

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

Fernanda Aguirre Carvalho

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS NA PRODUÇÃO DE BIOFILME EM
Staphylococcus spp. ISOLADOS DE HEMOCULTURAS DE UNIDADE
DE TERAPIA INTENSIVA ADULTA**

Santa Maria, RS
2017

Fernanda Aguirre Carvalho

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS NA PRODUÇÃO DE BIOFILME EM *Staphylococcus*
spp. ISOLADOS DE HEMOCULTURAS DE UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA
ADULTA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado 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 **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rosmari Hörner

Santa Maria, RS
2017

Fernanda Aguirre Carvalho

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS NA PRODUÇÃO DE BIOFILME EM *Staphylococcus*
spp. ISOLADOS DE HEMOCULTURAS DE UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA
ADULTA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado 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 **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovado em 27 de setembro de 2017:

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

Francisco Montagner, Dr. (UFRGS)

Maísa Kraulich Tizotti, Dr^a.(Externa)

Santa Maria, RS
2017

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho as três pessoas mais importantes da minha vida, a quem eu amo profundamente, aquelas a quem eu quero sempre orgulhar. **Pai, mãe e mana:** será sempre para vocês e por vocês.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, por me dar o que pode dar de melhor, a saúde e a força de vontade. Sei que sem isso eu não seria nada.

Aos meus pais, **Valdeci e Vania**, por todo o apoio que sempre me ofereceram. Por abdicarem da vida de vocês em favor das nossas quando vieram conosco pra Santa Maria. Por me mostrarem que sempre terei vocês, que o maior presente que vocês poderiam nos dar era estar sempre perto, sempre ao lado. Obrigada por saberem nos dar tudo àquilo que sempre quisemos sem parecer que estávamos ganhando o mundo. Obrigada por nos mostrarem o melhor caminho a seguir. Esta conquista é para vocês.

À minha Irmã, **Juliany**, por dividir comigo muito mais que os nove meses na barriga da mãe, divide comigo a vida, e que seja sempre assim. Será eternamente o meu porto seguro, a quem eu sempre vou recorrer e tentar proteger. Sou grata por te ter como irmã e sinto orgulho do que tu vens conquistando. Sei o quanto tu vibras com minhas vitórias, então esta é além de para nossos pais, para ti.

Ao meu namorado, **Renato**, primeiramente, muito obrigada por me aguentar nesta reta final de mestrado. Obrigada por ser bem mais que um namorado, ser alguém que me trás a tranquilidade que eu sempre desejei, por teu apoio e teu incentivo. Obrigada por dividir comigo meus sonhos e planos.

Ao meu cachorro, **Nick**, pois enquanto escrevo estes agradecimentos, bem como grande parte da dissertação ele estava aqui ao lado, na caminha. Por muitas vezes me olhava como quem diz “Força, ta acabando, tu conseguiu”. Obrigada por me mostrar o significado de amar um animalzinho com o maior amor do mundo.

A todos os meus **familiares**, que de uma forma ou de outra, me apoiaram e incentivaram a prosseguir no meu objetivo. Agradeço em especial a minha **Vó Celanira**, a quem tive o imenso prazer de conviver diariamente em casa por um curto período, mas que serviu de muito aprendizado. Por todos os dias que escutei “ta indo trabalhar minha filha”, por todos os mates e pipoca no fim de tarde, muito obrigada, onde tu estiveres sei que estás olhando e vibrando por minha conquista, sinto saudade todos os dias.

Às minhas amigas as quais hoje posso chamar de irmãs, por me receberem em Santa Maria e fazerem desta cidade o meu novo lar, por me mostrarem que estarão sempre ali, nas horas boas e nas ruins. **Adriana, Fernanda, Gabriela e Nathalia**, vocês são anjos que Deus colocou nas nossas vidas. Sem esquecer nosso pequeno afilhado **Benjamin**, veio para alegrar nossas vidas e nos ensinar uma nova forma de amor.

Às amigas que a Farmácia me deu, que dividiram horas de estudo, de aulas práticas com muita risada, de conversas no bar e acima de tudo de companheirismo (sem esquecer as festas e jantares). Aquelas que mesmo com o fim da faculdade continuaram presentes, dividindo conquistas e alegrias. Obrigada **Alice, Ana, Jéssica S, Jéssica G, Leidi, May e Marla**, por me mostrarem que além de colegas a faculdade nos traz amigas e que independente do tempo, da correria do dia a dia e da distância estão sempre comigo. Agradeço em especial a alguém que esta por vir, a quem espero ansiosamente conhecer e dizer o quanto já amo e quero estar sempre perto. Obrigada **Pedro Antônio**, por me aproximar ainda mais da tua mãe e me mostrar ainda mais o que eu já sabia, que podemos ficar felizes com a vida dos outros, daqueles a quem queremos o melhor, como se fosse à nossa vida.

À minha orientadora, **Dr^a Rosmari Horner**, agradeço pela oportunidade de fazer estágio no Laboratório, pelo aprendizado que tive como monitora da disciplina de Bacteriologia por dois semestres, pela oportunidade de realizar o mestrado, pelos ensinamentos e apoio na realização desta pesquisa, bem como em todo o tempo que estive presente no Laboratório.

Aos **colegas do Laboratório de Bacteriologia**, não só os que estão hoje e sim todos aqueles que passaram pelo Laboratório durante os quatro anos e meio que estive presente. Obrigada pelo

*convívio, por tornarem mais divertido com todos os aniversários e comemorações, pela disponibilidade em ajudar e ensinar. Em especial a pessoa que me acolheu, aquela que foi a minha maior amiga durante esses anos. Obrigada **Mônica**, por confiar em mim durante o tempo que fui tua estagiaria, por dividir comigo tua vida e por fazer parte da minha. Meu carinho, respeito e admiração por ti serão eternos. Agradeço imensamente por tu ter entrado na minha vida acadêmica, e se hoje conquisto esta vitória, grande parte dela devo a ti.*

*Às minhas estagiárias **Lais e Taci**, obrigada por alegrarem meus dias, por estarem sempre dispostas e perto quando eu precisava. Por muitas vezes aguentarem minha cara fechada. Por toda ajuda com as práticas realizadas, sem esquecer todos Whatsapp falando de batom ou de alguma promoção em loja. Obrigada por se tornarem minhas amigas.*

*A quem eu costumo chamar de “**Dona**” **Sirley**, funcionária da limpeza do departamento. Muito obrigada por todos os “Bom dia” com sorriso no rosto que a senhora me dirigia, obrigada por aqueles minutinhos de conversa, as quais a senhora estava sempre alegre. Já disse uma vez e hoje repito, a tua alegria faz a diferença no nosso dia a dia, o teu bom dia pode parecer pequeno, mas é do tamanho do sorriso e da alegria que a senhora sempre nos recebe.*

*À **banca examinadora** desta dissertação, que gentilmente se dispôs a avaliar e contribuir com este trabalho.*

*A **Universidade Federal de Santa Maria** e ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas** pela oportunidade de conclusão deste trabalho.*

A todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta pesquisa.

RESUMO

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS NA PRODUÇÃO DE BIOFILME EM *Staphylococcus* spp. ISOLADOS DE HEMOCULTURAS DE UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA ADULTA

AUTORA: Fernanda Aguirre Carvalho

ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a Rosmari Hörner

Unidades de Terapia Intensiva (UTI) são destinadas ao atendimento de pacientes em estado grave, que necessitam de monitorização e suporte contínuos de suas funções vitais. Estes possuem uma probabilidade 5 a 10 vezes maior de contrair Infecções de Corrente Sanguínea (ICS), sendo este risco diretamente proporcional à gravidade da doença, às condições nutricionais, à natureza dos procedimentos diagnósticos ou terapêuticos e ao tempo de internação. As ICS indicam a presença de microrganismos viáveis na corrente sanguínea, estando frequentemente associadas a um aumento considerável nas taxas de morbimortalidade. Além de serem uma das mais significativas complicações no processo infeccioso, as ICS tornam-se de grande relevância diagnóstica. Em hemoculturas, os cocos Gram Positivos têm emergido como os principais agentes recuperados, destacando-se *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativa e *Enterococcus* spp. Os *Staphylococcus* spp. estão frequentemente envolvidos em infecções associadas ao biofilme, pois este é um dos mecanismos de defesa do gênero, que é formado por bactérias reconhecidamente comensais da pele e de mucosas humanas, o que lhes coloca em lugar estratégico para infectar qualquer dispositivo médico que penetrar essas superfícies. No biofilme, estas bactérias apresentam um estilo de vida sésil, geralmente menos suscetíveis aos antimicrobianos do que suas formas planctônicas, proporcionando um ambiente de proteção contra as pressões externas, contra a ação do sistema imune e facilita a interação das células com organismo hospedeiro. Este trabalho teve como objetivo avaliar quatro diferentes métodos na produção de biofilme em *Staphylococcus* spp. isolados de hemoculturas de pacientes hospitalizados na UTI adulta do Hospital Universitário de Santa Maria, de abril de 2016 a abril de 2017. Neste período, foram solicitados 797 pedidos de hemoculturas na UTI. Destas 89 positivaram, sendo 54 do gênero *Staphylococcus* spp. as quais foram selecionadas para este estudo. Para avaliação da produção de biofilme os isolados foram testados através de 4 diferentes métodos: aderência em placa de poliestireno (MTP), considerado padrão ouro; tubo de borossilicato (TM); ágar vermelho congo (CRA); pesquisa dos genes *icaACD* (genotípica). O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foi analisado através de metodologia automatizada (Vitek® Biomerieux, France). Em 59,25% (32/54) dos isolados houve produção de biofilme por uma ou mais das quatro metodologias testadas. Foi detectado biofilme em 57,41% (31/54) dos isolados de *Staphylococcus* spp. pelo método MTP, 24,07% (13/54) pelo CRA e 11,11% (6/54) pelo TM. No genotípico apenas sete isolados (12,95%) expressaram os genes *icaACD* e dois isolados (3,70%) os genes *icaAD*. Em relação ao perfil de sensibilidade, os isolados produtores de biofilme foram mais resistentes aos antimicrobianos do que os não produtores. Através destes resultados podemos concluir que comparado à metodologia considerada padrão ouro (MTP), o CRA e o TM não apresentaram valores confiáveis para sugerirmos sua utilização na avaliação da produção de biofilme na rotina. Em relação ao teste genotípico, salienta-se a importância de novos estudos para avaliação de mecanismos de produção de biofilme *ica*-independentes.

Palavras-chave: Infecção de corrente sanguínea. Unidade de terapia intensiva. *Staphylococcus* spp.

ABSTRACT

EVALUATION OF METHODS IN THE PRODUCTION OF BIOFILME IN *Staphylococcus* spp. ISOLATED FROM ADULT INTENSIVE THERAPY UNIT HEMOCULTURES

AUTHOR: Fernanda Aguirre Carvalho

ADVISOR: Prof.^a Dr.^a Rosmari Hörner

Intensive Care Units (ICUs) are intended for the care of critically ill patients who need continuous monitoring and support of their vital functions. These are 5 to 10 times more likely to contract with Bloodstream Infections, and this risk is directly proportional to disease severity, nutritional conditions, the nature of diagnostic or therapeutic procedures, and length of stay. ICS indicates the presence of viable microorganisms in the bloodstream and is often associated with a considerable increase in morbidity and mortality rates. In addition to being one of the most significant complications in the infectious process, CSIs become of great diagnostic relevance. In blood cultures, Gram-positive cocci have emerged as the main agents recovered, especially *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negative and *Enterococcus* spp. *Staphylococcus* spp. are frequently involved in biofilm-associated infections, as this is one of the defense mechanisms of the genus, which is composed of bacteria known to be commensal to human skin and mucous membranes, which places them in a strategic place to infect any medical device that penetrates these surfaces. In biofilm, these bacteria present a sessile lifestyle, generally less susceptible to antimicrobials than their planktonic forms, providing an environment of protection against external pressures, against the action of the immune system and facilitates the interaction of cells with host organism. This work aimed to evaluate four different methods in the production of biofilm in *Staphylococcus* spp. isolated from blood cultures of patients hospitalized in the adult ICU of the Hospital Universitário de Santa Maria, from April 2016 to April 2017. During this period, 797 requests for blood cultures in the ICU were requested. Of these 89 positivated, being 54 of the genus *Staphylococcus* spp. which were selected for this study. To evaluate the biofilm production, the isolates were tested using 4 different methods: polystyrene plate adhesion (MTP), considered gold standard; borosilicate (TM) tube; Congo red agar (CRA); search for *ica*ACD (genotypic) genes. The antimicrobial susceptibility profile was analyzed by automated methodology (Vitek Biomerieux, France). In 59.25% (32/54) of the isolates biofilms were produced by one or more of the four methodologies tested. Biofilm was detected in 57.41% (31/54) of the isolates of *Staphylococcus* spp. by the MTP method, 24.07% (13/54) by the CRA and 11.11% (6/54) by the TM. In the genotype only seven isolates (12.95%) expressed the *ica*ACD genes and two isolates (3.70%) the *ica*AD genes. Regarding the sensitivity profile, biofilm isolates were more resistant to antimicrobials than non-producers. Through these results we can conclude that compared to the methodology considered gold standard (MTP), CRA and TM did not present reliable values to suggest its use in the evaluation of biofilm production in the routine. Regarding the genotypic test, the importance of new studies for the evaluation of mechanisms of biofilm-independent production is highlighted.

Keyword: Bloodstream infection. Intensive care units. *Staphylococcus* spp.

LISTA DE TABELAS

Manuscrito

Tabela 1- Critérios para a interpretação dos resultados referentes à produção de biofilme em placa, segundo Stepanović et al. (2007).....	26
Tabela 2- Condições e primers utilizados nas reações de PCR.....	28
Tabela 3- Resultados do teste fenotípico de produção de biofilme pela metodologia do Teste em Placa de Poliestireno (MTP).....	30
Tabela 4- Amostras produtoras de biofilme pela metodologia genotípica comparada aos testes fenotípico realizados.....	32
Tabela 5. Relação entre a resistência aos antimicrobianos de isolados produtores de biofilme e não produtores frente as quatro metodologias testadas.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CRA	Ágar Vermelho Congo
CVC	Cateter venoso central
GN	Gram negativa
GP	Gram positiva
HUSM	Hospital Universitário de Santa Maria
ICS	Infecção da corrente sanguínea
IRAS	Infecções relacionadas à assistência à saúde
MDR	Resistente a múltiplas drogas
MTP	Método de aderência em Placa de Poliestireno
OD	Densidade óptica
PBS	Tampão fosfato-salina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PIA	Adesina Intercelular Polissacarídeo
POP	Procedimento Operacional Padrão
SCoN	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
TM	Tubo de Borossilicato

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TSA	Ágar triptona de soja
TSB	Caldo triptona de soja
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
UTI	Unidade de terapia intensiva

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A- CARTA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	67
ANEXO B- SUBMISSÃO DO MANUSCRITO	70

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. INFECÇÃO DE CORRENTE SANGUÍNEA (ICS)	14
1.1.1 Infecções de corrente sanguínea relacionadas ao uso de dispositivos médicos.	14
1.1.2 Infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS).....	15
1.2 GÊNERO <i>Staphylococcus</i>	16
1.3 PRODUÇÃO DE BIOFILME	17
1.3.1 Formação do biofilme	17
1.4 RESISTÊNCIA BACTERIANA	18
2. JUSTIFICATIVA.....	19
3. OBJETIVOS.....	19
3.1 OBJETIVO GERAL.....	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4. MANUSCRITO	21
5. CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS.....	45
ANEXOS.....	50
ANEXO A – CARTA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	50
ANEXO B – SUBMISSÃO DO MANUSCRITO	53

1. INTRODUÇÃO

Bacteremia ou Infecção de corrente sanguínea (ICS) é o termo que designa a indicação da presença de microrganismos viáveis na corrente sanguínea. Frequentemente está associado a um aumento considerável nas taxas de morbidade e mortalidade, além de representar uma das mais significativas complicações no processo infeccioso, tornando-se assim de grande relevância. Deste modo, a hemocultura torna-se um exame de importante valor preditivo de infecção, uma vez que quando resultado o resultado for positivo para microrganismos patogênicos torna-se um indicador altamente específico para ICS, permitindo assim a identificação do patógeno e a realização do antibiograma, o qual auxilia na orientação terapêutica correta (ARAÚJO, 2012; BRASIL, 2013).

Unidades de Terapia Intensiva (UTI) são unidades destinadas ao atendimento de pacientes em estado grave, os quais necessitam de monitorização e suporte contínuos de suas funções vitais. É considerada uma área crítica pela instabilidade hemodinâmica dos pacientes internados, sendo a sepse a principal causa de óbito nestas unidades (CARVALHO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2012). O Consenso Brasileiro de Sepse revela uma incidência de sepse e choque séptico de 27% e 23%, respectivamente, entretanto dados sobre a incidência e evolução de sepse em UTI são raros (CARVALHO et al., 2010).

O gênero *Staphylococcus* spp. compreende cocos Gram-positivos pertencentes à família *Staphylococcaceae* (TORTORA et al., 2007; MURRAY et al., 2014;). Este gênero tem como reservatório primário a pele e membranas mucosas de mamíferos e aves, preferencialmente a região nasofaríngea, entretanto, possui uma distribuição ampla (MURRAY et al., 2014). É responsável pela produção de uma série de fatores de virulência, dentre eles a presença de cápsula, capacidade de formação de biofilme, a secreção de enzimas como catalase, nucleases, proteases, lipases, hialuronidases, fibrinolisinases, coagulase (em algumas espécies) e quatro hemolisinas (alfa, beta, delta e gama) (SPICER, 2002; GORDON & LOWY, 2008; MURRAY et al., 2014).

Destacam-se neste gênero as bactérias produtoras de biofilme, que se beneficiam de uma série de vantagens sobre aquelas que não o produzem, já que a matriz extracelular formada é capaz de sequestrar e concentrar nutrientes do ambiente. Além disso, um benefício adicional para o crescimento do biofilme é a capacidade de evadir múltiplos mecanismos de defesa produzidos pelo hospedeiro e bloquear fisicamente a ação de agentes antimicrobianos

utilizados na terapia (CROES et al., 2009; ARCHER et al., 2011). A vantagem final para o desenvolvimento dessas estruturas é uma potencial dispersão ou descolamento celular, nos quais as colônias podem se separar migrando a partir da comunidade original, para regiões não infectadas do hospedeiro, e promovendo o crescimento e a formação de um novo biofilme (ARCHER et al., 2011).

1.1. INFECÇÃO DE CORRENTE SANGUÍNEA (ICS)

Infecção de corrente sanguínea (ICS), também conhecida como Bacteremia, indica presença de microrganismos viáveis na corrente sanguínea. Possuem grande relevância clínica, pois frequentemente estão associadas a graves complicações, especialmente em pacientes críticos, prolongando o tempo de hospitalização e um aumento de morbidade e mortalidade (ARAUJO, 2012; BRASIL, 2013).

Alguns fatores de risco, relacionados ao hospedeiro, tornam-se importantes para o desenvolvimento de ICS e incluem: idade, sendo mais comum em pacientes idosos e em prematuros; nutrição parenteral; infecção em diferentes sítios; condições associadas à perda de barreiras de pele normais ou imunossupressão, como pacientes com transplante de medula óssea, portadores da Síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) ou que recebem quimioterapia (BRASIL, 2013). O número elevado de procedimentos e o tempo de internação atuam como fatores predisponentes para bacteremias. Observou-se, um aumento na incidência de casos de bacteremia relacionados ao uso de materiais médicos artificiais, que são facilmente colonizados por bactérias, prevalecendo os cateteres vasculares (MUNSON et al., 2003; OLIVEIRA, 2010)

Em relação à prevalência de microrganismo, os cocos Gram-positivos têm emergido como os principais agentes recuperados nas hemoculturas, destacando-se *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa* e *Enterococcus* spp. (FERNANDES et al., 2011).

1.1.1 Infecções de corrente sanguínea relacionadas ao uso de dispositivos médicos

Infecções associadas a dispositivos implantáveis têm se tornado um grande problema na medicina moderna. A maior realização de procedimentos invasivos, com o uso destes dispositivos, proporcionou aos patógenos um novo habitat a ser colonizado, aumentando-se assim os riscos de infecções de forma significativa. Além disso, estas infecções tornaram-se

uma constante causa de infecção hospitalar, associada a elevados índices de morbidade e mortalidade, ao aumento do tempo de permanência e consequentemente, dos custos hospitalares. (SCHOENFELDER et al., 2010; ROSADO et al., 2011).

Os cateteres representam um forte aliado na terapêutica de pacientes hospitalizados, pois possibilitam a administração de maneira contínua de fluídos intravenosos, medicamentos e hemoderivados, além de possibilitar uma nutrição parenteral prolongada, bem como a realização de hemodiálise (ROSADO et al., 2011). Entretanto, a inserção e a permanência do cateter, muitas vezes por longos períodos em pacientes internados nas UTIs, permitem que os microrganismos migrem para o sangue por meio de dois mecanismos principais: colonização extraluminal e colonização intraluminal. Na colonização extraluminal, os microrganismos que fazem parte da própria pele do paciente, ou até mesmo das mãos dos profissionais de saúde, sofrem ação da capilaridade e penetram na pele no momento em que o cateter é inserido ou nas próximas horas após a sua inserção. A superfície externa do cateter pode também ser colonizada devido o uso de antissépticos contaminados. Já na colonização intraluminal, ocorre a migração do microrganismo pela corrente sanguínea, devido a infecções que se originaram em outros locais, à manipulação incorreta do canhão do cateter ou até mesmo a administração de soluções contaminadas (BONVENTO, 2007; ROSADO et al., 2011). A maioria das infecções relacionadas a cateteres está associada ao uso dos cateteres venosos centrais (CVC), especialmente quando inseridos em UTIs (O' GRADY et al, 2002).

Staphylococcus spp. coagulase negativa representam a fonte mais comum de infecções em dispositivos médicos implantáveis, sendo que destes o *S. epidermidis* prevalece. Frequentemente são encontrados outros microrganismos como os bacilos Gram negativos, a *Candida* spp e o *Enterococcus* spp. (MACK et al., 2006; MARQUES, 2011).

1.1.2 Infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS)

São definidas como Infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) aquelas adquiridas após a admissão do paciente no ambiente hospitalar, tendo relação com os procedimentos hospitalares e/ou com o período de internação. São consideradas uma das principais causas de mortalidade hospitalar, influenciadas principalmente pelo quadro clínico do paciente, podendo ocorrer durante a internação ou após a alta (GUIMARÃES et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011; BRASIL, 2013).

Em UTIs, as IRAS estão associadas ao uso de procedimentos invasivos (CVC, sondas vesicais de demora, ventilação mecânica), período de internação prolongado, colonização por microrganismos muitas vezes multirresistentes e até mesmo pelo próprio ambiente da unidade, o qual favorece a seleção natural de microrganismos e a colonização dos pacientes (OLIVEIRA et al., 2012; PEREIRA et al., 2016). O processo de colonização do paciente é caracterizado pela presença do microrganismo no hospedeiro, mas ausência de manifestações clínicas e resposta imunológica no momento do isolamento bacteriano (JARVIS, 1996).

Além dos prejuízos à saúde do paciente, as IRAS, apresentam maiores gastos nas UTIs, especialmente em infecção de sítio cirúrgico e de corrente sanguínea associada a cateter (ANVISA, 2013).

1.2 GÊNERO *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus* compreende cocos Gram positivos pertencentes à família *Staphylococcaceae*, os quais têm emergido como os principais agentes recuperados nas hemoculturas (FERNANDES et al., 2011). Esses microrganismos possuem de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, são catalase-positiva, não formadores de esporos, imóveis e anaeróbios facultativos e estão presentes na pele e nas membranas mucosas dos seres humanos (TORTORA et al., 2007; MURRAY et al., 2014).

Os *Staphylococcus* spp. são capazes de sobreviver a diversas condições ambientais, como em meios contendo alta concentração de NaCl (até 10 %), numa faixa de pH de 4,2 a 9,3 (com pH ideal de 7 a 7,5) e em um intervalo de temperatura entre 7 °C e 48 °C (temperatura ótima de 35 °C a 37 °C) (MURRAY et al., 2014). São microrganismos responsáveis por um amplo espectro de doenças sistêmicas de gravidade considerável, sendo as espécies *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis* e *S. saprophyticus* as mais prevalentes (MURRAY et al., 2014).

Segundo relatório da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os *Staphylococcus* coagulase negativa são os principais microrganismos responsáveis por causarem ICS associadas a cateteres venosos centrais em pacientes adultos, pediátricos e neonatais internados em UTIs que possuem dez ou mais leitos, seguidos pelos *S. aureus* (BRASIL, 2013).

1.3 PRODUÇÃO DE BIOFILME

Biofilme caracteriza-se por ser uma comunidade de células sésseis aderidas a uma superfície, embebidas em uma matriz polimérica extracelular chamada “slime”, por elas produzidas, no qual podem exibir diferentes fenótipos, metabolismo, fisiologia e transcrição genética. Estas células são irreversivelmente ligadas a um substrato ou interface ou umas as outras, proporcionando um ambiente de proteção contra as pressões externas e facilita a interação de células com o organismo hospedeiro. Estas estruturas altamente hidratadas que contém canais que permitem à difusão interna de nutrientes e oxigênio (ARCHER et al., 2011; DONLAN; COSTERTON, 2002; FOULSTON et al., 2014; SPEZIALE et al., 2014).

Sabe-se que bactérias produtoras de biofilme possuem a capacidade de bloquear a ação de agentes antimicrobianos, tornando-se assim de 100 a 1000 vezes mais resistentes do que suas formas planctônicas, isto provavelmente advém da dificuldade de alguns antimicrobianos difundirem-se através da camada polissacarídica ou porque células dentro de biofilme diferem fisiologicamente de células planctônicas (DONLAN; COSTERTON, 2002; CARGILL; UPTON, 2009).

Além disso, as bactérias em biofilme exibem um fenótipo alterado no que diz respeito à taxa de crescimento e transcrição de genes (DONLAN; COSTERTON, 2002). Dessa forma, as colônias isoladas migram a partir da comunidade original, para regiões não infectadas do hospedeiro, promovendo o crescimento e a formação de um novo biofilme (ARCHER et al., 2011).

1.3.1 Formação do biofilme

A formação do biofilme é um processo que ocorre em três etapas, incluindo uma fase inicial de adesão, seguida da maturação ou proliferação e o evento final de descolamento, também chamado de dispersão (CROES et al., 2009; PERIASAMY et al., 2012; FOULSTON et al., 2014; SPEZIALE et al., 2014).

A adesão inicial pode ocorrer em superfícies bióticas, como os tecidos humanos, ou abióticas, como dispositivos médicos e superfícies metálicas e plásticas de indústrias de alimentos. Esta etapa é mediada por fatores inespecíficos, como interações eletrostáticas e hidrofóbicas, e específicas, como moléculas de superfícies (OTTO, 2013). Após a adesão inicial, as células replicam-se em microcolônias, tornando a adesão irreversível, formando

assim a matriz do biofilme. Posteriormente a esta fase bastante complexa, ocorre dificuldade de remoção do biofilme, uma vez que os microrganismos fixam-se à superfície e ligações químicas são fortemente estabelecidas (PALMER et al., 2007; SREY et al., 2013).

A segunda etapa da formação do biofilme é a maturação, a qual é caracterizada pela presença de macrocolônias circundadas por canais de água, as quais auxiliam na distribuição de nutrientes e moléculas sinalizadoras (SREY et al., 2013). Nesta fase são produzidas as adesinas, que medeiam o contato célula-célula, resultando na proliferação dos microrganismos em agrupamentos e na produção das multicamadas do biofilme (O'GARA, 2007). No gênero *Staphylococcus* spp, uma das mais importantes moléculas adesivas é a adesina intercelular polissacarídica (polysaccharide intercellular adhesin – PIA). A PIA é sintetizada, exportada e modificada pelos produtos do operon *ica* ADBC, com quatro regiões codificantes (OTTO, 2013).

A última etapa é denominada de dispersão, a qual permite que as células (individualmente ou em aglomerados) revertam-se para a forma de vida planctônica. Esta mudança geralmente ocorre quando a disponibilidade de nutrientes é limitada ou simplesmente para propagar-se e colonizar outros nichos (SREY et al., 2013). Por conta da dispersão, os microrganismos podem colonizar outras superfícies e repetir o ciclo de formação do biofilme (ABDALLAH et al., 2014).

1.4 RESISTÊNCIA BACTERIANA

Os antimicrobianos fazem parte de uma classe terapêutica usada para a eliminação bacteriana, com a capacidade de inibir a multiplicação ou induzir a morte do patógeno (SANTOS, 2016). Do ponto de vista clínico, uma bactéria é considerada resistente a um determinado antibacteriano, quando é capaz de crescer, *in vitro*, em concentrações mais altas do que a maior concentração alcançada pelo fármaco no sítio da infecção (HOIBY et al., 2010).

A associação entre o uso irracional e o desenvolvimento de resistência bacteriana é conhecida desde a introdução da penicilina na prática clínica e vem aumentando com o passar do tempo. As evidências de que o uso indiscriminado de antimicrobianos é o principal fator para a resistência bacteriana vem de certas observações, como o frequente surgimento de resistência durante o curso da terapia, gerando assim uma falha terapêutica. Constata-se uma correlação entre a comercialização de novos fármacos e o posterior desenvolvimento de

resistência, sendo por muitas vezes em um curto período de tempo desde a introdução do fármaco no mercado e o surgimento de resistência (ZIMERMAN, 2012).

Dessa forma, o conhecimento e estudos sobre os mecanismos de resistência bacteriana são fundamentais para alcançar uma percepção sobre esse fenômeno e planejar novas estratégias de prevenção (FRANCO, 2015).

2. JUSTIFICATIVA

De modo geral, pacientes hospitalizados em Unidades de Terapia Intensiva apresentam quadros críticos, com a disfunção de um ou mais sistemas orgânicos, que comprometem seus mecanismos homeostáticos. Tais quadros clínicos resultam em uma necessidade de cuidados intensivos, que implicam em procedimentos invasivos com finalidades de diagnóstico, tratamento e monitorização, e que frequentemente expõem o paciente a um maior número de fatores de risco para o desenvolvimento de infecções hospitalares ou relacionadas aos cuidados de saúde.

Infecções de corrente sanguínea, especialmente as relacionadas ao uso de cateter venoso central, podem ser consideradas uma grave complicação, pois frequentemente estão associadas ao prolongamento do período de internação, aumento das despesas hospitalares e a elevada mortalidade.

A capacidade de formar biofilme tem sido considerada como o principal fator de virulência responsável pela sobrevivência das bactérias, bem como relaciona-se diretamente à crescente multirresistência aos antimicrobianos. Levando em consideração o risco de infecção sanguínea em pacientes críticos, bem como a formação de biofilme, o aumento das taxas de resistência e o grande uso de dispositivos médicos nas UTIs, este estudo teve por finalidade analisar fenotipicamente e genotipicamente a formação de biofilme em hemoculturas de bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. isoladas no período de abril de 2016 a abril de 2017, da Unidade de Terapia Intensiva Adulta do Hospital Universitário de Santa Maria.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a produção de biofilme em bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. isoladas de hemoculturas provenientes de pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva Adulta do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), de abril de 2016 a abril de 2017.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a produção de biofilme dos isolados através de três metodologias fenotípicas: Método da aderência em placa de poliestireno (MTP), Método do tubo de borossilicato (TM) e Método do ágar vermelho congo (CRA);
- Avaliar a produção de biofilme dos isolados através de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) pela pesquisa dos genes *icaA*, *icaC* e *icaD*;
- Avaliar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados produtores e não produtores de biofilme;

4. MANUSCRITO

Manuscrito submetido para publicação na Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (ANEXO B), Qualis Capes B2.

AVALIAÇÃO DE QUATRO DIFERENTES MÉTODOS NA PRODUÇÃO DE BIOFILME EM *Staphylococcus spp.* ISOLADOS DE HEMOCULTURAS DE UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA ADULTA

Fernanda Aguirre Carvalho, Mônica de Abreu Rodrigues, Tacieli Fagundes da Rosa, Lais

Mainardi dos Santos, Marissa Bolson Serafin, Angelita Bottega, Rosmari Hörner

Objetivo: Avaliar quatro diferentes métodos na produção de biofilme em *Staphylococcus spp.* isolados de hemoculturas de pacientes hospitalizados em uma Unidade de Terapia Intensiva adulta .

Métodos: No período de abril de 2016 a abril de 2017 foram isolados 54 *Staphylococcus spp.* provenientes da unidade em estudo do Hospital Universitário de Santa Maria. Na avaliação da produção de biofilme foram utilizados os métodos da aderência em placa de poliestireno (MTP), considerado padrão ouro, do tubo de borossilicato (TM), e ágar vermelho congo (CRA), bem como o teste genotípico para detecção dos genes *icaACD*. O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foi analisado através de metodologia automatizada (Vitek® Biomerieux, France).

Resultados: Em 59,25% dos isolados detectou-se a produção de biofilme por uma ou mais das quatro metodologias testadas. Nos testes fenotípicos, foi detectado a produção de biofilme em 57,41% dos isolados de *Staphylococcus spp.* com o método MTP, em 24,07% com o CRA e em 11,11% no TM. No método genotípico verificou-se que apenas sete isolados (12,95%) expressaram os genes *icaACD* e dois isolados (3,70%) os genes *icaAD*. Os isolados produtores de biofilme foram mais resistentes aos antimicrobianos do que os não produtores.

Conclusão: Quando comparado à metodologia considerada padrão ouro (MTP), o CRA e o TM não apresentaram valores confiáveis para que se possa sugerir-los como métodos para detecção da produção de biofilme na rotina. A formação de biofilme dos isolados por

mecanismo *ica*ACD independente salienta a importância de novos estudos para avaliação de mecanismos de produção de biofilme *ica*-independentes.

Palavra-chave: Antibacterianos; Bacteremia; Biofilme; Hemocultura; *Staphylococcus*;

Unidade de Terapia Intensiva.

Keywords: Antibacterial; Bacteremia; Biofilm; Blood Culture; *Staphylococcus*; Intensive Care Unit.

INTRODUÇÃO

Unidades de Terapia Intensiva (UTI) destinam-se ao atendimento de pacientes em estado grave que necessitam de monitoração e suporte contínuos de suas funções vitais. São consideradas áreas críticas devido à instabilidade hemodinâmica dos pacientes internados, os quais possuem probabilidade cinco a 10 vezes maior de contrair infecções (Carvalho 2010; Lima 2007; Oliveira 2012).

Infecções de corrente sanguínea (ICS), também conhecidas como bacteremias, indicam a presença de microrganismos viáveis no sangue, e estão frequentemente associadas a um aumento considerável nas taxas de morbidade e mortalidade. Além disso, representam uma das mais significativas complicações no processo infeccioso. Dessa forma, a hemocultura constitui um exame de importante valor preditivo de infecção, uma vez que quando o resultado for positivo para microrganismos patogênicos torna-se um indicador altamente específico para ICS, o que permite a identificação do patógeno e a realização do antibiograma, o qual auxilia na orientação terapêutica correta (Araújo 2012; Brasil 2013).

Entre os principais agentes recuperados nas hemoculturas, os cocos Gram-positivos têm emergido como os prevalentes, destacando-se *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa* (SCoN) e *Enterococcus* spp. (Fernandes 2011).

Staphylococcus spp. possuem como um dos principais fatores de virulência a produção de biofilme, as quais se beneficiam de uma série de vantagens sobre aquelas que não o

produzem, já que a matriz extracelular formada é capaz de sequestrar e concentrar nutrientes do ambiente. Ressalta-se que, uma vantagem adicional para o crescimento do biofilme é a capacidade de evadir a múltiplos mecanismos de defesa produzidos pelo hospedeiro e bloquear fisicamente a ação de agentes antimicrobianos utilizados na terapia, tornando-se de 100 a 1000 vezes mais resistentes do que suas formas planctônicas (Archer 2011; Cargill & Upton 2009; Croes 2009; Donlan & Costerton 2002).

A vantagem final para o desenvolvimento dessas estruturas é uma potencial dispersão ou descolamento celular, nos quais as colônias podem se separar, migrando a partir da comunidade original, para regiões não infectadas do hospedeiro, e promovendo assim o crescimento e a formação de um novo biofilme (Archer 2011). No gênero *Staphylococcus* spp, uma das mais importantes moléculas adesivas é a adesina intercelular polissacarídica (polysaccharide intercellular adhesin – PIA). Esta é sintetizada, exportada e modificada pelos produtos do operon *ica* ADBC, os quais contêm quatro regiões codificantes (Otto 2013).

Levando em consideração o risco de infecção sanguínea em pacientes críticos hospitalizados em uma UTI, bem como a formação de biofilme que pode levar ao aumento das taxas de resistência e o grande uso de dispositivos médicos nessas unidades, este estudo teve por finalidade a avaliação de quatro métodos para identificar a produção de biofilme em bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. isolados em hemoculturas realizadas em um hospital escola da região sul do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras

Foram coletadas todas as amostras em que foram isolados *Staphylococcus* spp. nas hemoculturas de pacientes internados na UTI adulta do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), no período de abril de 2016 a abril de 2017. O HUSM é um órgão integrante da

Universidade Federal de Santa Maria, o qual atua como hospital escola terciário. A unidade em estudo possui 10 leitos, sendo que um destes é de isolamento.

As culturas foram solicitadas, sempre em duplicata, quando algum sinal clínico de bacteremia estava presente: aumento da temperatura corporal ($> 38^{\circ}\text{C}$) ou hipotermia ($<36^{\circ}\text{C}$), leucocitose (> 10.000 leucócitos / mm^3 , especialmente com desvio para a esquerda) ou granulocitopenia absoluta (<1000 leucócitos / mm^3). Estas foram consideradas positivas quando houve desenvolvimento da mesma bactéria em ambos os frascos, descartando assim uma possível contaminação. No período de 12 meses (abril de 2016 a abril de 2017) foram solicitadas 797 hemoculturas na unidade em estudo, sendo que 89 hemoculturas solicitadas positivaram, destas, 54 foram selecionadas para este estudo, por terem apresentado crescimento de bactérias do gênero *Staphylococcus* spp..

As amostras foram processadas através do sistema automatizado BACTEC 9240® (Becton, Dickson, Spark, MD), sendo os testes de identificação das bactérias isoladas e os perfis de sensibilidade frente aos antimicrobianos realizados no sistema automatizado Vitek® (Biomerieux, France) seguindo-se as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI 2016). Estas permaneceram armazenadas em caldo triptona de soja (TSB) (Himedia®) com 15% de glicerol a -80°C , no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFSM. Para a realização dos testes, os isolados foram reativados em ágar triptona de soja (TSA), sendo utilizado como controle positivo a cepa padrão da *American Type Culture Collection* de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (produtor de biofilme) (Wells 2011) e como controle negativo a cepa padrão de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (não-produtor de biofilme) (Liu 2015).

Testes fenotípicos para detecção da produção de biofilme

Três metodologias fenotípicas foram utilizadas para a detecção da produção de biofilme neste estudo, sendo um quantitativo (Método de aderência em placa de Poliestireno) e dois qualitativos (Ágar vermelho congo e Método do Tubo de Borossilicato).

Método de aderência em placa de Poliestireno (MTP)

Para a detecção da produção de biofilme pelo teste de MTP, o qual é considerado padrão ouro, seguiu-se o protocolo desenvolvido por Christensen et al. (1985), com adaptações (Stepanovic 2007).

O tempo para realização deste experimento é de quatro dias consecutivos, sendo que no primeiro dia as cepas foram reativadas em TSA e incubadas em atmosfera aeróbica por 24 h, a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. No segundo dia, foram inoculadas de 3 a 4 colônias em tubos contendo 5mL de TSB, os quais foram incubados nas mesmas condições de tempo e temperatura citadas anteriormente. No terceiro dia, os tubos foram passados no vórtex, sendo posteriormente feita a diluição 1:100 em caldo TSB suplementando com 1% de glicose (Neon®). As bactérias diluídas foram agitadas e em seguida, inoculadas em placa de poliestireno de microtitulação, com 96 poços, fundo em “U” (200 μL por poço). Estas foram incubadas novamente nas mesmas condições já citadas. No quarto e último dia, desprezou-se o sobrenadante dos poços, que posteriormente foram lavados por três vezes consecutivas com 300 μL de tampão fosfato-salino (PBS) estéril, pH 7,2, em temperatura ambiente. Após a lavagem, as bactérias restantes nos poços foram termofixadas por 60 min a 60°C , na posição invertida. Após este período, os poços foram corados com 150 μL de cristal violeta 2%, durante 15 min. Após desprezar-se o corante, foram adicionados 150 μL de etanol 95% por cada poço. As placas foram então, tampadas e deixadas, em temperatura ambiente, durante 30 min, para que se alcançasse a ressolubilização do corante, que em seguida foi desprezado com auxílio de micropipeta. Lavaram-se os poços com água deionizada estéril, até a completa saída do excesso de corante.

Após a total secagem das placas, a densidade óptica (OD) de cada poço foi medida a 570 nm utilizando-se leitor de microplacas de ELISA (Epoch™/BioTek®). O teste foi realizado em quadruplicata, sendo o controle negativo o poço contendo somente 200 µL de TSB suplementado com 1% de glicose. A interpretação dos resultados foi feita com base nos critérios estabelecidos por Stepanović et al. (2007), os quais encontram-se descritos na Tabela I.

Tabela I. Critérios para a interpretação dos resultados referentes à produção de biofilme em placa, segundo Stepanović et al. (2007)¹⁶.

Produção de biofilme		
$OD \leq OD_c$	0 (-)	Não-produtora
$OD_c \leq 2X OD_c$	1 (+)	Fraca
$2X OD_c < OD \leq 4X OD_c$	2 (++)	Moderada
$4X OD_c < OD$	3 (+++)	Forte

Ágar Vermelho Congo (CRA)

Este teste foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Freeman et al (1989). O meio CRA foi preparado utilizando-se 50g/L de sacarose (Dinâmica®), 37 g/L de brain heart infusion broth (Himedia®), 10 g/L de ágar No. 1/ Agar Powder, Bacteriological (Himedia®) e 0,8 g/L do corante Vermelho Congo (Vetec®). Os isolados foram reativadas em TSA e incubados em atmosfera aeróbica a $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h. No segundo dia, foram semeadas no CRA e novamente incubadas nas mesmas condições de tempo e temperatura acima citadas. A seguir, os isolados foram classificados como produtores de biofilme, quando houve crescimento de colônias pretas no meio. Quando as colônias apresentaram coloração rosa, vermelha ou bordô foram classificados como não produtores de biofilme. As leituras

foram realizadas novamente após 48 h e 72 h de incubação, sendo que todas as amostras foram analisadas em duplicata.

Teste do tubo de Borosilicato (TM)

Este teste foi realizado seguindo a metodologia descrita por Christensen et al. (1982). No primeiro dia, os isolados foram reativados em TSA e incubados em estufa bacteriológica com atmosfera aeróbica a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pelo período de 24 h. Após este período, as colônias dos isolados, foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 2,0 mL de caldo de triptona de soja (TSB), e incubadas por 48 h nas condições descritas acima. Após o tempo sugerido pela técnica, os conteúdos dos tubos foram desprezados sendo adicionado em cada tubo 2 mL de solução aquosa de azul de Tripan 0,4% (Vetec®). Após um minuto, com o auxílio de uma micropipeta o corante foi removido e procedeu-se a classificação dos isolados. Estes foram consideradas como produtores de biofilme quando houve presença visível de uma camada de material corado aderido à parede interna do tubo, e como não produtores de biofilme quando não ocorreu aderência nas paredes dos tubos.

Teste genotípico para detecção da produção de biofilme

Extração do DNA

Para a extração do DNA genômico seguiu-se o protocolo desenvolvido por Moosavian et al. (2014), com modificações, sendo a extração realizada através da lise térmica. Os isolados foram reativados em ágar Mueller-Hinton (Kasvi®) e incubados por 24 h em atmosfera aeróbica a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. No dia seguinte, duas a cinco colônias de cada isolado, foram suspensas em 750 μL de TE buffer (10 mM de Tris, 1mM de EDTA, pH 8), sendo a suspensão submetida a banho seco por 20 min a 100°C , e posteriormente levada a freezer -80°C por mais 20 min. O rendimento do DNA extraído foi confirmado através do aparelho Qubit

2.0 Fluorometer (Invitrogen™) antes dos ensaios baseados na Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) serem realizados.

Amplificação dos gene 16S

Foi realizado a PCR do gene 16S (Ludwig Biotec®) de todos os isolados do estudo, seguindo-se o protocolo de Lina et al. (1999), com algumas adaptações a fim de descartar possíveis inibidores de amplificação, bem como para avaliar a qualidade da extração do DNA. As condições e primers utilizados na realização da PCR encontram-se descritos na Tabela II.

Tabela II. Condições e primers utilizados nas reações de PCR.

Gene	Primer	Sequência do primer (5' → 3')	Condições da PCR	Band size	Ref.
	16S_F	TTGTACACACCGCCCGTC			Lina et al.
	A		Desnaturação inicial a 94 °C		(1999)
16S	16S_R	GGTACCTTAGATGTTTCA GTTC	por 5 min, seguida por 35 ciclos de 5 min a 94 °C; 60 s a 94 °C; 45 s a 55 °C; 45 s a 72 °C; extensão final de 5 min a 72 °C.	492 pb	
IcaA	<i>icaA_F</i>	ACAGTCGCTACGAAAAG			Arciola et al.
	AAA		Desnaturação inicial a 94 °C	103pb	(2005)
	<i>icaA_R</i>	GGAAATGCCATAATGAG	por 5 min, seguida por 30		
	AAC		ciclos de 5 min a 94 °C; 60		
IcaC	<i>icaC_F</i>	TAACTTTAGGCGCATATG	s a 94 °C; 30 s a 55 °C; 45 s		Arciola et al.
	TTT		a 72 °C; extensão final de 5	400	(2005)

	<i>icaC_R</i>	TTCCAGTTAGGCTGGTAT	min a 72 °C.	pb	
		TG			
IcaD	<i>icaD_F</i>	ATGGTCAAGCCCAGACA			Arciola et al.
		GAG		198	(2005)
	<i>icaD_R</i>	CGTGTTTTCAACATTTAA		pb	
		TGCAA			

Amplificação dos genes *icaA*, *icaD* e *icaC*

Os 54 isolados selecionados foram submetidos a PCR para detecção dos genes responsáveis pela produção de biofilme, operon *ica* (Ludwig Biotec®). Baseou-se no trabalho de Arciola et al. (2005) com adaptações, as condições da PCR utilizadas, bem como a sequência dos primers encontram-se descritas na Tabela II.

A PCR foi realizada em termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA). Uma alíquota de 2,0 µL de DNA foi adicionada a 23 µL do mix para a PCR, o qual continha 17,05 µL de água Mili-Q ultrapura, 1,75 µL de tampão 10X, 0,75 µL MgCl₂ 50 mM, 2,0 µL de trifosfato de desoxirribonucleotídeos (dATP, dUTP, dGTP e dCTP), 0,625 µL de cada primer e 0,2 µL de Taq DNA polimerase 5U/mL. Em todos os ensaios foi utilizado um controle negativo, sem a amostra de DNA. Os amplicons da PCR foram visualizados em transiluminador, após eletroforese em gel de agarose a 2% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio.

ÉTICA

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria, sob o número 38850614.4.0000.5346, sendo parte integrante de um projeto

maior intitulado "Identificação e avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos e mecanismos de resistência de bactérias isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria".

RESULTADOS

Em relação ao perfil dos pacientes envolvidos no estudo, 31 (57,40%) eram do gênero masculino e 23 (42,60%) feminino, com idades que variaram entre 17 e 85 anos (média de 55 anos). Foram identificadas 48,15% (26/54) *S. epidermidis*, 24,07% (13/54) *S. haemolyticus*, 16,67% (9/54) *S. hominis*, 5,56% (3/54) *S. aureus*, 3,70% (2/54) *S. capitis* e 1,85 % (1/54) *S. intermedius*.

Todos os 54 isolados analisados amplificaram o gene 16S RNAr. Destes, em 32 (59,25%) foram detectadas a produção de biofilme por uma ou mais técnicas, dentre as quatro metodologias testadas no estudo.

Em relação aos testes fenotípicos, houve positividade em 57,41% (31/54) para o teste MTP, 24,07% (13/54) para o teste CRA e 11,11% (6/54) para o teste TM. Em relação ao teste MTP, classificou-se quantitativamente a produção de biofilme conforme literatura (Chirstensen 1985; Stepanovic 2007), como descrito na tabela III.

Tabela III. Resultados do teste fenotípico de produção de biofilme pela metodologia do Teste em Placa de Poliestireno (MTP)

Produção de biofilme		Teste em placa de Poliestireno (MTP)
Não- produtora	0 (-)	23 (42,59%)

Fraca	1 (+)	11 (20,37%)
Moderada	2 (++)	11 (20,37%)
Forte	3 (+++)	9 (16,67%)
Total		54 (100%)

Quanto à produção de biofilme pela técnica padrão ouro (MTP), 31 amostras positivaram (57,41%), sendo que *S. epidermidis* foi à espécie prevalente (18/31; 58,07%), seguida de *S. haemolyticus* (7/31; 22,59%), *S. hominis* (3/31; 9,68%) e *S. intermedius*, *S. capitis* e *S. aureus* que apresentaram apenas 3,22% cada (1/31).

Em relação à metodologia genotípica, os resultados demonstraram que em 16 isolados (29,62%) foram detectados um ou mais genes analisados para produção de biofilme, sendo que sete isolados apresentaram os genes *icaACD*, dois o gene *icaAD* e dois o gene *icaAC*. Três isolados expressaram somente o gene *icaA*, um somente o *icaC* e um somente o *icaD*. 38 amostras não expressaram os genes estudados. Segundo metodologia (Arciola 2001; Gad 2009; Satorres & Alcaráz 2007; Vogel 2000) da PCR, biofilme positivo precisa expressar os genes *icaACD* concomitante, ou então *icaAD* para um microrganismo ser considerado produtor de biofilme.

Neste estudo, apenas nove isolados expressaram os genes de acordo com o determinado para classificação como produtor de biofilme. Correlacionando os resultados positivos para produção do biofilme pela metodologia da PCR com os testes fenotípicos, em nosso estudo todas as amostras positivas na PCR foram positivas em alguma das metodologias fenotípicas testadas. Nove amostras positivaram na PCR e na metodologia da placa de poliestireno, seis no ágar congo e PCR e três amostras na metodologia do tubo de borossilicato e PCR, conforme demonstrado na tabela IV.

Tabela IV. Amostras produtoras de biofilme pela metodologia genotípica comparada aos testes fenotípicos realizados.

Microrganismo	Genotípico			Fenotípico		
	<i>icaA</i>	<i>icaC</i>	<i>icaD</i>	Placa	Tubo	Congo
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	+	+	++	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	+	+	+	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	+	+	+	-	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	+	+	+	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	+	+	++	+	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	-	+	+++	-	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	-	+	+++	+	+
<i>Staphylococcus intermedius</i>	+	+	+	++	-	+

Quanto ao perfil de sensibilidade, em relação às amostras que apresentaram produção de biofilme em alguma das quatro técnicas (32/54; 59,25%), 93,75% destas apresentaram resistência à oxacilina, 96,68% à eritromicina e 87,50% à clindamicina. Todas as amostras foram sensíveis à linezolida, tigeciclina e vancomicina. Conforme ilustrado na tabela V, comparando o índice de resistência das bactérias produtoras de biofilme ao daquelas não produtoras, percebem-se níveis maiores de resistência naquelas produtoras de biofilme.

Tabela V. Comparação do perfil de sensibilidade de isolados produtores de biofilme e não produtores frente às quatro metodologias testadas.

Antimicrobianos	Formador de Biofilme (n=32)			Não Formador de Biofilme (n=22)		
	S	I	R	S	I	R
BENZILPENLICILINA	3,13	-	96,88	3,13	-	96,88
OXACILINA	6,25	-	93,75	18,18	-	81,82
GENTAMICINA	46,88	9,38	43,75	40,91	4,55	54,55
CIPROFLOXACINA	6,25	3,13	90,63	27,27	4,55	68,18
MOXIFLOFLOXACINA	6,25	15,63	78,13	27,27	27,27	45,45
NORFLOXACINA	6,25	3,13	90,63	31,82	-	68,18
ERITROMICINA	3,13	-	96,88	18,18	-	81,82
CLINDAMICINA	12,50	-	87,50	18,18	-	81,82
LINEZOLIDA	100	-	-	100	-	-
TEICOPLAPLANINA	46,88	9,38	43,75	81,82	-	18,18
VANCOMICINA	100	-	-	100	-	-
TIGECICLINA	100	-	-	100	-	-
ÁCIDO FUSÍDICO	90,63	9,38	-	86,36	9,09	4,55

RIFAMPICINA	78,13	3,13	18,75	100	-	-
TRIMETROPINA/ SULFAMETOXAZOL	31,25	-	68,75	36,36	-	63,64

DISCUSSÃO

A facilidade dos estafilococos em formar biofilme acaba por facilitar a bactéria a resistir à resposta imune do hospedeiro, além de proteger o microrganismo dos agentes antimicrobianos comercialmente disponíveis (Oliveira & Cunha 2010). Em vista do grande número de infecções causadas por bactérias produtoras de biofilme, torna-se necessário um método confiável para o seu diagnóstico (Oliveira & Cunha 2010).

No presente estudo, das 54 amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de ICS da UTI adulto, 32 (59,25%) demonstraram produção de biofilme, detectada por uma ou mais das quatro técnicas empregadas.

Estudos relatam o método de aderência em placa de poliestireno (MTP) como padrão-ouro para detecção da produção de biofilme (Hassan 2011; Mathur 2006; Mirzaee 2014; Nasr 2012; Panda 2016). Esta técnica possui a vantagem de ser um teste quantitativo, o qual permite comparar a adesão de diferentes estirpes, além de ser um método sensível, preciso e de boa reprodutibilidade para a determinação da produção de biofilme em *Staphylococcus* spp. (Christensen 1985; Mathur 2006; Nasr 2012). Em vista disso, consideramos em nosso estudo o MTP como padrão ouro.

Através desse método encontramos 57,41% (31/54) de positividade para produção de biofilme, sendo 20,37% (11/31) fracamente, 20,37% (11/31) moderadamente e 16,67% (9/31) fortemente produtoras. Valor este que está de acordo com os relatados em outros estudos, como o realizado por Hassan et al., no ano de 2011, em um hospital no Paquistão, no qual os

pesquisadores identificaram, por meio desta metodologia, que 54,54% das amostras eram produtoras de biofilme. Marthur et al. (2006) ao avaliarem isolados clínicos de *Staphylococcus* spp. provenientes de sangue, dispositivos infectados e superfícies de pele de diferentes centros de cuidados terciários na Índia, no ano de 2006, encontraram que 57,8% dos isolados clínicos produtores de biofilme, pela mesma metodologia.

Na pesquisa realizada por Nasr et al., no ano de 2012, ao avaliarem em um Hospital Universitário do Egito, a produção de biofilme em 50 isolados de *Staphylococcus* spp. de hemoculturas e cateteres intravasculares, encontraram 46,0% de positividade na técnica MTP, valor este próximo ao encontrado por Panda et al., no ano de 2016, na Índia, (45,6%) em amostras de uropatógenos. Em estudo realizado por Pinheiro e colaboradores (2016), com 169 isolados de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, provenientes de bacteremias de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas de Botucatu, no ano de 2016, constataram 27,8% como produtores de biofilme.

Em relação à metodologia do tubo de borossilicato, em nosso estudo houve produção de biofilme em seis dos isolados (11,11%). Correlacionando com a metodologia padrão ouro, apresentou valores de sensibilidade e especificidade de 16% e 64% ($kappa = 0,49$). Estudos relatam valores maiores para produção de biofilme por esta técnica, como o de Hassan et al., realizado em 2011, no qual foi detectado 49% dos seus isolados como produtores de biofilme por esta técnica, Panda et al., em 2016, 39,3% dos isolados de uropatógenos e de Pinheiro et al. (2016), no qual 28,4% dos isolados foram produtores de biofilme por TM. Estes autores descrevem esta metodologia como facilmente aplicável, no entanto, por se tratar de uma metodologia qualitativa, podem ocorrer variações na interpretação dos resultados por diferentes observadores, tornando assim o método inadequado para avaliar a produção de biofilme (Hassan 2011; Mathur 2006).

Em nosso estudo, pela metodologia CRA, 13 isolados produziram biofilme (24,07%). Já nas pesquisas desenvolvidas por Nasr et al. (2012) e Zalipour et al. (2016) estes valores foram superiores aos nossos sendo de, respectivamente, 46% e 62,25%, dos isolados produziram biofilme por esta técnica. No entanto, Hassan et al. (2011), encontraram valores menores, sendo que dos 110 isolados clínicos estudados, apenas 10% produziram biofilme por este método, assim como Panda et al. (2016), que encontraram apenas 11% dos 300 isolados de uropatógenos produtores de biofilme por esta metodologia. Quando correlacionada com a técnica padrão ouro (MTP), dos 13 isolados de nosso estudo que positivaram no CRA, 12 destes produziram biofilme pela técnica MTP. No entanto, 19 dos isolados que apresentaram produção de biofilme pela técnica MTP não apresentaram pela técnica CRA. Relacionando esta técnica com o padrão ouro (MTP), obtivemos valores de Sensibilidade e Especificidade de 38% e 64%, respectivamente ($\kappa=0,59$). Outro estudo comparou esta correlação, onde analisou 50 isolados de *Staphylococcus* spp. e embora 46% dos isolados de estafilococos tenham sido positivos para ambos os métodos, eles se correlacionaram em apenas 20% dos isolados Nasr (2012). Uma menor correspondência foi demonstrada por Marthur et al. (2006), onde apenas 5,2% dos isolados estafilococos se correlacionaram por estas duas técnicas.

Sobre a metodologia do CRA, por ser um teste fácil, rápido, com boa reprodutibilidade, estudos sugerem que esta metodologia poderia servir como uma alternativa ao método da placa (Elkhatib 2014; Nourbakhsh & Namvar 2016). Nossos valores de sensibilidade e especificidade foram baixos, o que justifica os 19 isolados produtores de biofilme que pela técnica padrão ouro não foram detectados como produtores de biofilme pela CRA (Sensibilidade de 38%). Estes valores encontrados em nosso estudo, bem como os encontrados por outros estudos já citados (Mathur 2006; Nasr 2012), confirmam que o método do CRA não pode ser recomendado para detecção da produção de biofilme por estafilococos provenientes de isolados clínicos.

Em relação ao teste genotípico (PCR) utilizado para detecção dos genes do operon *ica*, em nossa pesquisa 16 dos isolados (29,62%) expressaram um ou mais dos genes pesquisados. No entanto, estudos relatam que para a produção de biofilme é necessário a expressão dos genes *icaACD* concomitante ou *icaAD* (Arciola 2001; Gag 2009; Satorres & Alcalr az 2007; Vogel 2000). Em nossa pesquisa, apenas sete isolados (12,95%) e dois isolados (3,70%) expressaram os genes *icaACD* e *icaAD*, respectivamente. Valores estes baixos quando comparados a outros estudos da literatura (Nasr 2012; Pinheiro 2016; Zalipour 2016; Oliveira & Cunha 2010). Oliveira & Cunha (2010), encontraram 42% e 12,95% para os genes *icaACD* e *icaAD*, respectivamente. No entanto, Cafiso et al. (2004), estudaram a presença dos genes em 40 isolados de *S. epidermidis*, e encontraram a presença dos genes *icaAD* concomitante em apenas quatro isolados (10%), sendo que os genes *icaACD* concomitante foram expressos em 35% dos isolados. Já Zalipour et al (2016), estudaram apenas os genes *icaAD*, encontrando em 72,18% dos isolados *Staphylococcus* spp. a expressão de ambos os genes, sendo 50 isolados *S. epidermidis* e 59 *S. aureus*. Pinheiro et al (2016)., detectaram que 46,7% dos 169 isolados de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* apresentavam os genes *icaAD* concomitante. Estes pesquisadores relataram também que 13,8% e 20,7% dos isolados expressaram somente os genes *icaA* e *icaD*, respectivamente (Pinheiro 2016). No entanto, em nossa pesquisa encontramos somente três isolados que expressaram apenas *icaA* e 1 isolado apenas *icaD*.

Dos isolados investigados em nosso estudo, sete foram classificados como fortemente aderentes pela metodologia MTP e não expressaram nenhum dos genes testados. Oliveira & Cunha (2010), encontraram em sua pesquisa um isolado *Staphylococcus* coagulase negativa que não expressou nenhum gene e foi classificado como fortemente aderente pela metodologia MTP. Fato este que pode ser explicado por estudos que relatam a presença de genes em *Staphylococcus* *ica*-negativos formadores de biofilme, os quais são independente de

PIA (Arciola 2015; Figueiredo 2017). Além disso, Qin et al. (2007) relatam que isolados biofilme positivos, os quais são *ica*-negativos, representam uma nova subpopulação emergente em cepas clínicas.

Em relação ao perfil de sensibilidade das amostras que produziram biofilme por alguma das técnicas estudadas, nossos isolados apresentaram valores altos de resistência frente à oxacilina, eritromicina e clindamicina (93,75%, 96,68% e 87,50%, respectivamente). No entanto, todos os isolados produtores de biofilme foram sensíveis a linezolida, tigeciclina e vancomicina. No que diz respeito às amostras não produtoras de biofilme, encontramos valores menores de resistência frente às principais antimicrobianos utilizados na clínica, oxacilina, eritromicina e clindamicina ambas apresentaram valores de 81,82% de resistência. Todos isolados não produtores de biofilme foram sensíveis frente à linezolida, tigeciclina e vancomicina. Estes valores mais altos de resistência dos isolados formadores de biofilme vão de acordo com o descrito na literatura, que relacionam o aumento da resistência à capacidade da formação de biofilme (Archer 2011; Cargill 2009; Croes 2009; Donlan 2002).

CONCLUSÃO

Dos *Staphylococcus* spp. avaliados neste estudo pela técnica do MTP, 57,41% produziram biofilme. Esta técnica apresentou um bom desempenho na detecção da produção do biofilme para esse tipo de microrganismo. O CRA e TM não apresentaram valores confiáveis para sugerir sua utilização na identificação da produção de biofilme. Em relação à metodologia genotípica, a capacidade da formação de biofilme na ausência dos genes *ica* ressalta a importância de estudos maiores para investigação da formação de biofilme em cepas *ica*-independente. No que diz respeito à resistência, observou-se que cepas produtoras de biofilme apresentam valores mais elevados de resistência em relação as não produtoras.

Araújo MRE. 2012 Hemocultura: recomendações de coleta, processamento e interpretação dos resultados. *J Infect Control* 1:08-19.

Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff NK. 2011. Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation and roles in human disease. *Virulence* doi: 10.4161/viru.2.5.17724

Arciola CR, Campoccia D, Ravaioli S, Montanaro L. 2015. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Cell. Infect. Microbiol.* 2015; doi: 10.3389/fcimb.2015.00007

Arciola CR, Gamberini S, Campoccia D, Visai L, Speziale P, Baldassarri L, Montanaro L. 2005. 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.* doi:10.1002/jbm.a.30445

Arciola CR, Baldassarri L, 2001. Montanaro L. Presença de *icaA* e *icaD* genes e produção de muco em uma coleção de estirpes de estafilococos de infecções associadas ao cateter. *J Clin Microbiol.* 39: 2151 – 2156.

BRASIL. 2013. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Microbiologia Clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde. Módulo III: Principais Síndromes Infecciosas. 1ª Ed. Brasília.

Cafiso V, Bertuccio T, Santagati M, Campanile F, Amicosante G, Perilli MG et al. 2004. Presence of the *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. *Clin Microbiol Infect* doi: 10.1111/j.1469-0691.2004.01024.x

Cargill JS, Upton M. 2009. Low concentrations of vancomycin stimulates biofilm formation in some clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Clinical Pathology* doi: 10.1136/jcp.2009.069021

Carvalho RHD, Vieira JF, Filho PPG, Ribas RM. 2010. Sepses, sepses graves e choque séptico : aspectos clínicos, epidemiológicos e prognóstico em pacientes de Unidade de Terapia Intensiva de um Hospital Universitário. *Rev Soc Bras Med Trop* 43: 591-593.

Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. 1982. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect. Immun.* 37: 318-326.

Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH. 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J. Clin. Microbiol.* 996-1006.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Sixth Informational Supplement, Document M100-S26. Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016.

Croes S, Deurenberg RH, Boumans ML, Beisser OS, Neef C, Stobberingh EE. 2009. *Staphylococcus aureus* biofilm formation at the physiologic glucose concentration depends on the *S. aureus* lineage. *BioMed Central Microbiology* doi: 10.1186/1471-2180-9-229

Donlan RM, Costerton JW. 2002. Biofilms, survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev* doi: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002

Elkhatib WF, Khairalla AS, Ashour HM. 2014. Evaluation of different microtiter plate-based methods for the quantitative assessment of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Future Microbiol.* doi: 10.2217/fmb.14.33

Fernandes AP, Silva CJ, Costa C, Scheriber AZ, Mello FA, Loyola ABAT. 2011. Incidência Bacteriana em Hemoculturas no Hospital das Clínicas Samuel Libânio de Pouso Alegre MG. *REAS.* 2: 122-133.

- Figueiredo AMS, Ferreira FA, Beltrame CO, Côrtes MF. 2017. The role of biofilms in persistent infections and factors involved in *ica*-independent biofilm development and gene regulation in *Staphylococcus aureus*. *Crit. Rev. Microbiol.* 43 (5): 602-620.
- Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. 1989. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J.Clin.Pathol.* 42: 872-874.
- Gad GFM, El-Feky MA, El-Rehewy MS, Hassan MA, Abolella H, El-Baky RMA. 2009. Detecção de *icaA*, *icaD* genes e produção de biofilme por *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* isolado a partir de pacientes do tracto urinário cateterizados. *J Infect Dev Ctries* doi: 10.3855/jidc.241
- Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, Iqbal M. 2011. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Braz. J. Infect. Dis.* doi: 10.1016/S1413-8670(11)70197-0
- Lima ME, Andrade D, Hass VJ. 2007. Avaliação da Prospectiva da Ocorrência de Infecção em Pacientes Críticos de Unidade de Terapia Intensiva. *Rev. Bras. Ter. Intensiva* 19: 342-7.
- Lina G, Quaglia A, Reverdy ME, Leclercq R, Vandenesch F, Etienne J. 1999. Distribution of genes encoding resistance to Macrolides, Lincosamides, and Streptogramins among Staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1062–1066.
- Liu H, Zhao Y, Zhao D, Gong T, Wu Y, Han H, Xu T, Peschel A, Han S, Qu D. 2015. Antibacterial and anti-biofilm activities of thiazolidione derivatives against clinical *Staphylococcus* strains. *Emerg. Microbes. Infect* doi:10.1038/emi.2015.1
- Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Fatma T, Rattan A. 2006. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian J. Med. Microbiol.* doi: 10.4103/0255-0857.19890

- Mirzaee M, Najar-Peerayeh S, Behmanesh M, Moghadam MF, Ghasemian AM. 2014. Detection of Intracellular Adhesion (*ica*) Gene and Biofilm Formation *Staphylococcus aureus* Isolates from Clinical Blood Cultures. *J. Med. Bacteriol.* 3: 1-7.
- Moosavian M, Shoja S, Rostami S, Torabipour M, Farshadzadeh Z. 2014. Inducible clindamycin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* due to *erm* genes, Iran. *J. Microbiol.* 6: 421-427.
- Nasr RA, AbuShady HM, Hussein HS. 2012. Biofilm formation and presence of *icaAD* gene in clinical isolates of staphylococci. *Egypt. J. Med. Hum. Genet.* doi: /10.1016/j.ejmhg.2012.04.007
- Nourbakhsh F, Namvar AE. 2016. Detection of genes involved in biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates. *GMS Hyg. Infect. Control.* 11: 1-5.
- Oliveira A, Cunha MLRS. 2010. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. *BioMed Central Research Notes.* doi:10.1186/1756-0500-3-260
- Oliveira AC, Paula AO, Iquiapaza RA, Lacerda ACS. 2012. Infecções relacionadas à assistência em saúde e gravidade clínica em uma unidade de terapia intensiva. *Rev Gaúcha Enferm.* 33: 89-96.
- Otto, M. 2013 Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annual Review of Medicine.* doi: 10.1146/annurev-med-042711-140023
- Panda PS, Chaudhary U, Dube SK. 2016. Comparison of four different methods for detection of biofilm formation by uropathogens. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 2016 doi:10.4103/0377-4929.182013.

Pinheiro L, Brito CI, De Oliveira A, Pereira VC, Da Cunha MLRS. 2016 *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*. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2016.06.006

Qin Z, Yang X, Yang L, Jiang J, Ou Y, Molin S, *et al.* 2007. Formação e propriedades de biofilmes in vitro de isolados clínicos de *Staphylococcus epidermidis* ica-negativos. *J Med Microbiol*. 56:83 – 93.

Satorres SE, Alcaráz LE. 2007. Prevalência de *icaA* e *icaD* genes em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, isoladas de pacientes e o pessoal hospitalar. *Cent Eur J Public Health*. 15 :87 – 90.

Stepanović S, Vuković, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukić, S., Cirković, I., Ruzicka, F. 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* DOI: 10.1111 / j.1600-0463.2007.apm_630.x

Vogel L, Sloos JH, Spaargaren J, Suiker I, Dijkshoorn L. 2000. Produção de biofilme por isolados de *Staphylococcus epidermidis* associados à bacteriemia relacionada ao cateter. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 36: 139 – 141.

Wells CL, Henry-Stanley MJ, Barnes AM, Dunny GM, Hess DJ. 2011. Relation between antibiotic susceptibility and ultrastructure of *Staphylococcus aureus* biofilms on surgical suture. *Surg. Infect*. doi: 10.1089/sur.2010.104

Zalipour M, Ebrahim-Saraie HS, Sarvari J, Khashei R. 2016. Detection of biofilm production capability and *icaA/D* genes among staphylococci isolates from Shiraz, Iran. *Jund J Microbiol*. doi:10.5812/jjm.41431 .

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados nesta dissertação pode-se concluir que:

- Em 59,25% (32) dos isolados detectou-se a produção de biofilme por uma ou mais das quatro metodologias testadas.
- Em 57,41% (31) dos isolados de *Staphylococcus* spp. houve produção de biofilme pela metodologia considerada padrão ouro neste estudo (Método de aderência em placa de poliestireno).
- Em 24,07% (13) dos isolados de *Staphylococcus* spp. houve produção de biofilme pela metodologia do Ágar Vermelho Congo, enquanto na metodologia do Tubo de Borossilicato apenas 11,11% (6) dos isolados de *Staphylococcus* spp. produziram biofilme. Estes valores encontrados nesta pesquisa não são confiáveis para sugerir sua utilização na identificação da produção de biofilme.
- Nove isolados apresentaram produção de biofilme pela metodologia genotípica, sendo que dois isolados apresentaram os genes *icaAD* e sete os genes *icaACD*. A formação de biofilme dos isolados por mecanismo *ica*-independente salienta a importância de novos estudos para avaliação de mecanismos de produção de biofilme *ica*-independentes.
- Em relação ao perfil de sensibilidade dos isolados, nesta pesquisa os produtores de biofilme foram mais resistentes aos antimicrobianos do que os não produtores.

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, M. et al. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. **Archives of Microbiology**, Alemanha, v.196, n.7, p.453–472, 2014. Disponível em:< <http://link.springer.com/article/10.1007/s00203-014-0983-1>> Acesso em: 15 ago. 2017 DOI: 10.1007/s00203-014-0983-1
- ARAÚJO, M. R. E. D. Hemocultura: recomendações de coleta, processamento e interpretação dos resultados. **American Journal of Infection Control**, Nova York, v. 1, n.1,p.08-19,2012.Disponível em: <http://www.iqg.com.br/pbsp/img_up/01355393320.pdf> Acesso em: 10 ago. 2017 .
- ARCHER, N. K. et al. Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation and roles in human disease. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 445-459, 2011. Disponível em: < <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/viru.2.5.17724>> Acesso em: 10 ago. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.4161/viru.2.5.17724>
- BONVENTO, M. Vascular access and catheter associated blood-stream infections. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 19, n. 2, p. 227-230, 2007. Disponível em:< <http://www.rbti.org.br/artigo/detalhes/0103507X-19-2-15>> Acesso em: 12 ago. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-507X2007000200015>
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Microbiologia Clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde. **Módulo III: Principais Síndromes Infeciosas**. 1ª Ed. Brasília, 2013. Disponível em: < <http://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/principais-sindromes-infeciosas>> Acesso em: 15 ago. 2017.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Critérios diagnósticos de infecções relacionadas à Assistência à Saúde, Brasília, Distrito Federal: ANVISA; 2013. Disponível em: < <http://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/images/documentos/livros/Livro2-CriteriosDiagnosticosIRASaude.pdf>> Acessado em: 20 ago. 2017.
- CARVALHO, R. H. D. et al. Sepsis, sepsis grave e choque séptico : aspectos clínicos, epidemiológicos e prognóstico em pacientes de Unidade de Terapia Intensiva de um Hospital Universitário. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.43, n.5, p.591-3, 2010. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v43n5/v43n5a25.pdf> > Acesso em: 21 ago. 2017. DOI: 10.1590/S0037-86822010000500025
- CARGILL, J.S, UPTON, M. Low concentrations of vancomycin stimulates biofilm formation in some clinical isolates of Staphylococcus epidermidis. **Journal of Clinical Pathology**, v.62, p. 1112-1116, 2009. Disponível em:< <http://jcp.bmj.com/content/62/12/1112.short>> Acesso em: 11 ago. 2017. DOI: 10.1136/jcp.2009.069021

CHRISTENSEN, G. D. et al. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. **Infection and Immunity**, v. 37, n. 1, p. 318-326, Julho 1982. Disponível em: < <http://iai.asm.org/content/37/1/318.full.pdf+html> > Acesso em: 17 ago. 2017. DOI: 0019-9567/82/070318-09\$02.00/0

CROES, S et al. *Staphylococcus aureus* biofilm formation at the physiologic glucose concentration depends on the *S. aureus* lineage. **BioMed Central Microbiology**, Inglaterra, v.9, p.1-9, 2009. Disponível em:< <http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-9-229>> Acesso em: 11 ago. 2017. DOI:10.1186/1471-2180-9-229

DONLAN, R M., COSTERTON, J.W. Biofilms, survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, n.2, p.167-193, 2002. Disponível em:< <http://cmr.asm.org/content/15/2/167.short>> Acesso em: 11 ago. 2017. DOI: 10,1128 / CMR.15.2.167-193.2002

FERNANDES, A. P. et al. Incidência Bacteriana em Hemoculturas no Hospital das Clínicas Samuel Libânio de Pouso Alegre MG. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**. v. 2, p. 122-133. 2011. Disponível em: < http://acervosaud.dominiotemporario.com/doc/artigo_013.pdf> Acesso em: 29 ago. 2017.

FOULSTON, L. et al. The extracellular matrix of *Staphylococcus aureus* biofilms comprises cytoplasmic proteins that associate with the cell surface in response to decreasing pH. **American Society for Microbiology**, Colombia, v. 5, n. 5, p. 1-9, Sep.- Oct. 2014. Disponível em: <<http://mbio.asm.org/content/5/5/e01667-14.short>> Acesso em: 11 ago. 2017. DOI: 10,1128 / mBio.01667-14

FRANCO, J. M. P. L. et al. Resistência bacteriana e o papel do farmacêutico frente ao uso irracional de antimicrobianos: revisão integrativa. **Revista e-ciência**, Ceará, v. 3, n. 2, p. 5765, 2015. Disponível em: < http://www.fjn.edu.br/revista/index.php/eciencia/article/view/64/pdf_13> Acesso em: 1 ago. 2017.. DOI: 10.19095/rec.v3i2.64.

GORDON, R. J.; LOWY, F. D. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **Clinical Infectious Diseases**, Estados Unidos, v.46, n.5, p.350-359, 2008. Disponível em:<http://cid.oxfordjournals.org/content/46/Supplement_5/S350.full> Acesso em: 22 ago. 2017. DOI: 10.1086/533591

GUIMARAES, A. C. et al . Óbitos associados à infecção hospitalar, ocorridos em um hospital geral de Sumaré-SP, Brasil. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Brasília , v. 64, n. 5, p. 864-869, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-71672011000500010&lng=en&nrm=iso>. Acessado em: 24 ago. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-71672011000500010>.

HOIBY, N. et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Lyngby, v. 35, p. 322-332, 2010. Disponível em:<

[http://www.ijaaonline.com/article/S0924-8579\(10\)00009-9/abstract](http://www.ijaaonline.com/article/S0924-8579(10)00009-9/abstract)> Acesso em: 15 ago. 2017. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011

JARVIS WR. The epidemiology of colonization. **Infection Control Hospital Epidemiology**, v.17, p,47-52, 1996. Disponível em:<
<http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=9331599&fileId=S019594170000610X>> Acesso em: 5 ago. 2017. DOI: 10.2307/30142366

MACK, D. et al. Biofilm formation in medical device-related infection. **International Journal of Artificial Organs**. v. 29, n. 4, p. 343-359, 2006. Disponível em:<
<http://europepmc.org/abstract/med/16705603>> Acesso em: 17 ago. 2017.

MARQUES, P. B., CARNEIRO, F. M. C., FERREIRA, A. P. Perfil bacteriano de cultura de ponta de cateter venoso central. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 2, n. 1, p. 53-58, 2011. Disponível em:< http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232011000100006> Acesso em:17 ago. 2017.. DOI: <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232011000100006>

MUNSON, E. L. et al. Detection and treatment of bloodstream infection: laboratory reporting and antimicrobial management. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, n. 1, p. 495-497. 2003. Disponível em:<<http://jcm.asm.org/content/41/1/495.short>> Acesso em: 23 ago. 2017. DOI:10.1128/JCM.41.1.495-497.2003

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael. A. **Microbiologia médica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

O'GRADY, N.P. et al., Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. **Clinical Infectious Diseases**. v. 35, n. 11, p. 1281-1307, 2002. Disponível em:<<http://cid.oxfordjournals.org/content/35/11/1281.full>> Acesso em: 27 ago. 2017. DOI: doi: 10.1086/344188

O'GARA, J.P. Ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. **Federation of European Microbiological Societies**, Inglaterra, v.270, n.2, p.179-188, 2007. Disponível em:<
<http://femsle.oxfordjournals.org/content/270/2/179.full.pdf>> Acesso em: 14 ago. 2017. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00688.x

OLIVEIRA, A., CUNHA, M. L. R. S. Comparision of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. **BioMed Central Research Notes**. v.3, p. 260. 2010. Disponível em:< <http://bmresnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-3-260>> Acesso em: 18 ago. 2017. DOI: 10.1186/1756-0500-3-260

OLIVEIRA, A.C. et al. Infecções relacionadas à assistência em saúde e gravidade clínica em uma unidade de terapia intensiva. **Revista Gaúcha Enfermagem**, Porto Alegre, v.3, n.33, p. 89-96, 2012. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rgenf/v33n3/12.pdf>> Acesso em: DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1983-14472012000300012>

OLIVEIRA, T. F. L. de et al. Fatores associados à pneumonia nosocomial em indivíduos hospitalizados. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 57, n. 6, p. 630-636, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302011000600008&lng=en&nrm=iso>. Acessado em: 20 ago. 2017. DOI: 10.1590/S0104-42302011000600008.

OTTO, M. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. **Annual Review of Medicine**, Estados Unidos, v.64, p.175-188, 2013. Disponível em:< <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-med-042711-140023>> Acesso em: 11 ago. 2017. DOI: 10,1146 / annurev-med-042.711-140.023

PALMER, J.; FLINT, S.; BROOKS, J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. **Journal of Microbiology & Biotecnologia Industrial** , Inglaterra, v.34, n.9, p.577–588, 2007. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007/s10295-007-0234-4> Acesso em: 11 ago. 2017. DOI: 10,1007 / s10295-007-0234-4

PEREIRA, F. G. F. et al. Caracterização das infecções relacionadas à assistência à saúde em uma Unidade de Terapia Intensiva. **Revista Visa em Debate**, v. 4, n. 1, p. 70-77, 2016. Disponível em:< <https://visaemdebate.incqs.fiocruz.br/index.php/visaemdebate/article/view/614>> Acesso em: 14 ago. 2017. DOI: 10.3395/2317-269x.00614

PERIASAMY, S et al. Phenolsoluble modulins in staphylococci: What are they originally for? **Journal Communicative & Integrative Biology**, Estados Unidos, v.5, n.3, p.275-277, 2012. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/cib.19420?scroll=top&needAccess=true>> Acesso em: 11 ago. 2017. DOI: 10.4161/cib.19420

ROSADO, V., ROMANELLI, R. M. C, CAMARGOS, P. A. M. Risk factors and preventive measures for catheter-related bloodstream infections. **Jornal de Pediatria**, v.87, n.6, p.469-477, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0021-75572011000600003&lng=en&nrm=iso&tlng=en> Acesso em: 12 ago. 2017. DOI: 10.2223/JPED.2134

SANTOS, M. Q.; Avaliação do espectro de resistência da Escherichia coli em cidade do interior da bahia. 2016. 5f. TCC (Graduação) – Curso de Medicina, Departamento de Microbiologia, Centro Universitário Serra dos Órgãos, 2016. Disponível em:< <http://revistasunifeso.filoinfo.net/index.php/jornadaunifeso/article/view/60/61>> Acesso em: 15 ago. 2017.

SCHOENFELDER, S.M. et al, Success through diversity – How Staphylococcus epidermidis establishes as a nosocomial pathogen. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 6, p. 380-386, 2010. Disponível em:< <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S143842211000038X>> Acesso em: 18 ago. 2017. DOI: 10.1016/j.ijmm.2010.04.011

SPEZIALE, P. et al. Protein-based biofilm matrices in Staphylococci. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, p. 1-10, Dec. 2014.

SPICER, J.W. **Bacteriologia, micologia e parasitologia clínica**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 540p.

SREY, S.; JAHID, I.K.; HA, S.D. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. **Food Control**, Inglaterra, v.31, p.572-585, 2013. Disponível em:<
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713512006536>> Acesso em: 11 ago. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.001>

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiology: an introduction**. 9. ed. San Francisco: Pearson Benjamim Cummings, 2007.

ZIMERMAN, R.A. Uso indiscriminado de antimicrobianos e resistência microbiana. **Uso Racional de Medicamentos: temas selecionados**. Brasília, p. 21-30, Ministério da Saúde, 2012. Disponível em: <
http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/uso_racional_medicamentos_temas_selecionados.pdf> Acesso em: 13 ago. 2017.

ANEXOS**ANEXO A – CARTA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA
DE PÓS-GRADUAÇÃO E

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE AOS ANTIBACTERIANOS E DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS ISOLADAS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA

Pesquisador: Rosmari Horner

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 38850614.4.0000.5346

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 928.497

Data da Relatoria: 12/01/2015

Apresentação do Projeto:

As infecções hospitalares constituem uma importante causa de aumento da morbidade e mortalidade dos pacientes e contribui diretamente na elevação dos custos assistenciais. Nas últimas décadas, o grande problema têm sido os surtos de infecções hospitalares provocados por microrganismos multirresistentes (MDR) como por exemplo, *Staphylococcus aureus* resistente à metilina e *Staphylococcus Coagulase Negativa* (SCoN), família Enterobacteriaceae, principalmente as produtoras de carbapenemases tipo KPC, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.

O Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), um hospital terciário, centro de referência em diagnóstico e tratamento na região central do Rio Grande do Sul que recebe pacientes de mais de 30 municípios representa um nosocômio onde este tipo de microrganismo tem probabilidade frequente de isolamento. Torna-se evidente a crescente importância destas bactérias como agentes etiológicos de infecções hospitalares, especialmente pela escassez de esquemas terapêuticos efetivos e pela presença desses microrganismos potencialmente causadores de infecções. Assim, devido à importância no ambiente hospitalar e sua grande capacidade de disseminação, o objetivo deste projeto será efetuar a identificação e avaliação do perfil de sensibilidade frente os antimicrobianos e dos mecanismos de resistência bem como o perfil

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar

Bairro: Camobi

CEP: 97.105-970

UF: RS

Município: SANTA MARIA

Telefone: (55)3220-9362

E-mail: cep.ufsm@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



Continuação do Parecer: 928.497

epidemiológico das bactérias isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria, com a finalidade de contribuir de forma significativa na escolha do tratamento empírico a ser administrado a cada paciente.

Objetivo da Pesquisa:

Efetuar a identificação e avaliação do perfil de sensibilidade frente os antimicrobianos e dos mecanismos de resistência bem como o perfil epidemiológico das bactérias isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Descritos de maneira adequada.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Cronograma: aquele apresentado no projeto não é detalhado;

Orçamento: cfme apresentado no projeto, o custo do Material de Consumo é de cerca de R\$ 34 mil, que seria obtido com a submissão do projeto a editais públicos internos e externos.

Termo de Confidencialidade: Ok;

Autorização Institucional: foi apresentada autorização da GEPE;

Registro no GAP: Ok;

Folha de Rosto: Ok;

Registro na GEPE: foi apresentada;

TCLE: foi solicitado, formalmente a dispensa, o que é adequado ao tipo de projeto.

Recomendações:

Veja no site do CEP - <http://w3.ufsm.br/nucleodecomites/index.php/cep> - na aba "orientações gerais", modelos e orientações para apresentação dos documentos. Acompanhe as orientações disponíveis, evite pendências e agilize a tramitação do seu projeto.

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar

Bairro: Camobi

CEP: 97.105-970

UF: RS

Município: SANTA MARIA

Telefone: (55)3220-9362

E-mail: cep.ufsm@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



Continuação do Parecer: 928.497

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Como a amostra é de material biológico, optou-se pela aprovação do projeto, mesmo que a mesma não tenha sido justificada.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SANTA MARIA, 05 de Janeiro de 2015

Assinado por:
CLAUDEMIR DE QUADROS
(Coordenador)

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar

Bairro: Camobi

CEP: 97.105-970

UF: RS

Município: SANTA MARIA

Telefone: (55)3220-9362

E-mail: cep.ufsm@gmail.com

ANEXO B – SUBMISSÃO DO MANUSCRITO

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz



EVALUATION OF FOUR DIFFERENT METHODS IN BIOFILM PRODUCTION IN *Staphylococcus* spp. ISOLATED FROM BLOOD CULTURE OF ADULT INTENSIVE THERAPY UNIT

Journal:	<i>Memórias do Instituto Oswaldo Cruz</i>
Manuscript ID:	MIOC-2017-0367
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	11-Sep-2017
Complete List of Authors:	Carvalho, Fernanda; Universidade Federal de Santa Maria, Análises Clínicas e Toxicológicas Rodrigues, Mônica; Universidade Federal de Santa Maria, Análises Clínicas e Toxicológicas Da Rosa, Tacieli; Universidade Federal de Santa Maria, Análises Clínicas e Toxicológicas Dos Santos, Lais ; Universidade Federal de Santa Maria, Análises Clínicas e Toxicológicas Serafin, Marissa; Universidade Federal de Santa Maria, Análises Clínicas e Toxicológicas Bottega, Angelita; Universidade Federal de Santa Maria, Análises Clínicas e Toxicológicas Horner, Rosmari; Universidade Federal de Santa Maria, Análises Clínicas e Toxicológicas
Keyword:	Antibacterial, Bacteremia, Biofilm, Blood Culture, Staphylococcus, Intensive Care Unit
Theme:	Microbiology

SCHOLARONE[™]
Manuscripts