviation with young forms and granulations a “severity of infection”.

C-REACTIVE PROTEIN (CRP)

C-reactive protein (CRP) values were performed through the Dimension® Xpand® Plus device according to the manufacturer's recommendations at the referred hospital. Serum was used, evaluated by immuno-turbidimetry methodology (Reference value for inflammatory processes: <0.30 mg/dl). These data were collected through observational analysis of results obtained in the hospital records and were also evaluated according to the microorganism, since in the request of blood culture is always requested the CRP.

CLINICAL SIGNIFICANCE AND MORTALITY RATES

These data were collected through the analysis of the paste of each NB, which were requested through the identification number of each patient. Thus, it can be observed that the isolation of CoNS in blood culture was considered a colonization or infection and if it was related to the use of catheter. In addition, it was also observed whether the NB were discharged from the hospital or died.

STATISTICAL ANALYSIS

For the evaluation of the agreement between the methodologies, the Kappa index was used (Vaz *et al.*, 2007).

ETHICAL CONSIDERATIONS

This study was approved by the Ethical Research Committee of the Universidade Federal de Santa Maria under n° 38850614.4.0000.5346.

RESULTS

In 2014, 131 patients were admitted to the referred hospital, of which 176 CoNS were collected; and in the period from July 2016 to July 2017 these rates were of 79 patients and 120 isolates. Among the CoNS, in 2014 the prevalent species was *Staphylococcus epidermidis* (56.82%, 100/176), followed by *Staphylococcus warneri* (9.66%, 17/176) (**Table 1**). In 2016/2017 *S. epidermidis* (66.67%, 80/120) was also the prevalent specie, followed by *Staphylococcus haemolyticus* (10%, 12/120) and *Staphylococcus hominis* (10%, 12/120) (**Table 1**).

Also, in 2014, 6.87% (9/131) patients presented infection by CoNS associated with another microorganism: *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter complex*, *Enterococcus faecalis*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia* (n=2) and *Streptococcus pneumoniae*. As early as 2016/2017, 13.92% (11/79) of NB were affected by polymicrobial infections, with the isolation of *A. baumannii*, *E. faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* (n=2), *S. marcescens*, *S. maltophilia*, *S. maltophilia* and *Streptococcus agalactiae*, *S. agalactiae*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *K. pneumoniae*, and *Acinetobacter baumannii* and *S. marcescens*.

In relation to the hospital units where NB were admitted, in 2014, the NICU (61.36%, 108/176) was the sector where isolation was the most frequent, followed by the Obstetric Center (OC) (18.75%, 33/176); as well as in 2016/2017, where these were the two units in which the insulation prevailed, but with rates of 80.83% (97/120) and 9.17% (11/120), respectively (**Table 2**). These data were counted by means of the number of isolates, since the NB could have entered an area and subsequently was referred to another hospital unit.

In this study, through the automated methodology it can be observed that the isolates presented resistance to penicillin (71.26% in 2014; 99.17% in 2016/2017) and oxacillin (76% in 2014; 84.17% in 2016/2017) (**Table 3**). However, in both 2014 and 2016/2017 years, 100% sensitivity to linezolid, tigecycline and vancomycin were observed (**Table 3**). Moreover, teicoplanin showed high sensitivity, 98.09% in 2014, and 97.96% in 2016/2017.

The susceptibility profile of linezolid, tigecycline and vancomycin against to 176CoNS(2014) through the broth microdilution technique demonstrated MIC values of $\leq 2\mu\text{g/mL}$, $\leq 0,25\ \mu\text{g/mL}$ and $\leq 2\mu\text{g/mL}$, respectively; and of the 120 isolates (2016/2017), the

concentrations were $\leq 2\mu\text{g/mL}$, $\leq 0,5 \mu\text{g/mL}$ and $\leq 4\mu\text{g/mL}$, respectively, showing sensitivity to all isolates.

When comparing the microdilution methodology in broth with the automated system, the values of MIC presented by the automation were generally higher than that obtained by the microdilution method, but still considered as sensitive, presenting perfect agreement ($\kappa = 1$).

Regarding clinical significance, in 2014, of the 131 patients, 46.56% (61/131) were not treated and did not use invasive devices, which were admitted in the Ambulatory (AMB), Obstetric Center (OC) and in Gynecology and Obstetrics (GO). Moreover, of the treated patients (70/131), 77.14% (54/70) of the infections were related to the catheter. In 2016/2017, of the 79 patients admitted to the hospital, 21.52% (17/79) did not undergo treatment and did not use invasive devices who were also admitted to the AMB, OC and GO. Of the NB treated ($n = 62$), 95.16% (59/62) of the infections were related to the use of invasive devices.

The blood count in 2014 demonstrate that from the 131 patients (176 CoNS), 61.36% (131/176) were normal, 23.30% (41/176) presented leukocytosis, 7.95% (14/176) leucopenia, and 7.39% (13/176) neutrophilia and left deviation with young forms and granulations. In 2016/2017 from the 79 NB (120 isolates), these exam showed 35% (42/120) normal reference values, 55% (66/120) leukocytosis, 1.67% (2/120) leucopenia and 8.33% (10/120) neutrophilia and left deviation with young forms and granulations.

Regarding CRP, the mean was 0.15 ± 0.13 mg/dl for patients who developed CoNS and were untreated (61/176) and 1.41 ± 2.89 mg/dl considering the patients who had sepsis and received treatment (115/176). In 2016/2017 these rates were 0.27 ± 0.34 mg/dl for untreated patients (17/120) and 1.82 ± 2.94 mg/dl considering patients who had sepsis and consequently received treatment (103/120).

In relation to mortality rates, in 2014, 15.71% (11/70) of the NB died, and 84.29% (59/70) were discharged from hospital. In 2016/2017 these indices were 17.74% (11/62) and 82.26% (51/62) respectively. Of these, in 2014, three patients died of polymicrobial infections associated with Gram-negative microorganisms; already in 2016/2017 two patients.

DISCUSSION

Coagulase-negative staphylococci (CoNS) are among the most identified microorganisms in blood cultures in the neonatal period (Namvar *et al.*, 2017; Cantey *et al.*, 2018; Dong *et al.*, 2018). In this study, in 2014, of 131 patients, 176 CoNS were isolated, already in 2016/2017, these rates were 79 and 120 respectively. When comparing the year 2014 with 2016/2017, the number of isolates decreased, but we can not affirm, since we do not have access to the number of blood cultures requested. Among the CoNS, in both 2014 and 2016/2017 *S. epidermidis* was the prevalent, 56.82% and 66.67%, respectively, corroborating with other studies, since the rates of this species vary between 50 and 80% in infections (Namvar *et al.*, 2017; Cantey *et al.*, 2018; Dong *et al.*, 2018). A study carried out at the University Hospital of Örebro, Sweden, from 1987 to 2014, analyzing 332 CoNS isolated from blood cultures of NB also identified *S. epidermidis* as the predominant microorganism (67.4%), followed by *S. haemolyticus* (10.5%) and *S. capitis* (9.6%) (Ehlersson *et al.*, 2017). Dong *et al.* (2018) evaluated 96 cases of neonatal sepsis in the NICU of Bengbu Third People's Hospital in China from January (2010) to August (2014) and demonstrated that 70.10% (68/97) of blood cultures occurred the development of CoNS, which *S. epidermidis* was responsible for 44.3% (43/97) of the cases, followed by *S. haemolyticus* (14.4%, n = 14) and *S. hominis* (8.2%, n = 8). Ertugrul *et al.* (2016) conducted a study with blood cultures of NB at the NICU of the University Hospital of Dicle, Turkey between January 2011 to December 2014, in which CoNS were also the most prevalent, 34.07% (46/135), being *S. epidermidis* (60.87 % - 28/46) the most isolated.

CoNS, especially *S. epidermidis*, are bacteria that are present in the skin, thus, a possible explanation for these findings is that the migration of these microorganisms to the bloodstream occurs, which can be facilitated by the use of invasive devices (Berlak *et al.*, 2018). Still, some differences can be observed since their incidence can vary between different geographic regions and health units (Shane *et al.*, 2017).

In relation to the hospital sectors, the NICU was responsible for 61.36% of the isolation in 2014 and 80.83% in 2016/2017. Infections associated with health care acquired in NICU are mostly caused by CoNS, corroborating with data from this study (Bizzarro *et al.*, 2015; Namvar *et al.*, 2017; Cantey *et al.*, 2018; Dong *et al.*, 2018).

Regarding the susceptibility profile of the isolates in the study, of the CoNS that showed resistance, the percentage rates increased in practically all antimicrobial agents when compared 2014 to 2016/2017, highlighting the penicillin (71.26% in 2014), 99.17% in 2016/2017) and oxacillin (76% in 2014, 84.17% in 2016/2017). Dong *et al.* (2017) found high resistance rates for Gram-positive bacteria, 93.2% for penicillin, 90.0% for ampicillin, 84.7% for oxacillin and 81.1% for erythromycin.

Since most of the CoNS isolates show high resistance to beta-lactams, including penicillin and methicillin/oxacillin, vancomycin remains the drug for the treatment of these infections (Shane *et al.*, 2017). Dong *et al.* (2017) observed that all the isolates were sensitive to vancomycin, as well as in our research, where the antimicrobials linezolid, tigecycline and vancomycin presented 100% sensitivity in the different years of study and in the different methodologies tested. Furthermore, as to our knowledge, until the moment the isolation of CoNS with reduced susceptibility to vancomycin was not identified in this hospital.

In relation to clinical significance, in 2014, 53.44% (70/131) of the NB were treated, of which, 77.14% were related to the use of catheter. In 2016/2017, the indexes were 78.48% (62/79), and 95.16% (59/62), respectively. This fact is relevant since for a long time CoNS were considered colonizers of the skin, however, over the years they appeared as important nosocomial pathogens causing infections in patients with compromised or immature immune system, such as NB (Shane *et al.*, 2017; Heilmann *et al.*, 2018). Still, they are related to infections involving the use of invasive devices and the breakdown of the natural barrier of the skin, and can migrate to the bloodstream (Ertugrul *et al.*, 2016; Heilmann *et al.*, 2018).

Laboratory tests are also an important tool to aid in the diagnosis of neonatal sepsis, expressing a positive impact in reducing neonatal morbidity and mortality (Granzotto *et al.*, 2012). The blood count of NB usually presents innumerable information and its interpretation varies with the age and other characteristics of these patients (Aguiar *et al.*, 2015). Our research showed that in both 2014 and 2016/2017, the severity of the infection can not be related to the blood count, being that patients who had the infection and received antibiotic therapy had blood counts with normal reference values.

CRP is a protein synthesized by the liver and released rapidly after the onset of an inflammatory process, and has been used to monitor inflammatory and infectious diseases, being the most used marker in neonatal care worldwide (Lobo, 2012; Perrone *et al.*, 2017). In our study the mean CRP in 2014 was 0.15 ± 0.13 mg/dl for patients who did not receive

treatment and who developed CoNS, and 1.41 ± 2.89 mg/dl for patients who had sepsis and used antibiotics. In 2016/2017 these indices were 0.27 ± 0.34 mg/dl and 1.82 ± 2.94 mg/dl, respectively. Considering the two-year study, the NB in which the isolation of CoNS was considered to be infection, CRP values were higher, above 0.30mg/dl (RV), agreeing that CRP can be used as a biomarker in sepsis in NB. However, CRP when used for the prognosis of sepsis may present low specificity, since its levels may be elevated in other inflammatory processes (Perrone *et al.*, 2017).

Regarding mortality rates, the indices in 2014 were 15.71% and in 2016/2017, 17.74%. Of these, in 2014, three patients died of polymicrobial infections; already in 2016/2017 two patients. A study evaluating microorganisms isolated in blood cultures of NB, showed that 4.8% of the newborns died due to CoNS (Al-Taiar *et al.*, 2013). Cantey *et al.* (2018) showed that the mortality rate due to CoNS in neonatal sepsis was 1.6%, but in the multivariate analysis, this percentage was not significant. Lee *et al.* (2015) have shown that CoNS mortality rates can reach 9.4% in very low birth weight infants.

In this study it can be observed that in both 2014 and 2016/2017 *S. epidermidis* was the predominant microorganism in neonatal sepsis, and most cases are related to the use of catheters. The involvement of CoNS in infections is already well established in this hospital, in with resistance rates against most antimicrobials increased. Furthermore, CoNS demonstrate to be significant pathogens in neonatal sepsis, responsible for considerable mortality rates in NB.

CONFLICTS OF INTERESTS

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

Aguiar CF, Baldessar MZ, Dal-Bó K. Perfil hematológico dos neonatos admitidos em Unidade de Terapia Intensiva neonatal de um hospital no Sul do Brasil. **Rev AMRIGS**. 2015;59(4): 287-292.

Al-Taiar A, Hammoud MS, Cuiqing L, Lee JKF, Lui K, Nakwan N, et al. Neonatal infections in China, Malaysia, Hong Kong and Thailand. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed**. 2013;98:F249– 55. doi:10.1136/archdischild-2012-301767.

Arayici S, Şimşek GK, Canpolat FE, Oncel MY, Uras N, Oguz SS. Can Base Excess be Used for Prediction to Early Diagnosis of Neonatal Sepsis in Preterm Newborns? **Mediterr J Hematol Infect Dis**. 2019, 11(1): e2019014, doi:http://dx.doi.org/10.4084/MJHID.2019.014.

Berlak N, Shany E, Ben-Shimol S, Chertok IA, Goldinger G, Greenberg D, et al. Late onset sepsis: comparison between coagulase-negative staphylococci and other bacteria in the neonatal intensive care unit. **Infectious Diseases**. 2018. doi:10.1080/23744235.2018.1487075

Bizzarro MJ, Shabanova V, Baltimore RS, Dembry LM, Ehrenkranz RA, Gallagher PG. Neonatal sepsis 2004–2013: the rise and fall of coagulase-negative staphylococci. **J Pediatr (Rio J)**.2015;166:1193–99.

Cantey JB, Anderson KR ,Kalagiri RR, Mallett LH. Morbidity and mortality of coagulase-negative staphylococcal sepsis in very-low-birth-weight infants.**World J Pediatr**.2018. doi: https://doi.org/10.1007/s12519-018-0145-7

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).**Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-third informational supplement, document M100-S24**. Wayne, PA, USA: CLSI, 2014.

Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standart – Ninth edition,**

document M07-A9. Wayne, PA, USA: CLSI, 2012.

Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI).**Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-third informational supplement, document M100-S26.** Wayne, PA, USA: CLSI, 2016.

Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI).**Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-third informational supplement, document M100-S27.**Wayne, PA, USA: CLSI, 2017.

Dong H, Cao H, Zheng H. Pathogenic bacteria distributions and drug resistance analysis in 96 cases of neonatal sepsis. **BMC Pediatr.**2017;17:44. doi: 10.1186/s12887-017-0789-9.

Dong Y, Speer CP, Glaser K. Beyond sepsis: *Staphylococcus epidermidis* is an underestimated but significant contributor to neonatal morbidity. **Virulence.** 2018;9:1, 621-633. doi: 10.1080/21505594.2017.1419117.

Ehlersson G, Hellmark B, Svartström O, Stenmark B, Söderquist B. Phenotypic characterisation of coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures in newborn infants, with a special focus on *Staphylococcus capitis*. **ActaPaediatr.** 2017;106(10): 1576-1582. doi: 10.1111/apa.13950.

Ertugrul S, Aktar F, Yolbas I, Yilmaz A, Elbey B, Yildirim A, et al. Risk Factors for Health Care-Associated Bloodstream Infections in a Neonatal Intensive Care Unit. **Iran J Pediatr.** 2016;26(5):e5213. doi:10.5812/ijp.5213.

Granzotto JA, Fonseca SS, Lindemann FL. Fatoresrelacionados com a mortalidade neonatal em uma Unidade de Terapia Intensiva neonatal na região Sul do Brasil. **Rev AMRIGS.** 2012;56(1):57-62.

Gu B, Kelesidis T, Tsiodras S, Hindler J, Humphries RM. The emerging problem of linezolid-resistant *Staphylococcus*. **J Antimicrobial Chemotherapy**. 2013;68(1):4-11. doi: 10.1093/jac/dks354.

Heilmann C, Ziebuhr W, Becker K. Are coagulase-negative staphylococci virulent? **ClinMicrobiolInfect**. 2018. doi:10.1016/j.cmi.2018.11.012.

Jiang JH, Dexter C, Cameron DR, Monk IR, Baines SL, Abbott IJ, et al. Evolution of daptomycin resistance in Coagulase-negative staphylococci involves mutations of the essential two-component regulator WalKR. **Antimicrob Agents Chemother**. 2019;26;63(3). pii: e01926-18. doi: 10.1128/AAC.01926-18.

Lee SM, Chang M, Kim KS. Blood culture proven early onset sepsis and late onset sepsis in very-low-birthweight Infants in Korea. **J Korean Med Sci**. 2015;30(Suppl 1):S67–74. doi:10.3346/jkms.2015.30.S1.S67.

Liu L, Oza S, Hogan D, Chu Y, Perin J, Zhu J, Lawn JE, et al. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000-15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. **Lancet**. 2017;388(10063):3027–3035. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31593-8.

Lobo SM. Sequential C-reactive protein measurements in patients with serious infections: does it help? **Crit Care**. 2012;16(3):1-2. doi:10.1186/cc11347.

Memar MY, Alizadeh N, Varshochi M, Kafil HS. Immunologic biomarkers for diagnostic of Early-Onset Neonatal Sepsis. **J Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**. 2017; doi: 10.1080/14767058.2017.1366984.

Miller JM, Binnicker MJ, Campbell S, Carroll KC, Chapin KC, Gilligan PH, et al. A Guide to utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. **Clin Infect Dis**. 2018;67(6):e1–e94. doi: 10.1093/cid/ciy381

Namvar AE, Havaei SA, Azimi L, Lari AR, Rajabnia R. Molecular characterization of *Staphylococcus epidermidis* isolates collected from an intensive care unit. **Archives of Pediatric Infectious Diseases**.2017;5(2):e36176. doi: 10.5812/pedinfect.36176.

Perrone S, Lotti F, Longini M, Rossetti A, Bindi I, Bazzini F, Belvisi E, et al. Creactive protein in healthy term newborns during the first 48 hours of life. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed**. 2017;0:1–4. doi:10.1136/archdischild-2016-312506.

Pinheiro L, Brito CI, Pereira VC, Oliveira A, Bartolomeu AR, Camargo CH, Cunha MLRS. Susceptibility profile of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* isolated from blood cultures to vancomycin and novel antimicrobial drugs over a period of 12 years. **Microbial Drug Resistance**. 2016;22(4): 283-293. doi: 10.1089/mdr.2015.0064.

Rodwell RL, Leslie AL, Tudehope DI. Early diagnosis of neonatal sepsis using a hematologic scoring system.**J Pediatr (Rio J)**. 1988;112(5):761-7.

Shane AL, Sanchez PJ, Stoll BJ. Neonatal sepsis.**Lancet**. 2017;390:1770-80. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31002-4.

Tzialla C, Borghesi A, Serra G, Stronati M, Corsello G. Antimicrobial therapy in neonatal intensive care unit. **Italian J Pediatr**.2015;41(27):1-6. doi: 10.1186/s13052-015-0117-7.

Vaz AJ, Takei K, Bueno EC. Imunoensaios: Fundamentos e Aplicações. Rio de Janeiro: Guanabara Koogau, 2007.

Table 1 – Distribution of coagulase-negative staphylococci (CoNS) species isolated from blood cultures of newborns in 2014 and 2016/2017 in a tertiary hospital in southern Brazil.

Species	2014		2016/2017	
	n	%	n	%
<i>S. epidermidis</i>	100	56.82	80	66.67
<i>S. warneri</i>	17	9.66	8	6.67
<i>S. capitis</i>	13	7.39	4	3.33
<i>S. haemolyticus</i>	13	7.39	12	10
<i>S. hominis</i>	13	7.39	12	10
CoNS	8	4.55	1	0.83
<i>S. saprophyticus</i>	6	3.41	1	0.83
<i>S. lugdunensis</i>	2	1.14	0	0
<i>S. xylosus</i>	2	1.14	1	0.83
<i>S. equorum</i>	1	0.57	0	0
<i>S. auricularis</i>	1	0.57	0	0
<i>S. lentus</i>	0	0	1	0.83
Total	176	100	120	100

CoNS = Coagulase-negative staphylococci that the specie were not identified by automated system.

Table 2 – Distribution of blood cultures in which there was the isolation of coagulase-negative staphylococci (CoNS) and respective hospitalization units, in 2014 and 2016/2017, in a tertiary hospital in the southern region of Brazil.

Hospitalization Units	2014		2016/2017	
	n	%	n	%
NICU	108	61.36	97	80.83
PICU	3	1.70	4	3.33
RR	2	1.14	0	0
PPEC	1	0.57	2	1.67
GO	27	15.34	4	3.33
OC	33	18.75	11	9.17
SB	1	0.57	0	0
AMB	1	0.57	2	1.67
Total	176	100	120	100

AMB = Ambulatory; SB = Surgical block; OC = Obstetric Center; GO = Gynecology and Obstetrics; PPEC = Pediatric Prepared Emergency Care; RR = Recovery room; PICU = Pediatric Intensive Care Unit; NICU = Neonatal Intensive Care Unit.

Table 3 – Antimicrobial susceptibility profile of the 176 and 120 coagulase-negative staphylococci (CoNS) samples isolated from blood cultures in 2014 and 2016/2017, respectively, in a tertiary hospital in the southern region of Brazil.

Tested antimicrobials	2014					2016/2017				
	Number of samples tested	Sensitive		Resistant		Number of samples tested	Sensitive		Resistant	
		n	%	n	%		n	%	n	%
Clindamycin	173	133	76.88	40	23.12	120	51	42.50	69	57.50
Ciprofloxacin	176	84	47.73	92	52.27	119	32	26.89	87	73.11
Erythromycin	167	81	48.50	86	51.50	119	38	31.93	81	68.07
Gentamicin	170	84	49.41	86	50.59	119	39	32.77	80	67.23
Linezolid	173	173	100	0	0	120	120	100	0	0
Oxacillin	175	42	24	133	76	120	19	15.83	101	84.17
Penicillin	171	49	28.65	122	71.35	120	1	0.83	119	99.17
Sulfamethoxazole/Trimethoprim	173	101	58.38	72	41.62	120	40	33.33	80	66.67
Teicoplanin	157	154	98.09	3	1.91	98	96	97.96	2	2.04
Tigecycline	165	165	100	0	0	120	120	100	0	0
Vancomycin	176	176	100	0	0	120	120	100	0	0

5.2 ARTIGO 1

O artigo foi publicado no periódico *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* (ISSN 1678-9849), qualis capes 2013-2016 B3, na forma de artigo original.



Major Article

Assessment of different methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures of newborns

**Roberta Filipini Rampelotto^{[1],[2]}, Vinicius Victor Lorenzoni^[1], Danielly da Costa Silva^{[1],[2]},
Silvana Silveira Coelho^[1], Vanessa Wust^[1], Litiérri Razia Garzon^[1],
Melise Silveira Nunes^{[1],[3]}, Bettina Meneghetti^{[1],[3]}, Patrícia Chaves Brites^[4],
Manfredo Hörner^[5] and Rosmari Hörner^{[1],[2]}**

- [1]. Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.
[2]. Programa de Pós-Graduação, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.
[3]. Laboratório de Análises Clínicas, Hospital Universitário de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.
[4]. Laboratório de Biologia Molecular, Hospital Universitário de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.
[5]. Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

Abstract

Introduction: Coagulase-negative staphylococci (CoNS) are a frequent cause of bacteremia, especially in neonates. The major virulence determinant in CoNS is the ability to produce biofilms, which is conferred by the *ica*ADBC genes. This study aimed to assess different methods for the detection of biofilm formation in 176 CoNS isolates from blood cultures of newborns. **Methods:** The presence of the *ica*ACD genes was assessed by polymerase chain reaction (PCR), and biofilm formation was assessed on congo red agar (CRA), by the tube method (TM), and on tissue culture plates (TCP). **Results:** Of the 176 CoNS isolates, 30.1% expressed *ica*ACD and 11.4% expressed *ica*AD. The CRA assay and TM showed that 42% and 38.6% of the isolates were biofilm producing, respectively. On TCP, 40.9% of the isolates produced biofilms; 21% were weakly adherent and 19.9% were strongly adherent. When compared to the gold standard technique (PCR), the CRA assay showed 79% sensitivity and 84% specificity (kappa = 0.64), TM showed 78% sensitivity and 89% specificity (kappa = 0.68), and TCP showed 99% sensitivity and 100% specificity (kappa = 0.99). **Conclusions:** In this study, ~42% of CoNS isolates produced biofilms, and the presence of *ica*ACD was associated with a greater capacity to form biofilms. Compared to the other phenotypic methodologies, TCP is an ideal procedure for routine laboratory use.

Keywords: Biofilm. Blood culture. Coagulase-negative staphylococci. Newborn.

INTRODUCTION

Infections during the neonatal period lead to high levels of morbimortality. Sepsis is one of the most relevant complications of neonatal infections, and it increases the hospital care required for newborn babies^{1,3}. Coagulase-negative staphylococci (CoNS), which are part of the normal skin microbiota, are the most frequently isolated pathogens in blood stream infections. In particular, *Staphylococcus epidermidis* is capable of causing infections in both immunocompromised patients and newborns^{4,5}.

CoNS infections are frequently associated with the use of invasive medical devices, and biofilm formation is a major

virulence determinant in this group of bacteria^{6,7-11}. The formation of biofilms allows these microorganisms to adhere to biomaterials, and biofilm formation is related to infection recurrence and therapy failure, as the organisms within biofilms are more resistant to antimicrobials and host defenses^{4,7,9,11,12}.

In recent decades, there is increasing awareness of the great difficulty in eradicating infections caused by biofilm-forming bacteria, since these microorganisms are more resistant to and can survive in the presence of various antimicrobials, requiring removal of the related medical device or surgical methods to cure the infection^{6,12-15}.

CoNS develop into biofilms via a complex, multifactorial process that can be divided into four phases: adhesion, accumulation, maturation, and detachment, each involving specific molecular factors^{8,13,16}. Studies suggest that polysaccharide intercellular adhesin (PIA) is the most important component of *Staphylococcus* spp. biofilms. Biofilm production in *Staphylococcus* spp. is mediated by the chromosomal

Corresponding author: Rosmari Hörner.
e-mail: rosmari.ufsm@gmail.com
Received 2 May 2018
Accepted 31 August 2018



Assessment of different methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures of newborns

Running Title: Assessment of biofilm production in CoNS

***Roberta Filipini Rampelotto*^{[1],[2]}, *Vinicius Victor Lorenzoni*^[1], *Danielly da Costa Silva*^{[1],[2]},
Silvana Silveira Coelho^[1], *Vanessa Wust*^[1], *Litiérri Razia Garzon*^[1], *Melise Silveira Nunes*^{[1],[3]}, *Bettina Meneghetti*^{[1],[3]}, *Patrícia Chaves Brites*^[4], *Manfredo Hörner*^[5] and
Rosmari Hörner^{[1],[2]}**

[1]. Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil. [2]. Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil. [3]. Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil. [4]. Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Universitário de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil. [5]. Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

Corresponding author: Rosmari Hörner.

e-mail: rosmari.ufsm@gmail.com

Received 2 May 2018

Accepted 31 August 2018

ABSTRACT

Introduction: Coagulase-negative staphylococci (CoNS) are a frequent cause of bacteremia, especially in neonates. The major virulence determinant in CoNS is the ability to produce biofilms, which is conferred by the *icaADBC* genes. This study aimed to assess different methods for the detection of biofilm formation in 176 CoNS isolates from blood cultures of newborns. **Methods:** The presence of the *icaACD* genes was assessed by polymerase chain reaction (PCR), and biofilm formation was assessed on Congo red agar (CRA), by the tube method (TM), and on tissue culture plates (TCP). **Results:** Of the 176 CoNS isolates, 30.1% expressed *icaACD* and 11.4% expressed *icaAD*. The CRA assay and TM showed that 42% and 38.6% of the isolates were biofilm producing, respectively. On TCP, 40.9% of the isolates produced biofilms; 21% were weakly adherent and 19.9% were strongly adherent. When compared to the gold standard technique (PCR), the CRA assay showed 79% sensitivity and 84% specificity ($\kappa = 0.64$), TM showed 78% sensitivity and 89% specificity ($\kappa = 0.68$), and TCP showed 99% sensitivity and 100% specificity ($\kappa = 0.99$). **Conclusions:** In this study, ~42% of CoNS isolates produced biofilms, and the presence of *icaACD* was associated with a greater capacity to form biofilms. Compared to the other phenotypic methodologies, TCP is an ideal procedure for routine laboratory use.

Keywords: Biofilm. Blood culture. Coagulase-negative staphylococci. Newborn.

INTRODUCTION

Infections during the neonatal period lead to high levels of morbimortality. Sepsis is one of the most relevant complications of neonatal infections, and it increases the hospital care required for newborn babies¹⁻³. Coagulase-negative staphylococci (CoNS), which are part of the normal skin microbiota, are the most frequently isolated pathogens in blood stream infections. In particular, *Staphylococcus epidermidis* is capable of causing infections in both immunocompromised patients and newborns⁴⁻⁸.

CoNS infections are frequently associated with the use of invasive medical devices, and biofilm formation is a major virulence determinant in this group of bacteria^{4,7-11}. The formation of biofilms allows these microorganisms to adhere to biomaterials, and biofilm formation is related to infection recurrence and therapy failure, as the organisms within biofilms are more resistant to antimicrobials and host defenses^{4,7-9,11,12}.

In recent decades, there is increasing awareness of the great difficulty in eradicating infections caused by biofilm-forming bacteria, since these microorganisms are more resistant to and can survive in the presence of various antimicrobials, requiring removal of the related medical device or surgical methods to cure the infection^{6,12-15}.

CoNS develop into biofilms via a complex, multifactorial process that can be divided into four phases: adhesion, accumulation, maturation, and detachment, each involving specific molecular factors^{8,13,16}. Studies suggest that polysaccharide intercellular adhesin (PIA) is the most important component of *Staphylococcus* spp. biofilms. Biofilm production in *Staphylococcus* spp. is mediated by the chromosomal intracellular adhesion (*ica*) gene products, which are involved in cell adhesion and are arranged in an operon structure containing four biosynthesis genes *icaABCD*^{7,11,13}.

Considering the large number of infections caused by biofilm-forming bacteria, early detection and eradication of these microorganisms is necessary. A phenotypic method, along with detection of the genes in the *ica* operon, is generally used to verify biofilm production in *Staphylococcus* spp. infections^{7,12}. The purpose of the present study was to assess four methods for the detection of biofilm production in CoNS isolates from blood cultures of newborn patients in a tertiary hospital in southern Brazil. The four methods evaluated were tissue culture plate (TCP), the tube method (TM), Congo red agar (CRA), and polymerase chain reaction (PCR). This is the first study to assess biofilm production in CoNS isolates from blood cultures of newborn patients at this hospital.

METHODS

Location and duration of study

This study was conducted at the Laboratório de Bacteriologia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde of Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. Samples were isolated at a tertiary hospital in southern Brazil during a one-year period (2014).

Isolates

One hundred and seventy-six (176) CoNS isolates were obtained from the blood cultures of newborns. Blood cultures were required whenever a significant clinical sign was present, such as increased body temperature ($>38^{\circ}\text{C}$), hypothermia ($<36^{\circ}\text{C}$), leukocytosis (>10.000 leukocytes/ mm^3 , especially with left deviation), or absolute granulocytopenia (<1000 leukocytes/ mm^3). For the cultures, a 3 mL sample of blood was collected from each newborn and placed in a blood culture bottle. At least two blood cultures were used for each

sample. Isolates were processed with the BACTEC 9240® automated blood culture system (Becton Dickson, Sparks, MD), and samples were considered positive when two or more blood cultures developed CoNS. Species-level identification of CoNS and antimicrobial sensitivity profiles were performed with the Vitek® 2 system (bioMérieux, France). The sensitivity profiles were determined according to the Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) guidelines¹⁷ at the time of the study.

Blood cultures in which CoNS growth was detected were subsequently sent to the Laboratório de Bacteriologia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde at UFSM, where they were inoculated on tryptone soya agar (TSA) and incubated at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ for 18–24 h. The colonies were stored in tryptone soya broth (TSB) containing 15% glycerol at -80°C until biofilm detection.

PCR, TM, and CRA were performed in duplicate, and TCP was performed in quadruplicate. *S. epidermidis* American Type Culture Collection (ATCC) 12228 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (a strong biofilm producer) were used as the negative and positive controls, respectively.

Biofilm detection by the genotypic method (PCR)

DNA was extracted by the boiling method of Pérez-Pérez and Hanson¹⁸. The 16S rRNA gene sequence was determined to verify the presence of CoNS bacterial DNA, and then the *icaACD* genes were detected by PCR, which is considered the gold standard for detecting biofilm formation ability^{14,19}. The primers used, which are shown in **Table 1**, were obtained from GBT Oligos® and were designed based on the *Staphylococcus epidermidis* *icaACD* sequence (GenBank accession number U43366.1). To amplify the *icaACD* genes, a Thermo Cycler (model 2720, Biosystems) was used and programmed with the following cycling

conditions: an initial step at 94°C for 5 min followed by 50 cycles of 30 sec each at 94°C, 55.5°C, and 72°C, with a final step at 72°C for 1 min. Each PCR simplex reaction contained 17.05 µL of ultrapure water, 1.75 µL of buffer (10×; Ludwig-Biotec®), 0.75 µL of MgCl₂ (50 mM; Ludwig-Biotec®), 2 µL of dNTPs (100 mM; Ludwig-Biotec®)s 0.2 µL of Taq DNA polymerase (5 U/mL; Ludwig-Biotec®), 0.625 µL of forward primer, 0.625 µL of reverse primer, and 2 µL of DNA. The DNA fragments were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis, and the bands were visualized with a photo documentation system (KODAK DC 290, using 1D software, version 3.6).

Biofilm detection by phenotypic methods

Congo red agar (CRA)

Isolates were analyzed according to the method described by Freeman *et al.*²⁰. Briefly, isolates were inoculated on sheep blood agar, incubated at 35 ± 2°C for 24 h, and then transferred to CRA and incubated at 35 ± 2°C for 24 h. Biofilm-producing isolates formed black colonies, whereas non-biofilm-producing isolates formed red colonies.

Tube method (TM)

Isolates were assessed by the TM as described by Christensen *et al.*²¹. They were inoculated on sheep blood agar and incubated at 35 ± 2°C for 24 h. Then, selected colonies were inoculated into test tubes containing 2.0 mL of TSB and incubated at 35 ± 2°C for 48 h. Later, the contents were removed with a pipette, and 1.0 mL of a 0.4% aqueous solution of trypan blue was added to each tube. The stain was removed with a pipette and after a 1 min incubation, the results were read by visual observation. If colored bacteria adhered to the tube wall, the isolate was considered to be a biofilm producer, whereas if no colored

microorganisms adhered to the tube wall, the isolate was considered to be a non-biofilm producer.

Tissue culture plate (TCP)

Isolates were assessed by the TCP method as described by Christensen *et al.* (1985)²², with some modifications. The bacteria were inoculated on sheep blood agar and incubated at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ for 24 h. Then, colonies were transferred to test tubes containing 2.0 mL of TSB and incubated at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ for 24 h.

Using multichannel pipettes, 200 μL of TSB containing 1% glucose was added to each well of a 96-well flat bottom polystyrene tissue plate. Then, a 200 μL aliquot of the aforementioned bacterial suspension in TSB was added to each well; each isolate was inoculated into four parallel wells, and the plates were incubated at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ for 24 h. Then, the contents of each well were aspirated, and the wells were washed four times with 200 μL of phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2). The wells were stained with 100 μL of 2% crystal violet for 1 min. Then, the stain was aspirated, and wells were washed with distilled water. Plates were dried for 1 h at room temperature. The optical density (OD) at 570 nm was then read with an EpochTM Multi-volume Spectrophotometer (Biotech)²².

Sterile TSB containing 1% glucose, which underwent all procedures described above, without the addition of microorganisms, was included as a medium control. A cut-off value for the detection of biofilm formation was calculated as the standard deviation multiplied by three plus the OD of the medium control (cut-off value = standard deviation \times 3 + average OD medium control)²².

Isolates were classified into three categories: non-adherent (OD less than or equal to the cut-off value, i.e., $OD \leq 0.116$), weakly adherent ($OD > 0.116$ and ≤ 0.232), and strongly adherent ($OD > 0.232$).

Statistical analysis

Sensitivity and specificity were calculated based on comparison of the phenotypic methods and PCR, which is considered a gold standard. The Kappa index (k) was also calculated to verify agreement between the results obtained from the different methods^{7,23}. Data were analyzed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 20.0 for Windows. A p value less than 0.05 was considered statistically significant, and a 95% confidence interval (CI) was used.

Ethical approval

This study was approved by the Research Ethics Committee of Universidade Federal de Santa Maria (registration number 38850614.4.0000.5346).

RESULTS

The 16S rRNA gene was amplified in all 176 CoNS isolates, and 41.5% (73/176) were positive for *icaA*, *icaC*, or *icaD* by PCR; 30.1% (53/176) carried *icaACD*, 11.4% (20/176) carried *icaAD*, and none of the isolates expressed *icaA*, *icaC*, or *icaD* alone (**Figure 1**).

On CRA, 42% (74/176) of the isolates showed black-colored colonies, indicative of biofilm production, and 58% (102/176) showed red-colored colonies, indicating no biofilm production (**Figure 2**). The TM showed that 38.6% (68/176) of isolates adhered to the tube walls and were considered positive for biofilm production, while 61.4% (108/176) of isolates

did not adhere to the tube walls and were considered negative for biofilm production (**Figure 3**). In the TCP assay, 40.9% (72/176) of isolates produced biofilms; 21% (37/176) were weakly adherent, and 19.9% (35/176) were strongly adherent. Of the weakly adherent isolates, 78.4% (29/37) expressed *icaAD*, and 21.6% (8/37) expressed *icaACD*. All strongly adherent isolates (35/35) expressed all three genes (*icaACD*).

In our study, CRA showed 79% sensitivity (95% CI, 70–88), 84% specificity (95% CI, 76–92), 82% accuracy, and good agreement (Kappa = 0.64); the TM assay showed 78% sensitivity (95% CI, 69–87), 89% specificity (95% CI, 82–96), and 85% accuracy, and good agreement (Kappa = 0.83); and the TCP method showed 99% sensitivity (95% CI, 97–100), 100% specificity (95% CI, 99–100), 99% accuracy, and excellent agreement (Kappa = 0.99), when compared to the gold standard, PCR.

Among the isolates that were positive for *icaACD* or *icaAD* by PCR, *S. epidermidis* was the prevalent species (67.1%, 49/73), followed by *S. warneri* (8.2%, 6/73). **Table 2** shows the number of biofilm-producing CoNS species that were positive by the four tested techniques (PCR, CRA, TM, and TCP). **Table 3** shows the percentages of biofilm-producing and non-biofilm-producing isolates that were resistant to each tested antimicrobial. All isolates in this study were sensitive to linezolid, tigecycline, and vancomycin.

DISCUSSION

In this study, we analyzed the biofilm-formation ability of 176 CoNS isolates by four different techniques. Among the 176 isolates, 41.5% of were positive for *icaA*, *icaC*, or *icaD* by PCR; 30.1% expressed *icaACD*, and 11.4% expressed *icaAD*. Oliveira and Cunha⁷ compared different methods for detecting biofilm formation in CoNS isolates from clinical specimens of newborns and the nasal cavity of healthy people in Botucatu, São Paulo, Brazil.

They found that 82% of isolates were positive for *icaA*, *icaC*, or *icaD* by PCR; 40% carried *icaAD*, and 42% carried all three genes (*icaACD*). These percentages were higher than those in our study. Zalipour *et al.*¹² also assessed this virulence determinant in *Staphylococcus* spp. obtained from different clinical specimens collected in two school hospitals in Iran, and also found a higher rate than that in our study, as 81.9% of the *S. epidermidis* isolates expressed *icaAD*.

Regarding the phenotypic methods, 42% of the isolates showed biofilm production by the CRA assay. Similar results were reported by Öcal *et al.*¹¹ for CoNS isolates in samples from nasal cavities, catheters, and blood cultures of patients admitted to a hospital in Turkey; 40.3% of isolates produced biofilms by the CRA technique. In contrast, Oliveira and Cunha⁷ and Zalipour *et al.*¹² reported higher rates of biofilm formation on CRA, with 73% of CoNS and 70.8% of *S. epidermidis*, respectively. Hassan *et al.*²⁴ assessed microorganisms isolated from different clinical materials in a hospital in Pakistan, and only 10% of the tested bacteria were biofilm producing using the CRA technique.

In this study, 38.6% of isolates were considered positive for biofilm formation by the TM. Hassan *et al.*²⁴ and Oliveira and Cunha⁷ found somewhat higher values using TM, with ~49% and 82% biofilm-producing isolates, respectively.

Using TCP, 40.9% of our isolates were determined to be biofilm producing; 21% were weakly adherent, and 19.9% were strongly adherent. Oliveira and Cunha⁷ observed higher indices, and 81% of the isolates were biofilm producing by TCP; 35% were weakly adherent, and 46% were strongly adherent. Rani *et al.*²⁵ assessed biofilm formation in *S. epidermidis* obtained from clinical specimens in a hospital in India using TCP, and all isolates produced biofilm. In contrast, Hassan *et al.*²⁴ reported a value closer to that in our research, with 54.5% biofilm-producing isolates.

In the present study, of the weakly adherent isolates, 78.4% carried *icaAD* and 21.6% carried *icaACD*, whereas all the strongly adherent isolates carried all three genes. None carried one *ica* gene alone. Oliveira and Cunha⁷ reported that only 56.5% of the strongly adherent isolates contained all three genes (*icaACD*). These studies demonstrate that the presence of the *icaACD* genes is an important virulence determinant in clinical isolates of CoNS, since their expression is associated with the production of PIA, a major component of biofilms in *Staphylococcus* spp.⁷. We assumed that the presence of only one of the genes in the *ica* operon is not sufficient for biofilm formation²⁶.

The expression of *icaA* alone induces low enzymatic activity, as these strains typically produce only small amounts of PIA. The presence of *icaD* favors the production of polysaccharide, and larger chains are synthesized in the presence of *icaC*. The expression of *icaAD* or *icaACD* stimulates increased biofilm production; whereas *icaB* appears to function as a deacetylase for the formation of PIA^{7,11,13,27}. In addition to this *ica* operon-related mechanism of biofilm formation, biofilms can also be formed through protein adhesion mediated by surface proteins, such as biofilm-associated protein (*Bap*), its homologs Bhp and accumulation associated protein (*Aap*), and extracellular matrix binding protein (*Embp*), via cell adhesion and accumulation²⁸⁻³⁰.

In our study, the CRA assay showed 79% sensitivity, 84% specificity, and 82% accuracy (kappa = 0.64); the TM assay showed 78% sensitivity, 89% specificity, and 85% accuracy (kappa = 0.68); and the TCP assay showed 99% sensitivity, 100% specificity, and 99% accuracy (kappa = 0.99), when compared to the gold standard, PCR. Oliveira and Cunha⁷ compared the three techniques used in our study (CRA, TM, and TCP) to the gold standard technique (PCR) for strains that carried the biofilm-producing genes *icaACD*. They observed 100% sensitivity and specificity for the TM, 89% sensitivity and 100% specificity

for the CRA assay, and 96% sensitivity and 94% specificity for the TCP assay⁷. Thus, the authors concluded that the TM is the best method for biofilm detection due to its high sensitivity and specificity⁷. In our study, the CRA and TM assay failed to show consistent results. Thus, we concluded that TCP is the most suitable method for routine laboratory testing.

According to some researchers, the CRA assay is easier to implement than other methods; however, it is not recommended for biofilm detection in routine laboratory testing since it can yield false positive or false negative results^{7,31}. In fact, a study conducted in India showed that the TM cannot be used as a general screening test to identify biofilm-producing strains³². However, Oliveira and Cunha⁷ recommended this qualitative method (TM) for biofilm research because it is a low cost method that yields reliable results. Although the TCP method is now considered the gold standard by some researchers^{24,25,32}, as it is time-consuming, it is not widely used in routine laboratories⁷.

Among the biofilm-producing CoNS species detected by the standard technique (PCR), *S. epidermidis* was the most prevalent, at 67.1%, followed by *S. warneri* (8.2%). Oliveira and Cunha⁷ reported *S. epidermidis* as the most prevalent species, which was present at a higher rate than in our study⁷. The fact that *S. epidermidis* shows the highest rate of biofilm production capacity may be due to special mechanisms, such as their ability to colonize the surface of medical devices, resilience, and because they colonize the skin of babies as soon as they are born. Furthermore, among CoNS, *S. epidermidis* is the species most frequently isolated from neonatal infections, and it is frequently detected in infections associated with invasive devices^{7,13,15,25}.

In this study, high rates of resistance to penicillin, oxacillin, and clindamycin were detected among the biofilm-producing isolates. Research has shown that biofilm formation is

associated with an increase in microbial resistance, and the acquisition of resistance characteristics via gene transfer is possible within biofilms³³⁻³⁵.

Our results showed that approximately 42% of CoNS isolates were positive for *icaA*, *icaC*, or *icaD* by PCR, and strains containing all three genes (*icaACD*) showed a greater capacity to form biofilms. Regarding the phenotypic methodologies, the TM and CRA assay presented low of sensitivity and specificity values, and are not recommended for routine laboratory use. Thus, although the quantitative TCP method is a time-consuming technique, it would be ideal for verifying biofilm production in nosocomial CoNS isolates.

This study has some limitations. First, even in the presence of *ica* genes, a strain may not form a biofilm *in vitro* due to non-expression of these genes. Conversely, some isolates may produce biofilm, even in the absence of the *ica* genes, which could interfere with the sensitivity and specificity. In addition, it is known that biofilm production can be induced via other *ica*-independent genes, such as *Bap*, *Bhp*, *Aap*, and *Embp*, which were not examined in this study.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the pharmaceutical staff of the Clinical Analysis Laboratory of the University Hospital of Santa Maria and the financial support from CAPES.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

References

1. Agarwal A, Bhat S. Clinico-microbiological study of neonatal sepsis. *J Int Med Dentis*. 2015;2(1):22-9.
2. Fjalstad JW, Stensvold HJ, Bergseng H, Simonsen GS, Salvesen B, Rønnestad AE, et al. Early-onset sepsis and antibiotic exposure in term infants: A nationwide population-based study in Norway. *Pediatr Infect Dis J*. 2016;35(1):1-6.
3. Oliveira MLA, Veronesi CL, Goulart LS. Caracterização de recém-nascidos com hemoculturas positivas internados em Unidade de Terapia Intensiva neonatal. *Rev Eletr G & S*. 2012;3(2):717-29.
4. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(4):870-926.
5. Mitt P, Metsvaht T, Adamson V, Telling K, Naaber P, Lutsar I, et al. Five-year prospective surveillance of nosocomial bloodstream infections in an Estonian paediatric intensive care unit. *J Hosp Infect*. 2015;86(2):95-9.
6. Martínez-Meléndez A, Morfín-Otero R, Villarreal-Trevino L, Camacho-Ortíz A, González-González G, Llaca-Díaz J, et al. Molecular epidemiology of coagulase-negative bloodstream isolates: detection of *Staphylococcus epidermidis* ST2, ST7 and linezolid-resistant ST23. *Braz J InfectDis*. 2016;20(5):419-28.

7. Oliveira A, Cunha MLRS. Comparasion of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. *BMC Research Notes*. 2010;3:260.
8. Pedroso SHSP, Sandes SHC, Luiz KCM, Dias RS, Filho RAT, Serufo JC, et al. Biofilm and toxin profile: A phenotypic and genotypic characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from human bloodstream infections. *Microb Pathog*. 2016;100:312-8.
9. Batistão DW, Campos PA, Camilo NC, Royer S, Araujo BF, Naves KS, et al. Biofilm formation of Brazilian MRSA strains: prevalence of biofilm determinants and clonal profiles. *J Med Microbiol*. 2016;65:286-97.
10. Pinheiro L, Brito CI, De Oliveira A, Pereira VC, Da Cunha MLRS. *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*: detection of biofilm genes and biofilm formation in blood culture isolates from patients in a Brazilian teaching hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016;86(1):11-4.
11. Öcal DN, Dolapçı İ, Karahan ZC, Tekeli A. Investigation of biofilm formation properties of staphylococcus isolates. *Mikrobiyol Bul*. 2017;51(1):10-9.
12. Zalipour M, Ebrahim-Saraie HS, Sarvari J, Khashei R. Detection of biofilm production capability and *icaA/D* genes among staphylococci isolates from Shiraz, Iran. *Jund J Microbiol*. 2016;9(12):e41431.

13. Arciola CR, Campoccia D, Ravaoli S, Montanaro L. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Front Cel Infect Microbiol*. 2015; 1(5):1-10.
14. Solati SM, Tajbakhsh E, Khamesipour F, Gugnani HC. Prevalence of virulence genes of biofilm producing strains of *Staphylococcus epidermidis* isolated from clinical samples in Iran. *AMB Express*. 2015;5:47.
15. Xu LC, Siedlecki CA. Submicron-textured biomaterial surface reduces staphylococcal bacterial adhesion and biofilm formation. *Acta Biomater*. 2012;8(1):72-81.
16. Otto M. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu Rev Med*. 2013;64:175-188.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement Approved Standard M100-S24. CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA: CLSI, 2014.
18. Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol*; 2002;40(6):2153-62.
19. Arciola CR, Gamberini S, Campoccia D, Visai L, Speziale P, Baldassari L, Montanaro 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;75:408-13.

20. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol.* 1989;42:872-4.
21. Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun.* 1982;37(1):318-26.
22. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol.* 1985;22(6):996-1006.
23. Vaz AJ, Takei K, Bueno EC. *Imunoensaios: Fundamentos e Aplicações.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogau, 2007.
24. Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, Iqbal M. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Braz J Infect Dis.* 2011; 15(4):305-11.
25. Rani VS, Ravindra S, Rao RK. Biofilm detection and clinical significance of *Staphylococcus epidermidis* isolates. *J Evol Med Dental Sciences.* 2015;4(28):4844-9.
26. Fitzpatrick F, Humphreys H, O'Gara JP. Evidence for *icaADBC*-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Clin Microbiol.* 2005;43(4):1973-6.

27. Otto M. Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008;322:207-28.
28. Christner M, Franke GC, Schommer NN, Wendt U, Wegert K, Pehle P, et al. The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. *Mol Microbiol.* 2010;75(1):187-207.
29. O’Gara JP. *Ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Let.* 2007;270(2):179-88.
30. Figueiredo AMS, Ferreira FA, Beltrame CO, Côrtes MF. The role of biofilms in persistent infections and factors involved in *ica*-independent biofilm development and gene regulation in *Staphylococcus aureus*. *Crit Rev Microbiol.* 2017;43(5):602-20.
31. Knobloch JK, Horstkotte MA, Rohde H, Mack D. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol.* 2002;191(2):101-6.
32. Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Fatma T, Rattan A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: An evaluation of three screening methods. *Ind J Med Microbiol.* 2006;24(1):25-9.
33. Haghghatpanah M, Mozaffari ASN, Mojtahedi A, Amirmozafari N, Zeighami H. Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and plasmid-borne *bla*CTX-M and

*bla*TEM genes among clinical strains of *Escherichia coli* isolated from patients in the north of Iran. J Glob Antimicrob Resist. 2016;7:110-3.

34. 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(7):344-8.

35. De Araujo GL, Coelho LR, De Carvalho CB, Maciel RM, Coronado AZ, Rozebaum 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(5):855-64.

FIGURES AND TABLES

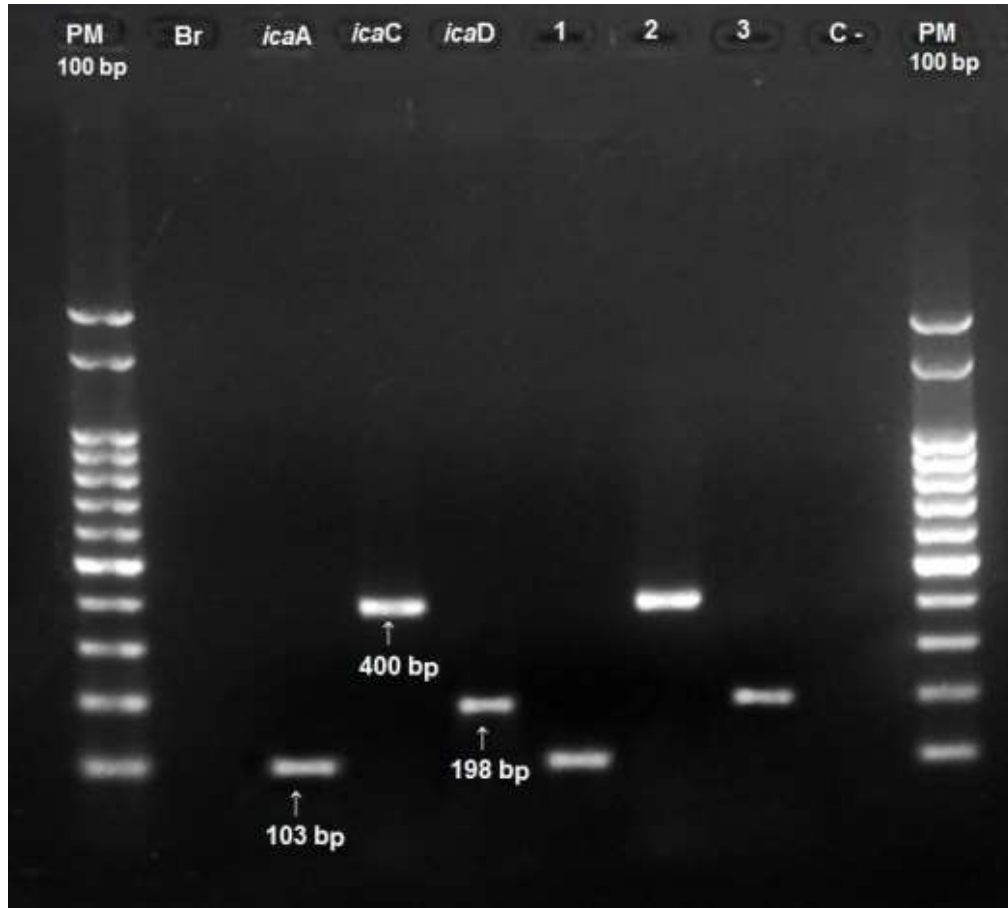


Figure 1 - Presence of the *icaA*, *icaC*, and *icaD* genes in CoNS isolates from newborn blood cultures. Br = White; *icaA* = *icaA*-positive control; *icaC* = *icaC*-positive control; *icaD* = *icaD* positive control; 1 = *icaA*-positive isolate; 2 = *icaC*-positive isolate; 3 = *icaD*-positive isolate; C- = Negative control (*S. epidermidis* ATCC 12228); PM 100 bp = DNA ladder.



Figure 2 - Biofilm production in CoNS isolates from newborn blood cultures as assessed by the Congo red agar (CRA) assay. Left, a biofilm-producing isolate; right, a non-biofilm-producing isolate

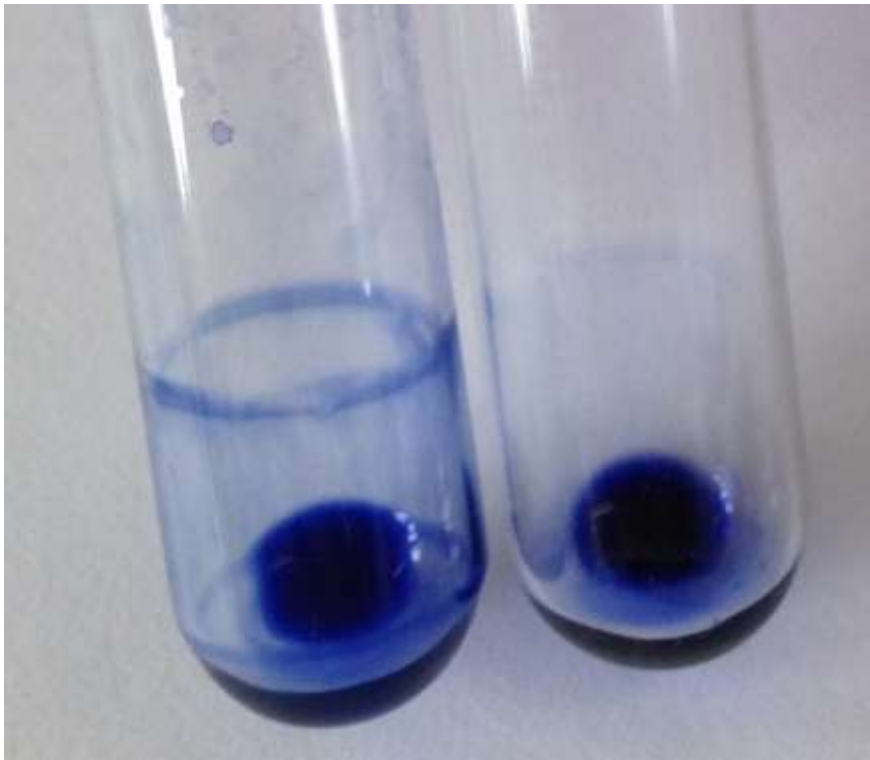


Figure 3 - Biofilm production in CoNS isolates from newborn blood cultures as assessed by the tube method (TM). Left, a biofilm-producing isolate; right, a non-biofilm-producing isolate.

Table 1 - Primers used for PCR.

Gene	Primer	Sequence (5'-3')	Product size (bp)
16S	16S-F	CCTATAAGACTGGGATAACTTCGGG	791
rRNA	16S-R	CTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCG	
<i>icaA</i>	<i>icaA</i> -F	ACAGTCGCTACGAAAAGAAA	103
	<i>icaA</i> -R	GGAAATGCCATAATGACAAC	
<i>icaC</i>	<i>icaC</i> -F	TAACTTTAGGCGCATATGTTTT	400
	<i>icaC</i> -R	TTCCAGTTAGGCTGGTATTG	
<i>icaD</i>	<i>icaD</i> -F	ATGGTCAAGCCCAGACAGAG	198
	<i>icaD</i> -R	CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA	

Table 2 – Biofilm production in CoNS isolates from newborn blood cultures (n) as assessed by phenotypic techniques.

Species	PCR	CRA	TM	TCP
<i>S. epidermidis</i>	49	52	48	48
<i>S. warneri</i>	6	5	6	6
<i>S. capitis</i>	5	7	4	5
<i>S. haemolyticus</i>	4	3	3	4
<i>S. hominis</i>	3	2	2	3
CoNS	2	2	1	2
<i>S. lugdunensis</i>	1	1	1	1
<i>S. saprophyticus</i>	1	1	1	1
<i>S. xylosus</i>	1	1	1	1
<i>S. cohnii</i>	1	-	1	1
Total	73	74	68	72

PCR: polymerase chain reaction, CRA: Congo red agar, TM: tube method, TCP: tissue culture plate.

Table 3 – Percentages of biofilm-forming and non-biofilm-forming* CoNS isolates from newborn blood cultures showing resistance to tested antimicrobials.

Antimicrobials	N	Resistant	n	Resistant
		biofilm producers n = 73		non-biofilm producers n = 103
Ciprofloxacin	51	69.9%	41	39.8%
Clindamycin	30	41.1%	10	9.7%
Erythromycin	44	60.3%	42	40.8%
Gentamicin	45	61.6%	41	39.8%
Oxacillin	71	97.3%	62	60.2%
Penicillin	73	100%	49	47.6%
Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	41	54%	31	30.1%

*Biofilm production was assessed with the gold standard technique (PCR).

5.3 MANUSCRITO 2

O manuscrito será traduzido para a língua inglesa e submetido ao periódico *Jornal de Pediatria* (ISSN 2255-5536), qualis capes B1, ou conforme sugestões da banca examinadora na forma de artigo original.

Epidemiologia molecular de *Staphylococcus epidermidis* na sepse neonatal

Roberta Filipini Rampelotto¹, Nuno Faria², Rosmari Hörner¹, Maria Miragaia^{2*}

¹*Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal de Santa Maria;* ²*Instituto de Tecnologia e Química António Xavier, Universidade Nova de Lisboa*

*Autor correspondente:

M. Miragaia

Laboratório de Evolução Bacteriana e Epidemiologia Molecular

Unidade de Microbiologia de Patógenos Humanos

Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB)

Universidade Nova de Lisboa (NOVA)

Rua da Quinta Grande, 6, Apt 127, 2780-156, Oeiras, Portugal

Telefone: + 351-21 115 7789; Fax: + 351-21 442 8766

Email: miragaia@itqb.unl.pt

Agradecimentos

Agradecemos a equipe no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Santa Maria.

Suporte financeiro

CAPES e Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB), Universidade Nova de Lisboa (NOVA).

Resumo

Introdução: Infecções de corrente sanguínea (ICS) estão entre as complicações infecciosas mais frequentes e graves relacionadas às infecções neonatais, responsáveis por elevadas taxas de morbimortalidade, sendo *S. epidermidis* o microrganismo mais isolado. **Objetivo:** Caracterizar a epidemiologia molecular de *S. epidermidis* isolados de hemoculturas de recém-nascidos admitidos em um hospital terciário no sul do Brasil no período de um ano (2016/2017). **Metodologia:** Os isolados foram confirmados em relação ao gênero e espécie pelo gene *tuf* e sequenciamento de Sanger, e após foi realizado a sequenciação total do genoma (WGS). Foram determinados os *multilocus sequence type* (ST), tipo de elemento *SCCmec*, genes de resistência e de virulência. **Resultados:** Dos 55 isolados *S. epidermidis*, 83,64% foram resistentes a meticilina (MRSE), estando a maioria relacionada ao *sequence type* (ST) 2, com uma variação de *single nucleotide polymorphism* (SNPs) entre 1 a 3583. Este grupo (ST2) foi associado ao cassete cromossômico estafilocócico *mec* (*SCCmec*) III e ao IVa, e os que apresentaram *SCCmecIII*, para além deste *SCCmec*, possuíam outros elementos genéticos móveis do tipo SCC, que subdividiram-se em *ccr* 9 e 4. Quanto aos genes de resistência todos os isolados carregavam o gene *blaZ* e não foi observado resistência a linezolida e vancomicina; sendo que 18,18% (10/55) dos recém-nascidos foram a óbito. **Conclusões:** Os *S. epidermidis* estudados foram bastante semelhantes, partilhando menos de 400 diferenças em relação aos SNPs. Apesar do tempo limitado de estudo, observamos uma evolução nestes isolados. Estes isolados foram responsáveis por significativas taxas de mortalidade, destacando a importância destes microrganismos na capacidade de causarem graves infecções, principalmente nos recém-nascidos.

Introdução

A sepse está entre as complicações infecciosas mais frequentes e graves relacionadas ao período neonatal, responsáveis por elevadas taxas de morbimortalidade, com um número estimado de mais de 400 mil mortes anuais no mundo (Liu et al., 2017; Yadav et al., 2018; Arayici et al., 2019). A hemocultura é considerada o padrão-ouro para identificação da sepse, possibilitando a determinação do agente etiológico envolvido e contribuindo para a conduta terapêutica específica (Shane et al., 2017; Arayici et al., 2019).

Staphylococcus coagulase negativos (SCoN), que fazem parte da microbiota normal da pele, estão entre os principais agentes isolados de hemoculturas no período neonatal, especialmente nas unidades de terapia intensiva (UTI-RN), sendo o *Staphylococcus epidermidis* o prevalente (Namvar et al., 2017; Cantey et al., 2018; Dong et al., 2018). Infecções causadas por *S. epidermidis* geralmente estão associadas a cuidados de saúde e ao uso de dispositivos médicos invasivos. Este microrganismo apresenta importantes fatores de virulência, entre eles a produção de toxinas e biofilme, e resistência aos antimicrobianos (Tziella et al., 2015; Jiang et al., 2019).

O componente principal da formação do biofilme em *S. epidermidis* é o polissacarídeo de adesão intercelular (PIA), mediado por produtos do gene cromossomal *ica*, o qual possui quatro genes de biossíntese (*icaABCD*) (Arciola et al., 2015). Ainda, a produção de biofilme também pode ser induzida através de uma adesão protéica mediada por proteínas de superfície como a *Bap*, *Bhp*, *Aap*, *Embp*, *atlE* e também pelo DNA extracelular (eDNA) e ácido teicoico (*tagF*) (Heilmann et al., 1996; Christner et al., 2012; Otto, 2014).

Além da formação do biofilme, outros genes de virulência já foram descritos em *Staphylococcus* spp. (Cheung et al., 2014; Lee et al., 2016). O *arginine catabolic mobile element* (ACME), frequentemente encontrado em *S. epidermidis* está ligado ao aumento da capacidade desta espécie em colonizar pele e mucosas (Du et al., 2013; Tolo et al., 2016). O ácido poli-gama-DL-glutâmico (PGA), também está presente nos *Staphylococcus* spp., e contribui para a proteção, sobrevivência e persistência das infecções (Kocianova et al., 2005).

As toxinas que estes microrganismos são capazes de produzir constituem um importante fator de virulência, e ocorrem especialmente devido a um grupo de peptídeos, *phenol-soluble modulins* (PSM) (Cheung et al., 2014). Os PSM produzidos por *S. epidermidis*

incluem PSMa, PSMd, PSMe, d-toxina, PSM-*mec* (tipo A), PSMb1 e PSMb2, os quais podem contribuir com sua patogenicidade de várias maneiras (Cheung et al., 2014).

Além destes fatores, a capacidade dos *S. epidermidis* em desenvolverem resistência aos antibacterianos aumentou nos últimos anos, representando uma preocupação crescente para a saúde pública (Tziella et al., 2015; Karam et al., 2016; Namvar et al., 2017; Jiang et al., 2019). Entre as resistências desenvolvidas por estes microrganismos, a mais frequente é frente a meticilina (MRSE), que pode conferir resistência a todos os antimicrobianos beta-lactâmicos, porém, também já foram descritos microrganismos com susceptibilidade reduzida e até mesmo resistentes a vancomicina e a linezolida, fármacos utilizados para o tratamento de isolados MRSE (Gu et al., 2013; Pinheiro et al., 2016; Miragaia, 2018).

O crescente aumento de microrganismos multirresistentes, aliado aos surtos hospitalares tornou-se um problema de saúde pública global, os quais podem ocorrer devido à disseminação de uma estirpe num mesmo ambiente (Kavailine et al., 2012; Chang et al., 2013; Zheng et al., 2017). Isolados de *S. epidermidis* podem persistir em um ambiente por décadas, sendo capazes de se disseminar entre os hospitais e até mesmo entre os países (Klingenberg et al., 2007; Widerstrom et al., 2009; Gordon et al., 2012; Ahlstrand et al., 2014); sendo o tipo clonal prevalente em diversos estudos no mundo o ST2 (Miragaia et al., 2007; Iorio et al., 2011; Springer-Verlag et al., 2012; Bispo et al., 2014; Thomas et al., 2014; Hellmark et al., 2013; Deplano et al., 2016; Martínez-Meléndez et al., 2016).

Portanto, para fazer o controle de infecção hospitalar é essencial identificar possíveis reservatórios e vias de disseminação, assim como caracterizar a nível molecular os isolados disseminados (Kavailine et al., 2012; Chang et al., 2013; Zheng et al., 2017). Através da utilização de novas tecnologias como sequenciamento total do genoma (WGS), foi possível alcançar um progresso considerável na identificação de etapas que levam ao desenvolvimento e disseminação da resistência aos antibacterianos (Miragaia, 2018).

O objetivo deste estudo foi caracterizar a epidemiologia molecular de *S. epidermidis* isolados de hemoculturas de recém-nascidos coletadas no período de um ano (2016/2017) em um hospital terciário do sul do Brasil, determinando os ST, *SCCmec*, genes de resistência e de virulência.

Metodologia

Isolados bacterianos

Foram utilizados *S. epidermidis* (n=55) coletados no período de um ano (julho de 2016 a julho de 2017), isolados de hemoculturas de recém-nascidos de um hospital terciário localizado no sul do Brasil.

Extração do ácido desoxirribonucleico (DNA)

A extração do DNA genômico bacteriano foi realizada utilizando o kit DNeasy (Qiagen, Valencia, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

Quantificação do ácido desoxirribonucleico (DNA)

O DNA foi quantificado utilizando espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S). As amostras foram selecionadas para prosseguir para o sequenciamento quando os índices dos raios estavam entre 1,8 a 2,0 nm para relação 260/280, e $\geq 1,8$ nm para 260/230, demonstrando a pureza do DNA.

Confirmação das espécies em *Staphylococcus epidermidis*

Teste genotípico para detecção do gene *tuf*

A confirmação das espécies em *S. epidermidis* foi realizada através do sequenciamento do gene *tuf*, pelo método de Sanger (Martineau et al., 2001). As reações de amplificação ocorreram no termociclador modelo T100™ Thermal Cycler, Biorad; e a visualização dos produtos da PCR ocorreu através de eletroforese em gel de agarose a 1% (45 minutos, 4V/cm) com a utilização do marcador de peso molecular (Gene ruler 1Kb plus, Fermentas, Waltham, Massachusetts, EUA). As bandas foram visualizadas no sistema de fotodocumentação Gel Doc™, BioRad.

Purificação do produto da PCR

A purificação do produto da PCR foi realizada com o kit High Pure PCR Product Purification, seguindo as recomendações do fabricante.

Sequenciamento de Sanger

Para o sequenciamento de Sanger foi utilizado 5 µL do DNA purificado, juntamente de 5 µL dos *primers* utilizados no *tuf* (*forward* e *reverse*), a uma concentração de 5 pmol. Os produtos foram sequenciados através de serviço externo pela Eurofins Genomics, Konstanz, Germany. A análise do sequenciamento foi realizada através do programa *SeqMan* (DNASTAR, Madison, Wisconsin, EUA), sendo os respectivos alinhamentos submetidos à base de dados *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) para comparação.

Diluição, quantificação e qualidade do DNA

O DNA genômico foi preparado de acordo com as indicações da unidade de sequenciação. Além da quantificação através do Nanodrop, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S., também foi realizada a quantificação do DNA através da leitura no QUBIT® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.) *system*, utilizando o kit Qubit dsDNA HS *Assay* seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram preparadas e enviadas para a unidade de sequenciação, contendo entre 10 a 20 ng/ul.

Ainda, para verificar a integridade do DNA, foi realizado a eletroforese em gel de agarose a 1% (45 minutos, 4V/cm), e o DNA visualizado no sistema de fotodocumentação Gel Doc™ (BioRad, Hercules, California, U.S.A.).

Sequenciamento total do genoma (WGS)

As bibliotecas genômicas foram preparadas empregando o kit Nextera XT (*paired end*), e a sequenciação efetuada utilizando a plataforma NexSeq da Illumina, Inc. (San Diego, California, U.S.), através de serviço externo.

As leituras de sequenciação (*reads*) foram utilizadas para a construção do genoma de cada isolado. Para esse efeito foi utilizado uma pipeline (INNUca) (<https://github.com/B-UMMI/INNUca>) que realizou o controle de qualidade das leituras, a construção de novo do genoma, verificação da qualidade das construções realizadas (*contigs*), e determinação do respectivo ST da espécie. Os genomas reconstruídos (*draft genomes*) foram submetidos a diferentes bases de dados para determinação do tipo de *SCCmec*, bem como do respectivo conteúdo genético em genes de resistência aos antimicrobianos e genes de virulência.

Para esta pesquisa foi utilizado um mínimo de identidade de 90% e 60% de cobertura, tendo-se recorrido às seguintes ferramentas e bases de dados: ABRicate (<https://github.com/tseemann/abricate>), empregando as bases de dados *ResFinder* (Zankari et al., 2012) e CARD (Jia et al., 2017) para a detecção da resistência aos antimicrobianos (data da última atualização das bases de dados, 25 de Outubro de 2018); base de dados própria para pesquisa dos genes de virulência de *S. epidermidis*; SCCmecFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/SCCmecFinder/>) para determinação do elemento genético móvel responsável pelo transporte do gene *mecA*.

A determinação das relações filogenéticas entre os isolados foi realizada através do programa *CSI Phylogeny* (Rolf et al., 2014), no qual foram determinadas as diferenças (SNP, *single nucleotide polymorphism*) em relação a cepa padrão RP62A. Os resultados da filogenia, bem como os metadados associados aos isolados, foram visualizados no programa Microreact (Argimón et al., 2016).

Resultados

Dos 55 *S. epidermidis* analisados, 34,54% (19/55) foram isolados em 2016 e 65,46% (36/55) em 2017 (Tabela 1). Destes, 83,64% (46/55) apresentaram o gene *mecA* e foram considerados MRSE (Tabela 1). Em relação aos setores de interação que estavam admitidos estes pacientes, a maioria estava na UTI-RN, 92,73% (51/55), seguido da Ginecologia e Obstetrícia (GO), 5,45% (3/55) (Tabela 1).

No que se refere aos ST, a maioria dos *S. epidermidis* foi relacionada ao ST2 (54,54%, 30/55), sendo apenas um MSSE (Tabela 1). Neste grupo, foi encontrado uma variação de SNPs entre 1 a 3583 diferenças (Figura 1). Ainda, em relação aos ST2 resistentes a meticilina, 65,52% (19/29) estavam associados ao SCCmecIII(3A) e 34,48% (10/29) ao SCCmecIVa(2B) (Tabela 1); que ainda se diferenciaram, pois os que carregavam o SCCmecIII possuíam outros elementos genéticos móveis do tipo SCC, o *ccr 9* (n=11) e o *ccr 4* (n=8) (Figura 2 e Figura 3).

O segundo grupo prevalente em relação ao ST foi o ST6, 15,54% (8/55), sendo a maioria não tipável (87,5%, 7/8) e 12,5% (1/8) relacionado ao SCCmecIVc(2B) (Tabela 1, Figura 1). Estes isolados mostraram uma variação de SNPs de 0 a 127 (Figura 1). Ainda, desta coleção, três novos ST foram descritos (*new*).

Quanto aos genes que conferem resistência aos antimicrobianos, todos os isolados apresentaram o gene *blaZ*, responsável pela resistência a penicilina; e 98,18% e 85,45% carregavam os genes *dfrC* (resistência a trimetoprima) e *aac(6')-aph(2'')* (resistência aos aminoglicosídeos), respectivamente (Tabela 2). Não foi observado resistência frente a linezolida e vancomicina.

Em relação aos fatores de virulência apresentados por estes isolados, 100% possuíam genes de produção de toxinas (*psm_alpha* e *hld*), genes responsáveis por proteção, sobrevivência e persistência das infecções (*capA*); presença de proteases, exoenzimas e proteínas extracelulares (*gehC*, *gehD*, *sspA* e *sspB*); genes que conferem resistência a peptídeos (*dltB*, *graR* e *mprF*); e a proteína de superfície *sdrG* (Tabela 3). Em relação à formação de biofilme em 85,45% dos *S. epidermidis* estavam presentes *embp* e em 67,27% *icaA* (Tabela 3). Já em relação a produção de ácido teicoico, todos os isolados (100%) apresentaram *tagF* (Tabela 3). O ACME, responsável pelo aumento da capacidade destes microrganismos em colonizar a pele e mucosas foi encontrado em 40% dos *S. epidermidis* (Tabela 3). Em relação ao desfecho dos pacientes, dez foram a óbito, sendo que dois possuíam infecções polimicrobianas, com mais de um microrganismo isolado (Tabela 4).

Discussão

A incidência de MRSE varia entre os hospitais, e segundo um levantamento realizado pelo SENTRY entre 1997 a 2001, estes índices foram de 76 a 80% nos isolados de hemoculturas em hospitais brasileiros e da América Latina (Sader et al., 2004). Uma atualização deste estudo, envolvendo centros de países da América do Norte, América Latina, Europa e Ásia, entre 1997 a 2016, mostrou que este tipo de resistência em ICS aumentou até 2005–2008, porém, posteriormente declinou em todas as regiões (Diekema et al., 2019).

Neste estudo, 83,64% foram considerados MRSE, corroborando com pesquisas de vigilância, que demonstram que a resistência a esse antimicrobiano varia entre 75 a 85% em *Staphylococcus coagulase negativos* (SCoN) (Zhao et al., 2012; May et al., 2014). Estes dados são importantes, uma vez que o tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina é realizado com a vancomicina (Shane et al., 2017), que apresentou elevada sensibilidade em nosso estudo.

Em relação aos setores de interação onde estavam admitidos estes pacientes, a maioria encontrava-se na UTI-RN. Nesta unidade, é comum que ocorram infecções hospitalares, já que são áreas destinadas a pacientes em estado crítico, sendo que infecções associadas aos cuidados de saúde adquiridas em UTI-RN, em sua maioria são causadas por SCoN (Cantey et al., 2018; Dong et al., 2018; Namvar et al., 2017).

Este estudo demonstrou predomínio do ST2, corroborando com o que é descrito na literatura, já que o tipo clonal nosocomial prevalente no mundo todo entre *S. epidermidis* (Miragaia et al., 2007; Iorio et al., 2011; Springer-Verlag et al., 2012; Bispo et al., 2014; Thomas et al., 2014; Hellmark et al., 2013; Deplano et al., 2016; Martínez-Meléndez et al., 2016; Bispo et al., 2014; Deplano et al., 2016; Hellmark et al., 2013; Iorio et al., 2012; Martínez-Meléndez et al., 2016; Miragaia et al., 2007; Springer-Verlag et al., 2012; Thomas et al., 2014). No Brasil, Riboli (2018), avaliando SCoN de hemoculturas de RN admitidos no Hospital das Clínicas de Botucatu, São Paulo, caracterizou os isolados por eletroforese em gel de campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*-PFGE) e encontrou dois *clusters* de *S. epidermidis* majoritários, os quais foram caracterizados como ST2 e ST59.

Widerström et al. (2016) realizaram a pesquisa dos ST para investigar os possíveis reservatórios de MRSE em uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI) de um hospital na Suíça, e encontraram nos profissionais da saúde e acompanhantes e houve a prevalência do tipo clonal ST2 e ST215. Em nossa pesquisa, não realizamos essa pesquisa, mas é de conhecimento que em sua maioria, as infecções ocorrem através da transmissão dos pais/acompanhantes e da equipe médica para os recém-nascidos (Remington et al., 2011).

Oliveira et al. (2016) avaliaram SCoN isolados de hemoculturas, também no sul do Brasil, e evidenciaram que o ST prevalente foi o ST2, seguido de ST6, assim como em nossa pesquisa. Porém, estes pesquisadores relataram que estes ST estavam relacionados apenas ao SCC*mec* III; já em nosso estudo, também observou-se a presença do SCC*mec*IVa(2B). Em nossa pesquisa o ST2 pode-se diferenciar em SCC*mec* III e IVa (Figura 2), sendo que os que apresentaram o tipo III, possuíam outros elementos genéticos móveis (*ccrs* (9 ou 4)) (Figura 3).

Através da visualização da árvore filogenética (Figura 1), pode-se observar que a grande maioria dos *S. epidermidis* deve compartilhar menos de 400 diferenças entre eles, que podemos sugerir que ocorra devido ao fenômeno de recombinação a estes isolados. Na análise em relação ao aparecimento dos microrganismos com o decorrer do tempo, não podemos

afirmar que ocorreu um surto hospitalar, porém, ressaltamos que na maioria dos isolados ocorreu uma evolução destes microrganismos.

A resistência frente aos antimicrobianos vem aumentando progressivamente e constitui uma preocupação crescente para a saúde pública (Tziella et al., 2015; Karam et al., 2016; Miró-Canturri et al., 2019). Além da maioria dos isolados carregarem o gene *mecA*, os mesmos também apresentaram 100% de resistência frente a penicilina (*blaZ*) e 98,18% a trimetoprima. Porém, não foi observado resistência frente a linezolida e vancomicina, fármacos elegíveis para o tratamento de infecções por isolados MRSE (Gu et al., 2013; Namvar et al., 2017).

Além da resistência bacteriana, a capacidade da formação de biofilme destes microrganismos, constitui um importante fator de virulência em *S. epidermidis* (Riboli, 2018). Neste estudo, 100% dos isolados apresentaram o gene *tagF*, em 85,45% *embp* e em 67,27% *icaA*. Já está bastante documentado na literatura que *S. epidermidis* estão entre os agentes etiológicos mais importantes associados a formação de biofilme, especialmente devido a capacidade destes microrganismos colonizarem a superfície de dispositivos médicos causando infecções (Arciola et al., 2015; Rani et al., 2015). A produção deste fator de virulência é preocupante, já que bactérias produtoras de biofilme aumentam sua capacidade de sobrevivência, tornando o tratamento destas infecções pouco eficaz (Arciola et al., 2015; Puja et al., 2015).

Os *S. epidermidis* apresentaram 100% dos genes produtores de toxinas *psm_alpha* e *hlD*; dos genes responsáveis por proteção, sobrevivência e persistência das infecções *capA*; proteases, exoenzimas e proteínas extracelulares *gehC*, *gehD*, *sspA* e *sspB*; genes que conferem resistência a peptídeos *dltB*, *graR* e *mprF*; e a proteína de superfície *sdrG*. O ACME, responsável pelo aumento da capacidade destes microrganismos em colonizar a pele e mucosas foi encontrado em 40% dos *S. epidermidis*. Cada vez mais se destaca a significância dos *S. epidermidis* que, embora sejam colonizadores da pele, possuem a capacidade de produzirem importantes fatores de virulência, bem como a transferência de genes, permitindo que cepas endêmicas permaneçam por décadas no ambiente hospitalar, disseminadas, inclusive, entre diversos países (Shane et al., 2017; Heilmann et al., 2018; Riboli, 2018).

Em relação ao desfecho dos pacientes, 18,18% (10/55) dos RN foram a óbito, sendo que dois possuíam infecções polimicrobianas (Tabela 2). Cunha et al. (2002), ao avaliarem a significância clínica de SCoN isolados de hemoculturas de RN na UTI-RN do Hospital das

Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, Brasil, evidenciaram 37,0% de infecções por SCoN, e destas, 13,0% estavam associadas a mortalidade dos RN. Al-taiar et al. (2013), investigaram microrganismos isolados em hemoculturas de recém-nascidos na China, e mostraram que 4,8% dos RN foram a óbito devido a infecções causadas por SCoN. Cantey et al. (2018) evidenciaram que a mortalidade por SCoN na sepse neonatal foi de 1,6%, porém, na análise multivariada, esta porcentagem não foi significativa; e Lee et al. (2015) demonstraram que os índices de mortalidade por SCoN podem chegar a 9,4% em neonatos com muito baixo peso ao nascer, sendo que crianças prematuras, têm mais chances de evoluírem a sepse, com elevada morbimortalidade associada (Wynn, 2016).

Conclusão

Este estudo mostrou que os *S. epidermidis* estudados devem compartilhar menos de 400 diferenças em relação aos SNPs. Apesar do tempo limitado de estudo pode-se observar que ocorreu uma evolução nestes isolados. O grupo ST2 foi relacionado a dois tipos de SCC*mec*, III(A) e IVa(2B), sendo que os que possuíam SCC*mec*III subdividiram-se em *ccr*, 9 ou 4. Ressaltamos que os *S. epidermidis* foram responsáveis por significantes índices de mortalidade. Desta forma, vale destacar a importância destes microrganismos como patógenos, capazes de causarem graves infecções, principalmente nos recém-nascidos.

Referências

AHLSTRAND, E. et al. Long-term molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* blood culture isolates from patients with hematological malignancies. **PLoS ONE**. v. 9, p. e99045, 2014.

AL-TAIAR, A. et al. Neonatal infections in China, Malaysia, Hong Kong and Thailand. **Arch Dis Child Fetal Neonatal**. v. 98, p. F249– 55, 2013.

ARAYICI, S. et al. Can base excess be used for prediction to early diagnosis of neonatal sepsis in preterm newborns? **Mediterr J Hematol Infect Dis**. v. 11, n. 1, p. e2019014, 2019.

ARCIOLA, C. R. et al. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. **Front Cel Infect Microbiol.** v. 5, p. 1-10, 2015.

ARGIMÓN, S. et al. Microreact: visualizing and sharing data for genomic epidemiology and phylogeography. **Microb Genom.** v. 2, n. 11, p. e000093, 2016.

BATISTÃO, D. W. et al. Biofilm formation of Brazilian MRSA strains: prevalence of biofilm determinants and clonal profiles. **J Med Microbiol.** v. 65, p. 286-297, 2016.

BISPO, P. J. et AL. Characterization of ocular methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolates belonging predominantly to clonal complex 2 subcluster II. **J Clin Microbiol.** v. 52, p. 1412–1417, 2014.

CANTEY, J. B. et al. Morbidity and mortality of coagulase-negative staphylococcal sepsis in very-low-birth-weight infants. **World J Pediatr.** 2018.

CHANG, R. L. et al. Strategies to minimize antibiotic resistance. **Int J Environ.** v. 10, n. 9, p. 4274-4305, 2013.

CHEUNG, G. Y., et al. Phenol-soluble modulins—critical determinants of staphylococcal virulence. **FEMS Microbiol.** n. 38, p. 698–719, 2014.

CHRISTNER, M., et al. *sarA* negatively regulates *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by modulating expression of MDA extracellular matrix binding protein and autolysis dependent release of eDNA. **Molecular Microbiol.** v. 86, p. 394-410, 2012.

CUNHA, M. L. R. S. et al. Significância clínica de estafilococos coagulase-negativa isolados de recém-nascidos. **J Pediatr.** v. 78, n. 4, p: 279-288, 2002.

DEPLANO, A. et al. National surveillance of *Staphylococcus epidermidis* recovered from bloodstream infections in Belgian hospitals. **J Ant Chem.** v. 71, n. 7, p. 1815-1819, 2016.

DIEKEMA, D. J. et al. The microbiology of bloodstream infection: 20-year trends from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antimicrobial Agents Chemother.** v. 63, n. 7, p. e00355-19, 2019.

DONG, Y.; SPEER, C. P.; GLASER, K. Beyond sepsis: *Staphylococcus epidermidis* is an underestimated but significant contributor to neonatal morbidity. **Virulence.** v. 9, n. 1, p. 621-633, 2018.

DU, X. et al. Molecular analysis of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from community and hospital environments in China. **PloS one.**v. 8, p. e62742, 2013.

GORDEEV, A. et al. Genetic polymorphism of *Staphylococcus epidermidis* strains in patients of the neonatal intensive care unit. **Bulletin of Russian State Medical University**, 2017.

GORDON, R. J. et al. *Staphylococcus epidermidis* colonization is highly clonal across US cardiac centers. **J Infect Dis.** v. 205, p. 1391–1398, 2012.

GU, B. et al. The emerging problem of linezolid-resistant *Staphylococcus*. **J Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 1, p. 4-11, 2013.

GU, B. et al. The emerging problem of linezolid-resistant *Staphylococcus*. **J Antimicrobial Chemotherapy**. v. 68, n. 1, p. 4-11, 2013.

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

HEILMANN, C.; ZIEBUHR, W.; BECKER, K. Are coagulase-negative staphylococci virulent? **Clin Microbiol Infect**, 2018.

HELLMARK, B. et al. Comparison of *Staphylococcus epidermidis* isolated from prosthetic joint infections and commensal isolates in regard to antibiotic susceptibility, *agr* type, biofilm production, and epidemiology. **Int J Med Microbiol.** v. 303, p. 32–39, 2013.

IORIO, N. L. P. et al. Characteristics related to antimicrobial resistance and biofilm formation of widespread methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* ST2 and ST23 lineages in Rio de Janeiro hospitals, Brazil. **Diag Microbiol Infect Dis.** n. 72, v. 1, p. 32-40, 2012.

JIA, B. et al. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. **Nucleic Acids Research.** v. 45, n D1, p. D566-573, 2017.

JIANG, J. H. et al. Evolution of daptomycin resistance in Coagulase-negative staphylococci involves mutations of the essential two-component regulator WalkR. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 26, n. 3, p. e01926-18, 2019.

KARAM, G. et al. Antibiotic strategies in the era of multidrug resistance. **Crit Care.** v. 136, n. 20, 2016.

KAVAILINI, P. DNA, protein binding, cytotoxicity, cellular uptake and antibacterial activities of new palladium(II) complexes of thiosemicarbazone ligands: effects of substitution on biological activity. **Metallomics.** n.4, p.101-113, 2012.

KLINGENBERG, C. et al. Persistent strains of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: virulence factors and invasiveness. **Clin Microbiol Infect.** v. 13, p. 1100–1111, 2007.

KOCIANOVA, S., et al. Key role of poly-gamma-DL-glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. **J Clin Invest.** v. 115, p. 688-694, 2005.

LE, K. Y.; OTTO, M. Quorum-sensing regulation in staphylococci - an overview. **Front Microbiol**, n. 6, p. 1174, 2015.

LEE, J. Y. H. et al. Functional analysis of the first complete genome sequence of a multidrug resistant sequence type 2 *Staphylococcus epidermidis*. **Microbial Genomics**, 2016.

LEE, S. M.; CHANG, M.; KIM, K. S. Blood culture proven early onset sepsis and late onset sepsis in very-low-birthweight Infants in Korea. **J Korean Med Sci.** v. 30, n. Suppl 1, p. S67–74, 2015.

LIU, L. et al. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000-15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. **Lancet.** v. 388, n. 10063, p. 3027–3035, 2017.

MARTINEAU, F. et al. Development of a PCR assay for identification of staphylococci at genus and species levels. **J Clin Microbiol.** v. 39, p. 2541-2547, 2001.

MARTÍNEZ-MELÉNDEZ, A. et al. Molecular epidemiology of coagulase-negative bloodstream isolates: detection of *Staphylococcus epidermidis* ST2, ST7 and linezolid-resistant ST23. **BJID.** v. 20, n. 5, p. 419–428, 2016.

MAY, L., E. et al. Trends in antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci in the United States, 1999 to 2012. **Antimicrob Agents Chemother,** n. 58, p. 1404–1409, 2014.

MIRAGAIA, M. et al. Inferring a population structure for *Staphylococcus epidermidis* from multilocus sequence typing data. **J Bacteriol.** v. 189, n. 6, p. 2540–2552, 2007.

MIRAGAIA, M. Factors contributing to the evolution of *mecA*-mediated β -lactam resistance in staphylococci: update and new insights from whole genome sequencing (WGS). **Frontiers in Microbiology.** v. 9, p. 2723, 2018.

MIRÓ-CANTURRI, A.; AYERBE-ALGABA, R.; SMANI Y. Drug repurposing for the treatment of bacterial and fungal infections. **Frontiers in Microbiology.** v. 10, n. 41, p. 1-12, 2019.

NAMVAR, A. E. et al. Molecular characterization of *Staphylococcus epidermidis* isolates collected from an intensive care unit. **Arch Pediatr Infect Dis.** v. 5, n. 2, p. e36176, 2017.

OLIVEIRA, C.F.D. et al. Coagulase-negative staphylococci in Southern Brazil: looking toward its high diversity. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 49, p. 292-299, 2016.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis*: Pathogenesis. In *Staphylococcus epidermidis*: Methods and Protocols, P.D. Fey, ed. (New York: Springer), p. 17-31, 2014.

PEDROSO, S. H. S. P. et al. Biofilm and toxin profile: A phenotypic and genotypic characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from human bloodstream infections. **Microbial Pathogenesis**. v. 100, p. 312-318, 2016.

PEERAYEH, S.N.; MOGHADAS, A. J.; BEHMANESH, M. Prevalence of virulence-related determinants in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. **Jund J Microbiol**. v. 9, n. 8, p. e30593, 2016.

PINHEIRO, L. et al. *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*: detection of biofilm genes and biofilm formation in blood culture isolates from patients in a Brazilian teaching hospital. **Diagnostic Microbiol Infect Dis**. v. 86, p. 11–14, 2016.

PUJA, G. et al. Detection of biofilm production in blood culture isolates of Staphylococci. **Int J Med Res Health Sci**. v. 4, n.1, p. 22-28, 2015.

QIN, L. et al. Toxin mediates sepsis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. **PLoS Pathog**, n. 13, p. e1006153, 2017.

QUECK, S. Y. et al. Mobile genetic element-encoded cytolysin connects virulence to methicillin resistance in MRSA. **PLoS Pathog**, n. 5, p. e1000533, 2009.

RAHIMI, F.; KARIMI, S. Biofilm Producing *Staphylococcus epidermidis* Strains Isolated From Clinical Samples in Tehran, Iran. **Arch Clin Infect Dis**. v. 11, n. 3, p. e33343, 2016.

RANI, V. S.; RAVINDRA, S.; RAO, R. K. Biofilm detection and clinical significance of *Staphylococcus epidermidis* isolates. **J Evol Med Dental Sciences**. v. 4, n. 28, p. 4844-4849, 2015.

REMINGTON, J. et al. S. Staphylococcal infections. **Infect Dis Fetus Newborn.**, p. 489–505, 2011.

RIBOLI, D. F. M. Significância clínica e epidemiologia molecular de *Staphylococcus* spp. nas infecções da corrente sanguínea em UTI neonatal. 2018. 38 f. Tese (Doutorado em Biologia Geral) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, Brasil, 2018.

ROLF, S. et al. Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. **PLoS ONE**. v. 9, n. 8, p. e104984, 2014.

SADER, H. S. et al. SENTRY Participants Group (Latin America). SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin America and Brazilian results for 1997 through 2001. **BJID**. v. 8, n. 1, p. 25-79, 2004.

SHANE, A. L. et al. Neonatal sepsis. **Lancet**. v. 390, p. 1770-1780, 2017.

SPRINGER-VERLAG, I., et al. Coagulase-negative staphylococci: update on the molecular epidemiology and clinical presentation, with a focus on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus*. **J Europ J Clin Microbiol Infect Dis**. v.31, n. 1, 2012.

THOMAS, J.C. et al. Differing lifestyles of *Staphylococcus epidermidis* as revealed through Bayesian clustering of multilocus sequence types. **Infect Genet Evol**. v. 22, p. 257-264, 2014.

TOLO, I. et al. Do *Staphylococcus epidermidis* genetic clusters predict isolation sources? **J Clin Microbiol**. v. 54, p. 1711-1719, 2016.

TZIALLA, C. et al. Antimicrobial therapy in neonatal intensive care unit. **Italian J Ped.** v. 41, n. 27, p. 1-6, 2015.

WIDERSTRÖM, M. et al. A multidrug-resistant *Staphylococcus epidermidis* clone (ST2) is an ongoing cause of hospital-acquired infection in a Western Australian hospital. **J Clin Microbiol.** v. 50, p. 2147-2151, 2012.

WIDERSTROM, M. et al. Clonality among multidrug-resistant hospital-associated *Staphylococcus epidermidis* in northern Europe. **Scand J Infect Dis.** v. 41, p. 642–649, 2009.

WYNN, J. L. Defining Neonatal Sepsis. **Curr Opin Pediatr.** v. 28, n.2, p. 135-140, 2016.

YADAV, N. S. et al. Bacteriological profile of neonatal sepsis and antibiotic susceptibility pattern of isolates admitted at Kanti Children's Hospital, Kathmandu, Nepal. **BMC Res Notes.** v. 11, n. 301, p.1-6, 2018.

ZANKARI, E. et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. **J Antimicrob Chemother.** v. 67, n. 11, p. 2640-2644, 2012.

ZHAO, C. et al. Antimicrobial resistance trends among 5608 clinical gram-positive isolates in China: results from the gram-positive cocci resistance surveillance program (2005–2010). **Diagn Microbiol Infect Dis,** v. 73, p. 174–181, 2012.

ZHENG, W.; SUN, W.; SIMEONOV, A. Drug repurposing screens and synergistic drug-combinations for infectious diseases. **British J Pharmac,** v. 175, n. 2, p. 181-191, 2017.

Tabelas

Tabela 1 – *Staphylococcus epidermidis* isolados de hemoculturas de recém-nascidos coletadas no período de um ano (2016/2017) em um hospital terciário do sul do Brasil.

ST	MRSE MSSE	mec class	ccr	SCCmec	Unidade hospitalar	Ano de isolamento	Óbitos
ST2 (n=30)	MRSE (n=29)	A (n=19)	3 (n=19)	III (3A) (n=19)	UTI-RN (n=29) UTI-PED (n=1)	2016 (n=12) 2017 (n=18)	n=3
		B (n=10)	2 (n=10)	IVa (2B) (n=10)			n=1
	MSSE (n=1)	-	-	-			n=2
ST6 (n=8)	MRSE (n=8)	B (n=8)	* (n=7)	NT (n=7)	UTI-RN (n=7) GO (n=1)	2016 (n=2) 2017 (n=6)	n=1
			2 (n=1)	IVc (2B) (n=1)			-
ST20 (n=2)	MRSE (n=2)	A (n=1)	2 (n=2)	II (2A) (n=1)	UTI-RN (n=1) UTI- PED (n=1)	2017 (n=2)	n=1
		B (n=1)		IVc (2B) (n=1)			-
32 (n=1)	MSSE (n=1)	-	-	-	UTI-RN (n=1)	2017 (n=1)	-
ST35 (n=2)	MSSE (n=2)	-	5 (n=1) - (n=1)	-	UTI-RN (n=2)	2016 (n=1) 2017 (n=1)	-
ST59 (n=4)	MRSE (n=3)	B (n=3)	2 (n=2)	IV (2B) (n=2)	UTI-RN (n=4)	2017 (n=4)	-
			* (n=1)	IVa (2B) (n=1)			-
	MSSE (n=1)	-	-	-			-
ST81 (n=1)	MRSE (n=1)	B (n=1)	2 (n=1)	IVa (2B&5) (n=1)	UTI-RN (n=1)	2016 (n=1)	n=1
ST87 (n=1)	MRSE (n=1)	B (n=1)	2 (n=1)	IVa (2B) (n=1)	GO (n=1)	2017 (n=1)	-
ST89 (n=1)	MSSE (n=1)	-	2 (n=1)	-	UTI-RN (n=1)	2017 (n=1)	-
ST283 (n=1)	MSSE (n=1)	-	-	-	UTI-RN (n=1)	2017 (n=1)	-
ST369 (n=1)	MRSE (n=1)	B (n=1)	2 (n=1)	IVa (2B) (n=1)	UTI-RN (n=1)	2016 (n=1)	-
ST - (n=1)	MRSE (n=1)	A (n=1)	3 (n=1)	III (3A) (n=1)	UTI-RN (n=1)	2016 (n=1)	n=1
ST - (n=1)	MSSE (n=1)	-	-	-	GO (n=1)	2016 (n=1)	-
ST - (n=1)	MSSE (n=1)	-	-	-	CO (n=1)	2017 (n=1)	-

ST = Sequence type; MRSE = *Staphylococcus epidermidis* resistente a meticilina; MSSE = *Staphylococcus epidermidis* sensível a meticilina; CO = Centro obstétrico; GO = Ginecologia e obstetria; UTI-PED = Unidade de terapia intensiva pediátrica; UTI-RN = Unidade de terapia intensiva neonatal.

Tabela 2 – Genes de resistência encontrados nos isolados de *Staphylococcus epidermidis*.

Antimicrobianos	Gene	Presença	
		n	%
Ácido fusídico	<i>fusB</i>	2	3,63
Aminoglicosídeos	<i>aac(6')-aph(2'')</i>	47	85,45
	<i>aad(6)</i>	2	3,36
	<i>aadD</i>	19	34,54
	<i>ant(6)-Ia</i>	2	3,63
	<i>ant(4')-Ib</i>	19	34,54
	<i>ant(9)-Ia</i>	1	1,81
	<i>aph(3')-III</i>	4	7,27
Penicilina	PC1 <i>blaZ</i>	55	100
	<i>blaZ(133)</i>	1	1,81
	<i>blaZ(138)</i>	36	65,45
	<i>blaZ(29)</i>	7	12,72
	<i>blaZ(49)</i>	11	20
	<i>blaZ(78)</i>	11	20
Meticilina	<i>mecA</i>	46	83,63
	<i>mecI</i>	21	38,18
	<i>mecR1</i>	21	38,18
Cloranfenicol	<i>cat(pC221)</i>	10	18,18
Fosfomicina	<i>fosB(3)</i>	12	21,81
	<i>fosB(4)</i>	43	78,18
Macrolídeos	<i>erm(A)</i>	1	1,81
	<i>erm(C)</i>	17	30,9
	<i>mph(C)</i>	5	9,09
Estreptograminas	<i>vat(B)</i>	1	1,81
	<i>vga(A)</i>	1	1,81
	<i>vga(B)</i>	1	1,81
Lincosamidas	<i>lnu(A)</i>	4	7,27
Macrolídeos, estreptograminas e lincosamidas	<i>msr(A)</i>	7	12,72
Tetraciclina	<i>tet(33)</i>	0	0
	<i>tet(K)</i>	8	14,54
Trimetoprima	<i>dfrC</i>	54	98,18
	<i>dfrG</i>	0	0

Tabela 3 – Genes de virulência encontrados nos isolados de *Staphylococcus epidermidis*.

Gene	Presença	
	n	%
<i>aap</i>	1	1,18
<i>arcA_ACME</i>	22	40
<i>alt1</i>	36	65,45
<i>alt2</i>	55	100
<i>alt3</i>	55	100
<i>altE</i>	19	34,54
<i>capA</i>	55	100
<i>dltB</i>	55	100
<i>embp</i>	47	85,45
<i>gehC</i>	55	100
<i>gehD</i>	55	100
<i>graR</i>	55	100
<i>hID</i>	55	100
<i>icaA</i>	37	67,27
<i>mprF</i>	55	100
<i>psm-mec</i>	21	38,18
<i>psm_beta1</i>	6	10,9
<i>psm_alpha</i>	55	100
<i>sdrF</i>	49	89,09
<i>sdrG</i>	55	100
<i>sdrH</i>	54	98,18
<i>sspA</i>	55	100
<i>sspB</i>	55	100
<i>tagF</i>	55	100

Tabela 4 – Características dos isolados de *Staphylococcus epidermidis* em que os neonatos foram a óbito.

ST	SCCmec	ccr	Unidade hospitalar	Infecção por outros microrganismos
ST2 (n=6)	III (3A) (n=4)	9 (n=3)	UTI-RN (n=5)	<i>Acinetobacter baumannii</i> e <i>S. marcescens</i> (n=1)
		4 (n=1)		
	IVa (2B) (n=2)	-	UTI-PED (n=1)	-
ST6 (n=1)	NT	-	UTI-RN	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i>
ST20 (n=1)	II (2A)	-	UTI-PED	-
ST81 (n=1)	IVa (2B&5)	-	UTI-RN	-
ST (n=1)	III (3A)	9	UTI-RN	-

ST = *Sequence type*; UTI-PED = Unidade de terapia intensiva pediátrica; UTI-RN = Unidade de terapia intensiva neonatal.

Figuras

Figura 1 – Árvore filogenética representando o agrupamento com base na contagem de SNPs, demonstrando a relação dos *sequence types* (ST) dos *S. epidermidis* isolados de hemoculturas de recém-nascidos.

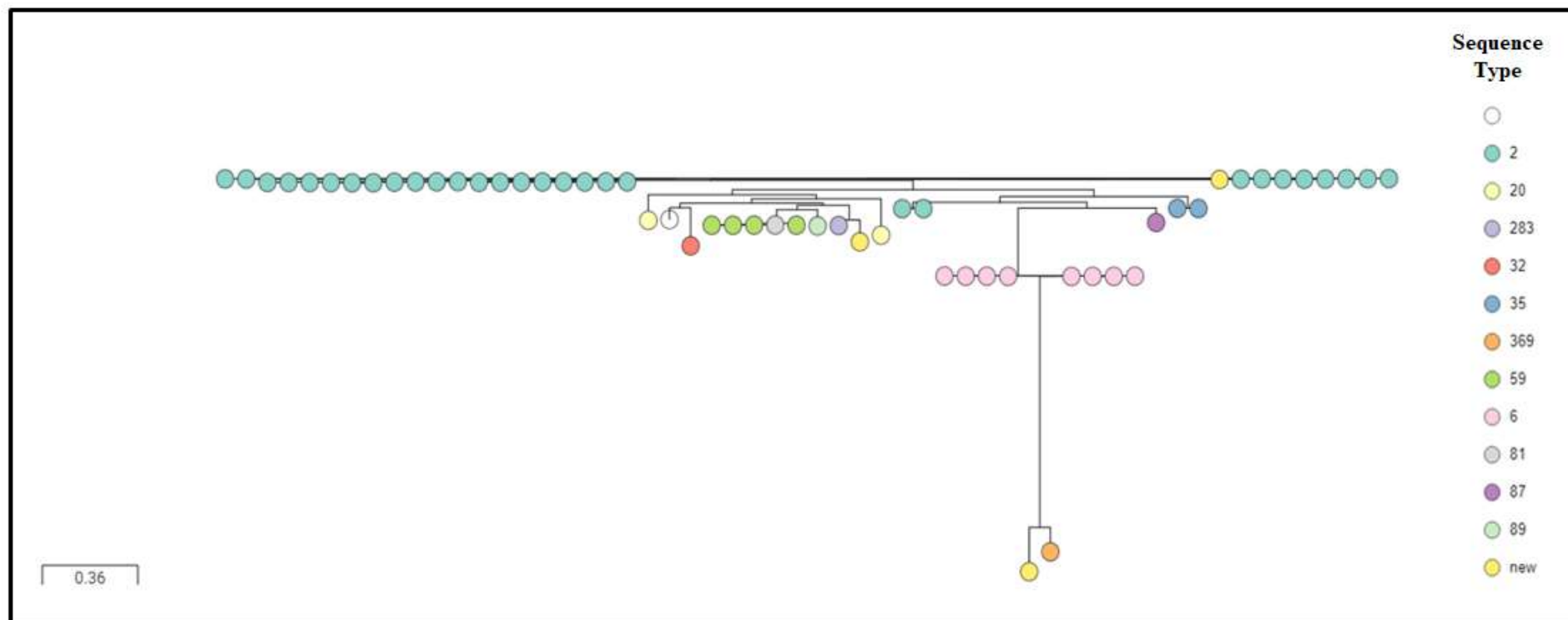


Figura 2 – Árvore filogenética com base na contagem de SNPs representando o grupo de ST2, associados ao tipo de *SCCmec*.

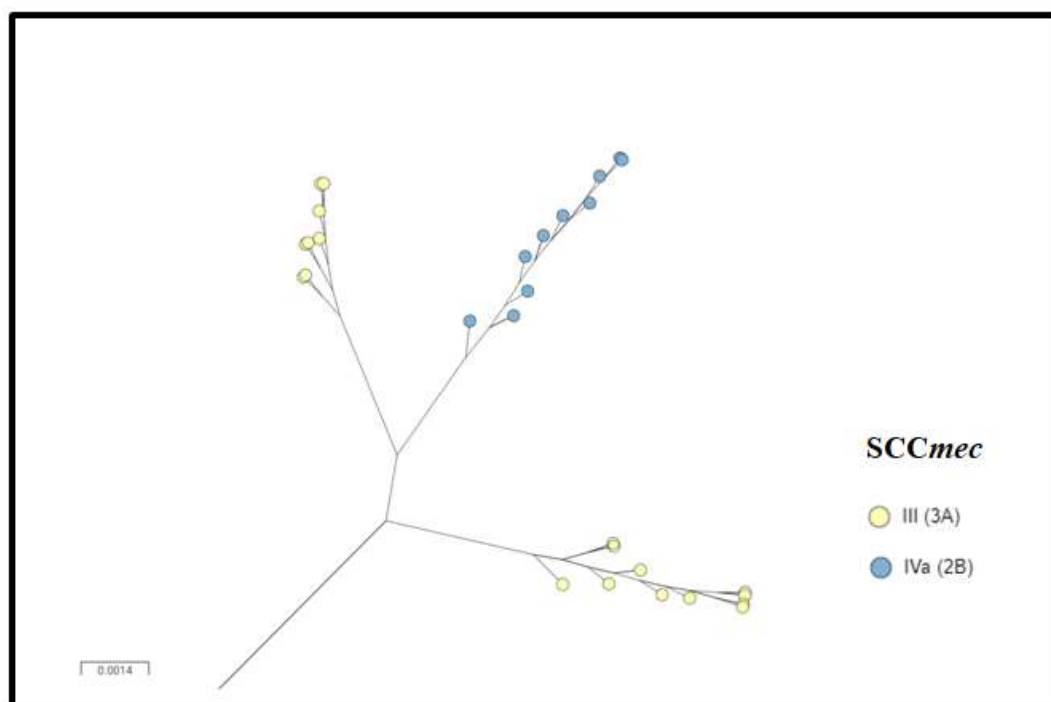
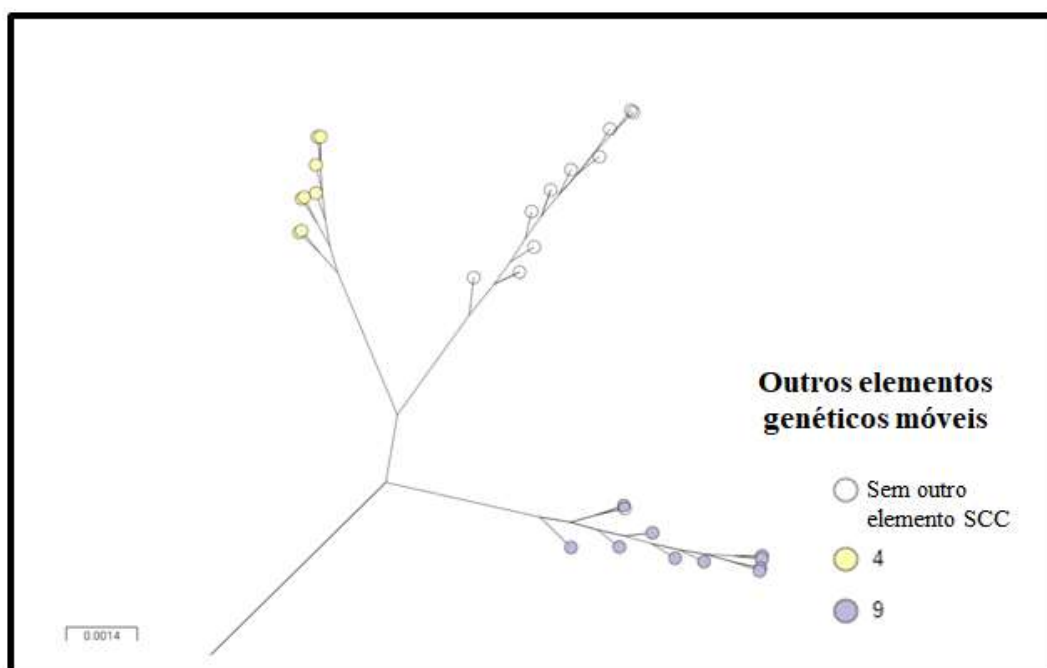


Figura 3 – Árvore filogenética com base na contagem de SNPs representando o grupo ST2, demonstrando o *SCCmecIII* e seus outros elementos genéticos móveis do tipo SCC (*ccr 9* e 4).



5.4 ARTIGO 2

O artigo foi publicado no periódico *The Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* (ISSN 2175-9790), qualis capes 2013-2016 B2, na forma de artigo original.

BJPS

Brazilian Journal of
Pharmaceutical Sciences

<http://dx.doi.org/10.1590/s2175-97902018000217369>

Article

Synergistic antibacterial effect of statins with the complex {[1-(4-bromophenyl)-3-phenyltriazene N_3 -oxide- $\kappa^2 N^1, O^4$] (dimethylbenzylamine- $\kappa^2 C^1, N^4$)palladium(II)}

Roberta Filipini Rampelotto^{1,2}, Vinicius Victor Lorenzoni^{1,2}, Danielly da Costa Silva^{1,2},
Guilherme A. de Moraes³, Marissa Bolson Serafin^{1,2}, Maisa Kräulish Tizotti^{1,2}, Silvana Coelho¹,
Priscilla Zambiasi³, Manfredo Hörner³, Rosmari Hörner^{1,2*}

¹ Department of Clinical and Toxicological Analysis, Health Sciences Center, University Federal of Santa Maria, ² Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Health Sciences Center, University Federal of Santa Maria, ³ Department of Chemistry, Center for Natural and Exact Sciences, University Federal of Santa Maria

The treatment of infections caused by resistant microorganisms represents a big challenge in healthcare due to limited treatment options. For this reason, the discovery of new active substances which are able to perform innovative and selective actions is of great impact nowadays. Statins and triazenes (TZC) have consolidated as a promising class of compounds, characterized by the expressive biological activity, especially antimicrobial activities. The aim of this study was to assess the *in vitro* synergistic antibacterial effect of the association of statins and a new TZC complex {[1-(4-bromophenyl)-3-phenyltriazene N_3 -oxide- $\kappa^2 N^1, O^4$](dimethylbenzylamine- $\kappa^2 C^1, N^4$)palladium(II)} (Pd(DMBA)LBBr) against American Type Culture Collection (ATCC) strains and clinical isolates. The complex and the statins showed bacterial activity of all tested strains and clinical isolates, evidencing that TZC complexation with metals can be promising. Simvastatin showed synergy when associated to the complex (FICI \leq 0.5), being the minimum inhibitory concentration (MIC) of 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ found in 6 samples. Thus, it is possible to infer that the association between Pd(DMBA)LBBr and simvastatin consists of an alternative to increase the potential of these compounds, since statins have low toxicity.

Keywords: Statins/antimicrobial activity. Triazene. Atorvastatin. Simvastatin.

INTRODUCTION

Antimicrobial resistance is a serious public health issue worldwide. Multi-drug resistant microorganisms (MDR) are an increasing concern since they show low susceptibility to different classes of antimicrobials that are commonly prescribed in hospitals (WHO, 2014; Tziaila *et al.*, 2015). It has also become a challenge for healthcare professionals because therapy options for the treatment of some infections caused by MDR are more and more

restrict due to the fast emergence and dissemination of these microorganisms (Azevedo, Silva, 2012; Thangamani *et al.*, 2015; Karam *et al.*, 2016).

This resistance occurs due to several reasons, mainly the indiscriminate use of these agents, thus decreasing the amount of drugs available for the treatment of such infections (Azevedo, Silva, 2012; Karam *et al.*, 2016). Therefore, there is the urge to discover new drugs with antibacterial properties, in addition to associations in the search of synergistic effects (Kalaivani, 2012; Thangamani *et al.*, 2015; Tizotti *et al.*, 2016).

Statins are a class of drugs which have shown a promising antibacterial activity against several bacterial species, being used for the reduction of lipids in patients with high cholesterol levels as well as showing anti-inflammatory activity (Almog *et al.*, 2004; Lopez-

*Correspondence: R. Hörner, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima, número 1000 – Prédio 26 – salas 1201/1205, CEP: 97105-900 - Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. Fone: 55 3220 8751 - FAX: 55 3220 1880. E-mail: rosmari.ufsm@gmail.com

Synergistic antibacterial effect of statins with the complex {[1-(4-bromophenyl)-3-phenyltriazene N_3 -oxide- $\kappa^2 N^1, O^4$](dimethylbenzylamine- $\kappa^2 C^1, N^4$)palladium(II)}

**Roberta Filipini Rampelotto^{1,2}, Vinicius Victor Lorenzoni^{1,2}, Danielly da Costa Silva^{1,2},
Guilherme A. de Moraes³, Marissa Bolson Serafin^{1,2}, Máisa Kräulich Tizotti^{1,2}, Silvana
Coelho¹, Priscilla Zambiazzi³, Manfredo Hörner³, Rosmari Hörner^{1,2*}.**

¹ Department of Clinical and Toxicological Analysis, Health Sciences Center, University Federal of Santa Maria, ² Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Health Sciences Center, University Federal of Santa Maria, ³ Department of Chemistry, Center for Natural and Exact Sciences, University Federal of Santa Maria

***Correspondence:**

R. Hörner

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT)

Centro de Ciências da Saúde (CCS)

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Avenida Roraima, número 1000 – Prédio 26 – salas 1201/1205

CEP: 97105-900 - Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

Fone: 55 3220 8751 - FAX: 55 3220 1880.

Email: rosmari.ufsm@gmail.com

Received for publication on 21st June 2017

Accepted for publication on 27th November 2017

ABSTRACT

The treatment of infections caused by resistant microorganisms represents a big challenge in healthcare due to limited treatment options. For this reason, the discovery of new active substances which are able to perform innovative and selective actions is of great impact nowadays. Statins and triazenes (TZC) have consolidated as a promising class of compounds, characterized by the expressive biological activity, especially antimicrobial activities. The aim of this study was to assess the *in vitro* synergistic antibacterial effect of the association of statins and a new TZC complex {[1-(4-bromophenyl)-3-phenyltriazene N_3 -oxide- $\kappa^2 N^1, O^4$](dimethylbenzylamine- $\kappa^2 C^1, N^4$)palladium(II)} (**Pd(DMBA)LBr**) against American Type Culture Collection (ATCC) strains and clinical isolates. The complex and the statins showed bacterial activity of all tested strains and clinical isolates, evidencing that TZC complexion with metals can be promising. Simvastatin showed synergy when associated to the complex (FICI \leq 0.5), being the minimum inhibitory concentration (MIC) of 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ found in 6 samples. Thus, it is possible to infer that the association between **Pd(DMBA)LBr** and simvastatin consists of an alternative to increase the potential of these compounds, since statins have low toxicity.

Keywords: Statins/antimicrobial activity. Triazenide. Atorvastatin. Simvastatin.

INTRODUCTION

Antimicrobial resistance is a serious public health issue worldwide. Multi-drug resistant microorganisms (MDR) are an increasing concern since they show low susceptibility to different classes of antimicrobials that are commonly prescribed in hospitals (WHO, 2014; Tziella *et al.*, 2015). It has also become a challenge for healthcare professionals because therapy options for the treatment of some infections caused by MDR are more and more restrict due to the fast emergence and dissemination of these microorganisms (Azevedo, Silva, 2012, Thangamani *et al.*, 2015; Karam *et al.*, 2016).

This resistance occurs due to several reasons, mainly the indiscriminate use of these agents, thus decreasing the amount of drugs available for the treatment of such infections (Azevedo, Silva, 2012, Karam *et al.*, 2016). Therefore, there is the urge to discover new drugs with antibacterial properties, in addition to associations in the search of synergistic effects (Kalaivani, 2012; Thangamani *et al.*, 2015; Tizotti *et al.*, 2016).

Statins are a class of drugs which have shown a promising antibacterial activity against several bacterial species, being used for the reduction of lipids in patients with high cholesterol levels as well as showing anti-inflammatory activity (Almog *et al.*, 2004; Lopez-Cortes *et al.*, 2013; Kozarov, Padro, Badimon, 2014; Thangamani *et al.*, 2015). Also, other substances worth noticing are triazenes (TZC), which contain an aliphatic chain composed by three nitrogen atoms interconnected in sequence (N=N-N), responsible for their biological properties (Moore, Robinson, 1986). These substances show wide pharmacological versatility such as antifungal, antileukemia and antibacterial activity, making them the focus of several studies (Hörner *et al.*, 2008; Domingues *et al.*, 2010; Mohammadi, 2014; Tizotti *et al.*, 2016).

Also, in order to increase the biological activity and stability of TZC in medicines, there is a growing interest in associating these compounds with metals (Sreedhara, Cowan, 2001; Karami *et al.*, 2017). Compounds that contain palladium (Pd(II)) are worth highlighting, mainly regarding antitumor activity, since they have more stability and less toxicity when compared to platin-based anticancer compounds, due to their similar structural behaviour (Dupont, Consorti, Spencer, 2005; Massai *et al.*, 2016; Karami *et al.*, 2017). Also, their potential antibacterial activity can have their action significantly increased up to 16 times when associated to antimicrobials than the free drug (Guerra *et al.*, 2005).

The aim of this study was to assess the in vitro synergistic antibacterial effect of the association between statins and a new TZC complex {[1-(4-bromophenyl)-3-phenyltriazene N_3 -oxide- $\kappa^2 N^1, O^4$](dimethylbenzylamine- $\kappa^2 C^1, N^4$)palladium(II)} (**Pd(DMBA)LBr**), their ligands N,N'-dimethylbenzylamine (**DMBA**), 1-Phenyl-3-(4-bromophenyl)triazene N_1 -hydroxide (**HLBr**), and precursor (**[Pd(DMBA)(μ -Cl)]₂**) against American Type Culture Collection (ATCC) strains and clinical isolates.

MATERIALS AND METHODS

Chemical compounds

The TZC were previously synthesized and chemically characterized in the Núcleo de Investigação de Triazenos e Complexos (*NiTriCo*) of Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Statins were purchased commercially in the form of their active principle (atorvastatin, formula: $C_{66}H_{68}CaF_2N_4O_{10} \cdot 3H_2O$, PM= 1209.4; simvastatin, formula: $C_{25}H_{38}O_5$, PM= 418.57).

Experimental

The synthesis of the ligand **HLBr** was realized according the literature and based on Scheme 1, while the synthesis of the complex **Pd(DMBA)LBr** from the ligand **HLBr** and the precursor complex **[Pd(DMBA)Cl]₂** followed according Scheme 2 (Martins *et al.*, 2017).

Synthesis of 1-(4-Bromophenyl)-3-Phenyltriazene N_3 -Oxide- $\kappa^2 N^1, O^4$](Dimethyl-Benzylamine- $\kappa^2 C^1, N^4$)Palladium(II)} (**Pd(DMBA)lbr**)

To obtain the complex **Pd(DMBA)LBr** a solution of the protonated ligand **HLBr** (0.05 g; 17.12 mmol) in 20 mL of tetrahydrofuran was prepared. To this transparent pale-yellow solution five drops of a concentrate solution of KOH in methanol were added under continuous stirring at room temperature. The reaction mixture changes to intense yellow indicating the presence of the deprotonated free ligand anion [**LBr**]⁻. A solution of the precursor complex **[Pd(DMBA)(μ -Cl)]₂** (0.053 g; 0.097 mmol) dissolved in 10 mL of tetrahydrofuran was added under stirring at room temperature - **[Pd(DMBA)(μ -Cl)]₂** was previously prepared according Cope and Friedrich (1968). The reaction mixture was stirred 1

h while the color changes to opaque yellow. The reaction mixture was filtered. After evaporation of the solvent mixture at room temperature, transparent yellow crystals with lozenge shape were obtained. Yield: 50% (0.049 g) based on 1-Phenyl-3-(4-bromophenyl)triazene N_1 -hydroxide. Anal. Calc. for $C_{21}H_{21}BrN_4OPd$: C, 47.43; H, 3.98; N, 10.54; Found: C, 45.9; H, 3.93; N, 10.19. IR $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$, KBr pellet: 3040 - 2833 ($\nu\text{C-H}$); 1588 ($\nu\text{C=C}$); 1480 ($\delta\text{N-H}$); 1417 ($\nu\text{N=N}$); 1314 (N-N-N); 1278 ($\nu\text{N}\rightarrow\text{O}$); 665 ($\text{C}_{\text{ar}}\text{-Br}$); 1163 (N-N). NMR ^1H (600 MHz DMF- d_7) δ = 7.94 ppm (d , J = 8.54 Hz, 2H, ArH); δ = 7.53-7.33 ppm (m , 7H, ArH); δ = 7.00 ppm (d , J = 7.27 Hz, 1H, ArH); δ = 6.88 ppm (t , J = 7.27 Hz, 1H, ArH); δ = 6.61 ppm (t , J = 7.42 Hz, 1H, ArH); δ = 6.31 ppm (d , J = 7.66 Hz, 1H, ArH); δ = 4.09 ppm (s , J = 19.34 Hz, 2H, CH_2); δ = 3.49 ppm (s , CH_3 , 6H). NMR ^{13}C (600 MHz DMF- d_7) δ = 149.07 ppm (C_{18}); δ = 148.91 ppm (C_1); δ = 148.44 ppm (C_{13}); δ = 141.19 ppm (C_7); δ = 134.42 ppm (C_{14}); δ = 131.42 ppm (C_3 , C_5); δ = 129.22 ppm (C_9 , C_{11}); δ = 127.40 ppm (C_{10}); δ = 126.62 ppm (C_2 , C_6); δ = 124.37 ppm (C_{15}); δ = 123.57 ppm (C_{16}); δ = 121.76 ppm (C_{17}); δ = 118.61 ppm (C_8 , C_{12}); δ = 117.42 ppm (C_4); δ = 72.39 ppm (C_{19}); δ = 51.69 ppm (C_{21} , C_{22}).

***In vitro* antibacterial activity**

The *in vitro* antibacterial activity was evaluated against different strains ATCC, including *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Enterobacter hormaechei* ATCC 700323, *Enterococcus casseliflavus* ATCC 700327, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Micrococcus luteus* ATCC 7468, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Salmonella* spp. ATCC 52117, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* BAA 1026, *Staphylococcus aureus* BAA 976, *Staphylococcus aureus* BAA 977, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 and against ten coagulase-negative staphylococci isolates in newborn blood cultures in 2014. Clinical isolates were identified through by automated system Vitek® 2 (bioMérieux, France).

Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Bacterial isolates and ATCC strains, stored in 15% glycerol at $-80\text{ }^\circ\text{C}$, were pre-activated using the agar trypticase soy medium (TSA) for 24 h at $35 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$. Evaluation of the

antibacterial activity of the compounds was performed using the conventional method of broth microdilution for Minimum Inhibitory Concentration (MIC) based on the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI, 2012a). The test compounds was diluted in ethanol at a concentration of $20.480 \mu\text{g mL}^{-1}$ and then successive dilutions were made with concentrations from 1.024 to $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, with ethanol concentration 5% to 0.0048%. The bacterial inoculum was prepared using a 0.5 McFarland scale, so that each well contained 5×10^5 CFU mL^{-1} . Plates were incubated for 24 h at 35 ± 2 °C and after this period, the MIC was determined visually as the lowest concentration that completely inhibited growth of microorganisms in dilution wells. For control and comparison MIC was determined as a broad spectrum antibacterial drug used in therapeutics: Tigecycline (Tygacil® - Wyeth). The drug was dissolved in physiological solution in the same manner as the compounds, but at a lower concentration ($5.120 \mu\text{g mL}^{-1}$). After successive dilutions were performed at concentrations of 256 to $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$. Tests were also conducted using only ethanol to demonstrate that it did not interfere with the activity.

Statistical analysis

The analysis of the combination of TZC and statins was obtained by calculating the Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI). The FICI was interpreted as “synergic” ($\text{FIC} \leq 0.5$); “no interaction” ($\text{FIC} > 0.5$ and ≤ 4.0) and “antagonism” ($\text{FIC} > 4.0$) (Odds, 2003; Konaté *et al.*, 2012).

Ethical considerations

This study was approved by the Research Ethics Committee (CEP) of UFSM, under the certificate number of presentation for ethical consideration (CAAE) 38850614.4.0000.5346.

RESULTS

All compounds showed antibacterial activity against the strains tested. The MIC of ATCC strains against ligands, precursor and complex, associated or not to statins, free palladium(II), tigecycline and FICI values, are shown in **Table I**; and it is possible to observe the same parameters in **Table II**, however against the 10 clinical isolates. Simvastatin showed

an activity similar or better than atorvastatin in all ATCC strains and clinical isolates analyzed, with the lowest MIC ($=16 \mu\text{g mL}^{-1}$) found in the ATCC strain of *S. aureus* BAA 976. Also, *S. aureus* BAA 977, *Micrococcus luteus* 7468 and the isolates 8 showed MIC $=32 \mu\text{g mL}^{-1}$. It has also been possible to observe that the best activity occurred in Gram-positive bacteria.

Regarding TZC, the DMBA ligand and the precursor ($[\text{Pd}(\text{DMBA})(\mu\text{-Cl})_2]$) showed MIC $\geq 128 \mu\text{g mL}^{-1}$ for all the microorganisms analyzed. The ligand HLBr showed good activity in ATCC strains, with MIC $=64 \mu\text{g mL}^{-1}$ for *E. faecalis* ATCC 51299 and *S. aureus* ATCC 25923, and for the clinical isolates the lowest MIC was $128 \mu\text{g mL}^{-1}$. As for the palladium(II) complex, (Pd(DMBA)LBr) showed greater antibacterial potential in nearly all microorganisms when compared to the ligand and the precursor, resulting in MIC $=64 \mu\text{g mL}^{-1}$ for some clinical isolates and MIC $=32 \mu\text{g mL}^{-1}$ for the ATCC strain of *E. faecalis* 51299.

When TZC was associated with simvastatin, it was possible to observe a decrease of MIC values in both ATCC strains and clinical isolates. The DMBA associated with simvastatin showed synergy (FICI ≤ 0.5) against strains of *B. cereus* ATCC 14579, *E. faecalis* ATCC 51299, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* 29213, and *S. aureus* BAA 1026. The precursor ($[\text{Pd}(\text{DMBA})(\mu\text{-Cl})_2]$) showed synergy against these strains as well as *Salmonella* ATCC 52117 and isolate 2.

The ligand 2 (HLBr), when associated to simvastatin, showed MIC $=64 \mu\text{g mL}^{-1}$ for *Salmonella* ATCC 52117; MIC $=32 \mu\text{g mL}^{-1}$ for *B. cereus*, *S. aureus* 2923, *S. aureus* BAA 1026, isolates 4 and 6; MIC $=16 \mu\text{g mL}^{-1}$ for *E. faecalis* ATCC 51299 and *S. aureus* 25923, with FICI < 0.5 against these samples. The complex (Pd(DMBA)LBr) was twice more active than its free ligands and precursor when associated with simvastatin, showing synergy against the strains *E. casseliflavus* ATCC 700327, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *S. aureus* 29213, *S. aureus* BAA 1026, isolates 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7, with FICI ≤ 0.5 . As for the association of TZC with atorvastatin, no synergy was evidenced, but MIC values were similar to the ones obtained when the compounds were separately tested, except for a few strains.

DISCUSSION

The emergence of antimicrobial resistance shows the need for searching new drugs, as well as their association (Masadeh *et al.*, 2012). Some studies have evidenced a possible

antibacterial effect of this class of drugs, associated to antimicrobials or not in order to reduce morbidity and mortality of several infectious diseases (Masadeh *et al.*, 2012; Ajrouche *et al.*, 2013; López-Cortés *et al.*, 2013; Kozarov, Padro, Badimon, 2014; Graziano *et al.*, 2015; Thangamani *et al.*, 2015).

In this study, it was possible to observe that statins are able to induce variable degrees of antibacterial activity, with simvastatin being more potent than atorvastatin. A study developed in 2012 comparing the antibacterial activity of atorvastatin, simvastatin and rosuvastatin showed that the two first statins were the most potent in Gram-positive microorganisms, with MIC=166.67±72.16 µg mL⁻¹ for atorvastatin and MIC=104.17±36.08 µg mL⁻¹ for simvastatin in *E. faecalis* 51299 strains, a result similar to the one found in our study. However, below-average results were found for *E. coli* 35218 (MIC=26.04±9.02 µg mL⁻¹ and MIC=58.08±18.04 µg mL⁻¹), and *S. epidermidis* 12228 (MIC=26.04±9.02 µg mL⁻¹), respectively (Masadeh *et al.*, 2012).

Graziano *et al.* has detected that simvastatin was the only statin with antibacterial activity against clinical isolates and ATCC strains of *S. aureus* susceptible (MSSA) and resistant to methicillin (MRSA), with *S. aureus* 29213 showing MIC=15.65 µg mL⁻¹ (Graziano *et al.*, 2015). The difference of MIC between these studies can be attributed to the different design of the study performed (Ting, Whitaker, Albandar, 2016). We suppose that it could have been due to the different methodology used in the solubility of statins, since the active principles used in our study were diluted in ethanol, whereas other researchers used dimethyl sulphoxide (DMSO). Thus, we performed the MIC of these strains by using the same methodology used in other studies, and results remained the same as when principles were diluted in ethanol. However, it is known that according to the document M100-S22 from CLSI, DMSO can inactivate DNA of microorganisms when used in doses higher than 1%, interfering with the antibacterial activity (CLSI, 2012b).

All statins induce their antihyperlipidemic activity through the same mechanism of action in eukaryotic cells, completely inhibiting the Class I 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase (HMG-CoA), hindering the formation of mevalonate of HMG-CoA, and leading to a decrease in biosynthesis of cholesterol and an increase in the removal of circulation of low density lipoproteins (LDL) (Shitara, Sugiyama, 2006; Masadeh *et al.*, 2012; Graziano *et al.*, 2015). However, studies have shown that it is unlikely that the antibacterial activity shown by this class of drugs is related to this action mechanism, since mechanisms of

antimicrobial effects of statins are yet to be elucidated (Masadeh *et al.*, 2012; Ting *et al.*, 2016). A possible mechanism which can be related would be due to promoting apoptosis in microbial cells or the hydrophobic nature of statins, leading to the rupture of the bacterial membrane, resulting in cell death (Bergman *et al.*, 2011; Tapia-Perez *et al.*, 2011; Masadeh *et al.*, 2012).

Other researchers have revealed that simvastatin inhibits the multiple biosynthetic pathways and the cellular processes in bacteria, including the selective interference of bacterial proteic synthesis, aiding the ability of this drug to suppress the production of some bacterial toxins such as α -hemolysin and Panton-Valentine leucocidin (Thangamani *et al.*, 2015). Furthermore, Thangamani *et al.* (2015) have shown that simvastatin has an excellent activity against biofilm-forming bacteria in *Staphylococcus*.

In terms of the difference of MIC in statins, it can be due to the difference in their chemical structure as well as their production. Simvastatin is the semisynthetic form which derives from lovastatin, a product of *Penicillium citrinum*, with higher intrinsic antibacterial activity. Atorvastatin, on the other hand, is the pure synthetic form (Mason *et al.*, 2005; Jerwood, Cohen, 2008; Ting *et al.*, 2016). These two are lipophilic statins, thus simvastatin probably goes through the cell membrane more easily, causing the inhibition of bacteria, depending on the dose. Atorvastatin has not shown significant antimicrobial activity, although it is lipophilic, and it is justified because this statin is not derived from fungi (Mason *et al.*, 2005; Graziano *et al.*, 2015). However, more studies regarding statins structure are needed in order to elucidate their effect against bacteria (Graziano *et al.*, 2015).

Regarding TZC, several studies using these compounds have shown that they have antimicrobial activity (Hörner *et al.*, 2008; Domingues *et al.*, 2010; Ombaka, Muguna, Gichumbi, 2012; Mohammadi, 2014; Paraginski *et al.*, 2014; Tizotti *et al.*, 2016), being proposed that their action mechanism occurs due to the chelating activity to metallic ions from the bacterial cell wall, inhibiting stages of bacterial synthesis, leading to cell death (Horner *et al.*, 2008; Ombaka, Muguna, Gichumbi, 2012; Yeo *et al.*, 2013).

The highest antibacterial activity was detected in Gram-positive microorganisms, and could be justified by the difference in the cell wall structure of these bacteria, which is less complex and has a thick layer of peptidoglycan. Gram-positive bacteria need this layer for their protection and the maintenance of osmotic pressure, thus, antibacterial activity may be

related to the inhibition of the synthesis of the peptidoglycan, leading to cell death (Yeo *et al.*, 2013).

The DMBA ligands and the precursor $[\text{Pd}(\text{DMBA})(\mu\text{-Cl})_2]$ showed $\text{MIC} \geq 128 \mu\text{g mL}^{-1}$. TZC complexed with palladium(II) showed better activity against the strains tested when compared to free ligands and precursor, proving to be an alternative for a new class of drugs with antibacterial activity. This activity can be justified since TZC complexed with transition metals such as Pd(II) can interact and cause damage to the DNA, providing a potent antibacterial activity, in addition to blocking cancer cells division leading to cell death (Hecht, 2000; Song *et al.*, 2006; Paraginski *et al.*, 2014). Therefore, complementary studies must be performed for the assessment of other biological parameters, their toxicity and therapeutic efficacy (Nunes *et al.*, 2014).

When associating TZC with atorvastatin or simvastatin, simvastatin has shown synergy. It is estimated that a third of American adults over 45 years old make use of these drugs routinely (Wang *et al.*, 2016). These drugs show a good safety profile with limited secondary effects, with low toxicity, allowing a frequent use in patients with high cholesterol levels (Thangamani *et al.*, 2015; Ting *et al.*, 2016). Also, studies show that patients who make use of this class of drugs have a lower risk of acquiring bacterial infections, proving the correlation of the use of statins and a lower incidence of sepsis and mortality related to these infections (Almog *et al.*, 2004; Ajrouche *et al.*, 2013; López-Cortés *et al.*, 2013).

Thus, according to MIC and FICI values obtained, we can infer that TZC complexed with palladium significantly increases the antibacterial activity, and worked even better when associated with simvastatin. The documentation of this synergistic effect is of great impact for the treatment of MDR bacteria together with the low toxicity performance of simvastatin.

CONFLICTS OF INTERESTS

The authors declare no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work received financial support from CNPq (Proc. 485262/2013-4). CNPq (Proc. 308014/2016-2) (M.H.) is thanked for grant.

REFERENCES

Ajrouché R, Al-Hajje A, El-Helou N, Awada S, Rachidi S, Zein S, et al. Statins decrease mortality in Lebanese patients with sepsis: A multicenter study. *Pharm Pract*. 2013;11(2):102-108.

Almog Y, Shefer A, Novack V, Maimon N, Barski L, Eizinger M, et al. Prior statin therapy is associated with a decreased rate of severe sepsis. *Statin Ther Sepsis*. 2004;110:880-885.

Azevedo CP, Silva JD. Avaliação do perfil de resistência da *Escherichia coli* isolada de uroculturas e correlação com antibioticoterapias empíricas atualmente propostas. *Revista Multidisciplinar em Saúde*. 2012; 4: 2-17.

Bergman P, Linde C, Putsep K, Pohanka A, Normark S, Henriques-Normark B, et al. Studies on the antibacterial effects of statins—*in vitro* and *in vivo*. *PloSone*. 2011;6(8):e24394.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standart. 9th Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, Pennsylvania, USA: CLSI; 2012a.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first information supplement, document M100-S22. Wayne, Pennsylvania, USA: CLSI; 2012b.

Cope AC, Friedrich EC. Electrophilic aromatic substitution reactions by platinum(II) and palladium(II) chlorides on N,N-dimethylbenzylamines. *J Am Chem Soc*. 1968;90(4):909-913.

Domingues VO, Hörner R, Reetz LGB, Kuhn F, Coser VM, Rodrigues JN, et al. *In vitro* evaluation of triazenes: DNA cleavage, antibacterial activity and cytotoxicity against acute myeloid leukemia cells. *J Braz Chem Soc*. 2010;21(12):2226-2237.

Dupont J, Consorti CS, Spencer J. The potential of palladacycles: more than just precatalysts. *Chem Rev.* 2005;105(6):2527e2572.

Graziano TS, Cuzzullin MC, Franco GC, Schwartz-Filho HO, De Andrade ED, Groppo FC, et al. Statins and antimicrobial effects: Simvastatin as a potential drug against *Staphylococcus aureus* Biofilm. *PloSone.* 2015;10(5):e0128098.

Guerra W, Azevedo EA, Monteiro ARS, Bucciarelli-Rodriguez M, Chartone-Souza, E, Nascimento AMA, et al. Synthesis, characterization, and antibacterial activity of three palladium(II) complexes of tetracyclines. *J Inorg Biochem.* 2005;99(12):2348-2354.

Hecht SM. Bleomycin: new perspectives on the mechanism of action. *J Nat Prod.* 2000;63(1):158-168.

Hörner M, Giglio VF, Santos AJRW, Wesphalen AB, Iglesias BA, Martins PR, et al. Triazenes and antibacterial activity. *Rev Bras Cienc Farm.* 2008;44(3):441-449.

Jerwood S, Cohen J. Unexpected antimicrobial effect of statins. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(2):362-364.

Kalaivani P. DNA, protein binding, cytotoxicity, cellular uptake and antibacterial activities of new palladium(II) complexes of thiosemicarbazone ligands: effects of substitution on biological activity. *Metallomics.* 2012;4(1):101-113.

Karam G, Chastre J, Wilcox MH, Vincent J. Antibiotic strategies in the era of multidrug resistance. *Crit Care.* 2016;20(1):136,1-9.

Karami K, Lighvan ZM, Lipkowski MDJ, Momtazi-Borojeni AA. Synthesis, electronic structure and molecular docking of new organometallic palladium (II) complexes with intercalator ligands: The influence of bridged ligands on enhanced DNA/serum protein binding and *in vitro* antitumoral activity. *J Organ Chem.* 2017;827:1-14.

Konaté K, Mavoungou JF, Lepengué AN, Aworet-Samseny RRR, Hilou A, Souza A, et al. Antibacterial activity against β -lactamase producing Methicillin and Ampicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) determination. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2012;11:1-12.

Kozarov E, Padro T, Badimon L. View of statins as antimicrobials in cardiovascular risk modification. *Cardio Research.* 2014;102(3):362-374.

López-Cortés LE, Gálvez-Acebal J, Del Toro MD, Velasco C, Cueto M, Caballero FJ, et al. Effect of statin therapy in the outcome of bloodstream infections due to *Staphylococcus aureus*: a prospective cohort study. *PloSone.* 2013;8(12):e82958.

Martins MAP, Salbego P, de Moraes GA, Zambiasi PJ, Orlando T, Bender CR, Pagliari AB, Frizzo CP, Hörner M, Understanding the crystalline formation of triazene n-oxides and the role of halogen $\cdots\pi$ Interactions. *New J Chem.* 2017. (in press).

Masadeh M, Mhaidat N, Alzoubi K, Al-Azzam S, Alnasser Z. Antibacterial activity of statins: a comparative study of Atorvastatin, Simvastatin, and Rosuvastatin. *Ann Clin Microbiol.* 2012;11:1-5.

Mason RP, Walter MF, Day CA, Jacob RF. Intermolecular differences of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors contribute to distinct pharmacologic and pleiotropic actions. *AJC.* 2005;96(5A):11F-23F.

Massai L, Pratesi A, Bogojeski J, Banchini M, Pillozzi S, Messori L. Antiproliferative properties and biomolecular interactions of three Pd(II) and Pt(II) complexes. *J Inorg Biochem.* 2016;165:1-6.

Mohammadi A. Novel triazene dyes based on N-phenylpiperazine: synthesis, anti-bacterial activity and solvatochromic properties. *J Mol Liq.* 2014;193:69-73.

Moore DS, Robinson SD. Catenated nitrogen ligands part I. Transition metal derivatives of triazenes, tetrazenes, tetrazadienes, and pentazadienes. *Adv Inorg Chem Radio Chem.* 1986;30:1-68.

Nunes MS, Garzon LR, Martini R, Rampelotto RF, Locatelli A, Horner M, et al. Atividade antibacteriana de um composto triazenido com ouro frente a cepas bacterianas e isolados clínicos. *Rev Cubana Farm.* 2014;48(4):573-581.

Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrobial Chemother.* 2003;52(1):1.

Ombaka AO, Muguna AT, Gichumbi JM. Antibacterial and antifungal activities of novel hydroxytriazenes. *J Envir Chem Ecotoxicol.* 2012;4(7):133-136.

Paraginski GL, Berticelli CR, Zambiasi PJ, Paraginski VTK, Horner M, dos Santos AJRWA, et al. *In vitro* antibacterial activity and toxicity toward *Artemia salina* Leach. of some triazene compounds. *Quim Nova.* 2014;37(7):1138-1444.

Shitara Y, Sugiyama Y. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. *Pharmacol Ther.* 2006;112(1):71-105.

Song Y, Wu Q, Yang P, Luan N, Wang L, Liu Y. DNA binding and cleavage activity of Ni (II) complex with all-trans retinoic acid. *J Inorgan Biochem.* 2006;100(10):1685-1691.

Sreedhara A, Cowan JA. Catalytic hydrolysis of DNA by metal ions and complexes. *J Biol Inorg Chem.* 2001;6(4):337-47.

Tapia-Perez JH, Kirches E, Mawrin C, Firsching R, Schneider T. Cytotoxic effect of different statins and thiazolidinediones on malignant glioma cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011;67(5):1193-1201.

Thangamani S, Mohammad H, Abushahbani FN, Hamed MI, Sobreirat JP, Hedrick E, et al. Exploring simvastatin, an antihyperlipidemic drug, as a potential topical antibacterial agent. *Nature Sci Rep.* 2015;16407:1-13.

Ting M, Whitaker EJ, Albandar JM. Systematic review of the *in vitro* effects of statins on oral and perioral microorganisms. *Eur J Oral Sci.* 2016;124(1):4-10.

Tizotti MK, Hörner R, De Freitas AGO, Kempfer CB, Bottega A, Rodrigues JN, et al. X-ray characterization and *in vitro* biological evaluation of 1-(4-amidophenyl)-3-(4-acetylphenyl)triazene and the gold(I) triazenide complex $\{Au(I)[RPhNNNPhR'][(PPh_3)]\}$ [R = (C O)NH₂, R' = (C O)CH₃]. *Inorg Chim Acta.* 2016;441:78-85.

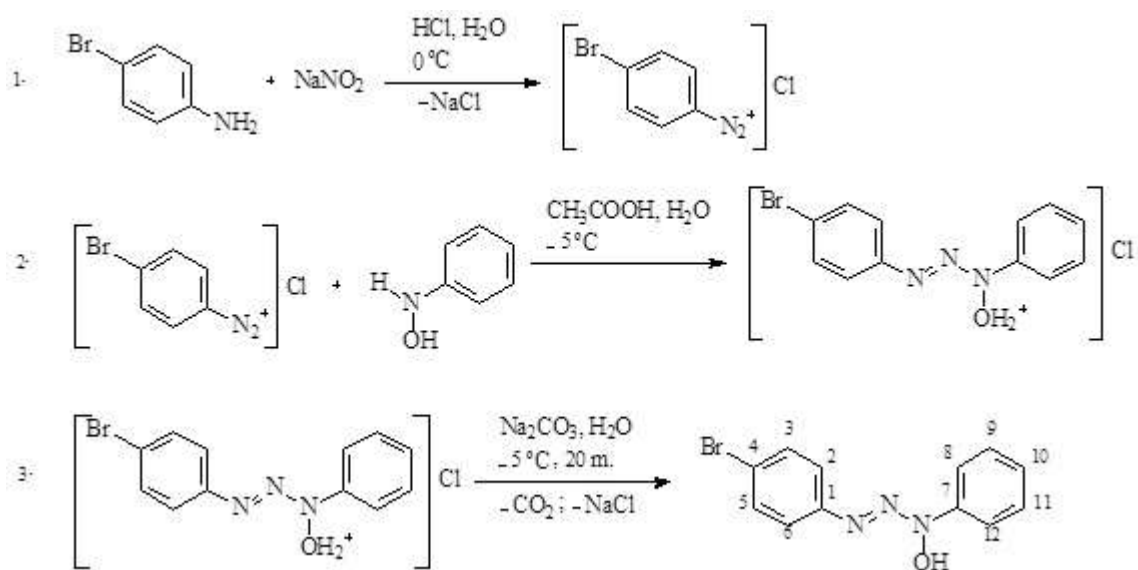
Tzialla C, Borghesi A, Serra G, Stronati M, Corsello G. Antimicrobial therapy in neonatal intensive care unit. *Italian J Ped.* 2015;41:1-6.

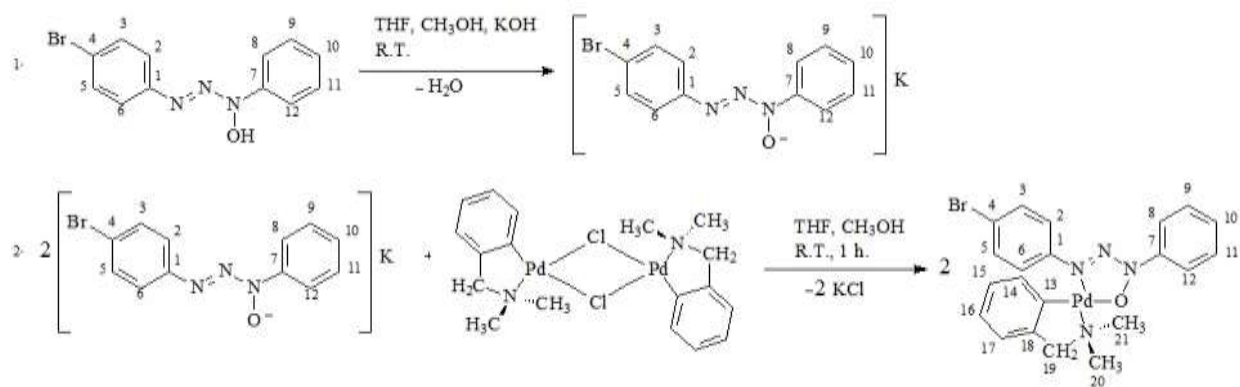
Wang HE, Griffin R, Shapiro NI, Howard G, Safford MM. Chronic statin use and long-term rates of sepsis: a population-based cohort study. *J Intensive Care Med.* 2016;31(6):386-396.

World Health Organization. WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Geneva, Switzerland: WHO; 2014.

Yeo CY, Sim JH, Khoo CH, Goh ZJ, Ang KP, Cheah YK, et al. Pathogenic Gram-positive bacteria are highly sensitive to triphenylphosphane-gold(O-alkylthiocarbamates), Ph₃PAu[SC(OR)=N(p-tolyl)] (R = Me, Et and iPr). *Gold Bull.* 2013;46(3):145-52.

Schemes

SCHEME 1 - Reaction scheme of the synthesis of the ligand **HLBr**.



SCHEME 2 - Reaction scheme of the synthesis of the complex **Pd(DMBA)LBr** from the ligand **HLBr** and the complex **[Pd(DMBA)Cl]₂** as precursors.

Tables

Table 1 – Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) of ligands, precursor and complex, associated or not with statins against standard bacteria.

Microorganism	$\mu\text{g mL}^{-1}$																						Pd livre	Tig
	A	S	L ₁	L ₁ +A	FICI	L ₁ +S	FICI	L ₂	L ₂ +A	FICI	L ₂ +S	FICI	P	P+A	FICI	P+S	FICI	C	C+A	FICI	C+S	FICI		
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	256	256	256	128	1	64	0.5	128	128	1.5	32	0.4	256	128	1	64	0.5	64	64	1.3	32	0.6	256	*
<i>Enterobacter hormaechei</i> ATCC 700323	256	128	256	256	2	128	1.5	256	256	2	128	1.5	256	128	1	64	0.8	128	128	1.5	64	1	128	*
<i>Enterococcus casseliflavus</i> ATCC 700327	512	256	128	128	1.3	64	0.8	128	128	1.3	64	0.8	128	128	1.3	64	0.8	128	128	1.3	32	0.4	256	<0.25
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	256	64	256	256	2	128	2.5	256	128	1	32	0.6	256	128	1	32	0.6	128	128	1.5	32	0.8	256	<0.25
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	256	128	256	128	1	32	0.4	64	64	1.3	16	0.4	128	64	0.8	32	0.5	32	32	1.1	16	0.6	256	<0.25
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	512	256	256	256	1.5	128	1	256	256	1.5	128	1	256	256	1.5	128	1	256	128	0.8	64	0.5	256	<0.25
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	512	256	256	256	1.5	128	1	256	256	1.5	128	1	256	256	1.5	128	1	256	256	1.5	128	1	256	<0.25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	256	128	256	256	2	128	1.5	256	256	2	128	1.5	256	128	1	64	0.8	128	128	1.5	64	1	256	0.5
<i>Micrococcus luteus</i> 7468	256	32	128	128	1.5	64	2.5	256	256	2	128	4.5	128	128	1.5	64	2.5	128	128	1.5	64	2.5	256	<0.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	256	128	128	128	1.5	64	1	128	128	1.5	64	1	128	128	1.5	64	1	128	64	0.8	32	0.5	256	2
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	256	128	256	256	2	128	1.5	128	128	1.5	64	1	256	128	1	64	0.8	128	128	1.5	64	1	128	<0.25
<i>Salmonella</i> ATCC 52117	512	256	256	256	1.5	128	1	256	128	0.8	64	0.5	256	128	0.8	64	0.5	128	128	1.3	64	0.8	256	*
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	512	256	256	128	0.8	64	0.5	128	64	0.6	16	0.2	256	128	0.8	64	0.5	64	64	1.1	32	0.6	256	<0.25
<i>Staphylococcus aureus</i> 29213	512	256	512	256	1	32	0.2	256	128	0.8	32	0.3	256	128	0.8	32	0.3	128	128	1.3	16	0.2	512	<0.25
<i>Staphylococcus aureus</i> BAA 1026	256	128	256	256	2	32	0.4	256	128	1	32	0.4	256	128	1	32	0.4	128	128	1.5	16	0.3	256	<0.25
<i>Staphylococcus aureus</i> BAA 976	512	16	512	512	2	128	8.3	512	256	1	128	8.3	512	128	0.5	64	4.1	256	256	1.5	128	8.5	256	<0.25
<i>Staphylococcus aureus</i> BAA 977	256	32	512	256	1.5	128	4.3	256	256	2	128	4.5	512	256	1.5	128	4.3	128	128	1.5	32	1.3	256	<0.25
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	256	128	512	128	0.8	64	0.6	256	256	2	128	1.5	512	256	1.5	64	0.6	128	128	1.5	64	1	256	<0.25

A = Atorvastatin; S = Simvastatin; L₁= Ligand 1 N,N'-dimethylbenzylamine (**dmba**); FICI= Fractional Inhibitory Concentration Index; L₂ = Ligand 2 1-Phenyl-3-(4-bromophenyl)triazene N₁-hydroxide (**HLBr**); P = Precursor **[Pd(DMBA)(μ -Cl)]₂**; C = Complex **{[1-(4-bromophenyl)-3-phenyltriazene N₃-oxide- κ^2 N¹, O⁴](dimethylbenzylamine- κ^2 C¹, N⁴)palladium(II)} (Pd(**dmba**)LBr)**; Pd = Palladium(II); Tig = Tigecycline; * = Test not realized..

Table 2 – Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) of ligands, precursor and complex, associated or not with statins against CoNS.

Microorganism	$\mu\text{g mL}^{-1}$																						
	A	S	L ₁	L ₁ +A	FICI	L ₁ +S	FICI	L ₂	L ₂ +A	FICI	L ₂ +S	FICI	P	P+A	FICI	P+S	FICI	C	C+A	FICI	C+S	FICI	Pd livre
Isolate 1	256	128	512	256	1.5	64	0.6	256	256	2	64	0.8	256	256	2	64	0.8	128	128	1.5	32	0.5	256
Isolate 2	256	128	256	256	2	64	0.8	128	128	1.5	64	1	256	128	1	32	0.4	64	64	1.25	16	0.4	256
Isolate 3	256	128	256	256	2	64	0.8	128	128	1.5	64	1	256	128	1	64	0.8	64	64	1.25	16	0.4	256
Isolate 4	256	128	256	128	1	128	1.5	256	128	1	32	0.4	256	128	1	128	1.5	128	128	1.5	32	0.5	256
Isolate 5	128	64	128	128	2	64	1.5	128	128	2	32	0.8	128	128	2	64	1.5	64	64	1.5	16	0.5	256
Isolate 6	256	128	256	256	2	128	1.5	128	128	1.5	32	0.5	128	128	1.5	128	2	64	64	1.25	16	0.4	256
Isolate 7	128	64	256	256	3	32	0.6	128	128	2	32	0.8	256	128	1.5	64	1.3	64	64	1.5	16	0.5	256
Isolate 8	128	32	128	128	2	32	1.3	128	128	2	64	2.5	128	128	2	64	2.5	64	64	1.5	16	0.8	256
Isolate 9	256	128	512	256	1.5	64	0.6	128	128	1.5	64	1	256	128	1	64	0.8	64	64	1.25	32	0.8	256
Isolate 10	128	64	128	128	2	64	1.5	128	128	2	64	1.5	128	128	2	64	1.5	64	64	1.5	32	1	256
MIC⁵⁰	256	128	256	256	-	64	-	128	128	-	64	-	256	128	-	64	-	64	64	-	16	-	256
MIC₉₀	256	128	512	256	-	128	-	256	128	-	64	-	256	128	-	128	-	128	128	-	32	-	256

A = Atorvastatin; S = Simvastatin; L₁= Ligand 1 N,N'-dimethylbenzylamine (**dmba**); FICI= Fractional Inhibitory Concentration Index; L₂ = Ligand 2 1-Phenyl-3-(4-bromophenyl)triazene N₁-hydroxide (**HLBr**); P = Precursor **[Pd(DMBA)(μ -Cl)]₂**; C = Complex {[1-(4-bromophenyl)-3-phenyltriazene N₃-oxide- κ^2 N¹, O⁴](dimethylbenzylamine- κ^2 C¹, N⁴)palladium(II)} (**Pd(dmba)LBr**); Pd = Palladium(II); Tig = Tigecycline; * = Test not realized.

5.5 RESULTADOS ADICIONAIS

5.5.1 Identificação dos isolados pelo gene *tuf*

Dos 80 *S. epidermidis*, identificados pela automação, enviados para o Laboratório de Evolução Bacteriana e Epidemiologia Molecular, ITQB-NOVA, Oeiras, Portugal, 78 amostras cresceram, sendo que nove foram manitol positivas. Dos 78 isolados em que ocorreu o crescimento, 55 foram confirmados como *S. epidermidis*, sendo dois destes manitol positivos. Ainda, nove amostras possuíam colônias amarelas e aparentemente pareciam estar contaminadas, assim, não foi possível extrair o DNA e não foram enviadas para sequenciamento. Os outros 14 isolados foram classificados como *S. capitis* (n=3), *S. cohnii* (n=3), *S. haemolyticus* (n=3), *S. aureus* (n=2), *S. hominis* (n=2) e 1 *S. xylosus*.

5.5.2 Concentração inibitória mínima (CIM) das estatinas

Em relação a CIM das estatinas frente aos 176 e 120 SCoN (2014; 2016/2017), a atorvastatina mostrou valores mais elevados de CIM quando comparado com a sinvastatina, para todos os isolados testados. Em 2014, 1,14% (2/176) apresentaram CIM = 64 µg/mL (*S. epidermidis*), 16,48% (29/176) CIM = 128 µg/mL, 54,54% (96/176) CIM = 256 µg/mL e 27,84% (49/176) CIM = 512 µg/mL. Em 2016 estes índices foram de 0,83% (1/120) (*S. epidermidis*), 25% (30/120), 59,17% (71/120), 15% (18/120), respectivamente.

Já para a sinvastatina, em 2014, um isolado de *S. capitis* (0,57% - 1/176) mostrou CIM = 32 µg/mL; 20,45% (36/176) CIM = 64 µg/mL e 78,98% (139/176) CIM = 128 µg/mL. Em 2016/2017, foram encontradas CIM nos valores de 64 µg/mL e 128 µg/mL, 26,67% (32/120) e 73,33% (88/120), respectivamente.

5.5.3 Atividade antibiofilme das estatinas frente a *Staphylococcus epidermidis*

Quanto a atividade antibiofilme das estatinas frente a *S. epidermidis* já caracterizados no Laboratório de Evolução Bacteriana e Epidemiologia Molecular do ITQB/NOVA, tanto a atorvastatina quanto a sinvastatina ativada mostraram um comportamento instável na maioria dos casos. Em determinados isolados ocorreu uma redução da formação do biofilme, porém,

quando em elevadas concentrações dos medicamentos (CIM entre 256 a 512 $\mu\text{g/mL}$), houve uma maior produção de biofilme; sendo que, outras vezes, em diferentes concentrações do composto (0,5 a 512 $\mu\text{g/mL}$), a formação do biofilme foi pouco variável, mantendo-se estável, não interferindo sua produção na presença das estatinas.

A atorvastatina mostrou resultados mais estáveis e menores valores de CIM para a atividade antibiofilme quando comparado com a sinvastatina ativada. Para a atorvastatina, a melhor CIM apresentada, que contribuiu para a redução da produção de biofilme foi $\leq 16 \mu\text{g/mL}$, para duas amostras (1243N e ICE 7); seguido da CIM $\leq 64 \mu\text{g/mL}$ para ITL299, HFA6228, BUG46, MEX60, DEN61, BUG37 e *S. aureus* ATCC 29213. Ainda, oito isolados evidenciaram CIM $\leq 128 \mu\text{g/mL}$ (AGT24, CV20, 148N, JAP271, DEN161, 966N, 1076NL, 790N); e 6 CIM $\leq 256 \mu\text{g/mL}$ (HFA6096, URU23, ICE95, CV28, GRE34, 19N).

Já para a sinvastatina ativada, duas amostras reduziram a produção de biofilme na concentração $\leq 32 \mu\text{g/mL}$ (619N2 e HFA6096); quatro na CIM $\leq 64 \mu\text{g/mL}$ (619N1, AGT24, ITL299, DEN22); três na CIM $\leq 128 \mu\text{g/mL}$ (CV20, ICE7, 19N); e quatro na CIM $\leq 256 \mu\text{g/mL}$ (1290N; HFA6228; BUG37; *S. aureus* ATCC29213). Em ambos compostos testados não foi possível verificar relação quanto a colonização ou infecção, bem como aos tipos de *clusters* (A/C, ou B).

6 DISCUSSÃO GERAL

Neste estudo foram avaliados SCoN isolados de hemoculturas de RN, em 2014 isolados 176 amostras e em 2016/2017, 120. Estes microrganismos estão entre os patógenos mais isolados nas infecções neonatais, sendo o *S. epidermidis* a espécie prevalente, principalmente nas UTI-RN, corroborando com os resultados desta pesquisa (**Manuscrito 1 e 2; Artigo 1**) (ARCIOLA et al., 2015; DONG et al., 2017; DE SOUSA et al., 2014; ERTUGRUL et al., 2016; PEREIRA, CUNHA, 2013; RAMPELOTTO et al., 2015). Uma vez que *S. epidermidis* são colonizadores da pele, esta espécie é frequentemente associada a infecções de pacientes com o sistema imune comprometido ou imaturo, como os RN; sendo que pode ocorrer a migração destes microrganismos para a corrente sanguínea, a qual é facilitada pelo uso de dispositivos invasivos (BECKER et al., 2014; BERLAK et al., 2018; MARTÍNEZ-MELÉNDEZ et al., 2016; MITT et al., 2014; OLIVEIRA; CUNHA, 2010; PEDROSO et al., 2016).

Em relação aos isolados de *S. epidermidis* (2016/2017; n=80), identificados pelo VITEK®2-bioMérieux, 78 foram recuperados: em nove destes não foi possível realizar a extração do DNA, e 79,71% (55/69) foram confirmados como esta espécie pelo gene *tuf*. Os outros isolados foram classificados como *S. capitis* (n=3), *S. cohnii* (n=3), *S. haemolyticus* (n=3), *S. aureus* (n=2), *S. hominis* (n=2) e 1 *S. xylosum* (**Resultados adicionais**). A utilização de aparelhos automatizados facilita o fluxo de trabalho e fornecem resultados mais rápidos do que métodos convencionais, porém, podem ocorrer problemas na identificação dos microrganismos (D'AZEVEDO et al., 2009). Paim et al. (2014) avaliaram a utilização do VITEK®2-bioMérieux na identificação de cocos GP e evidenciaram que foram identificados corretamente 77,9% e 97,1% dos isolados em níveis de espécie e gênero, respectivamente.

Quanto aos setores de internação, a UTI-RN foi o setor onde prevaleceram os isolamentos (**Manuscrito 1 e 2; Artigo 1**). As UTI adulto e neonatal são as unidades onde predominam as IH, já que estas áreas são destinadas a pacientes em estado crítico (DE CARVALHO et al., 2011, 2014). Ainda, infecções associadas aos cuidados de saúde adquiridas em UTI-RN, em sua maioria são causadas por SCoN (BIZZARRO et al., 2015; CANTEY et al., 2018; DONG et al., 2018; NAMVAR et al., 2017).

A resistência frente aos antimicrobianos vem aumentando progressivamente e constitui uma preocupação crescente para a saúde pública (HAGHIGHATPANAH et al.,

2016; KARAM et al., 2016; MIRÓ-CANTURRI et al., 2019; TZIALLA et al., 2015). Neste estudo, as taxas de resistência apresentadas pelos SCoN aumentaram em praticamente todos os antimicrobianos testados quando comparados o ano de 2014 ao de 2016/2017, destacando-se a penicilina (71,26% em 2014; 99,17% em 2016/2017) e a oxacilina (76% em 2014; 84,17% em 2016/2017) (**Manuscrito 1; Artigo 1**). Ainda, 83,64% dos *S. epidermidis* (2016/2017) foram considerados MRSE (**Manuscrito 2**), corroborando com pesquisas de vigilância, que demonstram que, a resistência a esse antimicrobiano varia entre 75 a 85% em *Staphylococcus coagulase negativos* (SCoN) (MAY et al., 2014; ZHAO et al., 2012).

Entretanto, os isolados demonstraram 100% de sensibilidade à linezolida, tigeciclina e vancomicina (**Manuscrito 1 e 2; Artigo 1**). Estes dados são importantes, uma vez que o tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina/oxacilina é a vancomicina, que apresentou elevada sensibilidade neste estudo (ROSSI; ANDREAZZI, 2005; SHANE et al., 2017).

Desde 2009, o CLSI estabeleceu que o teste de sensibilidade frente à vancomicina deve ser realizado através da CIM. Para sua determinação, deve ser utilizado o método da microdiluição em caldo, porém, a maioria dos laboratórios utiliza metodologias automatizadas, sendo que, embora os métodos utilizados na rotina sejam mais rápidos, podem não fornecer uma identificação acurada (CLSI, 2009). Ao avaliar a CIM da linezolida, tigeciclina e vancomicina através da microdiluição em caldo e da automação (VITEK®2-bioMérieux), todos os isolados foram sensíveis, e pode-se observar perfeita concordância ($\kappa=1$) entre as duas metodologias testadas (**Manuscrito 1**), sendo a automação mais rápida e de fácil realização do que o método da microdiluição em caldo, que é mais trabalhoso e demorado, sendo inconveniente a sua utilização na rotina laboratorial.

Dos *S. epidermidis* (2016/2017), observou-se predomínio do ST2 (**Manuscrito 2**), corroborando com várias pesquisas de todo o mundo, já que o tipo clonal nosocomial prevalente entre estes microrganismos é o ST2 (BISPO et al., 2014; DEPLANO et al., 2016; HELLMARK et al., 2013b; IORIO et al., 2012; MARTÍNEZ-MELÉNDEZ et al., 2016; MIRAGAIA et al., 2007; SPRINGER-VERLAG et al., 2012; THOMAS et al., 2014). Riboli (2018), avaliando SCoN de hemoculturas de RN admitidos no Hospital das Clínicas de Botucatu, São Paulo, encontrou dois *clusters* de *S. epidermidis* majoritários, os quais foram caracterizados como ST2 e ST59. Oliveira et al. (2016) avaliaram SCoN isolados de hemoculturas, na cidade de Porto Alegre, RS, e evidenciaram ST2 como o prevalente, seguido

de ST6, assim como em nossa pesquisa. Porém, estes pesquisadores relataram que estes ST estavam relacionados apenas ao SCC*mec* III; já em nosso estudo, também observou-se a presença do SCC*mec*IVa(2B) (**Manuscrito 2**). Ainda, o ST2 pode-se diferenciar os ST2 que apresentaram SCC*mec*III em dois grupos distintos, já que alguns apresentaram *ccr* 9 ou 4 (**Manuscrito 2**).

Através da visualização da árvore filogenética dos *S. epidermidis* (2016/2017), pode-se observar que a grande maioria dos *S. epidermidis* deve compartilhar menos de 400 diferenças entre eles, estando dois dos isolados em uma localização mais distante; que podemos sugerir que ocorra devido ao fenômeno de recombinação a estes isolados. Na análise em relação ao aparecimento dos microrganismos com o decorrer do tempo, não podemos afirmar que ocorreu um surto hospitalar, porém, ressaltamos que na maioria dos isolados ocorreu uma evolução destes microrganismos, sugerindo a existência de uma situação endêmica (**Manuscrito 2**).

Em relação aos genes presentes nos *S. epidermidis* (2016/2017), verificou-se a presença de 100% de *psm_alpha*, *hld*, *capA*, *gehC*, *gehD*, *sspA* e *sspB*, *dltB*, *graR* e *mprF*, e *sdrG*. O ACME, responsável pelo aumento da capacidade destes microrganismos em colonizar a pele e mucosas foi encontrado em 40% destes isolados (**Manuscrito 2**). Desta forma, cada vez mais se destaca a significância destes microrganismos, pela sua capacidade de produzirem importantes fatores de virulência (HEILMANN et al., 2018; RIBOLI, 2018; SHANE et al., 2017).

A significância clínica dos SCoN, em 2014, 53,44% dos RN foram tratados, sendo 77,14% das infecções relacionadas ao uso de cateter; em 2016/2017, os índices foram de 78,48% e 95,16% respectivamente (**Manuscrito 1**). A significância destes microrganismos é de extrema importância, já que os SCoN eram considerados colonizadores da pele, porém, com o passar dos anos surgiram como importantes patógenos nosocomiais, os quais estão relacionados com infecções envolvendo o uso de dispositivos invasivos (BECKER et al., 2014; HEILMANN et al., 2018; SHANE et al., 2017).

ICS, associadas ao cateter venoso central estão entre as principais infecções nas UTI-RN, responsáveis por 43,6% dos casos registrados em unidades de saúde de países da União Europeia (ANVISA, 2017a; ECDC, 2018). De acordo com o APIC *Implementation Guide* (2015) medidas como higienização das mãos, seleção do cateter e do seu sítio de inserção, preparo da pele do paciente e avaliação diária da necessidade de permanência do dispositivo

invasivo são práticas recomendadas com a finalidade em reduzir estas infecções (APIC, 2015; ECDC, 2018).

Os exames laboratoriais também representam uma importante ferramenta no auxílio do diagnóstico da sepse neonatal, expressando impacto positivo na redução da morbimortalidade dos neonatos (GRANZOTTO et al., 2012). O hemograma dos RN geralmente apresenta inúmeras informações e sua interpretação pode variar de acordo com a idade e outras características destes pacientes, sendo que os valores de referência para essa faixa etária são de difícil obtenção, já que, logo após o nascimento ocorrem modificações do quadro hematológico (AGUIAR et al., 2015). Esse estudo mostrou que tanto em 2014 quanto em 2016/2017 não se pode relacionar a gravidade da infecção com o hemograma, sendo que, pacientes que tiveram a infecção e receberam antibioticoterapia demonstraram hemogramas com valores de referencia normais (**Manuscrito 1**).

A proteína C reativa é uma proteína sintetizada pelo fígado e liberada rapidamente após o início de um processo inflamatório, e vem sendo utilizada para monitorar doenças inflamatórias e infecciosas, sendo o marcador mais utilizado em cuidados neonatais em todo o mundo (LOBO, 2012; PERRONE et al., 2017). Nesse estudo, a média da proteína C reativa em 2014 foi de $0,15 \pm 0,13$ mg/dl para os pacientes que não receberam tratamento e que desenvolveram SCoN, e de $1,41 \pm 2,89$ mg/dl para os pacientes que tiveram sepse e utilizaram antibioticoterapia. Em 2016/2017 estes índices foram de $0,27 \pm 0,34$ mg/dl e $1,82 \pm 2,94$ mg/dl, respectivamente (**Manuscrito 1**). Assim, nos dois anos de estudo os valores de proteína C reativa foram mais elevados nos pacientes que tiveram infecção, sugerindo que seria um bom biomarcador em sepse; porém, quando utilizada para o prognóstico da sepse possui baixa especificidade, uma vez que seus níveis podem estar elevados em outros processos inflamatórios (PERRONE et al., 2017).

Em relação às taxas de mortalidade, os índices em 2014 foram de 15,71% e em 2016/2017, 17,74%. Destes, em 2014, três pacientes foram a óbito por infecções polimicrobianas, com mais de um microrganismo isolado; já em 2016/2017 dois pacientes (**Manuscrito 1**). Quando avaliado apenas os *S. epidermidis* (2016/2017), 18,18% (10/55) dos RN foram a óbito, sendo que dois possuíam infecções polimicrobianas (**Manuscrito 2**). Cantey et al. (2018) evidenciaram que a mortalidade por SCoN na sepse neonatal foi de 1,6%, porém na análise multivariada, esta porcentagem não foi significativa. Al-taiar et al. (2013), investigaram microrganismos isolados em hemoculturas de recém-nascidos na China, e

mostraram que 4,8% dos RN foram a óbito devido a infecções causadas por SCoN. Lee et al. (2015) demonstraram que os índices de mortalidade por estes microrganismos podem chegar a 9,4% em neonatos com muito baixo peso ao nascer.

Além da resistência bacteriana, os SCoN possuem como principal fator de virulência a formação de biofilme (GILL et al., 2005; HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2005; VAN ACKER et al., 2014). Nesta pesquisa, aproximadamente 42% dos isolados apresentaram um dos genes pesquisados na formação do biofilme (*ica*) através da metodologia padrão (PCR), sendo *S. epidermidis* a espécie prevalente (**Artigo 1**). Nos isolados de *S. epidermidis* (2016/2017), 100% apresentaram o gene *tagF*, 85,45% *embp* e em 67,27% *icaA* (**Manuscrito 2**). Já está bastante documentado na literatura que os SCoN estão entre os agentes etiológicos mais importantes associados a formação de biofilme, especialmente devido a capacidade destes microrganismos colonizarem a superfície de dispositivos médicos causando infecções (ARCIOLA et al., 2015; OLIVEIRA; CUNHA, 2010; RANI et al., 2015; VIANA et al., 2011). A produção deste fator de virulência é preocupante, já que bactérias produtoras de biofilme aumentam sua capacidade de sobrevivência, tornando o tratamento destas infecções pouco eficazes (ARCIOLA et al., 2015; FEY; OLSON, 2010; GILL et al., 2005; HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2005; OLIVEIRA; CUNHA, 2010; PUJA et al., 2015; VAN ACKER et al., 2014).

Das amostras produtoras de biofilme (PCR), todas carregavam os genes *icaAC* ou *icaACD*, sendo que a expressão dos três genes concomitantemente foi relacionada com uma maior capacidade de formação de biofilme, já que das amostras fracamente aderentes, a maioria expressou os genes *icaAC* e pequena parte *icaACD*; já das fortemente aderentes, todas carregavam os três genes (**Artigo 1**). Oliveira e Cunha (2010) verificaram que a presença dos genes *icaACD* constituem importantes marcadores de virulência de isolados clínicos de SCoN, uma vez que estes genes estão associados à produção do PIA, principal componente da formação de biofilme em *Staphylococcus* spp.

Através das metodologias fenotípicas, 42,04% dos isolados produziram biofilme pelo CRA; 40,91% por TCP; e 38,65% por TM. Ao comparar as técnicas, este estudo mostrou que o CRA e TM apresentaram baixa sensibilidade e especificidade (**Artigo 1**). Segundo alguns pesquisadores o CRA é fácil e de rápida execução quando comparado aos outros métodos, porém, ainda não é recomendado para a detecção de biofilme na rotina laboratorial (KNOBLOCH et al., 2002; OLIVEIRA; CUNHA, 2010); já o TM de acordo com estudo

realizado por Mathur et al. (2006) também não é uma metodologia a ser utilizada como teste de rastreio para verificar cepas produtoras de biofilme, porém, Oliveira e Cunha (2010) recomendam este método qualitativo (TM) na pesquisa do biofilme. Em nossa pesquisa a TCP demonstrou altos índices de sensibilidade (99%) e especificidade (100%), com ótima concordância ($\kappa=0,99$) (**Artigo 1**). A TCP é considerada padrão-ouro por alguns pesquisadores, e apesar de ser uma técnica demorada, o ideal seria empregar este método quantitativo na rotina laboratorial (HASSAN et al., 2011; MATHUR et al., 2006; RANI et al., 2015).

Ainda, verificou-se que as amostras produtoras de biofilme foram mais resistentes aos antimicrobianos quando comparado com as não produtoras (**Artigo 1**). Esta resistência pode ocorrer devido à penetração limitada dos antimicrobianos, que acabam não atingindo a bactéria (DRENKARD, 2003). Outro fator que pode contribuir é a expressão e trocas de certos genes dentro do biofilme, sendo que em bactérias produtoras de biofilme a resistência aos antimicrobianos pode ser até mil vezes maior quando comparado a cepas não produtoras (DRENKARD, 2003; PLOUFFE, 2000; SAUER et al., 2002; WHITELEY et al., 2001).

A resistência bacteriana constitui um sério problema de saúde pública em todo o mundo, reduzindo o conjunto de fármacos disponíveis para o tratamento das infecções (KARAM et al., 2016; TZIALLA et al., 2015; ZHENG et al., 2018). Por este motivo a pesquisa de novos compostos com propriedade antibacteriana constitui uma necessidade e deve ser investigada, bem como o redirecionamento de fármacos (SERAFIN; HÖRNER, 2018; ZHENG et al., 2018).

O fato dos TZC apresentarem atividade biológica já descrita, tais como atividade antibacteriana, faz com que estes compostos sejam foco de inúmeros estudos (DOMINGUES et al., 2010; HÖRNER et al., 2008; MOHAMMADI, 2014; TIZOTTI et al., 2016). Várias pesquisas utilizando compostos TZC demonstram que esses possuem potencial atividade antimicrobiana, principalmente quando associados a metais, sendo sua maior atividade relacionada a microrganismos GP (DOMINGUES et al., 2010; HÖRNER et al., 2008; MOHAMMADI, 2014; OMBAKA et al., 2012; PARAGINSKI et al., 2014; TIZOTTI et al., 2016). Estes achados corroboram com esta pesquisa, na qual o composto TZC complexado com o metal Pd apresentou melhor atividade frente às cepas e isolados testados (**Artigo 2**). No que se refere ao mecanismo de ação antibacteriano dos TZC, pesquisadores sugerem que este está relacionado à atividade quelante a íons metálicos constituintes da parede celular dos

microrganismos, dificultando os estágios da síntese da parede bacteriana, conduzindo a morte celular (HÖRNER et al., 2008; OMBAKA et al., 2012).

Em relação ao redirecionamento de drogas, uma classe de fármacos reposicionados, que têm demonstrado uma atividade bacteriana promissora frente a diversas espécies bacterianas, especialmente àquelas formadoras de biofilme, são as estatinas, utilizadas para a redução de lipídios em pacientes com elevados níveis de colesterol (ALLA et al., 2013; KOZAROV et al., 2014; LÓPEZ-CORTÉS et al., 2013). Nesta pesquisa, as estatinas mostraram atividade antibacteriana, sendo que a sinvastatina apresentou atividade mais pronunciada, e quando associada ao composto TZC demonstrou sinergismo na maioria dos isolados e cepas testadas (**Artigo 2; Resultados adicionais**). Para a atorvastatina, o menor valor de CIM foi de 64 µg/mL em três isolados de *S. epidermidis*; já para a sinvastatina, 32 µg/mL, um isolado de *S. capitis* (**Resultados adicionais**).

Quanto a atividade antibiofilme das estatinas, pode-se observar que em determinados casos ocorreu uma redução da formação do biofilme, porém, quando em elevadas concentrações dos medicamentos, houve uma maior produção de biofilme (**Resultados adicionais**). O biofilme é composto por três fatores específicos, aderência, acumulação/maturação e desprendimento, desta forma, uma possível explicação para estes achados seria que, durante a acumulação/maturação, possa ocorrer uma provável formação de resistência destes microrganismos as estatinas, aumentando a formação deste fator de virulência (ARCIOLA et al., 2015; OTTO, 2013; PEDROSO et al., 2016; ROHDE et al., 2010).

Estudos sugerem que é improvável que a ação antibacteriana das estatinas seja atribuída ao mesmo mecanismo de ação utilizado para redução do colesterol (MASADEH et al., 2012; TING et al., 2015). Um possível mecanismo seria a promoção da apoptose ou à natureza hidrofóbica das estatinas, causando a ruptura da parede e membrana bacteriana, resultando na morte celular (BERGMAN et al., 2011; MASADEH et al., 2012; MUCK et al., 2004; TAPIA-PEREZ et al., 2011; YAMAZAKI et al., 2006). Ainda, outro fator que poderia estar relacionado a esta atividade, seria a diferença na estrutura química das estatinas, bem como, a forma pela qual são sintetizadas: a sinvastatina é a forma semissintética, que deriva a partir de um fungo, com maior atividade antibacteriana intrínseca; já a atorvastatina é a forma sintética pura (GRAZIANO et al., 2015; MASON et al., 2005; TING et al., 2015).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Em 2014, de 131 pacientes, foram isolados 176 SCoN, e em 2016/2017, estes índices foram de 79 e 120, respectivamente, sendo nos dois anos de estudo, *S. epidermidis* a espécie prevalente;
- Quando comparado o ano de 2014 com o de 2016/2017, o número de isolamentos reduziu, porém não podemos afirmar, já que não temos acesso ao número de hemoculturas solicitadas;
- A UTI-RN foi o setor de internação onde prevaleceram os isolamentos nos dois anos de estudo;
- Em relação a resistência apresentada pelos SCoN, as taxas aumentaram em praticamente todos os antimicrobianos testados quando comparados o ano de 2014 ao de 2016/2017, destacando-se a penicilina (71.26% em 2014; 99.17% em 2016/2017) e a oxacilina (76% em 2014; 84.17% em 2016/2017);
- Em relação ao perfil de suscetibilidade frente aos antimicrobianos utilizando metodologia automatizada e o método manual da CIM, todos os isolados apresentaram 100% de sensibilidade frente à linezolida, tigeciclina e vancomicina;
- O perfil de suscetibilidade de linezolida, tigeciclina e vancomicina frente aos SCoN através da microdiluição em caldo demonstrou valores de CIM superiores quando comparado o ano de 2014 com os de 2016/2017; no primeiro ano de estudo (2014) os valores de CIM foram $\leq 2\mu\text{g/mL}$, $\leq 0,25\ \mu\text{g/mL}$ e $\leq 2\mu\text{g/mL}$, respectivamente; e em 2016/2017, as concentrações foram $\leq 2\mu\text{g/mL}$, $\leq 0,5\ \mu\text{g/mL}$ e $\leq 4\mu\text{g/mL}$, respectivamente, mostrando sensibilidade para todos os isolados;
- Ao comparar os dois métodos analisados pode-se observar concordância perfeita ($\kappa=1$), sendo conveniente a utilização da automação na rotina laboratorial, por ser uma metodologia rápida e de fácil realização;
- Em relação à significância clínica, em 2014, 53,44% dos RN foram tratados, sendo 77,14% relacionadas ao uso de cateter; já em 2016/2017, os índices foram de 78,48% e 95,16% respectivamente;
- Em relação ao hemograma, pode-se observar que tanto em 2014 quanto em 2016/2017 não se pode relacionar a gravidade da infecção com o hemograma, e pacientes que tiveram a infecção demonstraram hemogramas com valores de referencia normais;

- Os valores de proteína C reativa nos dois anos de estudo foram mais elevados nos pacientes que tiveram infecção, sugerindo que seria um bom biomarcador em sepse;
- Quanto às taxas de mortalidade, SCoN mostraram ser patógenos significativos na sepse neonatal, responsáveis por consideráveis índices de mortalidade, que em 2014 foram de 15,71% e em 2016/2017, 17,74%, sendo que destes, em 2014, três pacientes foram a óbito pelas infecções polimicrobianas; já em 2016/2017 dois pacientes;
- Em relação a produção de biofilme, dos 176 SCoN analisados, 41,48% mostraram ter um dos genes pesquisados através da PCR (*ica*): 30,11% carregavam os genes *icaACD* e 11,36% *icaAD*;
- Através do CRA e TM, 42,04% e 38,64% dos 176 isolados, respectivamente, produziram biofilme;
- Na TCP, 40,91% (72/176) isolados produziram biofilme, 21,02% foram fracamente aderentes e 22,16% fortemente, sendo que 40,28% das fracas apresentaram os genes *icaAC* e 11,11% *icaACD*, já das fortes, todas possuíam os três genes;
- A presença dos três genes (*icaACD*) concomitantemente foi relacionada com uma maior capacidade de formação de biofilme;
- Quando comparados ao padrão-ouro (PCR), CRA e TM apresentaram baixa sensibilidade e especificidade, sendo inconveniente a utilização destas metodologias na rotina laboratorial;
- A TCP apresentou 99% de sensibilidade e 100% de especificidade, com ótima concordância ($\kappa=0,99$), assim, apesar de ser uma técnica demorada, o ideal seria empregar este método quantitativo para verificar a produção de biofilme em isolados clínicos nosocomiais;
- Em relação às espécies produtoras de biofilme conforme a PCR, dos 176 SCoN, *S. epidermidis* foi o microrganismo prevalente;
- Observou-se que a resistência frente aos antimicrobianos está relacionada a produção de biofilme;
- Em relação a confirmação da espécie dos isolados de *S. epidermidis* (2016/2017) através do gene *tuf* e sequenciamento de Sanger, dos 78, nove isolados não pode-se extrair o DNA e 55 foram confirmados como *S. epidermidis*;

- Os demais isolados (n=14) foram identificados como *S. capitis* (n=3), *S. cohnii* (n=3), *S. haemolyticus* (n=3), *S. aureus* (n=2), *S. hominis* (n=2) e 1 *S. xylosus*;
- Dos 55 *S. epidermidis* analisados, 83,64% (46/55) foram MRSE, confirmados também pela presença do gene *mecA*, e 16,36% (9/55) MSSE;
- Dos MRSE, a maioria dos *S. epidermidis* foi relacionada ao ST2 (63,04% (29/46)), 65,52% (19/29) associados ao SCC*mecIII*(3A) e 34,48% (10/29) ao SCC*mecIVa*(2B), seguido de ST6, 17,39% (8/46), sendo a maioria não tipavel (87,5%, 7/8) e 12,5% (1/8) relacionado ao SCC*mecIVc*(2B);
- Em relação aos genes que conferem resistência aos antimicrobianos, todos os *S. epidermidis* (2016/2017) apresentaram o gene *blaZ*, responsável pela resistência a penicilina;
- Ainda, observou-se que os isolados de *S. epidermidis* (2016/2017) carregavam os genes *dfrC* (resistência a trimetoprima) e *aac(6)-aph(2)* (resistência aos aminoglicosídeos), em índices de 98,18% e 85,45%, respectivamente;
- Quanto aos fatores de virulência apresentados pelos *S. epidermidis* (2016/2017), 100% dos isolados possuíam genes *psm_alpha* e *h1D* (produção de toxinas); *capA* (proteção, sobrevivência e persistência das infecções); *gehC*, *gehD*, *sspA* e *sspB* (presença de proteases, exoenzimas e proteínas extracelulares); *dltB*, *graR* e *mprF* (resistência a peptídeos); e *sdrG* (proteína de superfície);
- Em relação à formação de biofilme, nos *S. epidermidis* (2016/2017), em 100% dos isolados foi evidenciado o gene *tagF*, em 85,45% *embp* e em 67,27% *icaA*;
- O ACME, responsável pelo aumento da capacidade destes microrganismos em colonizar a pele e mucosas foi encontrado em 40% dos *S. epidermidis* (2016/2017);
- O composto TZC, seus ligantes, precursor, atorvastatina e sinvastatina apresentaram atividade antibacteriana $\leq 512 \mu\text{g/mL}$ frente as cepas ATCC e aos dez isolados clínicos;
- Ao complexar TZC com Pd a atividade antibacteriana aumentou significativamente e foi ainda melhor quando o TZC foi associado à sinvastatina, observando sinergismo ($\text{FICI} \leq 0,5$) na maioria das cepas e isolados testados; o que pode ser impactante no tratamento de isolados MDR;

- Em relação a CIM das estatinas frente aos 176 e 120 SCoN (2014; 2016/2017), a atorvastatina mostrou valores mais elevados de CIM quando comparado com a sinvastatina, para todos os isolados testados;
- Para a atorvastatina a CIM mais baixa ocorreu para três isolados de *S. epidermidis* considerando os dois anos de estudo, CIM = 64 µg/mL (*S. epidermidis*); já para a sinvastatina, um isolado de *S. capitis* mostrou CIM = 32 µg/mL;
- Quanto a atividade antibiofilme das estatinas nos *S. epidermidis*, tanto a atorvastatina quanto a sinvastatina ativada mostraram um comportamento instável na maioria dos casos;
- A atorvastatina mostrou menores valores de CIM para a atividade antibiofilme, sendo a menor CIM ≤ 16 µg/mL, para duas amostras, e para a sinvastatina ativada, duas amostras reduziram a produção de biofilme na concentração ≤ 32 µg/mL.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; BHAT, S. Clinico-microbiological study of neonatal sepsis. **J Int Med Dentis**. n. 2, v. 1, p. 22-29, 2015.
- AGUIAR, C. F.; BALDESSAR, M. Z.; DAL-BÓ K. Perfil hematológico dos neonatos admitidos em Unidade de Terapia Intensiva neonatal de um hospital no Sul do Brasil. **Rev AMRIGS**. v. 59, n. 4, p. 287-292, 2015.
- AGUIAR, R. E. História natural da sepse: artigo de revisão. **Bras Med**. n. 47, p. 69-76, 2010.
- AHLSTRAND, E. et al. Long-term molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* blood culture isolates from patients with hematological malignancies. **PLoS ONE**. v. 9, p. e99045, 2014.
- AKU, F. Y. et al. Bacteriological profile and antibiotic susceptibility pattern of common isolates of neonatal sepsis, Ho Municipality, Ghana-2016. **Maternal Health, Neonatology, and Perinatology**. n.4, v. 2, p. 1-8, 2018.
- ALLA, V. M. et al. A reappraisal of the risks and benefits of treating to target with cholesterol lowering drugs. **Drugs**. n. 10, v. 73, p. 1025–1054, 2013.
- AL-TAIAR, A. et al. Neonatal infections in China, Malaysia, Hong Kong and Thailand. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed**. v. 98, p. F249– 55, 2013.
- ALVARES, P. A. et al. Hospital-acquired infections in children. **The Pediatric Infectious Disease Journal**. v. 38, n. 1, p. e12-e14, 2019.
- ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Critérios diagnósticos de infecção associada à assistência à saúde neonatologia**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017a.
- ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Diretriz Nacional para Elaboração de Programa de Gerenciamento do Uso de Antimicrobianos em Serviços de Saúde**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017b.
- APIC IMPLEMENTATION GUIDE. Guide to Preventing Central Line-Bloodstream Infections. USA, 2015. Disponível em: https://apic.org/Resource_/TinyMceFileManager/2015/APIC_CLABSI_WEB.pdf.
- ARAÚJO, M. R. E. Hemocultura: recomendações de coleta, processamento e interpretação dos resultados. **J Infect Control**. v. 1, n. 1, p. 08-19, 2012.
- ARAYICI, S. et al. Can base excess be used for prediction to early diagnosis of neonatal sepsis in preterm newborns? **Mediterr J Hematol Infect Dis**. v. 11, n. 1, p. e2019014, 2019.

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. **J Biom Mat Res.** v. 75, n. 2, p. 408-413, 2005.

ARCIOLA, C. R. et al. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. **Front Cel Infect Microbiol.** v. 5, p. 1-10, 2015.

ARGIMÓN, S. et al. Microreact: visualizing and sharing data for genomic epidemiology and phylogeography. **Microb Genom.** v. 2, n. 11, p. e000093, 2016.

ASHBURN, T. T.; THOR, K. B. Drug repositioning: Identifying and developing new uses for existing drugs. **Nature.** v. 3, p. 673-683, 2004.

AZEVEDO, C.P.; SILVA, J.D. Avaliação do perfil de resistência da *Escherichia coli* isolada de uroculturas e correlação com antibioticoterapias empíricas atualmente propostas. **Rev. Multidiscip Saúde.** v.4, p. 2-17, 2012.

BACK, D. F. et al. Three-dimensional triazenido layers attained through classical and non-classical hydrogen interactions and its coordination to palladium under prolific occurrence of bifurcated hydrogen bonding. **Polyhedron.** v. 31, p. 558-564, 2012.

BAIG, S. et al. Novel SCCmec type XIII (9A) identified in an ST152 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Infect Genet Evol.** v. 61, p. 74-76, 2018.

BATISTÃO, D. W. et al. Biofilm formation of Brazilian MRSA strains: prevalence of biofilm determinants and clonal profiles. **J Med Microbiol.** v. 65, p. 286-297, 2016.

BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. Coagulase-negative staphylococci. **Clin Microbiol.** v. 27, p. 870e926, 2014.

BENTLIN, M. R. et al. Brazilian neonatal research network (rede brasileira de pesquisas neonatais). Practices related to late-onset sepsis in very low-birth weight preterm infants. **JPED.** v. 91, n. 2, p. 168-174, 2015.

BERGMAN, P. et al. Studies on the antibacterial effects of statins—*in vitro* and *in vivo*. **PloS one.** n. 8, v. 6, p. e24394, 2011.

BERGOGNE-BEREZIN, E.; TOWNER, K. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Microbiological, clinical, and epidemiologic features. **Clin Microbiol Rev,** v. 9, p.148-65, 1996.

BERLAK, N. et al. Late onset sepsis: comparison between coagulase-negative staphylococci and other bacteria in the neonatal intensive care unit. **Infectious Diseases.** 2018.

BISPO, P. J. et AL. Characterization of ocular methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolates belonging predominantly to clonal complex 2 subcluster II. **J Clin Microbiol.** v. 52, p. 1412–1417, 2014.

- BIZZARRO, M. J. et al. Neonatal sepsis 2004–2013: the rise and fall of coagulase-negative staphylococci. **JPED**. n. 166, p. 1193–99, 2015.
- BONMASSAR, L. et al. Triazene Compounds in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia: A Short Review and a Case Report. **Curr Med Chem**. v. 20, p.2389-2401, 2013.
- BONNET, V. et al. Influence of bacterial resistance on mortality in intensive care units: A registry study from 2000 to 2013 (IICU Study). **J Hospital Infect**. v. 102, n.3, p. 317-324, 2019.
- CAFISO V. et al. Presence of the *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. **Clin Microbiol Infect**. v. 10, p. 1081-1088, 2004.
- CAILES, B. et al. The current and future roles of neonatal infection surveillance programmes in combating antimicrobial resistance. **Early Human Development**. v. 91, p. 613–618, 2015.
- CALDAS, J. P. S. et al. Acurácia diagnóstica do leucograma, proteína C reativa, interleucina-6 e fator de necrose tumoral-alfa na sepse neonatal tardia. **JPED**. v. 84, n. 6, p. 536-542, 2008.
- CAMACHO-GONZALEZ, A.; SPEARMAN, P. W.; STOLL, B. J. Evaluation of neonatal sepsis. **Ped Clin North America**. v. 60, n. 2, p. 367-389, 2013.
- CANTEY, J. B. et al. Morbidity and mortality of coagulase-negative staphylococcal sepsis in very-low-birth-weight infants. **World J Pediatr**. 2018.
- CAVALCANTE, C. Q. et al. Determinação de paládio em amostras biológicas aplicando técnicas analíticas nucleares. **Química Nova**. v. 31, n. 5, p. 1094-1098, 2008.
- CDC. Core Elements of Hospital Antibiotic Stewardship Programs. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC; 2014.
- CHABNER, B. A. et al. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12^a ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2012.
- CHAMON, R. C. et al. Complete substitution of the Brazilian endemic clone by other methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages in two public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **BJID**. v. 21, n. 2, p. 185–189, 2017.
- CHAN, E. W. L. et al. Synergistic effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on antibacterial activity of cefuroxime and chloramphenicol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Glob Antimicrob Resist**. v. 10, p. 70-74, 2017.
- CHANG, R. L. et al. Strategies to minimize antibiotic resistance. **Int J Environ**. v. 10, n. 9, p. 4274-4305, 2013.

CHEUNG, G. Y. C.; DUONG, A. C.; OTTO, M. Direct and synergistic hemolysis caused by *Staphylococcus* phenol-soluble modulins: implications for diagnosis and pathogenesis. **Microb Infect.** v. 14, p. 380-386, 2012.

CHEUNG, G. Y., et al. Phenol-soluble modulins—critical determinants of staphylococcal virulence. **FEMS Microbiol Rev**, n. 38, p. 698–719, 2014.

CHEUNG, G. Y., et al. *Staphylococcus epidermidis* strategies to avoid killing by human neutrophils. **PLoS Pathog**, n. 6, p. e1001133, 2010.

CHRISTENSEN G.D. et al. Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. **Infect Immun.** v. 37, p. 318-26, 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. **J Clin Microbiol.** v. 22, n. 6, p. 318 - 326, 1985.

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

CHRISTNER, M., et al. *sarA* negatively regulates *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by modulating expression of MDA extracellular matrix binding protein and autolysis dependent release of eDNA. **Molecular Microbiol.** v. 86, p. 394-410, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standart – Ninth edition, document M07-A9.** Wayne, PA, USA: CLSI, 2012.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-third informational supplement, document M100-S26.** Wayne, PA, USA: CLSI, 2016.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement M100-S19.** Wayne, PA, USA: CLSI: 2009.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-third informational supplement, document M100-S27.** Wayne, PA, USA: CLSI, 2017.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-third informational supplement, document M100-S24.** Wayne, PA, USA: CLSI, 2014.

CORDEIRO, D. N. G. **Significância clínica da presença de *Staphylococcus coagulase* negativo isolados de recém-nascidos de uma unidade de terapia intensiva neonatal em**

Brasília - DF. 2007. 143 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) - Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

CUNHA, M. L. R. S. et al. Significância clínica de estafilococos coagulase-negativa isolados de recém-nascidos. **J Pediatr.** v. 78, n. 4, p: 279-288, 2002.

D'AZEVEDO, et al. Evaluation of the automated system Vitek 2 for identification and antimicrobial susceptibility testing of brazilian Gram-positive cocci Strains. **BJID.** v. 13, n. 2, p. 107-110, 2009.

DA SILVEIRA, M. et al. Nasal colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among elderly living in nursing homes in Brazil: risk factors and molecular epidemiology. **ACMA.** v. 17, n. 1, p. 18, 2018.

DAL-PIZZOL, F.; RITTER, C. À procura do Santo Graal: aonde vamos com os biomarcadores na sepse? **Rev Bras Ter Intensiva,** v. 24, n. 2, p. 117-118, 2012.

DATASUS, dados de 2017, <http://www.datasus.gov.br/>, <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205&id=6938&VObj=http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sim/cnv/inf10>. Acesso em: 06/07/2019.

DE AZEVEDO, J. R. A. et al. Procalcitonina como biomarcador de prognóstico da sepse grave e choque séptico. **Rev Col Bras Cir.** v. 39, n. 6, p. 456-461, 2012.

DE CARVALHO, M. M. et al. Infecções hospitalares em unidade de terapia intensiva neonatal. **Rev Interd.** v. 7, n. 4, p. 189-198, 2014.

DE CARVALHO, M. M. et al. Infecções hospitalares nas Unidades de Terapia Intensiva em um hospital público. **Rev Inter.** v. 4, n. 4, 2011.

DE OLIVEIRA, W. L. M. **Avaliação da patogenicidade e do mecanismo de resistência à metilicina em amostras de *Staphylococcus spp.*** 43f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2013.

DE SOUSA M. A. et al. Microrganismos prevalentes em hemoculturas de pacientes da unidade de terapia intensiva de um Hospital Escola de Goiânia, GO. **News Lab.** n. 126, p. 88-94, 2014.

DELLINGER, R. P. et al. Surviving sepsis campaign guidelines committee including the pediatric subgroup (2013). Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. **Crit Care Med.** n. 41, p. 580-637, 2013.

DENG, C. et al. Risk factors and pathogen profile of ventilator associated pneumonia in a neonatal intensive care unit in China. **Pediatrics.** v. 53, n.3, p. 332-337, 2011.

DEPLANO, A. et al. National surveillance of *Staphylococcus epidermidis* recovered from bloodstream infections in Belgian hospitals. **J Ant Chem.** v. 71, n. 7, p. 1815-1819, 2016.

DIAMENT, D. et al. Diretrizes para tratamento da sepse grave/choque séptico - abordagem do agente infeccioso – diagnóstico. **Rev Bras Ter Intens.** v. 23, n. 2, p. 134-144, 2011.

DIEKEMA, D. J. et al. The microbiology of bloodstream infection: 20-year trends from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antimicrobial Agents Chemother.** v. 63, n. 7, p. e00355-19, 2019.

DIEP, B. A. et al. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Lancet.** v. 367, n. 9512, p. 731-739, 2006.

DOMINGUES, V. et al. *In vitro* evaluation of triazenes: DNA cleavage, antibacterial activity and cytotoxicity against acute myeloid leukemia cells. **J Braz Chem Soc.** v. 21, p. 2226-2237, 2010.

DONG, H.; CAO, H.; ZHENG, H. Pathogenic bacteria distributions and drug resistance analysis in 96 cases of neonatal sepsis. **BMC Pediatr.** v. 17, p. 44, 2017.

DONG, Y.; SPEER, C. P.; GLASER, K. Beyond sepsis: *Staphylococcus epidermidis* is an underestimated but significant contributor to neonatal morbidity. **Virulence.** v. 9, n. 1, p. 621-633, 2018.

DRENKARD, E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Microbes Infect.** v. 5, p. 1213–1219, 2003.

DU, X. et al. Molecular analysis of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from community and hospital environments in China. **PloS one.** v. 8, p. e62742, 2013.

DUBIN, G. et al. Molecular cloning and biochemical characterisation of proteases from *Staphylococcus epidermidis*. **Biol Chem.** v. 382, n. 11, p. 1575–1582, 2001.

DUPONT, J.; CONSORTI, C. S.; SPENCER, J. The potential of palladacycles: more than just precatalysts. **Chem Rev.** v. 105, p. 2527-2572, 2005.

ECDC - EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. Healthcare-associated infections acquired in intensive care units. **Annual epidemiological report for 2016.** Stockholm: 2018.

EHLERSSON, G. et al. Phenotypic characterisation of coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures in newborn infants, with a special focus on *Staphylococcus capitis*. **Acta Paediatr.** v. 106, n. 10, p. 1576-1582, 2017.

EL-SONBATI, A. Z. et al. Supramolecular structure and spectral studies on mixed-ligand complexes derived from β -diketone with azodye rhodanine derivatives. **Spectrochimica Acta Part A: molecular and biomolecular spectroscopy.** v. 99, p. 353-360, 2012.

ENGEL, C. et al. Outras infecções neonatais: Sepsis Neonatal. **Neonologia**. 2016. (Medgrupo - Ciclo II : Medcurso 2016), 2016.

ENRIGHT, M. C. et al. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol**. v. 38, p. 1008–1015, 2000.

ERTUGRUL, S. et al. Risk factors for health care-associated bloodstream infections in a neonatal intensive care unit. **Iran J Pediatr**. v. 26, n. 5, p. e5213, 2016.

ESCHBORN, S.; WEITKAMP, J. Procalcitonin versus C-reactive protein: review of kinetics and performance for diagnosis of neonatal sepsis. **Journal of Perinatology**. v. 39, p. 893-903, 2019.

EUZÉBY, J. P. List of prokaryotic names with standing in nomenclature – Genus *Staphylococcus*, 2013. <http://www.bacterio.cict.fr/staphylococcus.html>. Acessado em: 12/05/2019.

FEIL, E. J. Toward a synthesis of genotypic typing and phenotypic inference in the genomics era. **Future Microbiology**, 2015.

FERNANDES, A. P. et al. Incidência bacteriana em hemoculturas no hospital das clínicas Samuel Libânio, Pouso Alegre, MG. **Rev Eletr Acerv Saud**. v. 2, p. 122-133, 2011.

FERRER, R. et al. Empiric antibiotic treatment reduces mortality in severe sepsis and septic shock from the first hour: results from a guideline-based performance improvement program. **Crit Care Med**. v. 42, p. 1749–1755, 2014.

FEY, P. D; OLSON, M. E. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. **Future Microbiol**. v. 6, n. 5, p. 917–933, 2010.

FIGUEIREDO, A. M. S.; FERREIRA, F. A. The multifaceted resources and microevolution of the successful human and animal pathogen methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 3, p. 265–278, 2014.

FJALSTAD, J. W. et al. Early-onset sepsis and antibiotic exposure in term infants: A nationwide population-based study in Norway. **Ped Infect Dis J**. v. 35, n.1, p. 1-121, 2016.

FREEMAN, D. J.; FALKINER, F. R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **J of Clin Pathol**. v.42, p.872-874, 1989.

GARRITY, G. M.; WINTERS, M.; SEARLES, D. B. **Taxonomic outline of the procaryotic genera. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilson. Release 1.0, Apr 2001.

GARROD, D. et al. Midwifery. **BJOG**. n. 1, p. 149-157, 2011.

GILL, S. R. et al. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. **J Bacteriol.** v. 7, n. 187, p. 2426–2438, 2005.

GOLDSTEIN, B.; GIROIR, B.; RANDOLPH, A. International Consensus Conference on Pediatric Sepsis: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. **Ped Crit Care Med.** v. 6, n. 1, p. 2-8, 2005.

GORDEEV, A. et al. Genetic polymorphism of *Staphylococcus epidermidis* strains in patients of the neonatal intensive care unit. *Bulletin of Russian State Medical University*, 2017.

GORDON, R. J. et al. *Staphylococcus epidermidis* colonization is highly clonal across US cardiac centers. **J Infect Dis.** v. 205, p. 1391–1398, 2012.

GRANSLO, H.N., et al. Arginine catabolic mobile element is associated with low antibiotic resistance and low pathogenicity in *Staphylococcus epidermidis* from neonates. **Ped Res.** v. 68, p. 237-241, 2010.

GRANZOTTO JA, FONSECA SS, LINDEMANN FL. Fatores relacionados com a mortalidade neonatal em uma Unidade de Terapia Intensiva neonatal na região Sul do Brasil. **Revista da AMRIGS**, v. 56, n.1, p.57-62, 2012.

GRAZIANO, T. S. et al. Statins and antimicrobial effects: Simvastatin as a potential drug against *Staphylococcus aureus* biofilm. **PLoS one.** v. 10, n. 5, p. e0128098, 2015.

GRIESS, P. On new nitrogenous derivatives of the phenyl- and benzoyl-series. **Proc Royal Soc.** v. 9, p. 594–597, 1858.

GRIRRANE, A. G.; GARCIA, H.; ÁLVAREZ, E. Isolation and X-ray characterization of palladium-N complexes in the guanylation of aromatic amines - Mechanistic implications. **Beilstein Journal of Organic Chemistry.** v. 9, p. 1455-1462, 2013.

GU, B. et al. The emerging problem of linezolid-resistant *Staphylococcus*. **J Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 1, p. 4-11, 2013.

GUERRA, W. et al. Synthesis, characterization, and antibacterial activity of three palladium(II) complexes of tetracyclines. **J Inorg Biochem.** v. 99, p. 2348-2354, 2005.

HAGHIGHATPANAH, M. et al. Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and plasmid-borne *bla*CTX-M and *bla*TEM genes among clinical strains of *Escherichia coli* isolated from patients in the north of Iran. **J Glob Antimicrob Resist.** v. 7, p. 110–113, 2016.

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

- HARBARTH, S. et al. Inappropriate initial antimicrobial therapy and its effect on survival in a clinical trial of immunomodulating therapy for severe sepsis. **Am J Med.** v. 115, n. 7, p. 529-535, 2003.
- HASSAN, A. et al. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. **BJID.** v. 15, n. 4, p. 305-311, 2011.
- HEALY, C. M. et al. Distinguishing true coagulase-negative *Staphylococcus* infections from contaminants in the neonatal intensive care unit. **J Perinatol.** v. 33, n. 1, p. 52–58, 2013.
- HEGGENDORNN, L. H. et al. Epidemiological profile and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from nosocomial infections. **Rev Saúde e Meio Ambient.** v. 2, n. 21, p. 26–47, 2016.
- HEILMANN, C. et al. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm forming *Staphylococcus epidermidis*. **Molecular Microbiol.** v. 20, p. 1083-1091, 1996.
- HEILMANN, C.; ZIEBUHR, W.; BECKER, K. Are coagulase-negative staphylococci virulent? **Clin Microbiol Infect**, 2018.
- HELLMARK, B. et al. Comparison of *Staphylococcus epidermidis* isolated from prosthetic joint infections and commensal isolates in regard to antibiotic susceptibility, *agr* type, biofilm production, and epidemiology. **Int J Med Microbiol.** v. 303, p. 32–39, 2013a.
- HELLMARK, B. et al. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) and arginine catabolic mobile element (ACME) in *Staphylococcus epidermidis* isolated from prosthetic joint infections. **Europ J Clin Microbiol Infect Dis.** v. 32, n. 5, p. 691-697, 2013b.
- HOOVEN, T. A.; POLIN, R. A. Neonatal bacterial infections. Common Problems in the Newborn Nursery. **Springer.** p. 71-80, 2018.
- HÖRNER, M. et al. Triazenos e atividade antibacteriana. **BJPS.** v. 44, p. 441- 449, 2008.
- HORNIK, C. P. et al. Early and late onset sepsis in very-low-birth-weight infants from a large group of neonatal intensive care units. **Early Human Develop.** v. 88, n. 2, p. S69–S74, 2012.
- HOTCHKISS, R. S.; KARL, I. E. The pathophysiology and treatment of sepsis. **N Engl J Med.** v. 348, p. 138-150, 2003.
- IDSA. Infectious Diseases Society of America. Data supplement for “Implementing an Antibiotic Stewardship Program: guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America,” 2016.
- IORIO, N. L. P. et al. Characteristics related to antimicrobial resistance and biofilm formation of widespread methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* ST2 and ST23 lineages in Rio de Janeiro hospitals, Brazil. **Diag Microbiol Infect Dis.** n. 72, v. 1, p. 32-40, 2012.

- ITO, T. Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (*sccmec*): Guidelines for reporting novel *sccmec* elements. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 53, n. 12, p. 4961-4967, 2009.
- ITO, T., et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 45, p. 1323–36, 2001.
- JANDA, S. et al. The effect of statins on mortality from severe infections and sepsis: a systematic review and meta analysis. **Crit Care.** v. 25, n. 4, p. 7-22, 2010.
- JANSEN, T. C. et al. The prognostic value of blood lactate levels relative to that of vital. **Crit Care.** v.12, p. 160, 2008.
- JIA, B. et al. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. **Nucleic Acids Research.** v. 45, n D1, p. D566-573, 2017.
- JIANG, J. H. et al. Evolution of daptomycin resistance in Coagulase-negative staphylococci involves mutations of the essential two-component regulator WalKR. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 26, n. 3, p. e01926-18, 2019.
- JIN, W. Y. et al. Evaluation of VITEK 2, MicroScan, and Phoenix for identification of clinical isolates and reference strains. **Diagn Microbiol Infect Dis.** n. 70,p. 442-447, 2011.
- JONES, C. J. A química dos elementos dos blocos D e F. Porto Alegre: Bookman, 2002.
- KARAM, G. et al. Antibiotic strategies in the era of multidrug resistance. **Crit Care.** v. 136, n. 20, 2016.
- KARAMI, K. et al. Synthesis, electronic structure and molecular docking of new organometallic palladium (II) complexes with intercalator ligands: The influence of bridged ligands on enhanced DNA/serum protein binding and in vitro antitumoral activity. **J Organ Chem.** v. 827, p. 1-14, 2017.
- KASPER, D.; FAUCI, A. **Doenças Infeciosas de Harrison.** 2 ed. Porto Alegre: Ed. AMGH editora LTDA, 2015. 1164p.
- KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 44, p. 1549–55, 2000.
- KAVAILINI, P. DNA, protein binding, cytotoxicity, cellular uptake and antibacterial activities of new palladium(II) complexes of thiosemicarbazone ligands: effects of substitution on biological activity. **Metallomics.** n.4, p.101-113, 2012.
- KLINGENBERG, C. et al. Persistent strains of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: virulence factors and invasiveness. **Clin Microbiol Infect.** v. 13, p. 1100–1111, 2007.

KNOBLOCH, J. K. et al. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. **Med Microbiol Immunol**. v. 191, n. 2, p. 101-106, 2002.

KOCIANOVA, S., et al. Key role of poly-gamma-DL-glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. **J Clin Invest**. v. 115, p. 688-694, 2005.

KONATÉ, K. et al. Antibacterial activity against β -lactamase producing Methicillin and Ampicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) determination. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**. v. 11, p. 1-12, 2012.

KOZAROV, E.; PADRO, T.; BADIMON, L. View of statins as antimicrobials in cardiovascular risk modification. **Cardiov Res**. v. 102, n. 3, p. 362–374, 2014.

KREISWIRTH, B. et al. Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Science**, v. 259, n. 227-30, 1993.

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

LE, K. Y. et al. Molecular determinants of staphylococcal biofilm dispersal and structuring. **Front Cell Infect Microbiol**, n. 4, p. 167, 2014.

LEE, H. Procalcitonin as a biomarker of infectious diseases. **Korean J Intern Med**. v. 28, n. 3, p. 285-291, 2013.

LEE, J. D. Química inorgânica não tão concisa. 5 ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1999.

LEE, J. Y. H. et al. Functional analysis of the first complete genome sequence of a multidrug resistant sequence type 2 *Staphylococcus epidermidis*. **Microbial Genomics**, 2016.

LEE, S. M.; CHANG, M.; KIM, K. S. Blood culture proven early onset sepsis and late onset sepsis in very-low-birthweight Infants in Korea. **J Korean Med Sci**. v. 30, n. Suppl 1, p. S67–74, 2015.

LEVELS & TRENDS IN CHILD MORTALITY. Report 2017. Estimates developed by the UN Inter-agency Group for Child Mortality Estimation. United Nations Children's Fund, World Health Organization, World Bank and United Nations. New York (NY): United Nations Children's Fund; 2017.

LEVY, M. M. et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Int Care Med**. v. 29, n. 4, p. 530–538, 2003.

LI, M. et al. Gram-positive three-component antimicrobial peptide-sensing system. **Proc Natl Acad Sci**. v. 104, n. 22, p. 9469–9474, 2007.

LI, W.; RAOUL, T. D.; FOURNIER, P. E. Bacterial strain typing in the genomic era. **FEMS Microbiol Rev.** v.33, n. 5, p. 892–916, 2009.

LIAPPIS, A. P. et al. The effect of statins on mortality in patients with bacteremia. **Clin Infect Dis.** v. 33, p. 1352–1357, 2001.

LIU, L. et al. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000-15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. **Lancet.** v. 388, n. 10063, p. 3027–3035, 2017.

LIU, S. L. et al. Bacterial phylogenetic clusters revealed by genome structure. **J Bacteriol.** v. 181, p. 6747-55, 1999.

LOBO, S. M. Sequential C-reactive protein measurements in patients with serious infections: does it help? **Crit Care.** v. 16, n. 3, p. 1-2, 2012.

LONDOÑO, J. et al. Lactato sérico en urgencias como factor pronóstico en pacientes con sepsis sin hipotensión. **Rev Med Clin.** v. 141, p. 246-251, 2014.

LÓPEZ-CORTÉS, L. E. et al. Effect of statin therapy in the outcome of bloodstream infections due to *Staphylococcus aureus*: a prospective cohort study. **PloS one.** v. 8, n. 12, p. e82958, 2013.

LORENZONI, V. V. Increased antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae* from a University Hospital in Rio Grande do Sul, Brazil. **RSBMT.** v. 51, n.5, p. 676-679, 2018.

LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* infections. **N Engl J Med.** v. 339, p. 520-532, 1998.

MACHADO, A. B. M. P. et al. Distribution of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) types I, II, III and IV in coagulase-negative staphylococci from patients attending a tertiary hospital in southern Brazil. **J Med Microbiol.** v. 56, p. 1328-1333, 2007.

MARTIN, G. S. et al. Epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **N Engl J Med.** n. 348, p. 1546-1554, 2003.

MARTINEAU, F. et al. Development of a PCR assay for identification of staphylococci at genus and species levels. **J Clin Microbiol.** v. 39, p. 2541-2547, 2001.

MARTÍNEZ-MELÉNDEZ, A. et al. Molecular epidemiology of coagulase-negative bloodstream isolates: detection of *Staphylococcus epidermidis* ST2, ST7 and linezolid-resistant ST23. **BJID.** v. 20, n. 5, p. 419–428, 2016.

MARTINS, M. A. **Manual de infecção hospitalar: epidemiologia, prevenção e controle.** 2nd. ed. Belo Horizonte: MEDSI, 2001.

MASADEH, M. et al. Antibacterial activity of statins: a comparative study of atorvastatin, simvastatin, and rosuvastatin. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.** v. 11, n. 13, p. 1-5, 2012.

- MASON, R. P. et al. Intermolecular differences of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors contribute to distinct pharmacologic and pleiotropic actions. **American J Cardiol.** v. 96, n. 5A, p. 11–23, 2005.
- MASSAI, L., et al. Antiproliferative properties and biomolecular interactions of three Pd(II) and Pt(II) complexes. **J Inorg Biochem.** v. 165, p. 1-6, 2016.
- MATHUR, T. et al. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: An evaluation of three screening methods. **Ind J Med Microbiol.** n. 24, p. 25-29, 2006.
- MATOS, G. F. J.; VICTORINO, J. A. Critérios para o diagnóstico de sepse, sepse grave e choque séptico. **Rev Bras Ter Intensiva.** v. 16, n. 2, p. 102- 104, 2004.
- MAY, L., E. et al. Trends in antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci in the United States, 1999 to 2012. **Antimicrob Agents Chemother,** n. 58, p. 1404–1409, 2014.
- MEISNER, M. Update on procalcitonin measurements. **An Lab Med.** v. 34, n. 4, p. 263-273, 2014.
- MEMAR, M. Y. et al. Immunologic biomarkers for diagnostic of Early-Onset Neonatal Sepsis. **J Maternal-Fetal & Neonatal Medicine.** 2017.
- MIKKELSEN, M. E. et al. Serum lactate is associated with mortality in severe sepsis independent of organ failure and shock. **Crit Care Med.** v. 37, p. 96-104, 2009.
- MILHEIRIÇO, C.; OLIVEIRA, D. C.; DE LENCASTRE, H. Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome *mec* type IV in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: “SCC*mec* IV multiplex”. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** v. 60, p. 42–48, 2007.
- MILLER, J. M. et al. A Guide to utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. **Clin Infect Dis.** v. 67, n. 6, p. e1–e94, 2018.
- MIRAGAIA, M. et al. Comparison of molecular typing methods for characterization of *Staphylococcus epidermidis*: proposal for clone definition. **J Clin Microbiol.** v. 46, n. 1, p. 118–129, 2008.
- SPRINGER-VERLAG, I., et al. Coagulase-negative staphylococci: update on the molecular epidemiology and clinical presentation, with a focus on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus*. **J Europ J Clin Microbiol Infect Dis.** v.31, n. 1, 2012.
- MIRAGAIA, M. et al. Genetic diversity of Arginine Catabolic Mobile Element in *Staphylococcus epidermidis*. **PLoS ONE.** v. 4, n. 11, p. e7722, 2009.
- MIRAGAIA, M. et al. Inferring a population structure for *Staphylococcus epidermidis* from multilocus sequence typing data. **J Bacteriol.** v. 189, n. 6, p. 2540–2552, 2007.

- MIRAGAIA, M. Factors contributing to the evolution of *mecA*-mediated β -lactam resistance in staphylococci: update and new insights from whole genome sequencing (WGS). **Frontiers in Microbiology**. v. 9, p. 2723, 2018.
- MIRÓ-CANTURRI, A.; AYERBE-ALGABA, R.; SMANI Y. Drug repurposing for the treatment of bacterial and fungal infections. **Frontiers in Microbiology**. v. 10, n. 41, p. 1-12, 2019.
- MIRZAEI, R., et al. Prevalence of *atlE*, *ica*, *mecA*, and *mupA* genes in *Staphylococcus epidermidis* isolates. **Infect Dis Clin Pract**. v. 25, n. 37-40, 2017a.
- MITT, P. et al. Five-year prospective surveillance of nosocomial bloodstream infections in an Estonian paediatric intensive care unit. **J Hosp Infect**. v. 86, p. 95-99, 2014.
- MOHAMMADI, A. Novel triazene dyes based on N-phenylpiperazine: Synthesis, anti-bacterial activity and solvatochromic properties. **J Mol Liq**. v.193, p. 69–73, 2014.
- MOORE, D. S.; ROBINSON, S. D. Catenated nitrogen ligands part I. Transition metal derivatives of triazenes, tetrazenes, tetrazadienes, and pentazadienes. **Adv Inorg Chem Radiochem**. v. 30, p. 1-68, 1986.
- MORO, A. C. et al. Antitumor and antimycobacterial activities of cyclopalladated complexes: X-ray structure of [Pd(C2,N-dmba)(Br)(tu)] (dmba =N,N- dimethylbenzylamine, tu = thiourea). **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 44, p. 4611-4615, 2009.
- MORO, A. C.; MAURO, A. E.; ANANIAS, S. R. Clivagem dos ciclopalladados diméricos [Pd(dmba)(m-X)]₂ (dmba = N,N-dimetilbenzilamina; X = Cl, N3, NCO) por tiouréia. **Ecl Química**, v.29, p.57-61, 2004.
- MUCK, A. O.; SEEGER, H.; WALLWIENER, D. Class-specific pro-apoptotic effect of statins on human vascular endothelial cells. **Z Kardiol**. v. 93, p. 398–402, 2004.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. Microbiologia médica. 6 ed. Maryland: Elsevier, 2009. 604 p.
- NAMVAR, A. E. et al. Molecular characterization of *Staphylococcus epidermidis* isolates collected from an intensive care unit. **Arch Pediatr Infect Dis**, v. 5, n. 2, p. e36176, 2017.
- NASCIMENTO, T. C. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from an intensive care unit in Minas Gerais, Brazil, over a six-year period. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, p. 16–23, 2018.
- NATHWANI, D.; SNEDDON, J. Practical guide to antimicrobial stewardship in hospitals. BiomérieuxR. Disponível em: <<http://bsac.org.uk/wpcontent/uploads/2013/07/Stewardship-Booklet-Practical-Guide-toAntimicrobial-Stewardship-in-Hospitals.pdf>>. Acesso em: 05/07/2019.

- NUNES, M. S. et al. Synthesis, characterization and biological activity of a gold(I) triazenide complex against chronic myeloid leukemia cells and biofilm producing microorganisms. **BJPS**. v. 53, n. 4, p. e00191, 2017.
- NUNES, M. S., et al. Atividade antibacteriana de um composto triazenido com ouro frente a cepas bacterianas e isolados clínicos. **Rev Cubana Farm**. v. 48, n. 4, p. 573-581, 2014.
- O'CONNELL, K. M. G. et al. Combating multidrug-resistant bacteria: Current strategies for the discovery of novel antibacterials. **Angewandte Chemie International Edition**. v. 52, n. 41, p. 10706–10733, 2013.
- O'GARA, J.P. *Ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiol Let**. v. 270, p.179- 188, 2007.
- O'NEILL, J. I. M. Tackling drug-resistant infections globally: final report and 766 recommendations. **AMR review**. 2016.
- ÖCAL, D. N. et al. Investigation of biofilm formation properties of *Staphylococcus* isolates. **Mikrobiyol Bul**. v. 51, n. 1, p. 10-19, 2017.
- ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **J Antimicrobial Chemother**. v. 52, p. 1, 2003.
- OHARA-NEMOTO, Y. et al. Characterization and molecular cloning of a glutamyl endopeptidase from *Staphylococcus epidermidis*. **Microb Pathog**. v. 33, n. 1, p. 33–41, 2002.
- OLIVEIRA, A.; CUNHA, M. L. R. S. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. **BMC Research Notes**. v.3, n. 260, p. 1-8, 2010.
- OLIVEIRA, C.F.D. et al. Coagulase-negative staphylococci in Southern Brazil: looking toward its high diversity. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 49, p. 292-299, 2016.
- OLIVEIRA, M. L. A.; VERONESI, C. L.; GOULART, L.S. Caracterização de recém-nascidos com hemoculturas positivas internados em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal. **Rev Eletr G & S**. v. 3, n. 2, p. 717-729, 2012.
- OMBAKA, A. O; MUGUNA, A. T.; GICHUMBI, J. M. Antibacterial and antifungal activities of novel hydroxytriazenes. **J Envir Chem Ecotoxicol**. v. 4, p. 133-136, 2012.
- ORATI, J. A. et al. Dosagens séricas de proteína C-reativa na fase inicial da sepse abdominal e pulmonar. **Rev Bras Ter Intensiva**. v. 25, n. 1, p. 6-11, 2013.
- OTTO, M. Staphylococcal biofilms. Recent review on the molecular biology of staphylococcal biofilm formation. **Curr Top Microbiol Immunol**. v. 322, p. 207–228, 2008.
- OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* - the 'accidental' pathogen. **Nature Rev**. v. 7, p. 555-567, 2009.

- OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis*: Pathogenesis. In *Staphylococcus epidermidis*: Methods and Protocols, P.D. Fey, ed. (New York: Springer), p. 17-31, 2014.
- OTTO, M. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. **Annu Rev Med.** v. 64, p. 175–188, 2013.
- PAIM, T. G. S.; CANTARELLI, V.; D'AZEVEDO, P. A. 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, n.3 p. 777-38, 2014.
- PALIT, P.; MANDAL, S. C.; MANDAL, N. B. Reuse of old, existing, marketed non-antibiotic drugs as antimicrobial agents: a new emerging therapeutic approach. microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. **Formatex.** p. 1883-1892, 2013.
- PAMMI, M.; WEISMAN, L. E. Late-onset sepsis in preterm infants: update on strategies for therapy and prevention. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 13, p. 487–504, 2015.
- PARAGINSKI, G. L., et al. *In vitro* antibacterial activity and toxicity toward *Artemia salina* leach. Of some triazene compounds. **Quím Nova.** v. 37, n. 7, p. 1138-1144, 2014.
- PAZZINI, L. T. **Caracterização genotípica de microrganismos isolados de infecções da corrente sanguínea relacionadas a cateteres em recém-nascidos.** 2010. 146 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Universidade de Botucatu, São Paulo, 2010.
- PEDROSO, S. H. S. P. et al. Biofilm and toxin profile: A phenotypic and genotypic characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from human bloodstream infections. **Microbial Pathogenesis.** v. 100, p. 312-318, 2016.
- PEERAYEH, S.N.; MOGHADAS, A. J.; BEHMANESH, M. Prevalence of virulencerelated determinants in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. **Jund J Microbiol.** v. 9, n. 8, p. e30593, 2016.
- PEREIRA, V. C.; CUNHA M. L. R. Coagulase-negative staphylococci strains resistant to oxacillin isolated from neonatal blood cultures. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** p. 1-4, 2013.
- PÉREZ-PÉREZ, F. J.; HANSON, N. D. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. **J Clin Microbiol.** v. 40, p. 2153-2162, 2002.
- PERRONE, S. et al. Creactive protein in healthy term newborns during the first 48 hours of life. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.** p. 1–4, 2017.
- PINHEIRO, L. et al. *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*: detection of biofilm genes and biofilm formation in blood culture isolates from patients in a Brazilian teaching hospital. **Diagnostic Microbiol Infect Dis.** v. 86, p. 11–14, 2016a.

PINHEIRO, L. et al. Susceptibility profile of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* isolated from blood cultures to vancomycin and novel antimicrobial drugs over a period of 12 years. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 4, p. 283-293, 2016b.

PINHEIRO, M. S. B. **Epidemiologia da infecção hospitalar e mortalidade intra-hospitalar de uma unidade de terapia intensiva neonatal em hospital de referência regional de São Paulo**. 2008. 133f. Dissertação - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

PINHEIRO, M. S. B. et al. Infecção hospitalar em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal: Há influência do local de nascimento. **Rev Paul Ped**. v. 27, n. 1, p. 6-14, 2009.

PLOUFFE, J.F. Emerging therapies for serious gram-positive bacterial infections: A focus on linezolid. **Clin Infect Dis**. v. 31, p. S144-S149, 2000.

PRABHAKARAN, R. et al. Structural and biological studies of mononuclear palladium(II) complexes containing N-substituted thiosemicarbazones. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 43, p. 268-273, 2008.

PRASAD, S., et al. Molecular & phenotypic characterization of *Staphylococcus epidermidis* in implant related infections. **The Indian Journal of Medical Research**, n. 136, v. 3, p. 483-490, 2012.

PUJA, G. et al. Detection of biofilm production in blood culture isolates of *Staphylococci*. **Int J Med Res Health Sci**. v. 4, n.1, p. 22-28, 2015.

PUSCH, T. et al. Controlling outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* among infants caused by an endemic strain in adult inpatients. **American J Infect Control**, v. 41, p. 51-6, 2013.

QIN, L. et al. Toxin mediates sepsis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. **PLoS Pathog**, n. 13, p. e1006153, 2017.

QUECK, S. Y. et al. Mobile genetic element-encoded cytolysin connects virulence to methicillin resistance in MRSA. **PLoS Pathog**, n. 5, p. e1000533, 2009.

QUIROGA, A. G., et al. Novel tetranuclear orthometalated complexes of Pd(II) and Pt(II) derived from p-isopropylbenzaldehyde thiosemicarbazone with cytotoxic activity in cis-DDP resistant tumor cell lines. Interaction of these complexes with DNA. **J Med Chem**. v.41, n.9, p.1399-1408, 1998.

RAHIMI, F.; KARIMI, S. Biofilm Producing *Staphylococcus epidermidis* Strains Isolated From Clinical Samples in Tehran, Iran. **Arch Clin Infect Dis**. v. 11, n. 3, p. e33343, 2016.

RAIMUNDO, O. et al. Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococcal bacteraemia in a newborn intensive care unit. **J Hospital Infect**. v. 51, p. 33-42, 2002.

RAMPELOTTO, R. F. et al. Análise do perfil de sensibilidade frente aos antimicrobianos de bactérias isoladas de bacteremias em um hospital universitário. **Rev Cub Farm.** v. 49, n. 1, p. 61-69, 2015.

RAMPELOTTO, R. F. et al. Assessment of different methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures of newborns. **RSBMT.** v. 51, n. 6, p. 761-767, 2018a.

RAMPELOTTO, R. F. et al. Synergistic antibacterial effect of statins with the complex {[1-(4-bromophenyl)-3-phenyltriazene N3-oxide-κ2 N1,O4](dimethylbenzylamine-κ2 C1, N4)palladium(II)}. **Braz J Pharm Sci.** v. 54, p. 1-9, 2018b.

RANI, V. S.; RAVINDRA, S.; RAO, R. K. Biofilm detection and clinical significance of *Staphylococcus epidermidis* isolates. **J Evol Med Dental Sciences.** v. 4, n. 28, p. 4844-4849, 2015.

REMYINGTON, J. et al. S. Staphylococcal infections. **Infect Dis Fetus Newborn.**, p. 489–505, 2011.

RESENDE, D. S. et al. Late onset sepsis in newborn babies: epidemiology and effect of a bundle to prevent central line associated bloodstream infections in the neonatal intensive care unit. **BJID.** v. 19, n. 1, p. 52-57, 2015.

RHODES, A. et al. Campanha sobrevivendo à sepse: Diretrizes internacionais para a gestão de sepse e choque séptico: 2016. **Critical Care Medicine.** v. 45, n. 3, p. 486-556, 2017.

RIBOLI, D. F. M. **Significância clínica e epidemiologia molecular de *Staphylococcus spp.* nas infecções da corrente sanguínea em UTI neonatal.** 2018. 38 f. Tese (Doutorado em Biologia Geral) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, Brasil, 2018.

ROBERTS, A. L. Identification of *Staphylococcus epidermidis* in the clinical microbiology laboratory by molecular methods. **Methods Mol Biol,** v. 2014, p. 33 – 53, 2014.

RODRIGUES, M. A. et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a University Hospital in the South of Brazil. **BJID.** v. 51, n.1, p. 35-41, 2015.

RODWELL, R.L.; LESLIE, A.L.; TUDEHOPE, D.T. Early diagnosis of neonatal sepsis using a hematologic scoring system. **JPED (Rio).** p.112:761-7, 1988.

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

ROLF, S. et al. Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. **PLoS ONE.** v. 9, n. 8, p. e104984, 2014.

- ROSENTHAL, V. D. et al. International Nosocomial Infection Control Consortium report, data summary of 50 countries for 2010-2015: device-associated module. **Am J Infect Control**. v. 44, p. 1495–1504, 2016.
- ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma**. São Paulo: Atheneu; 2005.
- RUSSEL, J. A. Management of sepsis. **N Engl J Med**. v. 355, p. 1699-713, 2006.
- RUSSELL, A. B.; SHARLAND, M.; HEATH, P. T. Improving antibiotic prescribing in neonatal units: time to act. **Arch Dis Child Fetal Neonatal**, n. 97, p. F141–6, 2012.
- SADEGHI, M. M. et al. Simvastatin modulates cytokine-mediated endothelial cell adhesion molecule induction: involvement of an inhibitory G protein. **The Journal of Immunology**. v. 165, 2712-2718, 2000.
- SADER, H. S. et al. SENTRY Participants Group (Latin America). SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin America and Brazilian results for 1997 though 2001. **BJID**. v. 8, n. 1, p. 25-79, 2004.
- SADOVSKAYA, I. et al. Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A. **Infect Immun**. v. 73, n. 5, p. 3007–3017, 2005.
- SANTOS, A. F. et al. Evaluation of MALDI-TOF MS in the microbiology laboratory. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 49, n. 3, p. 191-197, 2013.
- SANTOS, S. O., et al. Colistin resistance in non-fermenting Gram-negative bacilli in a university hospital. **BJID**. v. 20, n.6, p. 649-650, 2016.
- SAUER, K. et al. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. **J Bacteriol**. v. 184, p. 1140-1154, 2002.
SCCmec website: www.sccmec.org. Acessado em: 17/06/2019.
- SEIBERT, G. et al. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase em um hospital escola. **Einstein**. v. 12, n.3, p. 282-286, 2014.
- SERAFIN, M. B. et al. Drug Repositioning in Oncology. **American Journal of Therapeutics**, *Ahead of print*, 2019.
- SERAFIN, M. B.; HÖRNER, R. Drug repositioning, a new alternative in infectious diseases. **BJID**. v. 22, n. 3, p. 252-256, 2018.
- SHAHEEN, F. et al. *In vitro* assessment of cytotoxicity, anti-inflammatory, antifungal properties and crystal structures of metallacyclic palladium(II) complexes. **Journal of Organometallic Chemistry**. v. 695, p. 315-322, 2009.
- SHANE, A. L. et al. Neonatal sepsis. **Lancet**. v. 390, p. 1770-1780, 2017.

- SHANE, A. L.; STOLL, B. J. Neonatal sepsis: progress towards improved outcomes. **J Infect.** v. 68, n. 1, p. S24-32, 2014.
- 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*. **Antimicrob Agents Chemother.** n. 55, p. 3765-3773, 2011.
- SIEVERT, D. M. et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: Summary of data reported to the national healthcare safety network at the centers for disease control and prevention, 2009-2010. **Infect Control Hosp Epidemiol.** v. 34, p. 1-14, 2013.
- SILVA, C. H. P. M; LINS, A. P.; CRUZ, C. S. O. Avaliação do sistema staph-id para a identificação de *Staphylococcus* isolados a partir de espécimes clínicos humanos. **RBAC.** v. 38, p. 7-9, 2006.
- SILVA, D. C. et al. Phenotypic methods for screening carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* and assessment of their antimicrobial susceptibility profile. **RSBMT.** v. 50, n. 2, p. 173-178, 2017.
- SLOOS, J. H. et al. Performance of phenotypic and genotypic methods to determine the clinical relevance of serial blood isolates of *Staphylococcus epidermidis* in patients with septicemia. **J Clin Microbiol.** v. 38, p. 2488-2493, 2000.
- SMITH, S. C. J. R.; GRUNDY, S. M. 2013 ACC/AHA guideline recommends fixed-dose strategies instead of targeted goals to lower blood cholesterol. **J Am Coll Cardiol.** v. 64, n. 6, p. 601–612, 2014.
- SOLATI, S. M. et al. Prevalence of virulence genes of biofilm producing strains of *Staphylococcus epidermidis* isolated from clinical samples in Iran. **AMB Express.** v. 5, p. 47, 2015.
- SREEDHARA, A.; COWAN, J. A. Catalytic hydrolysis of DNA by metal ions and complexes. **J Biol Inorg Chem.** v. 6, n. 4, p. 337-347, 2001.
- STEVEN, M. K.; TIMOTHY, J. O. Static biofilm cultures of gram-positive pathogens grown in a microtiter format used for anti-biofilm drug discovery. **Current Protocols in Pharmacology.** v. 50, n. 1, 2010.
- TACCONELLI, E. et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO 813 priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **Lancet Infect Dis.** v. 18, n. 3, p. 318-327, 2018.
- TAPIA-PEREZ, J. H. et al. Cytotoxic effect of different statins and thiazolidinediones on malignant glioma cells. **Cancer Chemother Pharmacol.** v. 67, p. 1193–1201, 2011.

TENOVER, F. C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol**, v. 33, p. 2233-9, 1995.

THANGAMANI, S. et al. Exploring simvastatin, an antihyperlipidemic drug, as a potential topical antibacterial agent. **Nature Scientific Reports**. v. 5, n. 16407, p. 1-13, 2015.

THOMAS, J. C.; ROBINSON, D. A. Multilocus Sequence Typing of *Staphylococcus epidermidis*. **Springer**, p. 61-69, 2014.

THOMAS, J.C. et al. Differing lifestyles of *Staphylococcus epidermidis* as revealed through Bayesian clustering of multilocus sequence types. **Infect Genet Evol**. v. 22, p. 257-264, 2014.

TING, M.; WHITAKER, E. J.; ALBANDAR, J. M. Systematic review of the *in vitro* effects of statins on oral and perioral microorganisms. **Eur J Oral Sci**. v. 124, p. 4–10, 2015.

TIZOTTI, M. K. et al. X-ray characterization and *in vitro* biological evaluation of 1-(4-amidophenyl)-3-(4-acetylphenyl)triazene and the gold(I) triazene complex {Au(I)[RPhNNNPhR']][PPh₃]} [R = (C O)NH₂, R' = (C O)CH₃]. **Inorg Chim Acta**. v. 441, p. 78-85, 2016.

TLEYJEH, I. M. et al. Statins for the prevention and treatment of infections: a systematic review and meta-analysis. **Arch Intern Med**. v. 169, n. 18, p. 1658-1667, 2009.

TOLO, I. et al. Do *Staphylococcus epidermidis* genetic clusters predict isolation sources? **J Clin Microbiol**. v. 54, p. 1711-1719, 2016.

TORMO, M. A. et al. *Bap* dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? **Microbiol**. v. 151, p. 2465-75, 2005.

TURNER, K. M; FEIL, E. J. The secret life of the multilocus sequence type. **Int J Antimicrob Agents**. v. 29, n. 2, p. 129–135, 2007.

TZIALLA, C. et al. Antimicrobial therapy in neonatal intensive care unit. **Italian J Ped**. v. 41, n. 27, p. 1-6, 2015.

URIBE-ALVAREZ, C. et al. *Staphylococcus epidermidis*: metabolic adaptation and biofilm formation in response to different oxygen concentrations. **FEMS Pathogens and Disease**. v. 73, p. 1-15, 2015.

VAN ACKER, H.; VAN DIJCK, P.; COENYE, T. Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. **Trends Microbiol**. v. 22, n. 6, p. 326–333, 2014.

VAN DEN BERGHE, G. et al. Intensive insulin therapy in critically ill patients. **N Engl J Med**. v. 345, p. 1359-1367, 2001.

- VANDAMME, P. A. Taxonomy and classification of bacteria. In *Manual of clinical microbiology*, J. Versalovic, K. Carroll, G. Funke, J. Jorfensen, M. Landry, and D. Warnock, eds. (Washington, DC: ASM Press), p. 213-227, 2011.
- VAZ, A. J.; TAKEI K.; BUENO, E. C. **Imunoensaios: Fundamentos e Aplicações**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogau, 2007.
- VIANA, P. P. A. et al. Incidência bacteriana em hemoculturas de recém-nascidos e perfil de suscetibilidade frente aos antimicrobianos. **Rev Bio Farm**. v. 1. n. 5, p: 102-110, 2011.
- VINCENT, J. L.; DONADELLO, K.; SCHMIT, X. Biomarkers in the critically ill patient: C-Reactive Protein. **Crit Care Clin**. v. 27, n. 2, p. 241-254, 2011.
- VON EIFF, C.; PETERS, G.; HEILMANN, C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. **Lancet Infect Dis**. v. 2, p. 677-685, 2002.
- VUONG, C.; OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* infections. **Microb Infect**. v. 4, p. 481-89, 2002.
- WACKER, C. et al. Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infect Dis**. v. 13, n. 5, p. 426-435, 2013.
- WALKER, O.; KENNY, C. B.; GOEL, N. Neonatal sepsis. **Paediatrics and Child Health**. p. 1-6, 2019.
- WANG, L. et al. *SarZ* is a key regulator of biofilm formation and virulence in *Staphylococcus epidermidis*. **J Infect Dis**. v. 197, p. 1254-1262, 2008.
- WANG, R., et al. *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice. **J Clin Invest**. v. 121, p. 238-248, 2011.
- WHITELEY, M. et al. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Nature**. v. 413, p. 860-864, 2001.
- WIDERSTRÖM, M. et al. A multidrug-resistant *Staphylococcus epidermidis* clone (ST2) is an ongoing cause of hospital-acquired infection in a Western Australian hospital. **J Clin Microbiol**. v. 50, p. 2147-2151, 2012.
- WIDERSTROM, M. et al. Clonality among multidrug-resistant hospital-associated *Staphylococcus epidermidis* in northern Europe. **Scand J Infect Dis**. v. 41, p. 642-649, 2009.
- WIDERSTRÖM, M. Significance of *Staphylococcus epidermidis* in Healthcare-Associated Infections, from Contaminant to Clinically Relevant Pathogen—This Is a Wakeup Call! **J Clin Microbiol**. v. 54, n. 7, p. 1679-1681, 2016.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals, 2018.

WYNN, J. L. Defining Neonatal Sepsis. **Curr Opin Pediatr.** v. 28, n.2, p. 135-140, 2016.

WYNN, J. L. et al. Time for a neonatal-specific consensus definition for sepsis. **Pediatr Crit Care Med.** v. 15, n. 6, p. 523–528, 2014.

YADAV, N. S. et al. Bacteriological profile of neonatal sepsis and antibiotic susceptibility pattern of isolates admitted at Kanti Children's Hospital, Kathmandu, Nepal. **BMC Res Notes.** v. 11, n. 301, p.1-6, 2018.

YAMAZAKI, H. et al. Influence of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors on ubiquinone levels in rat skeletal muscle and heart: relationship to cytotoxicity and inhibitory activity for cholesterol synthesis in human skeletal muscle cells. **J Atheroscler Thromb.** v. 13, p. 295–307, 2006.

ZALIPOUR, M. et al. Detection of biofilm production capability and *icaA/D* genes among staphylococci isolates from Shiraz, Iran. **Jund J Microbiol.** v. 9, n. 12, p. e41431, 2016.

ZANKARI, E. et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. **J Antimicrob Chemother.** v. 67, n. 11, p. 2640-2644, 2012.

ZHANG, Y. Q. et al. Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). **Molecular Microbiology**, v. 49, p. 1577-1593, 2003.

ZHAO, C. et al. Antimicrobial resistance trends among 5608 clinical grampositive isolates in China: results from the gram-positive cocci resistance surveillance program (2005–2010). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 73, p. 174–181, 2012.

ZHENG, W.; SUN, W.; SIMEONOV, A. Drug repurposing screens and synergistic drug-combinations for infectious diseases. **Br J Pharmacol.** v. 175, p. 181-191, 2018.

ZHENG, W.; SUN, W.; SIMEONOV, A. Drug repurposing screens and synergistic drug-combinations for infectious diseases. **British J Pharmac**, v. 175, n. 2, p. 181-191, 2017.

ZONG, Z.; PENG, C.; LU, X. Diversity of SCC*mec* elements in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci clinical isolates. **PLoS One.** v. 6, n. 5, p. 201-291, 2011.