

**DETERMINAÇÃO DE PERFIL CLONAL, RESISTÊNCIA E VIRULÊNCIA DE**  
***Staphylococcus saprophyticus* ISOLADO DE PACIENTES COM INFECÇÃO**  
**URINÁRIA**

**Katheryne Benini Martins Duarte**

Tese apresentada ao Instituto de  
Biociências, *campus* de Botucatu,  
UNESP, no Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Geral e Aplicada, área de  
concentração Biologia de Parasitas e  
Microrganismos (BPM).

*Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha*

**BOTUCATU – SP**  
**2017**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**DETERMINAÇÃO DE PERFIL CLONAL, RESISTÊNCIA E VIRULÊNCIA  
DE *Staphylococcus saprophyticus* ISOLADO DE PACIENTES COM  
INFECÇÃO URINÁRIA**

**KATHERYNE BENINI MARTINS DUARTE**

**MARIA DE LOURDES RIBEIRO DE SOUZA DA CUNHA**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, *campus* de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre (ou Doutor) no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, área de concentração Biologia de Parasitas e Microrganismos (BPM).

*Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha*

**BOTUCATU – SP  
2017**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Duarte, Katheryne Benini Martins.

Determinação do perfil clonal, resistência e virulência de *Staphylococcus saprophyticus* isolados de pacientes com infecção urinária / Katheryne Benini Martins Duarte. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu  
Orientador: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha  
Capes: 20100000

1. Infecções urinárias. 2. Infecções estafilocócicas. 3. *Staphylococcus saprophyticus*. 4. Fatores de virulência. 5. Epidemiologia. 6. Resistência microbiana a medicamentos.

Palavras-chave: Infecção do trato urinário; *Staphylococcus saprophyticus*; epidemiologia; fatores de virulência; resistência antimicrobiana.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por toda ajuda e por ser minha fortaleza em tempos difíceis, por direcionar e conduzir meus caminhos. Sem o Senhor eu jamais teria chegado até aqui. Que esse trabalho seja para a honra e glória do seu nome.

*Soli Deo Gloria!*

À minha orientadora Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha, por investir em mim, pela orientação e todo conhecimento passado.

Aos meus amigos de laboratório, em especial Mariana Fávero Bonesso, Danilo Flavio Moraes Riboli, Lúcia Maria Abraão, Luiza Pinheiro, Eliane Pereira Franche, pela amizade, ensinamentos e colaboração com o meu trabalho.

Aos funcionários e professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia.

Ao Adriano Martison Ferreira, pela colaboração com meu trabalho durante o período de coleta de amostras no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina.

Aos meus irmãos e irmãs em Cristo da Igreja Presbiteriana do Jardim Paraíso e da Igreja Presbiteriana do Guarapó, pela amizade, carinho e orações pela minha vida.

## **DEDICATÓRIA**

Para minha mãe Kelly Benini Martins, meu querido avô Arlindo Benini, minha avó Edith Benini (*in memoriam*), minha irmã Keyth Karolyne Benini Martins e meu tio Kleyson Benini, pessoas fundamentais na minha vida, por todo amor e apoio incondicional que sempre me deram.

**Obrigada por tudo. Amo vocês!**

Para meu querido marido e companheiro Marcio Duarte, por toda a compreensão, ajuda, carinho e amor, por me incentivar a superar meus limites e por sempre me lembrar que o mais importante é olhar pra frente.

**Obrigada por tudo. Amo você!**

## SUMÁRIO

### Resumo

<b>1 Introdução geral.....</b>	<b>8</b>
<b>2 Justificativa.....</b>	<b>23</b>
<b>3 Objetivo geral.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1 Objetivos específicos.....</b>	<b>24</b>
<b>4 Referências bibliográficas.....</b>	<b>25</b>

<b>5 Resultados.....</b>	<b>33</b>
--------------------------	-----------

<b>5.1 Artigo I.....</b>	<b>33</b>
--------------------------	-----------

### Resumo

<b>Introdução.....</b>	<b>34</b>
------------------------	-----------

<b>Materiais e métodos.....</b>	<b>35</b>
---------------------------------	-----------

<b>Resultados.....</b>	<b>38</b>
------------------------	-----------

<b>Discussão.....</b>	<b>42</b>
-----------------------	-----------

<b>Referências.....</b>	<b>45</b>
-------------------------	-----------

<b>5.2 ARTIGO II.....</b>	<b>48</b>
---------------------------	-----------

### Resumo

<b>Introdução.....</b>	<b>49</b>
------------------------	-----------

<b>Materiais e métodos.....</b>	<b>51</b>
---------------------------------	-----------

<b>Resultados.....</b>	<b>57</b>
------------------------	-----------

<b>Discussão.....</b>	<b>70</b>
-----------------------	-----------

<b>Referências.....</b>	<b>78</b>
-------------------------	-----------

<b>5.3 ARTIGO III.....</b>	<b>88</b>
----------------------------	-----------

### Resumo

<b>Introdução.....</b>	<b>89</b>
------------------------	-----------

<b>Materiais e métodos.....</b>	<b>89</b>
---------------------------------	-----------

<b>Resultados.....</b>	<b>95</b>
<b>Discussão.....</b>	<b>102</b>
<b>Referências.....</b>	<b>104</b>
<b>5.4 ARTIGO IV.....</b>	<b>109</b>
<b>Resumo</b>	
<b>Introdução.....</b>	<b>110</b>
<b>Materiais e métodos.....</b>	<b>111</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>117</b>
<b>Discussão.....</b>	<b>124</b>
<b>Referências.....</b>	<b>129</b>
<b>Conclusões.....</b>	<b>132</b>

## Resumo

As infecções do trato urinário (ITU) estão entre as doenças infecciosas mais comuns na prática clínica, e *Staphylococcus saprophyticus* se destaca como o segundo agente etiológico mais isolado nessas infecções. Esse estudo objetiva caracterizar o perfil clonal, os fatores de virulência e o perfil de resistência aos antimicrobianos em isolados planctônicos e em biofilme de *S. saprophyticus* isolado de amostras de urina de pacientes com infecção do trato urinário, além de comparar a identificação de espécies de ECN obtida no Vitek 2 e no Maldi-TOF MS com a identificação genotípica. Foram utilizadas no estudo amostras de *S. saprophyticus* isoladas da urina de diferentes pacientes. As amostras utilizadas no estudo foram obtidas em estudo prospectivo conforme isolamento no Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HC-FMB) nos anos de 2013 e 2014, e comparadas com um banco de amostras previamente coletadas em 2008. As amostras foram coletadas de paciente procedentes de enfermarias, ambulatórios, pronto-socorro e unidades básicas de saúde de Botucatu e região. Foram estudadas 217 amostras de ECN de pacientes com ITU. A concordância do sistema automatizado Vitek 2 com o ITS-PCR foi de 84,8%, com sensibilidade e especificidade de 98% e 100%, respectivamente. Maldi-TOF MS identificou corretamente todas as amostras de ECN. Os resultados obtidos através da análise de PFGE permitiram identificar 41 perfis distintos, entre os quais foram encontrados 11 clones entre as 169 amostras de *S. saprophyticus*. Várias amostras altamente relacionadas foram encontradas entre os isolados nos anos de 2008, 2013 e 2014. Além disso, sete clones estiveram dispersos em diferentes cidades. Das 169 amostras, 166 (98,2%) foram resistentes a oxacilina, 30 (17,7%) amostras foram resistentes a trimetoprim/sulfametoxazol, duas amostras (1,2%) apresentaram resistência intermediária a norfloxacin e todas as amostras foram sensíveis a

vancomicina e ciprofloxacina. O gene *mecA* foi encontrado em cinco amostras de *S. saprophyticus*, e quatro dessas amostras tiveram o SCC*mec* identificado e classificado como SCC*mec* tipo IV. Os genes *uafA* e *aas* que codificam proteínas de adesão foram encontrados em todas as amostras, enquanto o gene *UafB* foi encontrado em 1,2% e o gene *sdrI* em 8,9% das amostras. Quanto aos genes do operon *icaA*DBC, em 59 amostras (34,9%) foi encontrado o operon *ica* completo e a produção de biofilme em 119 (70,4%) isolados. A produção de EEs não ocorreu em nenhuma das 113 amostras de *S. saprophyticus* portadoras de genes para enterotoxinas. Os isolados em sua forma planctônica foram sensíveis à maioria dos agentes antimicrobianos. Já as amostras em biofilme apresentaram considerável aumento da CIM quando comparadas com as planctônicas, com algumas amostras passando da categoria de sensíveis na condição de planctônicas para resistentes quando em biofilme.

**Palavras chave:** ITU, *S. saprophyticus*, epidemiologia, fatores de virulência, resistência antimicrobiana.

## **1 Introdução Geral**

A infecção do trato urinário (ITU) é caracterizada pela presença de microrganismos no trato urinário e pode ocorrer em várias estruturas do sistema urinário, como bexiga urinária, rins, ureteres e uretra (Camargo et al., 2001). Além do sistema urinário, a ITU pode também acometer estruturas adjacentes como próstata e epidídimo, podendo ocorrer um agravamento no estado do paciente, dependendo do seu estado clínico e idade (Kunin, 1997).

As ITU são as infecções mais comuns na prática clínica e a segunda infecção mais comum observada na população em geral depois das infecções do trato respiratório (Valiquette, 2001). Acometem homens e mulheres em qualquer idade, entretanto, devido

a anatomia feminina, como uretra mais curta e sua maior proximidade com vagina e ânus, as ITU são especialmente problemáticas para elas, e até um terço de todas as mulheres vão experimentar uma em algum momento durante suas vidas (Hooton, 2000; Valiquette, 2001).

A ITU pode comprometer somente o trato urinário inferior, o que especifica o diagnóstico de cistite, ou afetar simultaneamente o trato urinário inferior e o superior, o que é denominado pielonefrite (Turner et al., 2015).

As ITU podem ainda ser classificadas em não complicadas e complicadas. As ITU não complicadas descrevem a infecção de um trato urinário estrutural e fisiologicamente normal, enquanto ITU complicadas ocorrem na presença de uma anormalidade do trato urinário e/ou disfunção que predispõe a infecção persistente ou recorrente. As infecções podem ocorrer em pacientes com cateter urinário ou anormalidades funcionais ou anatômicas do trato urinário. Anormalidades incluem uropatia obstrutiva, disfunção da bexiga neurogênica, litíase urinária, transplante renal e disfunção renal (Ishihara et al., 2001; Turner et al., 2015).

Os agentes etiológicos das ITU variam na dependência do local onde foi adquirida a infecção, se na comunidade ou no ambiente hospitalar. Os agentes etiológicos mais frequentemente envolvidos com ITU adquirida na comunidade são, do mais frequente para o menos frequente: *Escherichia coli*, *S. saprophyticus*, *Proteus mirabilis* e *Klebsiella* spp. (Barnett e Stephens, 1997; Alós, 2005). Contudo, quando a ITU é adquirida no ambiente hospitalar, os agentes etiológicos são diversificados, predominando as enterobactérias, com redução na frequência de *E. coli* e um crescimento de *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Enterococcus faecalis* e de fungos, com destaque para espécies do gênero *Candida* (Hooton e Satmm, 1997; Barnett e Stephens, 1997).

*S. saprophyticus* é uma espécie do grupo de estafilococos coagulase-negativa (ECN), e, pelo fato desses microrganismos fazerem parte da microbiota da pele e da mucosa urogenital, o seu isolamento era considerado contaminação, até que Pereira, em 1962, descreveu a presença de ECN resistente a novobiocina na urina de pacientes com ITU. Em 1968, Mitchell isolou esse ECN de pacientes mulheres com ITU e o identificou como *Micrococcus* do subgrupo 3 (Mitchell, 1968). Esses organismos foram posteriormente reclassificados e renomeados *S. saprophyticus* em 1974 (Ishihara et al., 2000). Desde o final da década de 1970, *S. saprophyticus* foi reconhecido como um dos mais importantes patógenos que causam com mais frequência ITU não complicada, principalmente em mulheres jovens, sendo responsável por 7% a 30% dessas infecções (Meers et al., 1975; Latham et al., 1983).

*S. saprophyticus* é o segundo mais frequente agente de ITU (*E. coli* é o primeiro), sendo principalmente isolado de urina de mulheres jovens sexualmente ativas (Golledge, 1998; Lee et al., 1987). Apesar de ser isolado mais frequentemente na forma de cistite aguda não complicada (Nicolle, 2008), pode causar pielonefrite e sepse (Golledge, 1998; Lee et al., 1987), além de infecções em homens como uretrite, prostatite e nefrolitíase (Raz et al., 2005).

Além de *S. saprophyticus*, outras espécies de ECN também são encontradas em ITU, tais como: *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. sciuri*, *S. capitis*, *S. xylosus*, *S. warneri*, *S. cohnii*, *S. lentus* e *S. hominis* (Alcarás et al., 2003). No laboratório de rotina, *S. saprophyticus* geralmente é identificado com base nos testes de resistência a novobiocina (5µg), ausência de hemólise e testes de coagulase ou DNase negativos. Ocorre, no entanto, que outras espécies de ECN também são resistentes a novobiocina como *S. cohnii*, *S. sciuri*, *S. xylosus* e *S. hominis* (Konemann et al., 2001). Atualmente, vários sistemas comerciais para identificação de *Staphylococcus* têm sido desenvolvidos

como métodos alternativos à identificação clássica que são mais trabalhosos e demorados para o uso em laboratório de rotina (Ferreira et al., 2012). Métodos automatizados, como o sistema automatizado Vitek 2 e *kits* comerciais, são utilizados tanto na rotina quanto na pesquisa. Entretanto esses métodos ainda não são capazes de identificar todas as espécies de ECN, devido às variações na expressão das características fenotípicas (Couto et al., 2001).

Mais recentemente, a técnica de ionização por dessorção a *laser* assistida por matriz, cuja sigla em inglês é Maldi (*matrix assisted laser desorption ionization*), seguido pela detecção em um analisador do tipo tempo de voo, sigla TOF (do inglês *time of flight*) (Maldi-TOF MS), tem sido utilizado em muitos laboratórios para identificação de espécies de bactérias e fungos, apesar do alto custo para a compra do equipamento, pois esse método parece ser mais rápido e principalmente mais preciso para a identificação de bactérias e leveduras quando comparado com sistemas de identificação padrão ou comerciais (Tan et al., 2012), o que é muito importante, principalmente para identificação correta das diversas espécies de ECN, das quais muitas partilham homologia genética e fenotípica significativa, tornando a identificação definitiva desafiadora (Kim et al., 2008), mas necessária, principalmente para identificação correta das espécies de ECN de maior importância clínica com *S. saprophyticus*, espécie de grande importância nas ITU.

Como mencionado anteriormente, *S. saprophyticus* é o segundo microrganismo mais isolado nas ITU. Devido a sua importância, o genoma dessa bactéria foi recentemente caracterizado. Os elementos genéticos que contribuem para o sucesso, como um agente patogênico urinário, foram descritos. Dentre esses, incluem-se as adesinas (Nicolle, 2008).

Para que a infecção do trato urinário possa se estabelecer, as bactérias precisam aderir na superfície das células epiteliais. Para isso, muitos patógenos, incluindo *S. saprophyticus*, expressam proteínas de superfície que se aderem a moléculas das células do hospedeiro, incluindo as da matriz extracelular (King et al., 2011), como colágeno, fibronectina e laminina (Kleine et al., 2010). Essas proteínas, cruciais para o desenvolvimento das infecções microbianas, são denominadas MSCRAMMs (componentes da superfície microbiana que reconhecem as moléculas adesivas da matriz) (Foster e Höök, 1998).

Apenas um pequeno número de MSCRAMMs foram descritos em *S. saprophyticus*, enquanto outros estafilococos têm mais de dez proteínas MSCRAMMs, sugerindo que a colonização por *S. saprophyticus* envolve um mecanismo distinto de outros estafilococos (Kuroda et al., 2005), sendo mais específico para aderência às células do trato urinário, como pôde ser verificado em estudos de aderência a células epiteliais humanas de diferentes sítios, em que se observou um tropismo desse microrganismo por células da uretra e área periuretral, comparadas às células da boca e da pele (Colleen et al., 1979; Mardh et al., 1979).

Até o momento, foram descritas quatro proteínas envolvidas na adesão de *S. saprophyticus*. A proteína autolisina/adesina (Aas), uma autolisina multifuncional, que aglutina eritrócitos de carneiro e se liga à fibronectina (Gatermann e Meyer, 1994); o fator de uroadesão A (UafA), que também aglutina eritrócitos de carneiro e medeia a ligação às células uroepiteliais humanas (Kuroda et al., 2005); a proteína de repetição aspartato-serina (Sdr1), que se liga ao colágeno e à fibronectina (Sakinç et al., 2009); e a adesina UafB, o mais recente fator de uroadesão identificado e caracterizado, que medeia a ligação do microrganismo a fibronectina, fibrinogenio e células epiteliais da bexiga humana (King et al., 2011).

Após a adesão inicial na superfície, pode ocorrer a adesão intercelular e formação do biofilme. O biofilme é constituído por um agregado de microrganismos envolvidos por uma matriz extracelular de origem polissacarídica ou proteica produzida pelas próprias bactérias, que permanecem aderidas em superfícies abióticas ou bióticas (Gotz, 2002; O’Neil et al., 2007), formando comunidades bacterianas “sésseis” caracterizadas por células ligadas a um substrato e umas às outras, que são envolvidas por uma matriz polimérica chamada “*slime*”.

As bactérias em biofilme exibem um fenótipo alterado no que diz respeito à taxa de crescimento e transcrição de genes (Donlan e Consterton, 2002). Os biofilmes são estruturas hidratadas que contêm canais que permitem a difusão interna de nutrientes e oxigênio e também conferem proteção contra os mecanismos de defesa do hospedeiro e a entrada de antimicrobianos (Donlan, 2002).

A formação de biofilme é considerada um importante fator de virulência de bactérias, pois estas têm demonstrado a habilidade de persistir em concentração de antibiótico superior se comparadas as mesmas bactérias em estado planctônico. Além disso, bactérias em biofilme também apresentam maior resistência contra as defesas inatas e adaptativas do hospedeiro (Stewart e Consterton, 2001).

O processo de formação do biofilme é complexo e em geral dividido em três etapas, que são adesão, maturação e desprendimento, para que ocorra a dispersão das bactérias (Molloy 2012).

Na fase de adesão, o microrganismo se liga a receptores no hospedeiro por meio das adesinas (Vuong e Otto, 2002; Fitzpatrick et al., 2005).

A fase de acúmulo ou adesão intercelular para a formação de um biofilme maduro é o estágio em que ocorre a formação de uma estrutura multicelular. Várias moléculas são responsáveis por essa adesão célula a célula, sendo que em *Staphylococcus* o componente

mais importante na adesão entre as células bacterianas é o polissacarídeo de adesão intercelular (PIA, do inglês *polysaccharide intercellular adhesin*). O PIA é composto de duas cadeias: o polissacarídeo I (80% a 85% do peso total), formado por pelo menos 130 resíduos de  $\beta$ -1,6-N-acetilglicosamina, sendo de 15% a 20% destes resíduos desacetilados e assim carregados positivamente, e o polissacarídeo II (<20%), estruturalmente relacionado ao polissacarídeo I, que apresenta menor conteúdo de resíduos de N-acetilglicosamina desacetilados e contém fosfato e succinato que conferem caráter aniônico à molécula (Vuong e Otto, 2002; Fitzpatrick et al., 2005).

A terceira etapa é a fase de destacamento. A matriz do biofilme recobre as células bacterianas na colônia do biofilme, sendo necessária a degradação da matriz para que ocorra o desprendimento das células do biofilme. O processo de desprendimento do biofilme utilizado por *Staphylococcus* ocorre através da produção de enzimas extracelulares ou surfactantes que solubilizam componentes adesivos da matriz do biofilme (Boles e Horswill, 2011).

A síntese do PIA é mediada pelo *locus ica* do *operon icaADBC* (O' Toole et al., 2000; Conlon et al., 2002). Este *operon* é composto pelo gene *icaR* que está envolvido na regulação dos genes estruturais *ica* (O'Gara e Humphreys, 2001; Dobinsky et al., 2002; Vuong et al., 2004) e por quatro genes *icaADBC* responsáveis pela biossíntese desse polissacarídeo (Fitzpatrick et al., 2005) que, juntos com outros polímeros, como ácidos teicoicos e proteínas, formam a matriz extracelular também chamada de “*slime*” (Otto, 2008).

As proteínas IcaA, IcaD e IcaC, localizadas na membrana citoplasmática, participam na extensão da cadeia do polissacarídeo. A proteína IcaA representa uma atividade catalítica N-acetilglicosaminatransferase, formando os primeiros oligossacarídeos. Sozinha, tem baixa atividade, que é aumentada quando coexpressa

com IcaD, levando à síntese de resíduos maiores de  $\beta$  1,6-N-acetilglicosamina, contendo de 10 a 20 oligômeros (Dobinsky et al., 2002; Gotz, 2002). Contudo, longos oligômeros de até 130 resíduos são formados somente na presença de IcaC e possivelmente essa proteína atua ainda no transporte transmembrana do polímero formado. O gene *icaB* codifica uma proteína que catalisa as reações de desacetilação durante a biossíntese da PIA (O’Gara e Humphreys, 2001; Dobinsky et al., 2002; Vuong et al., 2004).

A presença do PIA desacetilado parece ser essencial para a formação de biofilme, evasão imune e adesão às células epiteliais. Foi o que Vuong e colaboradores (2004) encontraram em estudo comparativo de uma cepa de *S. epidermidis* selvagem com IcaB que promove a desacetilação do PIA e uma cepa de *S. epidermidis* IcaB mutante. Foi observado na cepa selvagem que a desacetilação introduziu cargas positivas na molécula do PIA que antes era neutra. Os grupos amino livres quando expostos se tornam protonados em pH neutro e ácido. Assim, descobriram que o PIA desacetilado afetou significativamente suas propriedades biofísicas, o que foi crucial para a fixação de PIA na superfície celular bacteriana, em contraste com a cepa mutante em que o PIA foi libertado para o filtrado de cultura.

Além disso, o PIA completamente acetilado na cepa IcaB mutante tinha uma tendência muito maior para precipitar em solução aquosa em comparação com PIA parcialmente desacetilado da cepa de tipo selvagem. Assim, a desacetilação de PIA é importante para a solubilidade num ambiente aquoso.

Os autores observaram também que a desacetilação do PIA é indispensável para a formação de biofilme eficiente e colonização da superfície. Para investigar o impacto do PIA desacetilado, determinou-se primeiro a colonização de uma superfície abiótica e células epiteliais humanas *in vitro*. A formação de biofilme em plástico *in vitro* foi completamente abolida na cepa IcaB mutante. Além disso, a adesão da cepa mutante às

células epiteliais foi significativamente menor do que a do tipo selvagem. Esses resultados indicam que a desacetilação de PIA contribui para a colonização eficaz de *S. epidermidis* no hospedeiro. Por fim, os autores observaram também que a desacetilação de PIA desempenha um papel importante nos processos de evasão imune. Avaliou-se a fagocitose pelos neutrófilos humanos e a resistência a peptídeos antibacterianos pelas cepas de *S. epidermidis* IcaB mutantes e do tipo selvagem. A fagocitose pelos neutrófilos humanos foi significativamente aumentada na cepa mutante. Além disso, a estirpe IcaB mutante mostrou significativamente maior sensibilidade aos efeitos de LL-37 humana e  $\beta$ -defensina-3, dois peptídeos antibacterianos encontrados na pele humana e grânulos específicos de neutrófilos.

Em comparação a *S. aureus* e *S. epidermidis*, infecções associadas a biofilme por outras espécies de estafilococos são menos frequentes. Em *S. saprophyticus*, o biofilme parece ser crucial para o desenvolvimento das infecções, porém, esse fator de virulência ainda precisa ser investigado nessa espécie (Otto, 2008).

Além do biofilme, os estafilococos produzem diversas toxinas extracelulares como as enterotoxinas (EEs) e a toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) (Dinges et al., 2000). As enterotoxinas estafilocócicas e TSST-1 pertencem à família dos superantígenos (SAGs) originalmente identificada em *S. aureus*. Toxinas estafilocócicas foram primeiramente descritas em 1959 por Bergdoll et al. (1959), e atualmente são conhecidas 23 enterotoxinas sorologicamente distintas (Ortega et al., 2010; Wilson et al., 2011).

Todas as 23 enterotoxinas compartilham atividade superantigênica, entretanto, apenas em algumas delas (EEA até EEI, EER, EES e EET) foi comprovado o potencial emético (Le Loir et al., 2003; Ono et al., 2008). O Comitê de Nomenclatura Internacional para Superantígenos estafilocócicos propôs que apenas superantígenos estafilocócicos

que induzem vômitos após a administração oral em um modelo experimental de primatas devem ser designados como enterotoxinas estafilocócicas. A comissão também recomendou que outras toxinas semelhantes que não apresentam propriedades eméticas em modelos animais primatas ou que ainda não foram testadas devem ser designadas como enterotoxinas estafilocócicas-*like* (Omoe et al., 2005).

Por essa razão, várias EEs foram designadas como EE-*like* (EEI), uma vez que não têm qualquer propriedade emética ou as suas atividades eméticas ainda não foram testadas nesse modelo (Lina et al., 2004). Até o momento, além das cinco EEs clássicas e antigenicamente distintas descobertas na década de 1960 (EEA até EEE), 18 novos tipos de EEs ou EEI foram descritas (EEG-EEIU, EEIV2, EEIX) (Hennekinne et al, 2012; Ortega et al, 2010; Wilson et al, 2011).

EEs e EEIs são proteínas solúveis em água, globulares e estruturalmente estáveis, com peso molecular que varia de 22 kDa a 29 kDa. As características comuns de EEs são as elevadas estabilidade e resistência à maioria das enzimas proteolíticas, tais como pepsina ou tripsina, permitindo que mantenham sua atividade no trato gastrointestinal e sua termoestabilidade (Le Loir et al., 2003).

A toxina envolvida na síndrome do choque tóxico foi inicialmente designada como EEF (Bergdoll et al., 1981). No entanto, não mostrou a atividade biológica *in vivo* característica de uma enterotoxina, por isso, mais tarde foi designada como TSST-1 (Tueyo et al., 2005). A toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) é reconhecida como a principal causa de síndrome do choque tóxico, caracterizada por febre, hipotensão e choque em humanos (Leriche et al., 2012). A toxina possui muitas propriedades em comum com as EEs, inclusive a habilidade de estimular a proliferação não específica de células T e induzir a liberação de IL-1 e TNF- $\alpha$  (Takeuchi et al., 1998).

A síndrome do choque tóxico foi primeiramente relatada em 1978 por Tood et al., (1978) associada com uma doença sistêmica causada por *S. aureus* em crianças e adolescentes (Dingers et al., 2000). No início dos anos 80 uma epidemia de síndrome do choque tóxico ocorreu nos Estados Unidos em mulheres jovens. Quase todos os casos foram associados com menstruação, uso de tampões e colonização vaginal ou cervical de *S. aureus* (Dingers et al., 2000).

Assim, a síndrome do choque tóxico é dividida em duas formas: menstrual e não menstrual (Lapin e Ferguson, 2009; Leriche et al., 2012), esta última resultando de uma infecção estafilocócica inicial ou pela colonização por cepas de *S. aureus* produtora dessa toxina. Pode ocorrer após lesão da pele ou membrana mucosa, em associação com abscessos (Lapin e Ferguson, 2009). Por ser um superantígeno que, quando presente na corrente sanguínea, desencadeia sintomas como febre, hipotensão e descamação da pele (Stiles 2005; Hale et al., 2006), se o paciente não for tratado imediatamente, pode levar a um choque letal (Dinges et al., 2000).

Todas essas toxinas apresentam atividade de superantígeno e este, ao contrário dos antígenos convencionais, não precisa ser processado por células apresentadoras de antígenos (APCs). A forma clássica de ativação de células T do sistema imunológico se dá pela ligação dos receptores das células T (TCR) aos antígenos processados e apresentados pelo complexo maior de histocompatibilidade (MHC) de células apresentadoras de antígenos (APC). Se a célula T reconhecer o antígeno como não próprio, ocorre a produção de tirosina-quinase, que vai estimular a proliferação e a diferenciação de células T. A resposta é altamente regulada para limitar efeitos nocivos (Xu e McCormick, 2012).

A ativação de células T mediada pelas EEs é diferente devido à sua característica e habilidade em ativar linfócitos T no domínio  $\beta$  da cadeia variável (V $\beta$ ) do TCR, assim,

um elevado número de células T podem ser estimuladas sob a exposição à EE (Xu e McCormick, 2012). Esses superantígenos se ligam às superfícies laterais tanto dos TCRs quanto das moléculas de MHC de classe II, fora do sítio de ligação do antígeno, distorcendo a interação normal de TCR-MHC-II (Lapin e Ferguson, 2009; Xu e McCormick, 2012).

Essa interação resulta na ativação e proliferação em massa de células T inespecíficas (Mehrotra et al., 2000; Le Loir et al., 2003). Estima-se que concentrações em picogramas desses superantígenos podem ser suficientes para estimular inespecificamente até 50% de todas as células T do corpo humano (Fraser e Proft, 2008) ocorrendo assim a produção de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina (IL-1, IL-2), interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). A produção de grande quantidade dessas citocinas causa uma reação inflamatória intensa, danificando os tecidos dos hospedeiros (McCormick et al., 2003; Huang et al., 2007).

Em comparação com *S. aureus*, o potencial enterotoxigênico de ECN ainda não foi bem caracterizado. Até agora, apenas enterotoxinas produzidas por *S. aureus* foram exaustivamente descritas. As primeiras descrições de surtos de gastroenterite aguda envolvidas com enterotoxinas produzidas por ECN apareceram no final dos anos 1950 e início dos anos 1970 (Omori e Kato, 1959 e Breckinridge e Bergdoll, 1971).

Contudo, os resultados da pesquisa pioneira sobre enterotoxinas produzidas por ECN foram aceitos com certa ressalva pela falta de provas definitivas. Porém, nos últimos anos, o desenvolvimento de novas técnicas tem permitido atestar com segurança a capacidade de ECN de produzir enterotoxinas (Podkowik et al., 2013). Desde então, têm surgido alguns estudos sobre o potencial toxigênico de ECN em espécies como: *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. warneri*, *S. chromogenes* e *S. lentus* (Breckinridge e Bergdoll, 1971; Vernozy-Rozandet et al., 1996; Bennett, 1996).

As primeiras pesquisas envolvendo o potencial toxigênico dos ECN geralmente envolviam isolados de alimentos, entretanto, no início da década de 1980, começaram a surgir alguns relatos de ECN enterotoxigênicos envolvidos em outras doenças humanas. O primeiro estudo sobre o envolvimento do ECN em pacientes com síndrome do choque tóxico foi realizado por Crass e Bergdoll (1986). Nesse estudo, EEs e TSST-1 foram analisadas em culturas bacterianas isoladas de pacientes, e em 7 de 19 casos de síndrome do choque tóxico foram isolados ECN produtores de EEs ou TSST. Os autores descreveram estirpes de *S. epidermidis* capazes de produzir TSST-1 e EEC, e outras espécies de ECN capazes de produzir EEA e TSST-1 (Crass e Bergdoll, 1986). Desde então, têm surgido outros relatos envolvendo produção de EEs e TSST-1 por diferentes espécies de ECN de isolados clínicos (Barretti et al., 2009; Cunha et al. 2006; Vasconcelos et al., 2011; Ataee et al., 2011).

Assim, o potencial patogênico de diversas espécies de ECN tem se destacado pela produção de vários fatores de virulência. Entretanto, além dos fatores de virulência, ECN se destaca também pelo significativo aumento na resistência aos agentes antimicrobianos (Loksal et al., 2009).

Quanto ao perfil de suscetibilidade antimicrobiana de *S. saprophyticus*, a espécie é geralmente sensível à maioria dos agentes antimicrobianos utilizados para o tratamento de ITU (Kahlmeter, 2003), e alguns dados mostram que a prevalência de isolados resistentes é < 5% (Le Bouter et al., 2011). No entanto, *S. saprophyticus* resistentes aos antibióticos betalactâmicos e carreadores do gene *mecA* têm sido relatados (Söderquist e Berglund, 2009).

Os antimicrobianos que pertencem a classe dos betalactâmicos atuam inibindo as enzimas bacterianas responsáveis pela catalisação da reação de transpeptidação necessária para a união das cadeias de peptideoglicano, constituintes da parede celular.

Essas enzimas foram denominadas de proteínas ligadoras da penicilina – Penicillin Binding Protein (PBP) – por serem o sítio-alvo de ligação e possuírem alta afinidade com as penicilinas, análogos estruturais de seu substrato (Chambers e Sachdeva, 1990; Lim e Strynadka, 2002).

Quatro PBPs já foram descritas para estafilococos, as PBPs 1, 2, e 3 são essenciais para o crescimento celular e sobrevivência das cepas suscetíveis, sendo inibidas por concentrações muito baixas dos betalactâmicos (Pinho et al., 2001). A resistência surgiu pela produção de uma PBP adicional, PBP2a ou PBP2', uma proteína de 78 kDa, capaz de substituir a função das outras PBPs, sem prejuízos à síntese da parede celular na presença de concentrações destes compostos que seriam letais (Hartman e Tomasz, 1984; Ghuysen, 1994). Consequentemente, a resistência à meticilina confere resistência cruzada a todos os compostos betalactâmicos, exceto a cefalosporina de quinta geração, ceftarolina e ceftobiprole (CLSI, 2015).

A produção desta PBP está relacionada com a aquisição do gene *mecA*, parte integrante de um elemento genético móvel denominado cassete cromossômico estafilocócico *mec* – Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*). O SCC*mec*, também designado como ilha genômica ou ilha de resistência antibiômica, integra-se ao cromossomo bacteriano em uma sequência específica – *bacterial chromosomal attachment site* (attBSCC) – localizada próxima à origem de replicação dos estafilococos, na extremidade 3' de uma região de leitura aberta – *open reading frame* (ORF) – de função desconhecida, denominada orfX (Katayama et al., 2000; Ito et al., 2001; Okuma et al., 2002). Esse elemento é um veículo bem adaptado para intercâmbio genético entre espécies estafilocócicas e parece desempenhar papel importante na sobrevivência das células bacterianas em ambientes “estressantes” (Hiramatsu et al., 2001; Katayama et al., 2003).

O complexo do gene *mec* compreende o gene *mecA* (2,1kb), seus reguladores *mecI* e *mecRI* e a sequência de inserção IS431. A proteína MecI codificada pelo gene *mecI* impede a transcrição do *mecA*, na ausência de agentes  $\beta$ -lactâmicos. Na presença desses compostos, o gene *mecRI* codifica uma proteína transdutora de sinal, MecRI, que cliva a MecI e induz a transcrição do gene *mecA* e a subsequente produção de PBP2a. Os genes regulatórios podem estar truncados pelas sequências de inserção IS431 e IS1272, levando à desrepressão do gene *mecA* (Ito et al., 2001). O complexo *mec* atualmente é formado por seis classes: *A*, *B*, *C1*, *C2*, *D* e *E* (Ito et al., 2003; IWG-SCC, 2009).

O SCC*mec* é composto ainda do complexo do gene *ccr* (*cassete chromosome recombinase*), com três genes *ccr* distintos classificados como: *ccrA*, *ccrB* e *ccrC*, que codificam recombinases responsáveis pela mobilidade do SCC*mec*, pois medeiam a integração e a excisão do SCC*mec* no cromossomo estafilocócico (Ito et al 2003; Fridkin et al., 2005;IWG-SCC, 2009).

O restante do material genético do complexo SCC*mec* compreende as regiões denominadas J (de “*junkyard*”) que estão localizadas entre e ao redor dos complexos *mec* e *ccr* e contêm genes que codificam resistência a agentes antimicrobianos não  $\beta$ -lactâmicos e metais pesados (Hiramatsu et al., 2001; Fridkin et al., 2005).

Muitas estruturas diferentes, incluindo sequências de inserção e transposons, foram identificadas na maioria dos tipos de SCC*mec* na região J. Cada tipo de SCC*mec* foi, portanto, posteriormente classificado em subtipos baseados nos polimorfismos ou variações na região J, bem como pela combinação do tipo de complexo do gene *ccr* e a classe do complexo do gene *mec* (Shore et al., 2011; IWG-SCC, 2009), sendo conhecidos 11 diferentes tipos de SCC*mec* (Shore et al., 2011). SCC*mec* classificado como SCC*mec* tipo I (complexo gene *mec* classe *B* e *ccrA1B1*), SCC*mec* tipo II (complexo gene *mec* classe *A* e *ccrA2B2*), SCC*mec* tipo III (complexo gene *mec* classe *A* e *ccrA3B3*), SCC*mec*

tipo IV (complexo gene *mec* classe *B* e *ccrA2B2*), SCC*mec* tipo V (complexo gene *mec* classe *C2* e *ccrC*), SCC*mec* tipo VI (complexo gene *mec* classe *B* e *ccrA4B4*), SCC*mec* tipo VII (complexo gene *mec* classe *C1* e *ccrC*), SCC*mec* tipo VIII (complexo gene *mec* classe *A* e *ccrA4B4*), SCC*mec* tipo IX (complexo gene *mec* classe *C2* e *ccrA1B1*), SCC*mec* tipo X (complexo gene *mec* classe *C1* e *ccrA1B6*), SCC*mec* tipo XI (complexo gene *mec* classe *E* e *ccrA1B3*).

Os SCC*mec* dos tipos I, IV, V, VI, VII e VIII geralmente contêm somente recombinases e genes estruturais e regulatórios para resistência a meticilina (Deurenberg e Stobberingh, 2008). Já os tipos II, III, IX, X, XI possuem elementos de transposição e genes codificadores de resistência aos antimicrobianos não betalactâmicos. Os isolados que contêm os tipos I, II e III possuem classicamente origem hospitalar e os tipos IV e V têm origem comunitária (Deresinski 2005, Li et al., 2011, Shore et al., 2011).

Métodos de tipagem molecular como a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) têm sido utilizados para elucidar a epidemiologia de muitas doenças infecciosas. No entanto, pouco se conhece a respeito da epidemiologia molecular de *S. saprophyticus* isolado de casos de ITU, e não se sabe se são cepas específicas ou clones que estão relacionados com infecções em humanos (Widerström et al., 2007).

## **2. Justificativa**

A ITU é uma das doenças infecciosas mais comuns. Na etiologia da ITU *S. saprophyticus* é um dos agentes etiológicos mais isolados, sendo responsável por causar infecções agudas em crianças e adultos de ambos os sexos. A identificação rápida e eficiente dessas bactérias é de grande importância para a rotina nos laboratórios de microbiologia clínica. Embora os métodos automatizados, como Vitek 2, utilizados em laboratórios de rotina sejam mais rápidos, podem não fornecer uma identificação acurada, sendo necessários mais estudos da eficácia desses sistemas e de outras tecnologias mais

recentes e promissoras, como a espectrometria de massa, Maldi-TOF MS na identificação desses microrganismos.

Embora a ITU por *S. saprophyticus* tenha sido bem documentada na literatura, a resistência antimicrobiana, o perfil de virulência como a capacidade de formar biofilme, bem como o potencial toxigênico dessa espécie ainda são pouco estudados. Além disso, a utilização da tipagem por PFGE permite conhecer a epidemiologia de clones prevalentes de *S. saprophyticus* envolvidos na etiologia de infecções do trato urinário na população da cidade de Botucatu e região.

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo geral**

Caracterizar o perfil clonal, os fatores de virulência e o perfil de resistência aos antimicrobianos em isolados planctônicos e em biofilme de *S. saprophyticus* isolado de amostras de urina de pacientes com infecção do trato urinário, além de comparar a identificação de espécies de ECN obtida no Vitek 2 e no Maldi-TOF MS com a identificação genotípica.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Identificar *S. saprophyticus* isolado de amostras de urina pela técnica genotípica de ITS-PCR e comparar com a identificação obtida no Vitek 2 e no Maldi-TOF MS.
- Detectar a presença dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* e *tst-1* que codificam as enterotoxinas EEA, EEB, EEC, EED, EEE, EEG, EEH, EEI e da toxina da síndrome do choque tóxico (TSST) nas amostras isoladas.
- Investigar a produção de enterotoxinas e TSST-1 pela técnica de eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) nos isolados positivos para os respectivos genes.

- Identificar a presença dos genes *icaA*, *icaC*, *icaB* e *icaD* envolvidos na formação de biofilme.
- Avaliar a produção de biofilme em placa de poliestireno.
- Detectar a presença dos genes das adesinas *UafA* e *UafB* e *Sdr1* e *Aas*.
- Detectar a presença do gene *mecA* nas amostras isoladas e a caracterização do tipo de *SCCmec* nas amostras positivas para o gene.
- Avaliar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana frente a vancomicina, oxacilina, sulfametoxazol/trimetoprim, ciprofloxacina e norfloxacina pela técnica de microdiluição em células planctônicas e em biofilme.
- Determinar o perfil clonal de *S. saprophyticus* pela tipagem molecular por PFGE.
- Avaliar a dispersão de clones de *S. saprophyticus* entre os municípios estudados por georreferenciamento.

#### 4. Referências bibliográficas

- Alós JI. Epidemiology and etiology of urinary tract infections in the community. Antimicrobial susceptibility of the main pathogens and clinical significance of resistance. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005; 4: 3-8.
- Argudín MA, Mendoza MC, Rodicio MR. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins*. 2010; 2:1751-73.
- Ataee RA, Mehrabi-Tavana A, Izadi M, Hosseini SM, Ataee MH. Bacterial meningitis: a new risk factor. *J Res Med Sci*. 2011; 16: 207–10.
- Barnett BJ, Stephens DS. Urinary tract infection: an overview. *Am J Med Sci*. 1997; 314: 245-49.
- Barretti P, Montelli AC, Batalha JE, Caramori JC, Cunha Mde L. The role of virulence factors in the outcome of staphylococcal peritonitis in CAPD patients. *BMC Infect Dis*. 2009; 9: 212.
- Bennett RW. Atypical toxigenic *Staphylococcus* and non-*Staphylococcus aureus* species on the horizon? an update. *J Food Prot*. 1996; 59: 1123–6.

- Bergdoll MS, Surgalla MJ, Dack GM. Staphylococcal enterotoxin. Identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin-neutralizing property. *J Immunol.* 1959; 83: 334-8.
- Bergdoll MS, Crass BA, Reiser RF, Robbins RN, Davis JP. A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic-shock-syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. *Lancet.* 1981; 1: 1017-21.
- Boles BR, Horswill AR. Staphylococcal biofilm disassembly. *Trends microbiol.* 2011; 19: 449-55.
- Breckindridge JC, Bergdoll MS. Outbreak of food borne gastroenteritis due to a coagulase-negative enterotoxin producing *Staphylococcus*. *NEJM.* 1971; 284, 541-43.
- Camargo IL, Maschieto A, Salvino C, Darini ALC. Diagnóstico bacteriológico das infecções do trato urinário: uma revisão técnica. *Rev. Medicina.* 2001; 34:70-8.
- Chambers HF, Sachdeva M. Binding of beta-lactam antibiotics to penicillin-binding proteins in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis.* 1990; 161: 1170-76.
- Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev.* 1997; 10: 781-91.
- Colleen S, Hovelius B, Winslander A, Mardh PA. Surface properties of *S. saprophyticus* and *S. epidermidis* as studied by adherence test and two-polymer, aqueous phase systems. *Acta path microbial Immunol Scand.* 1979; 87:321-28.
- Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Table: M100-S25; 950 West Valley Road, Suite 2500 Wayne, PA19087 USA, 2015.
- Crass BA, Bergdoll MS. Involvement of coagulase-negative staphylococci in toxic shock syndrome. *J Clin Microbiol.* 1986; 23:43-5.
- Cunha MLRS, Peresi E, Calsolari RAO., Araújo Jr, J.P. Detection of Enterotoxins genes in coagulase-negative *Staphylococci* isolated from foods. *Braz J. Microbiol.* 2006; 37:70-4.
- Deresinski S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. *Clin Infect Dis.* 2005; 40: 562-73.
- Deurenberg RH., Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol.* 2008; 8: 747-63.
- Dingers MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13:16-34.

- Dobinsky S, Bartscht K, Mack D. Influence of Tn917 insertion on transcription of the icaADBC operon in six biofilm-negative transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis*. *Plasmid*. 2002; 47: 10-17.
- Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002; 8: 881-90.
- Donlan RM, Consterton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15: 167-93.
- Fitzpatrick F, Humphreys H, O'Gara JP. The genetics of staphylococcal biofilm formation--will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection. *Clin Microbiol Infect*. 2005; 11: 967-73.
- Foster TJ, Höök M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*. 1998; 6: 484-88.
- Fraser JD, Proft T. The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. *Immunol Rev*. 2008; 225: 226-43.
- Fridkin SK, Hageman JC, Morrison M, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities. *N Engl J Med*. 2005; 352: 1436-44.
- Fueyo JM, Mendoza MC, Rodicio MR, Muñoz J, Alvarez M.A, Martín MC. Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen gene profiles of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical mastitis in dairy cows and relationships with macrorestriction genomic profiles. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 1278-84.
- Gatermann S, Meyer HG. *Staphylococcus saprophyticus* hemagglutinin binds fibronectin. *Infect. Immun*. 1994; 62:4556-63.
- Ghuysen JM. Molecular structures of penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Trends Microbiol*. 1994; 2: 372-80.
- Golledge CL. *Staphylococcus saprophyticus* bacteremia. *J Infect Dis*. 1988; 157: 215.
- Götz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol*. 2002; 43: 1367-78.
- Hale ML, Swietnicki W. Model Systems to study a superantigen-induced disease: Toxic shock syndrome. *Drug Discov Today: Diseases models*. 2006; 3:121-26.
- Hartman BJ, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 1984; 158: 513-16.
- Hennekinne JA, Ostyn A, Guillier F., Herbin, S., Pruffer, A.L., Dragacci, S.. How should staphylococcal food poisoning outbreaks be characterized? *Toxins*. 2010; 2: 2106–16.
- Hooton TM, Stamm WE. Diagnosis and treatment of uncomplicated urinary tract infection. *Infect Dis Clin North Am*. 1997; 11:551-81.

Huang Y, Sui Y, Zhang X, et al. Response of T cells in vivo induced by repeated superantigen treatments at different time intervals. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2007; 39:467–74.

International Working Group on the classification of Staphylococcal cassette chromosome elements (IWG-SCC). Classification of Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): Guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009. 4961-67.

Ishihara S, Yokoi S, Ito M, Kobayashi S, Deguchi T. Pathologic significance of *Staphylococcus saprophyticus* in complicated urinary tract infections. *Urology.* 2001; 57: 17-20.

Ito T, Katayama Y, Asada K, et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45: 1323-36.

Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist Updat.* 2003; 6: 41-52.

Johnson HM, Russell JK, Pontzer C.H. Staphylococcal enterotoxin microbial superantigens. *FASEB J.* 1991; 5: 2706-12.

Kahlmeter G. An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO.SENS Project. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 51: 69-76.

Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcal cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44: 1549-55.

Katayama Y, Takeuchi F, Ito, et al. Identification in methicillin-susceptible *Staphylococcus hominis* of an active primordial mobile genetic element for the staphylococcal cassette chromosome mec of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2003; 185: 2711-22.

Kleine B, Gatermann S, Sakinc T. Genotypic and phenotypic variation among *Staphylococcus saprophyticus* from human and animal isolates. *BMC Res Notes.* 2010; 10:163.

Klotz M, Opper S, Heeg K, Zimmermann S. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A to D by real-time fluorescence PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 4683–87.

Koksal F, Yasar H, Samasti M. Antibiotic resistance patterns of coagulase-negative staphylococci strains isolated from blood cultures of septicemic patients in Turkey. *Microbiol Res.* 2009; 164: 404-10.

- Kim M, Heo SR, Choi SH, et al. Comparison of the MicroScan, VITEK 2, and Crystal GP with 16S rRNA sequencing and MicroSeq 500 v2.0 analysis for coagulase-negative Staphylococci. *BMC Microbiol.* 2008; 8:233.
- King NP, Beatson SA, Totsika, et al. M. UafB is a serine-rich repeat adhesin of *Staphylococcus saprophyticus* that mediates binding to fibronectin, fibrinogen and human uroepithelial cells. *Microbiol.* 2011; 157:1161-75.
- Koneman EV, Allen SD, Sowell VR, Sommer HM. Introdução à microbiologia médica. In: *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido*. 5° ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.
- Kunin CM. *Urinary tract infections: detection, prevention and management*. 5 ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1997.
- Kuroda M, Yamashita A, Hirakawa H, et al. Whole genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection. *Proc Natl Acad Sci.* 2005; 102: 13272-77.
- Lappin E, Ferguson AJ. Gram-positive toxic shock syndromes. *Lancet Infect Dis.* 2009; 9: 281-90.
- Latham RH, Running K, Stamm WE. Urinary tract infections in young adult women caused by *Staphylococcus saprophyticus*. *JAMA.* 1983; 250: 3063-66.
- Le Bouter A, Leclercq R, Cattoir V. Molecular basis of resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins in *Staphylococcus saprophyticus* clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents.* 2011; 37: 118-23.
- Lee W, Carpenter RJ, Phillips LE, Faro S. Pyelonephritis and sepsis due to *Staphylococcus saprophyticus*. *J Infect Dis.* 1987; 155: 1079-80.
- Le Loir Y, Baron F, Guatier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet. Mol. Res.* 2003; 2:63-76.
- LeRiche T, Black AY, Fleming NA. Toxic shock syndrome of a probable gynecologic source in an adolescent: a case report and review of the literature. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2012; 25: 133-7.
- Li S, Skov RL, Han X, et al. Novel types of staphylococcal cassette chromosome mec elements identified in clonal complex 398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55: 3046-50.
- Lim D, Strynadka NC. Structural basis for the beta lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Struct Biol.* 2002; 9: 870-76.
- Lina G, Bohach GA, Nair SP, Hiramatsu K, Jouvin-Marche E, Mariuzza R. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. *J Infect Dis.* 2004; 189: 2334-36.

- Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest*. 2003; 111: 1265-73.
- Marrack P, Kappler J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science*. 1990; 248: 705-11.
- Mardh PA, Colleen S, Hovelius B. Attachment of bacteria to exfoliated cells from the urogenital tract. *Invest Urol*. 1979; 16: 322-26.
- Meers PD, Whyte W, Sandys G. Coagulase-negative staphylococci and micrococci in urinary tract infections. *J Clin Pathol*. 1975; 28: 270-73.
- Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J. Clin. Microbiol*. 2000; 38:1032-35.
- McCormick JK, Tripp TJ, Llera AS, Sundberg EJ, Dinges, M.M., Mariuzza, R.A., Schlievert, P.M. Functional analysis of the TCR binding domain of toxic shock syndrome toxin-1 predicts further diversity in MHC class II/superantigen/TCR ternary complexes. *J Immunol*. 2003; 171:1385-1392.
- Mitchell RG. Classification of *Staphylococcus albus* strains isolated from the urinary tract. *J Clin Pathol*. 1968; 21: 93–6.
- Molloy S. Biofilms take shape. *Nat. Rev. Microbiol*. 2012:10.
- Nicolle LE. Uncomplicated urinary tract infection in adults including uncomplicated pyelonephritis. *Urol Clin North Am*. 2008; 35: 1-12.
- O'Gara JP, Humphreys H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *J Med Microbiol*. 2001; 50: 582-87.
- Okuma K, Iwakawa K, Turnidge JD, et al. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 4289-94.
- Omoe K, Imanishi K, Hu DL, et al. Characterization of novel staphylococcal enterotoxin-like toxin type P. *Infect Immun*. 2005; 73: 5540-46.
- Omori G, Kato Y. A staphylococcal food-poisoning caused by a coagulase negative strain. *Bilken's Journal*, 1959; 2: 92.
- O'Neill E, Pozzi C, Houston P, et al. Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. *J. Clin. Microbiol*. 2007; 45:1379-88.
- Ono HK, Omoe K, Imanishi K, et al. Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. *Infect Immun*. 2008; 76: 4999-5005.

- Ortega E, Abriouel H, Lucas R, Gálvez A. Multiple roles of *Staphylococcus aureus* enterotoxins: pathogenicity, superantigenic activity, and correlation to antibiotic resistance. *Toxins*. 2010; 2: 2117-31.
- Otto M. Staphylococcal biofilm. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008; 322: 207-28.
- Pereira AT. Coagulase-negative strains of staphylococcus possessing antigen 51 as agents of urinary infection. *J Clin Pathol*. 1962; 15: 252–53.
- Pinho MG, de Lencastre H, Tomasz A. An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 10886-91.
- Podkowika M, Parkb JY, Seob KS, Bystrońa J, Bania J. Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. *Int J Food Microbiol*. 2013; 163, 34-40.
- Proft T, Fraser JD. Bacterial superantigens. *Clin Exp Immunol*. 2003; 133: 299–306.
- Raz R, Colodner R, Kunin CM. Who are you—*Staphylococcus saprophyticus*? *Clin Infect Dis* 2005; 40: 896–8.
- Sakinç T, Kleine B, Michalski N, Kaase M, Gatermann SG. SdrI of *Staphylococcus saprophyticus* is a multifunctional protein: localization of the fibronectin-binding site. *FEMS Microbiol Lett*. 2009; 301: 28–34.
- Shore AC, Deasy EC, Slickers P, 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*. 2011; 55: 3765-73.
- Söderquist B, Berglund C. Methicillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus* in Sweden carries various types of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec). *Clin Microbiol Infect*. 2009; 15: 1176-78.
- Stewart PS, Consterton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilm. *Lancet*. 2001; 358: 135-8.
- Stiles BG, Krakauer T. Staphylococcal enterotoxins: A purging experience in review, Part I. *Clin Microbiol Newslett*. 2005; 27:179-86.
- Tan KE, Ellis BC, Lee R, Stamper PD, Zhang SX, Carroll KC. Prospective evaluation of a matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system in a hospital clinical microbiology laboratory for identification of bacteria and yeasts: a bench-by-bench study for assessing the impact on time to identification and cost-effectiveness. *J Clin Microbiol*. 2012; 50: 3301-08.
- Thomas D, Chou S, Dauwalder O, Lina G. Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Chem Immunol Allergy*. 2007; 93: 24-41.

- Todd J, Fishaut M, Kapral F, Welch T. Toxic-shock syndrome associated with phage-group-I Staphylococci. *Lancet*. 1978; 2: 1116-18.
- Turner RM, Wu B, Lawrence K, Hackett J, Karve S, Tunceli, O. Assessment of Outpatient and Inpatient Antibiotic Treatment Patterns and Health Care Costs of Patients with Complicated Urinary Tract Infections. *Clin Ther*. 2015; 37: 2037-47.
- Valiquette L. Urinary tract infections in women. *Can J Urol*. 2001; 8: 6-12.
- Vasconcelos NG, Pereira VC, Araújo Júnior JP, Da Cunha Mde L. Molecular detection of enterotoxins E, G, H and I in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples of newborns in Brazil. *J Appl Microbiol*. 2011; 111: 749–62.
- Vernozy-Rozand C, Mazuy C, Prevost G, et al. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococcal isolated from goats and cheese. *Int J Food Microbiol*. 1996; 30, 271-280.
- Vuong C, Otto M. Staphylococcus epidermidis infections. *Microbes Infect*. 2002; 4: 481-89.
- Vuong C, Kocianova S, Voyich JM, et al. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem*. 2004; 279: 54881-86.
- Xu SX, McCormick JK. Staphylococcal superantigens in colonization and disease. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012; 2: 52.
- Widerström M, Wiström J, Ferry S, Karlsson C, Monsen T. Molecular epidemiology of *Staphylococcus saprophyticus* isolated from women with uncomplicated community-acquired urinary tract infection. *J Clin Microbiol*. 2007; 45:1561-64.
- Wilson GJ, Seo KS, Cartwright RA, et al. A novel core genome-encoded superantigen contributes to lethality of community-associated MRSA necrotizing pneumonia. *PLoS Pathog*. 2011; doi: 10.1371/journal.ppat.1002271.

## **5 Resultados**

### **5.1 Artigo I: Comparação da técnica de Maldi-TOF MS com o sistema automatizado Vitek 2 para identificação de *Staphylococcus saprophyticus* e outros estafilococos coagulase-negativa isolados de pacientes com infecções urinárias.**

**Artigo I: \*Artigo nas normas do *Journal of Microbiological Methods*.**

#### **Resumo**

A identificação dos estafilococos coagulase-negativa (ECN) em nível de espécies é necessária para a orientação correta em termos de tratamento adequado. Esse estudo objetiva comparar dois métodos de identificação de espécies de ECN isolados de pacientes com ITU: método automatizado de identificação Vitek 2 e a técnica de ionização por dessorção a laser assistida por matriz (Maldi-TOF MS) com a identificação genotípica pela técnica Internal Transcribed Spacer PCR (ITS-PCR). Foram coletadas 217 amostras de ECN de pacientes com infecção do trato urinário (ITU). A concordância do sistema automatizado Vitek 2 com o ITS-PCR foi de 84,8%, com sensibilidade e especificidade de 98% e 100%, respectivamente. Das 33 amostras identificadas incorretamente pelo Vitek 2, 31 pertenciam a espécie *S. saprophyticus*. Já o Maldi-TOF MS mostrou uma excelente correlação com o ITS-PCR, pois identificou corretamente todas as amostras de ECN. Maldi-TOF MS é mais preciso do que o sistema automatizado Vitek 2 para identificar em nível de espécie os ECN isolados de ITU, particularmente isolados urinários de *S. saprophyticus*.

**Palavras chave:** ECN, identificação, ITU, Maldi-TOF, Vitek 2.

## 1 Introdução

*S. saprophyticus* é o segundo agente etiológico mais comumente isolado de pacientes com ITU na comunidade. Além de *S. saprophyticus*, outras espécies de estafilococos coagulase-negativa (ECN) também estão envolvidas em casos de ITU, incluindo *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus lentus* e *Staphylococcus hominis* (Guirguitzova et al., 2002).

A identificação acurada dessas espécies de ECN é de grande importância para uma melhor compreensão do potencial patogênico desses microrganismos (Heikens et al., 2005; Sivadon et al., 2005) e principalmente para a orientação correta dos médicos em termos de estratégias de tratamento adequado (Kim et al., 2008).

Atualmente, vários sistemas comerciais para identificação de *Staphylococcus* têm sido desenvolvidos para uso em laboratório de rotina como métodos alternativos à identificação clássica, que é laboriosa e demorada (Ferreira et al., 2012). A disponibilidade comercial dos sistemas de identificação rápida miniaturizados fornece para o laboratório clínico a capacidade de identificação rápida de espécies de ECN (Pfaller e Herwaldt, 1988).

O Vitek 2 é um dos sistemas automatizados amplamente utilizados em laboratórios de microbiologia clínica; entretanto, esse sistema automatizado não é capaz de diferenciar entre várias espécies de ECN (Dupont et al., 2010).

Recentemente, a técnica de ionização por dessorção a *laser* assistida por matriz, cuja sigla em inglês é Maldi (*matrix assisted laser desorption ionization*), seguido pela detecção em um analisador do tipo tempo de voo, cuja sigla é TOF (do inglês “*time of flight*”) – Maldi-TOF MS –, muito utilizada durante muitos anos nos campos de

proteômica e toxicologia, tem sido aplicada na microbiologia para a identificação de espécies de microrganismos (Alatoom et al., 2011). Maldi-TOF MS tem sido descrito como um meio rápido e preciso para identificação de bactérias em nível de espécie (Carbonnelle et al., 2011), principalmente espécies de ECN (Argemi et al., 2015).

A eficiência desses métodos na identificação de *S. saprophyticus* é pouco conhecida. Sendo esta a espécie de ECN mais associada à ITU, este estudo tem como objetivo comparar dois métodos de identificação de espécies de ECN, com ênfase na identificação de *S. saprophyticus* isolado de pacientes com ITU: método automatizado de identificação Vitek 2 e Maldi-TOF MS, com a identificação genotípica pela técnica Internal Transcribed Spacer PCR (ITS-PCR).

## **2 Materiais e métodos**

### *2.1 Amostras*

Foram utilizadas no estudo amostras de *S. saprophyticus* isolado da urina de diferentes pacientes. As amostras utilizadas foram obtidas em estudo prospectivo conforme isolamento no Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HC-FMB) nos anos de 2013 e 2014, e um banco de amostras previamente coletadas em 2008. As amostras foram coletadas de pacientes procedentes de enfermarias, ambulatórios, pronto-socorro e unidades básicas de saúde de Botucatu e região.

Foram incluídos indivíduos de ambos os sexos e de todas as idades, que tiveram uroculturas positivas para ECN consideradas compatíveis com ITU, com contagem de colônias igual ou superior a 100.000 unidades formadoras de colônias por mililitro de urina ( $\geq 10^5$  UFC/mL) segundo os critérios de avaliação de Kass (1956).

Segundo o protocolo de coleta dos serviços, os pacientes foram orientados a coletar a urina de jato médio, com higiene prévia da região genital. Foi desprezado o

primeiro jato e colhido o jato médio em frasco estéril apropriado, sendo o restante da micção desprezado. Em crianças e recém-nascidos a amostra foi obtida com auxílio de saco coletor colocado de maneira asséptica.

A urina foi homogeneizada e semeada com alça descartável (0,001 mL ou 1  $\mu$ L), sem centrifugação. A alça foi imersa na urina de forma vertical e a semeadura realizada através da técnica de esgotamento, utilizada para quantificação, sendo os resultados reportados em unidades formadoras de colônias por mililitro de urina (UFC/mL).

As amostras foram semeadas em placas contendo meio de ágar Cled (Cysteine Lactose Electrolyte-Deficient Medium) e ágar MacConkey (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra). As placas foram incubadas em estufa por 18 a 24 horas, à temperatura de 35°C, e após esse período foi realizado a contagem do número de colônias.

## 2.2 Identificação fenotípica dos estafilococos

Os isolados foram semeados em ágar sangue com 5% de sangue de carneiro (isolamento secundário) e corados pelo método do Gram, objetivando-se sua pureza e a observação de sua morfologia e coloração específica. Após a confirmação dessas características, as linhagens foram submetidas às provas de catalase, DNase e coagulase em tubo (padrão ouro), para distinção das espécies de *Staphylococcus aureus* e ECN, conforme preconizado por Koneman et al. (2001). As amostras de ECN foram identificadas pelo aparelho de automação Vitek 2 no Laboratório de Análises Clínicas do HC da FMB.

## 2.3 Maldi-TOF MS

Todas as amostras de ECN foram analisadas no Maldi-TOF MS, por meio da metodologia de espectrometria de massa Maldi-TOF. Uma porção de uma colônia de uma placa de ágar sangue foi aplicada em um *slide* juntamente com uma solução matriz. O *slide*, após secagem, foi carregado no equipamento. A amostra foi submetida a vários

disparos no interior do espectrômetro de massa. A matriz absorveu a luz e, juntamente com a amostra, ganhou uma carga elétrica (ionização). Campos elétricos guiaram os íons dentro do tubo de vácuo, os quais foram separados de acordo com o “peso” (massa, com moléculas menores voando mais rápido que os maiores) e seu tempo de voo. Os resultados foram exibidos como uma série de linhas ou de picos (espectros) que correspondem a fragmentos da molécula original. Ao analisar o padrão dos fragmentos, foi possível deduzir a estrutura das moléculas. Os espectros da amostra foram comparados a um banco de dados de espectros desenvolvido a partir de certo número de espécies bacterianas. Os espectros da amostra foram interpretados para fornecer resultados de identificação do organismo associados a um nível de confiança.

#### 2.4 Extração do DNA e identificação genotípica das espécies de ECN

Nas amostras identificadas como espécies de ECN foi realizada a extração de DNA com o Kit Illustra<sup>®</sup> (GE Healthcare), sendo as extrações realizadas segundo as instruções do fabricante.

A identificação genotípica foi realizada usando *primers* de sequências conservadas adjacentes aos genes 16S e 23S pela técnica Internal Transcribed Spacer PCR (ITS-PCR) descrita por Couto et al. (2001) com os *primers* G1 “GAAGTCGTAACAAGG” 16S e L1 “CAAGGCATCCACCGT” 23S. A eficiência das ampliações foi monitorada pela eletroforese em *agarose metaphor* 3% preparado em tampão 1,0 x TBE e corado com Saber Safe. Para controle dos resultados, foram utilizadas as seguintes linhagens de referência internacional: *S. epidermidis* (ATCC 12228), *S. epidermidis* (ATCC 35983), *S. haemolyticus* (ATCC 29970), *S. hominis* (ATCC 27844), *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* (ATCC 700237), *S. lugdunensis* (ATCC 700328), *S. saprophyticus* (ATCC 15305) e *S. warneri* (ATCC 10209).

## 2.5 Análises estatísticas

Foi aplicado teste para avaliação da sensibilidade e especificidade utilizando o ITS-PCR como padrão ouro.

## 3 Resultados

Foram isoladas 217 amostras de ECN de pacientes com ITU, e em todas essas amostras foi realizada a identificação pelo sistema automatizado Vitek 2, por Maldi-TOF MS e pelo método genotípico ITS-PCR.

O sistema automatizado Vitek 2 identificou 138 *S. saprophyticus*, 34 *S. epidermidis*, 19 *S. warneri*, 13 *S. hominis* subsp. *hominis*, 10 *S. haemolyticus*, 2 *S. lugdunensis* e 1 *S. lentus*, enquanto que pelo Maldi-TOF MS e ITS-PCR foram identificados 169 *S. saprophyticus*, 33 *S. epidermidis*, 3 *S. warneri*, 10 *S. haemolyticus*, 1 *S. lugdunensis* e 1 *S. aureus*. A subespécie *S. hominis* subsp. *hominis* e a espécie *S. lentus* foram identificadas apenas pelo Vitek 2. Na tabela 1 se encontram as espécies de ECN identificadas por cada método.

Em relação à comparação de sensibilidade e especificidade dos métodos de identificação com o ITS-PCR para todas as espécies estudadas, o Vitek 2 obteve sensibilidade de 98% e especificidade de 100%; para o Maldi-TOF MS, a sensibilidade e especificidade foram de 100% para os dois. Na tabela 2 estão descritas a comparação de sensibilidade e a de especificidade entre os métodos de identificação para cada espécie encontrada.

O teste de concordância entre o Vitek 2 e o ITS-PCR revelou 84,8% de concordância. Já a concordância entre Maldi-TOF MS e ITS-PCR foi de 100%. Na tabela 3 se encontram os resultados de concordância entre o Vitek 2 e o ITS-PCR para cada espécie de ECN.

**Tabela 1.** Comparação dos métodos de identificação.

Espécies	Métodos de Identificação					
	Vitek2		Maldi-TOF MS		ITS-PCR	
	N	%	N	%	N	%
<i>S. saprophyticus</i>	138	63,6	169	77,9	169	77,9
<i>S. epidermidis</i>	34	15,7	33	15,2	33	15,2
<i>S. warneri</i>	19	8,7	3	1,4	3	1,4
<i>S. hominis</i>	13	6,0	0	0	0	0
<i>S. haemolyticus</i>	10	4,6	10	4,6	10	4,6
<i>S. lugdunensis</i>	2	0,9	1	0,5	1	0,5
<i>S. lentus</i>	1	0,5	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	0	0	1	0,5	1	0,5
<b>Total</b>	<b>217</b>	<b>100</b>	<b>217</b>	<b>100</b>	<b>217</b>	<b>100</b>

**Tabela 2.** Comparação de sensibilidade e especificidade entre os métodos com o ITS-PCR.

Espécies	Sensibilidade (%)		Especificidade (%)	
	Vitek 2	Maldi-TOF MS	Vitek 2	Maldi-TOF MS
<i>S. saprophyticus</i>	81,6%	100,0	100%	100,0
<i>S. epidermidis</i>	100%	100,0	99,4%	100,0
<i>S. warneri</i>	100%	100,0	92,5%	100,0
<i>S. hominis</i>	0,0	100,0	94%	100,0
<i>S. haemolyticus</i>	100%	100,0	99,5%	100,0
<i>S. lugdunensis</i>	100%	100,0	99,5%	100,0
<i>S. lentus</i>	0,0	100,0	99,5%	100,0
Total (%)	98,0	100,0	100,0	100,0

**Tabela 3.** Taxa de concordância entre o ITS e o Vitek 2.

ITS-PCR							
Vitek 2	<i>S.saprophyticus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. warneri</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. aureus</i>	Total
<i>S. saprophyticus</i>	138	0	0	0	0	0	138
<i>S. epidermidis</i>	0	33	0	1	0	0	34
<i>S. warneri</i>	16	0	3	0	0	0	19
<i>S. hominis</i>	13	0	0	0	0	0	13
<i>S. haemolyticus</i>	1	0	0	9	0	0	10
<i>S. lugdunensis</i>	0	0	0	0	1	1	2
<i>S. lentus</i>	1	0	0	0	0	0	1
Total	169	33	3	10	1	1	217
<b>Concordância</b>	<b>81,6%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>90%</b>	<b>100%</b>	<b>0.0%</b>	<b>84,8%</b>

#### 4 Discussão

*S. saprophyticus* correspondeu a 169 dos 217 isolados de ECN no presente estudo. Apesar de ser a espécie mais prevalente, outros ECN também foram encontrados com menor frequência: *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus* e *S. lugdunensis*.

Alcaráz et al. (2003) também identificaram diferentes espécies de ECN em estudo de 13 amostras de ECN isolados de urina, sendo quatro (30,7%) *S. saprophyticus*, quatro (30,7%) *S. haemolyticus*, dois (15,4%), *S. epidermidis*, dois (15,4%) *S. hominis* e um *S. lugdunensis* (7,8%). Para Ferreira et al., (2012) *S. saprophyticus* também foi a espécie mais isolada de casos de ITU, correspondendo a 56,4% dos isolados, entretanto, outras espécies de ECN também foram identificadas: *S. epidermidis* (15,9%); *S. haemolyticus* (7,9%); *S. warneri* (1,9%) e um *S. lugdunensis* (1%). Esses achados mostram que existe uma variedade de espécies de ECN associadas com infecção urinária, além de *S. saprophyticus*.

Além de isolados de casos de ITU, os estafilococos representam um gênero de bactérias frequentemente isolado em uma ampla variedade de amostras no laboratório de microbiologia clínica. À semelhança de outros gêneros de bactérias, certas espécies de estafilococos são mais comumente associadas à doença do que outros, assim, a identificação precisa das bactérias em nível de espécie muitas vezes ajuda a distinguir entre os que são microbiota, clinicamente relevantes ou contaminantes da cultura (Clark et al., 2013).

Dentre os estafilococos, o grupo dos ECN é composto de um grande número de espécies, muitas das quais partilham homologia genética e fenotípica significativa, tornando a identificação definitiva desafiadora. A determinação da espécie correta de ECN pode ser particularmente difícil, devido a um elevado grau de semelhança genética

entre as espécies, e testes fenotípicos para a identificação nem sempre fornecem resultados confiáveis (Kim et al., 2008).

Além da similaridade genética, existem outros problemas potenciais; diferentes cepas de uma espécie podem não apresentar uma característica específica; os isolados a partir de culturas antigas podem não mostrar os padrões bioquímicos esperados; isolados de hospedeiros que foram submetidos a terapia antimicrobiana a longo prazo podem alterar as suas características bioquímicas típicas (Becker et al., 2004).

Poucos estudos têm avaliado a acurácia do sistema automatizado Vitek 2 e do Maldi-TOF-MS na identificação das espécies de ECN, isolados de casos de ITU, principalmente *S. saprophyticus*. No presente trabalho, o Vitek 2 apresentou 98% de sensibilidade e 100% de especificidade, sendo que a sensibilidade para *S. saprophyticus* foi de 81,6%. Já o Maldi-TOF MS apresentou 100% de sensibilidade e especificidade. A concordância do sistema automatizado Vitek 2 com o ITS-PCR foi de 84,8% do total de ECN, sendo de 81,6% para *S. saprophyticus*. Diferentemente do sistema automatizado Vitek 2, no presente trabalho o Maldi-TOF MS mostrou uma excelente correlação com identificação do ITS-PCR, pois todas as amostras foram identificadas corretamente pelo aparelho.

Além desse trabalho, outros estudos realizados também mostram que o Maldi-TOF MS é mais eficiente para identificação das espécies de ECN do que o sistema automatizado Vitek 2. Em pesquisa realizada por Lee et al. (2013), Vitek 2 identificou corretamente 86,7% dos isolados, enquanto Maldi-TOF-MS 100% dos 30 isolados de *S. saprophyticus* de casos de ITU previamente identificados por sequenciamento. Dupont e colaboradores (2010) avaliam a acurácia de Maldi-TOF-MS e de Vitek 2 para a identificação de 234 isolados clínicos de ECN compostos de 20 espécies diferentes

identificadas pelo sequenciamento do gene *sodA*. Como resultado, Maldi-TOF-MS identificou corretamente 97,4% dos isolados, enquanto Vitek 2 identificou 78,6%.

No presente trabalho, 31 das 33 amostras identificadas erroneamente pelo aparelho Vitek 2 pertenciam a espécie *S. saprophyticus*, o que é preocupante por se tratar da principal espécie de ECN isolada de casos de ITU. De acordo com Spanu et al., (2003) o desempenho inferior do sistema Vitek 2 para identificação de ECN pode estar relacionado com as taxas relativamente baixas de metabolismo apresentados por essas espécies e um curto tempo de incubação. A possibilidade de falsos negativos dentro do curto tempo de incubação usado por este sistema pode muito bem contribuir para a identificação incorreta.

Os autores supracitados basearam essa afirmativa no problema que tiveram em suas pesquisas para a discriminação das espécies *S. hominis* e *S. warneri*. Segundo os autores, os perfis bioquímicos usados pelo sistema Vitek 2 para identificar essas duas espécies são em grande parte sobrepostos. As únicas diferenças são que *S. hominis* deverá produzir ácido a partir de lactose (mas não de manitol), ao passo que o inverso é o esperado de *S. warneri*. Uma vez que todos os dez isolados de *S. hominis* em questão não conseguiram produzir qualquer ácido a partir de lactose ou manitol no sistema Vitek 2, as amostras não podiam ser conclusivamente identificadas como *S. hominis* (devido à falta de produção de ácido a partir de lactose) ou como *S. warneri* (devido à falta de produção de ácido a partir de manitol).

Ferreira, et al. (2012), ao avaliarem a acurácia do Vitek 1 para identificação de estafilococos, semelhante aos resultados do presente trabalho, também relataram que a espécie mais identificada incorretamente pelo aparelho foi *S. saprophyticus*, devido principalmente à não detecção da resistência à novobiocina, e em *S. epidermidis* pela falha na prova da sacarose.

Por essas razões, sistemas automatizados como o Vitek 2, que se baseiam nas atividades metabólicas e/ou características morfológicas, apesar de permitirem que os microbiologistas identifiquem isolados bacterianos em nível de espécie com maior facilidade e rapidez do que o obtido anteriormente pelo método clássico (Kim, et al., 2008), estão sujeitos a erros na identificação (Lee et al., 2013).

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que Maldi-TOF MS é o melhor método para identificação das espécies de ECN. Além da identificação correta dos microrganismos, essa tecnologia traz consigo outras vantagens. Com a técnica de Maldi-TOF MS, a preparação e análise da amostra são simples e podem ser realizadas dentro de alguns minutos. Nenhuma etapa de lise especial é necessária para além da exposição à solução de matriz, e o aparelho não necessita de um operador especializado. Poucas células são necessárias para a análise no Maldi-TOF MS, e o perfil é gerado com consumo e custo mínimos. Muitas amostras podem ser processadas por dia, e, além disso, o custo da análise é muito mais barato se comparado ao de outras técnicas, o que compensa o alto custo para aquisição do equipamento.

### **Referências bibliográficas**

Alatoom, A.A., Cunningham, S.A., Ihde, S.M., Mandrekar, J., Patel, R., 2011. Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of gram-positive cocci by use of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 49, 2868-2873.

Alcaráz LE, Satorres SE, Lucero RM, Puig de Centorbi ON., 2003. Species identification, slime production and oxacillin susceptibility in coagulase-negative Staphylococci isolated from nosocomial specimens. *Braz J Microbiol.* 34, 45-51.

Argemi, X., Riegel, P., Lavigne, T., Lefebvre, N., Grandpré, N., Hansmann, Y., Jaulhac, B., Prévost, G., Schramm, F., 2015. Implementation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Routine Clinical Laboratories Improves Identification of Coagulase-Negative Staphylococci and Reveals the Pathogenic Role of *Staphylococcus lugdunensis*. *J Clin Microbiol.* 53, 2030-2036.

Becker, K., Harmsen, D., Mellmann, A., Meier, C., Schumann, P., Peters, G., von Eiff, C., 2004. Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol.* 42, 4988-4995.

Carbonnelle, E., Beretti, J.L., Cottyn, S., Quesne, G., Berche, P., Nassif, X., Ferroni, A., 2007. Rapid identification of *Staphylococci* isolated in clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 45, 2156-2161.

Chatzigeorgiou, K.S., Sergentanis, T.N., Tsiodras, S., Hamodrakas, S.J., Bagos, P.G., 2011. Phoenix 100 versus Vitek 2 in the identification of gram-positive and gram-negative bacteria: a comprehensive meta-analysis. *J Clin Microbiol.* 49, 3284-3291.

Clark, A.E., Kaleta, E.J., Arora, A., Wolk, D.M., 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 26, 547-603.

Dupont, C., Sivadon-Tardy, V., Bille, E., Dauphin, B., Beretti, J.L., Alvarez, A.S., Degand, N., Ferroni, A., Rottman, M., Herrmann, J.L., Nassif, X., Ronco, E., Carbonnelle, E., 2010. Identification of clinical coagulase-negative staphylococci, isolated in microbiology laboratories, by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry and two automated systems. *Clin Microbiol Infect.* 16, 998-1004.

Ferreira, A.M., Bonesso, M.F., Mondelli, A.L., da Cunha, Mde L., 2012. Identification of *Staphylococcus saprophyticus* isolated from patients with urinary tract infection using a simple set of biochemical tests correlating with 16S-23S interspace region molecular weight patterns. *J Microbiol Methods.* 91, 406-411.

Fletcher, R.H., Fletcher, S.W., Wagner, E.H., 1991. Diagnóstico. Em: Fletcher, R.H., Fletcher, SW, Wagner, EH, (Eds.). *Epidemiologia Clínica.* Artes Médicas, Porto Alegre, pp 68-107.

Guirguitzova, B., Chancova, D., Zozikov, B., 2002. The staphylococci as uropathogens, frequency of isolation in hospitalized patients and sensitivity to antimicrobial agents. *Ann Urol (Paris).* 36, 341–347.

Heikens, E., Fleer, A., Paauw, A., Florijn, A.C., Fluit, A., 2005. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol.* 43, 2286–2290.

Kim, M. Heo S.R., Choi, S.H., Kwon, H., Park J.S., Seong, M.W., Lee. D.H., Park, K.U., Song, J., Kim, E.C., 2008. Comparison of the MicroScan, VITEK 2, and Crystal GP with 16S rRNA sequencing and MicroSeq 500 v2.0 analysis for coagulase-negative *Staphylococci*. *BMC Microbiol.* 8,233.

Kloos, W.E., Bannerman, T.L., 1994. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol. Rev.* 7, 117–140.

Kloos, W.E., Schleifer, K.J., 1975. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol.* 1, 82–88.

Lee, T.F., Lee, H., Chen, C.M., Du, S.H., Cheng, Y.C., Hsu, C.C., Chung, M.Y., Teng, S.H., Teng, L.J., Hsueh, P.R., 2013. Comparison of the accuracy of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry with that of other commercial identification systems for identifying *Staphylococcus saprophyticus* in urine. *J Clin Microbiol.* 51, 1563-1566.

Pfaller, M.A., Herwaldt, L.A., 1998. Laboratory, clinical, and epidemiological aspects of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* 1, 281-299.

Sivadon, V., Rottman, M., Chaverot, S., Quincampoix, J.C., Avettand, V., de Mazancourt, P., Bernard, L., Trieu-Cuot, P., Féron, J.M., Lortat-Jacob, A., Piriou, P., Judet, T., Gaillard, J.L., 2005. Use of genotypic identification by *sodA* sequencing in a prospective study to examine the distribution of coagulase-negative *Staphylococcus* species among strains recovered during septic orthopedic surgery and evaluate their significance. *J Clin Microbiol.* 43, 2952-2954.

Smith, I.M., Beals, P.D., Kingsbury, K.R., Hasenclever, N.F., 1958. Observations on *Staphylococcus albus* septicemia in mice and men. *Arch Intern Med.* 102, 375–388.

Spanu, T., Sanguinetti, M., Ciccaglione, D., D'Inzeo, T., Romano, L., Leone, F., Fadda, G., 2003. Use of the VITEK 2 system for rapid identification of clinical isolates of *Staphylococci* from bloodstream infections. *J Clin Microbiol.* 41, 4259-4263.

## 5.2 Artigo II: Epidemiologia molecular, resistência antimicrobiana e fatores de virulência de *Staphylococcus saprophyticus* isolado de pacientes com infecção do trato urinário.

\*Artigo nas normas do *Journal of Clinical Microbiology*.

### Resumo

*Staphylococcus saprophyticus* é um agente etiológico comumente isolado de casos de infecções do trato urinário (ITU). Esse estudo objetiva caracterizar o perfil clonal, a presença de genes que codificam fatores de virulência relacionados a adesão, biofilme, toxinas, capacidade de produção de biofilme e o perfil de resistência aos antimicrobianos em amostras de *S. saprophyticus* isolado de casos de ITU de diferentes pacientes de Botucatu e outras cidades da região. Os genes de adesão *uafA* e *aas* foram encontrados em todas as amostras, enquanto o gene *UafB* foi encontrado em 1,2% das amostras. Já o gene *sdrI* foi encontrado em 8,9% das amostras. Quanto aos genes do operon *icaADBC*, 59 amostras (34,9%) apresentaram o operon *ica* completo. Das 169 amostras de *S. saprophyticus*, 119 (70,4%) produziram biofilme. Em 113 (66,8%) amostras foi encontrado pelo menos um gene de enterotoxina. Os resultados obtidos através da análise de PFGE permitiram identificar 41 perfis distintos, entre os quais foram encontrados 11 clones entre as 169 amostras de *S. saprophyticus*. Várias amostras altamente relacionadas foram encontradas entre os isolados nos anos 2008, 2013 e 2014. Além disso, sete clones estiveram dispersos em diferentes cidades. Quando a suscetibilidade antimicrobiana, 166 (98,2%) foram resistentes à oxacilina, 30 (17,7%) amostras foram resistentes a trimetoprim/sulfametoxazol, duas amostras (1,2%) apresentaram resistência intermediária à norfloxacin. O gene *mecA* foi encontrado em

cinco amostras de *S. saprophyticus* e quatro dessas amostras tiveram o SCCmec identificado e classificado como SCCmec tipo IV.

**Palavras-chave:** epidemiologia molecular, fatores de virulência, ITU, sensibilidade antimicrobiana, *S. saprophyticus*.

## INTRODUÇÃO

*S. saprophyticus* é o segundo mais frequente agente de infecção do trato urinário (ITU) (*E. coli* é o primeiro), sendo principalmente isolado de urina de mulheres jovens e sexualmente ativas (1,2). Apesar de ser mais frequentemente isolado na forma de cistite aguda não complicada (3), pode causar septicemia e pielonefrite (1,2), além de infecções em homens como uretrite, prostatite e nefrolitíase (4).

À diferença da maioria das espécies de estafilococos coagulase negativa (ECN), *S. saprophyticus* raramente é resistente aos agentes antimicrobianos utilizados para o seu tratamento (5,6); no entanto, *S. saprophyticus* resistente a antibióticos betalactâmicos e carreadores do gene *mecA* foi reportado (7).

Além da resistência aos antibióticos betalactâmicos, para que a ITU possa se estabelecer, *S. saprophyticus* expressa proteínas de superfície chamadas adesinas que se aderem a moléculas da superfície de células hospedeiras, incluindo aquelas da matriz extracelular. Essas proteínas da superfície das células bacterianas que promovem adesão são denominadas MSCRAMMs (componentes da superfície microbiana que reconhecem as moléculas adesivas da matriz) (8). Até o momento, quatro proteínas foram identificadas em *S. saprophyticus*. Estas proteínas são denominadas fator de uroadesão A (UafA), fator de uroadesão B (UafB), proteína de repetição serina-aspartato ligadora de colágeno I (SdrI) e autolisina (Aas), que também tem função adesiva (9,10).

Bactérias do gênero *Staphylococcus*, principalmente os ECN, também são conhecidas pela capacidade de produzir biofilme. A relevância desse fator de virulência se destaca principalmente por promover a evasão das células bacterianas do sistema imunológico do hospedeiro (11), além de diminuir drasticamente a suscetibilidade aos agentes antimicrobianos (12). Em *Staphylococcus* spp. o componente mais importante na adesão entre as células bacterianas na formação de biofilme é o polissacarídeo de adesão intercelular (PIA) (13) codificado pelo *locus ica* do *operon icaADBC* (14) que, junto com outros polímeros, como ácidos teicoicos e proteínas, formam a matriz extracelular chamada “*slime*” (15).

Outros fatores de virulência dos estafilococos são as toxinas extracelulares, como as enterotoxinas (EEs) e a toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) que apresentam atividade de superantígenos (16). Atualmente, são conhecidas 23 enterotoxinas sorologicamente distintas (17). As EEs estão associadas aos casos de intoxicação alimentar, entretanto, alguns estudos têm relatado o papel das EEs na patogênese de infecções sistêmicas em humanos (18).

Embora a ITU causada por *S. saprophyticus* tenha sido bem documentada, pouco se sabe sobre a epidemiologia molecular da espécie e se cepas específicas ou clones estão mais relacionados com infecções humanas. Além disso, poucos estudos reportam a resistência antimicrobiana, a disseminação geográfica da espécie, bem como a avaliação da presença de genes relacionados a fatores de virulência como EEs, TSST-1, adesinas e biofilme. Sendo assim, o estudo tem como objetivos caracterizar o perfil clonal, avaliar a dispersão desse patógeno, detectar a presença do gene *mecA*, tipagem do *SCCmec*, a presença de genes que codificam fatores de virulência relacionados a adesão, biofilme, EEs e TSST-1 e a capacidade de produção de biofilme em amostras de *S. saprophyticus* isolado de casos de ITU de diferentes pacientes de Botucatu e outras cidades da região.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Amostras.** Foram utilizadas no estudo amostras de *S. saprophyticus* isolado da urina de diferentes pacientes. Foram incluídas no estudo amostras enviadas ao Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HC-FMB) nos anos 2013 e 2014 e um banco de amostras previamente coletadas em 2008. As amostras são procedentes de enfermarias, ambulatórios, pronto-socorro e vários centros de saúde de Botucatu e região.

**Critérios de inclusão.** Foram incluídos no estudo indivíduos de ambos os sexos e de todas as idades, que tiveram uroculturas positivas para *S. saprophyticus* consideradas compatíveis com ITU, com contagem de colônias igual ou superior a 100.000 unidades formadoras de colônias por mililitro de urina ( $\geq 10^5$  UFC/mL) segundo os critérios de avaliação de Kass (19).

**Coleta.** Segundo o protocolo de coleta dos serviços, os pacientes foram orientados a coletar a urina de jato médio, com higiene prévia da região genital. Foi desprezado o primeiro jato e colhido o jato médio em frasco estéril apropriado, sendo o restante da micção desprezado. Em crianças e recém-nascidos a amostra foi obtida com auxílio de saco coletor colocado de maneira asséptica.

**Semeadura.** A urina foi homogeneizada e semeada com alça descartável (0,001 mL ou 1  $\mu$ L), sem centrifugação. A alça foi imersa na urina de forma vertical e a semeadura realizada através da técnica de esgotamento, utilizada para quantificação, sendo os resultados reportados em unidades formadoras de colônias por mililitro de urina (UFC/mL).

As amostras foram semeadas em placas contendo meio de ágar Cled (Cysteine Lactose Electrolyte-Deficient Medium) e ágar MacConkey (Oxoid, Basingstoke,

Inglaterra). As placas foram incubadas em estufa por 18 a 24 horas, à temperatura de 35°C, e após esse período foi realizado a contagem do número de colônias.

**Identificação fenotípica dos estafilococos.** Os isolados foram semeados em ágar sangue com 5% de sangue de carneiro (isolamento secundário) e corados pelo método do Gram, objetivando-se sua pureza e a observação de sua morfologia e coloração específica. Após a confirmação dessas características, as linhagens foram submetidas às provas de catalase, DNase e coagulase em tubo (padrão ouro), para distinção das espécies de *Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase negativa (ECN), conforme preconizado por Koneman et al., (20). Para identificação dos *S. saprophyticus*, todos os ECN foram identificados pelo método genotípico conforme descrito a seguir.

**Extração do DNA e identificação genotípica dos isolados de *S. saprophyticus*.** Nas amostras identificadas como espécies de ECN foi realizada a extração de DNA com o Kit Illustra® (GE Healthcare), sendo as extrações realizadas segundo as instruções do fabricante.

A identificação genotípica dos ECN foi realizada usando *primers* de sequências conservadas adjacentes aos genes 16S e 23S pela técnica Internal Transcribed Spacer PCR (ITS-PCR) descrita por Couto et al., (21) usando os primers G1 “GAAGTCGTAACAAGG” 16S e L1 “CAAGGCATCCACCGT” 23S. A eficiência das ampliações foi monitorada pela eletroforese em *agarose metaphor* 3% preparado em tampão 1,0 x TBE e corado com Saber Safe. Para controle dos resultados, foram utilizadas as seguintes linhagens de referência internacional: *S. epidermidis* (ATCC 12228), *S. epidermidis* (ATCC 35983), *S. haemolyticus* (ATCC 29970), *S. hominis* (ATCC 27844), *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* (ATCC 700237), *S. lugdunensis* (ATCC 700328), *S. saprophyticus* (ATCC 15305) e *S. warneri* (ATCC 10209).

### **Detecção do gene *mecA* de resistência à oxacilina e classificação do SCC*mec*.**

Para a detecção do gene *mecA* foram realizadas reações de PCR utilizando os *primers* *mecA1* (AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG) e *mecA2* (AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG) – 533 (pb), empregando os parâmetros descritos por Murakami et al., (22). Em todas as reações realizadas foram utilizadas linhagens de referência internacional: *S. aureus* ATCC 33591 (positivo) e *S. aureus* ATCC 25923 (negativo). Para a classificação do SCC*mec* em *S. saprophyticus* foram utilizados os primers para o *locus* específicos de cada tipo (23).

**Amplificação do DNA por PCR para detecção dos genes das adesinas (*sdrI*, *uafB1*, *uafB2* e *aas*) e biofilme (*operon icaADBC*).** A detecção dos genes das adesinas e do *operon ica* foi realizada utilizando os *primers* (tabela 1) e os parâmetros conforme preconizados por King et al., (9) Kleine et al., (24) e Arciola et al., (25).

**Tabela 1. Primers utilizados na PCR para detecção dos genes das adesinas e do operon *ica*.**

Gene	Sequência de nucleotídeos 5' a 3'	Produto amplificado (pb)	Referências
<i>uafA</i>	GTGCAACGAATACTGCGAAA	597	9
	CGTGTGCTCGTGTGTCTCTT		
<i>uafB</i>	GAGGATTTAGGTTTCAGCAATCG	506	9
	AAACCGTATCCCTGTTTAGCC		
<i>sdrI</i>	ACGCAGTAAGGAAGGCTCAA	587	9
	CTGACGGTTTAACTGCTTGG		
<i>aas</i>	ATTTGAGCAACACCACGATTAG	437	25
	TCCGACAGATTACTTATCTTGGG		
<i>icaA</i>	ACA GTC GCT ACG AAA AGA AA	103	25
	GGA AAT GCC ATA ATG AGA AC		
<i>icaC</i>	TAA CTT TAG GCG CAT ATG TTT	400	25
	TTC CAG TTA GGC TGG TAT TG		
<i>icaD</i>	ATG GTC AAG CCC AGA CAG AG	198	25
	CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA		
<i>icaB</i>	CTGATCAAGAATTTAAATCACAAA	302	25

**Amplificação do DNA por PCR para detecção dos genes das toxinas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seh*, *sei* e *tst*).** A detecção dos genes que codificam as enterotoxinas e TSST-1 foi realizada utilizando os *primers* (tabela 2) e os parâmetros conforme preconizado por Johnson et al., (26) e Jarraud et al., (27).

**Tabela 2. Primers utilizados na PCR para detecção dos genes das toxinas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* e *tst*).**

Gene	Sequência de nucleotídeos 5' a 3'	Produto amplificado (pb)	Referências
<i>sea</i>	TTGGAAACGGTTAAAACGAA	120	26
	GAACCTTCCCATCAAAAACA		
<i>seb</i>	TCGCATCAAACCTGACAAACG	478	26
	GCAGGTACTCTATAAGTGCC		
<i>sec</i>	GACATAAAAGCTAGGAATTT	257	26
	AAATCGGATTAACATTATCC		
<i>sed</i>	CTAGTTTGGTAATATCTCCT	317	26
	TAATGCTATATCTTATAGGG		
<i>see</i>	CAAAGAAATGCTTTAAGCAATCTTAG	482	26
	GCCAC		
	CTTACCGCCAAAGCTG		
<i>seg</i>	AATTATGTGAATGCTCAACCCGATC	642	27
	AAACTTATATGGAACAAAAGGTACTA		
	G TTC		
<i>seh</i>	CAATCACATCATATGCGAAAGCAG	376	27
	CATCTACCCAAACATTAGCACC		
<i>sei</i>	CTCAAGGTGATATTGGTGTAGG	576	27
	AAAAAACTTACAGGCAGTCCATCTC		
<i>tst</i>	ATGGCAGCATCAGCTTGATA	350	26
	TTTCCAATAACCACCCGTTT		

Os géis de agarose foram preparados em concentração de 2% em TBE 1X, corados com SYBER SAFE DNA Gel Stain® (Invitrogen) e visualizados em transiluminador de luz UV.

**Pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em placa de poliestireno (Christensen et al. 1985) modificado por Oliveira e Cunha (2010).** O método da pesquisa da produção de biofilme em placas de cultura proposto por Christensen et al., (28) foi utilizado com modificações propostas por Oliveira e Cunha (29). Esse método apresenta bases espectrofotométricas, baseando-se na leitura da densidade óptica (DO) do material aderente produzido pela bactéria.

Em todos os testes foram utilizadas linhagens de referência internacional como controles positivos (*S. aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 35983) e negativos (*S. aureus* ATCC 33591, *S. epidermidis* ATCC12228) e TSB estéril. A leitura da densidade óptica foi realizada no leitor de Elisa, da marca Labsystem, modelo Multiskan EX, em filtro de 540 nm. As amostras foram classificadas como negativas, quando o valor do ponto de corte correspondia à classificação de não aderente ( $\leq 0,111$ ), e em positivas, quando o valor do ponto de corte correspondia à classificação de fraco aderente ( $> 0,111$  ou  $\leq 0,222$ ) ou forte aderente ( $> 0,222$ ).

**Teste de sensibilidade antimicrobiana.** As amostras de *S. saprophyticus* foram avaliadas quanto a sensibilidade a vancomicina, oxacilina, sulfametoxazol/trimetoprim, ciprofloxacina e norfloxacina pela técnica de microdiluição.

Para a técnica de microdiluição em caldo na determinação da CIM para cada droga, foram utilizadas placas de microtitulação estéreis, com o caldo Müeller-Hinton ajustado com cátions (Oxoid, 1 U.K.), conforme recomendado pelo CLSI (30). Uma solução-estoque de cada droga foi preparada em água destilada na concentração de 3.200 µg/mL. Em placa de microtitulação foram feitas diluições seriadas das drogas nas concentrações de uma escala logarítmica de 2, compreendendo os *breakpoints* CLSI (30) para cada droga em caldo Müeller-Hinton, com um volume final de 100 µL. Das amostras isoladas, uma suspensão bacteriana com turvação correspondente a escala 0,5 de

McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL) foi preparada e diluída em 1:312, e foram adicionados 100  $\mu$ L em cada poço. As placas foram incubadas em estufa a 35°C e a leitura do MIC feita após 24 e 48 horas de incubação. Foram utilizados um controle positivo, contendo o caldo e a suspensão bacteriana, e um controle negativo, contendo apenas o caldo Müeller-Hinton. O MIC foi considerado como a menor concentração de antimicrobiano que inibiu completamente o crescimento do microrganismo, conforme detectado a olho nu: foram classificados com crescimento positivo os poços que apresentaram turvação e/ou presença de bactérias no fundo do poço. As amostras de *S. saprophyticus* foram consideradas sensíveis, com resistência intermediária ou resistente de acordo com os *breakpoints* estabelecidos para cada droga de acordo com o CLSI (30).

**Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).** A PFGE das amostras de *S. saprophyticus* isoladas foi feita segundo o protocolo modificado de McDougal et al., (31) Para análise de similaridade, cálculo dos coeficientes de correlação Dice e criação do dendograma pelo método UPGMA (*unweighted pair group method using arithmetic averages*) foi utilizado o *software* BioNumerics® (versão 6.1; Applied Maths, Bélgica).

**Georreferenciamento do serviço de saúde.** Com o intuito de possibilitar a melhor compreensão da dispersão desse patógeno entre os municípios, as coordenadas geográficas dos locais onde se encontram os serviços de saúde em que foram coletadas as amostras de indivíduos acometido por ITU por esse agente foram integradas em bases de dados que permitissem a utilização dos sistemas de informação geográfica – *geographical information systems* (GIS) – no *software* ArcGIS 10 (ESRI, Redlands, CA, USA).

## RESULTADOS

**Deteção dos genes das adesinas (*uafA* e *uafB*, *sdrI*, *aas*) e dos genes do operon *icaADBC*.** Foram coletadas 169 amostras de *S. saprophyticus* de diferentes pacientes com

ITU. Os genes da proteína de adesão, fator de uroadesão A (*uafA*) e a autolisina (*aas*) foram encontrados em todas as amostras de *S. saprophyticus*, enquanto o gene de uroadesão B (*UafB*) foi encontrado em duas (1,2%) amostras. Já o gene *sdrI* de adesão ao colágeno I foi encontrado em 15 (8,9%) amostras.

Quanto aos genes do *operon icaADBC*, da formação de biofilme, 132 (78,1%) amostras apresentaram pelo menos um dos genes do *operon*, sendo que em 59 amostras (34,9%) o *operon icaADBC* estava completo. Na tabela 3 se encontram os genes do *operon ica* encontrados nas amostras de *S. saprophyticus*.

**Tabela 3. Detecção dos genes do operon *ica* nas amostras de *S. saprophyticus***

<b>Genes do operon <i>ica</i></b>	<b>N (%)</b>
<i>icaA</i>	<b>1 (0,6)</b>
<i>icaC</i>	<b>2 (1,2)</b>
<i>icaAB</i>	<b>1 (0,6)</b>
<i>icaAD</i>	<b>11 (6,5)</b>
<i>icaDC</i>	<b>1 (0,6)</b>
<i>icaAC</i>	<b>10 (5,9)</b>
<i>icaBC</i>	<b>2 (1,2)</b>
<i>icaADC</i>	<b>26 (15,4)</b>
<i>icaABC</i>	<b>11 (6,5)</b>
<i>icaADB</i>	<b>8 (4,7)</b>
<i>icaADBC</i>	<b>59 (34,9)</b>
<b>Total de amostras</b>	<b>132 (78,1)</b>

**Avaliação da produção de biofilme em placa de poliestireno.** Todas as amostras de *S. saprophyticus* foram avaliadas quanto à produção de biofilme em placa de poliestireno. Das 169 amostras, 119 (70,4%) produziram biofilme, 88 (52,1%) amostras classificadas como forte-aderentes e 31 (18,3%) como fraco-aderentes.

Das 119 amostras produtoras de biofilme, 52 (43,7%) apresentavam o *operon* *icaADBC* completo, 47 (39,5%) amostras não apresentaram o *operon* completo, mas estava presente pelo menos o gene *icaA*, e em 20 (16,8%) amostras não foram encontrados genes do *operon* *icaADBC*.

**Deteção dos genes de toxinas.** Em 113 (66,8%) amostras foi encontrado pelo menos um gene de enterotoxina. O gene que codifica a toxina 1 da síndrome do choque tóxico (*tst-1*) não foi encontrado. Na tabela 4 se encontram os genes encontrados nas 113 amostras de *S. saprophyticus*.

**Tabela 4. Genes das enterotoxinas encontrados nas amostras de *S. saprophyticus***

<b>Gene</b>	<b>N (%)</b>
<i>sea</i>	10 (5,9)
<i>sec</i>	1 (0,6)
<i>sed</i>	2 (1,2)
<i>seg</i>	16 (9,4)
<i>sei</i>	7 (4,1)
<i>sea+seg</i>	5 (2,9)
<i>sea+sec</i>	3 (1,8)
<i>sea + sei</i>	4 (2,4)
<i>sea + sed</i>	1 (0,6)
<i>sec + seg</i>	4 (2,4)
<i>sec + sei</i>	1 (0,6)
<i>sed+ seg</i>	1 (0,6)
<i>seg+ sei</i>	12 (7,1)
<i>sea + seb + seg</i>	1 (0,6)
<i>sea + sec+ seg</i>	2 (1,2)
<i>sea + sed + seg</i>	3 (1,8)
<i>sea + seg + sei</i>	19 (11,2)
<i>sec + seg + sei</i>	2 (1,2)
<i>sea + seb + seg + sei</i>	7 (4,1)
<i>sea + sec + seg + sei</i>	12 (7,1)
<b>Total</b>	<b>113 (66,8)</b>

**Procedência das amostras, idade e sexo dos pacientes com infecção urinária causada por *S. saprophyticus*.** Das 169 amostras de *S. saprophyticus* isoladas, 70 (41,4%) foram procedentes de pacientes atendidos em postos de saúde de Botucatu e região, 41 (24,3%) de pacientes ambulatoriais, 50 (29,6%) atendidos nos prontos-socorros e 8 (4,7%) de enfermarias. A maior parte das amostras 162 (95,8%) foi procedente de pacientes não hospitalizados.

A análise do sexo e da idade dos pacientes com infecção urinária por *S. saprophyticus* (tabela 5) mostrou que a maioria era do sexo feminino (97%) e 148 (87,5%) tinham idade entre 11 e 49 anos.

**Tabela 5. Idade e sexo dos pacientes com infecção urinária causada por *S. saprophyticus*.**

Idade (anos)	Masculino	Feminino	Total (%)
	N (%)	N (%)	
2 a 8	2 (1,2)	2 (1,2)	4 (2,4)
11 a 15	1 (0,6)	23 (13,6)	24 (14,2)
16 a 20	0 (0,0)	29 (17,1)	29 (17,1)
21 a 25	0 (0,0)	31 (18,3)	31 (18,3)
26 a 30	0 (0,0)	15 (8,9)	15 (8,9)
31 a 39	1 (0,6)	33 (19,5)	34 (20,1)
40 a 49	0 (0,0)	17 (10,1)	17 (10,1)
50 a 60	0 (0,0)	11 (6,5)	11 (6,5)
> 60	1 (0,6)	3 (1,8)	4 (2,4)
Total (%)	5 (3%)	164 (97%)	169 (100,0)

**Identificação e distribuição dos clones de *S. saprophyticus* no município de Botucatu e região.** Os resultados obtidos através da análise de PFGE (Anexo 1: figura complementar) permitiram identificar o total de 41 perfis distintos, entre os quais foram encontrados 11 clones entre as 169 amostras. Dentre os clones identificados, o clone 1 e o clone 2 se destacam pelo número de amostras agrupadas e por serem os clones que mais

se dispersaram entre os municípios, além de terem agrupado amostras de três anos (2008, 2013, 2014) (tabela 6).

O clone 1, composto de 29 amostras, foi encontrado entre pacientes de seis municípios distintos em especial no município Botucatu, onde 23 amostras foram detectadas. O clone 2, constituído por 21 amostras, foi identificado em três cidades, sendo também mais isolado no município de Botucatu. Sete clones agruparam amostras dos anos 2008, 2013 e 2014, e três clones agruparam amostras dos anos 2008 e 2013. Na tabela 6 está descrito o número de isolados em cada um dos clones, número de cidades em que foram encontrados os clones e número de isolados por ano de coleta. A figura 1 é o mapa da dispersão dos 11 clones de *S. saprophyticus* pelo município de Botucatu e região.

**Tabela 6. Número de isolados em cada um dos clones, número de cidades em que foram encontrados os clones e número de isolados por ano de coleta.**

<b>Clones</b>	<b>Nº de isolados</b>	<b>Nº de cidades com isolamento</b>	<b>Nº de isolados (ano de isolamento)</b>
1	29	6	9 (2008); 14 (2013); 6 (2014)
2	21	3	10 (2008); 5 (2013); 6 (2014)
3	15	1	9 (2008); 3 (2013); 3 (2014)
4	10	2	2 (2008); 8 (2013)
5	8	1	6 (2008); 2 (2013)
6	6	2	1 (2008); 3 (2013); 2 (2014)
7	6	2	3 (2008); 1 (2013); 2 (2014)
8	6	1	1 (2008); 4 (2013); 1 (2014)
9	5	2	2 (2008); 2 (2013); 1 (2014)
10	5	1	2 (2008); 3 (2013)
11	4	2	2 (2013); 2 (2014)

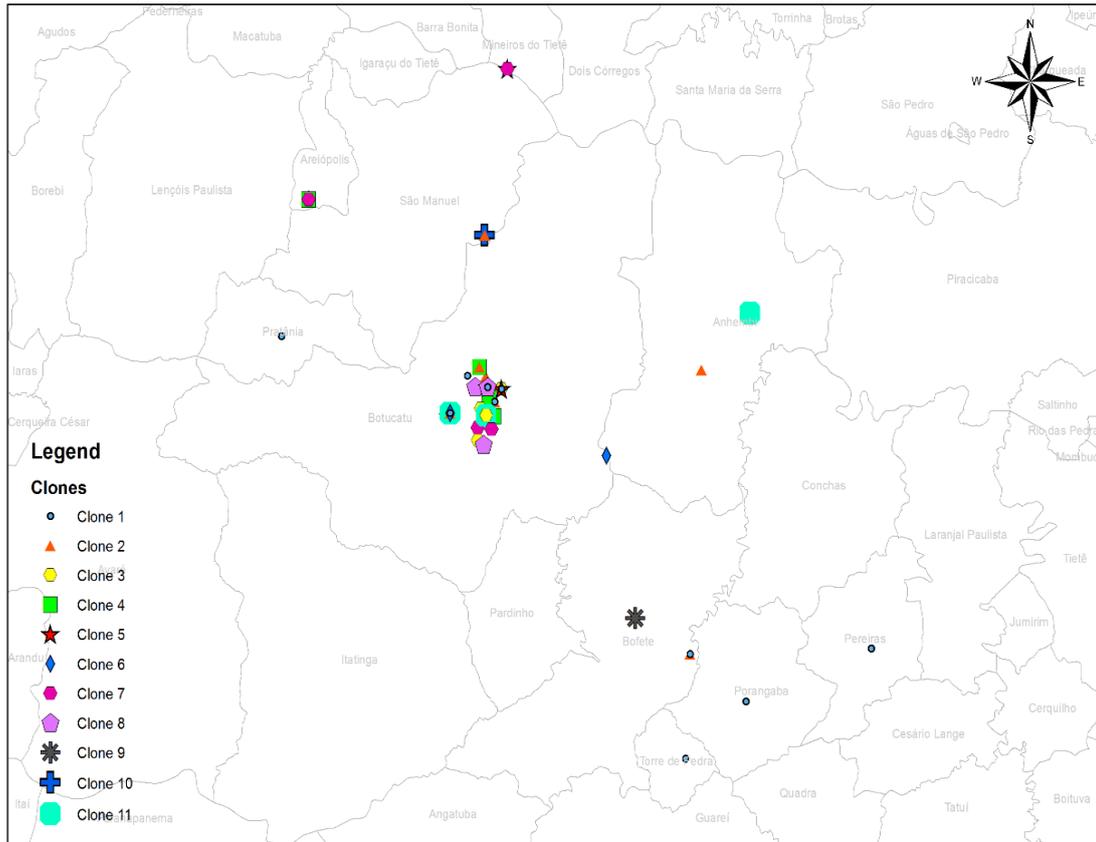


Figura 1. Georreferenciamento das unidades de saúde com casos de ITUs por *S. saprophyticus* no município de Botucatu e região.

### **Virulência dos clones de *S. saprophyticus* isolado de pacientes com ITU.**

Quanto aos genes de fatores de virulência (tabela 7), em todos os clones foram encontrados genes das EEs. Os genes das adesinas *uafA* e *aas*, como estiveram presentes em todas as amostras, conseqüentemente estão em todos os clones, já o gene *sdrI* foi encontrado em 13 isolados, sendo em oito amostras do clone 1 e em cinco amostras do clone 3.

Para os genes do *operon icaADBC* do biofilme, três clones (clone 1, clone 7 e clone 8) apresentaram todas as amostras com o *operon* completo, o clone 10 não

apresentou nenhum gene do *operon* e os demais clones (2, 3, 4, 5, 6, 9 e 11) apresentaram amostras com pelo menos um dos genes.

Quanto à produção de biofilme, todas as amostras dos clones 1, 2, 5 e 8 produziram biofilme, e somente um clone (clone 9) não apresentou alguma amostra produtora de biofilme. Os demais clones apresentaram pelo menos uma amostra produtora. Todos os fatores de virulência pesquisados encontrados em cada clone se encontram na tabela 7.

**Tabela 7. Características dos clones de *S. saprophyticus* isolado de pacientes com ITU.**

Clones	Nº de amostras	Genes EEs	Genes adesinas	<i>Operon ica</i> completo	Genes <i>ica</i> ADBC	Produção de biofilme
1	29	A (29), G (19), I (19)	<i>uafA</i> (29), <i>sdrI</i> (8), <i>aas</i> (29)	29	<i>icaA</i> (29), <i>icaB</i> (29), <i>icaC</i> (29), <i>icaD</i> (29)	29 amostras produtoras
2	21	A (5), G (21)	<i>uafA</i> (21), <i>aas</i> (21)	-	<i>icaA</i> (21), <i>icaC</i> (21), <i>icaD</i> (21)	21 amostras produtoras
3	15	A (15), C (12), D (3), G (15), I (12)	<i>uafA</i> (15), <i>sdrI</i> (5), <i>aas</i> (15)	-	<i>icaA</i> (3), <i>icaC</i> (3), <i>icaD</i> (3)	10 amostras produtoras
4	10	A (3), I (3)	<i>uafA</i> (10), <i>aas</i> (10)	-	<i>icaA</i> (7), <i>icaD</i> (7)	6 amostras produtoras
5	8	A (8), C (8), G (8)	<i>uafA</i> (8), <i>aas</i> (8)	-	<i>icaA</i> (8), <i>icaB</i> (8), <i>icaC</i> (8)	8 amostras produtoras
6	6	A (6), B (6), C (6), I (6)	<i>uafA</i> (6), <i>aas</i> (6)	-	<i>icaA</i> (3), <i>icaD</i> (3)	2 amostras produtoras

**Tabela 7. Continuação**

<b>Clones</b>	<b>N° de amostras</b>	<b>Genes EEs</b>	<b>Genes adesinas</b>	<b>Operon <i>ica</i> completo</b>	<b>Genes <i>ica</i>ADBC</b>	<b>Produção de biofilme</b>
7	6	A (3), C (3)	<i>uafA</i> (6), <i>aas</i> (6)	6	<i>icaA</i> (6), <i>icaB</i> (6), <i>icaC</i> (6), <i>icaD</i> (6)	4 amostras produtoras
8	6	G (6), I (6)	<i>uafA</i> (6), <i>aas</i> (6)	6	<i>icaA</i> (6), <i>icaB</i> (6), <i>icaC</i> (6), <i>icaD</i> (6)	6 amostras produtoras
9	5	G (5), I (5)	<i>uafA</i> (5), <i>aas</i> (5)	-	<i>icaA</i> (1)	0 amostra produtora
10	5	A (0), B (0), C (3), D (1), E (0), G (3), H (0), I (3)	<i>uafA</i> (5), <i>aas</i> (5)	-	-	2 amostras produtoras
11	4	A (0), B (0), C (1), D (4), E (0), G (1), H (0), I (1)	<i>uafA</i> (4), <i>aas</i> (4)	-	<i>icaC</i> (2)	1 amostra produtora

**Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), detecção do gene *mecA* de resistência à oxacilina e classificação do SCC*mec*.** Das 169 amostras de *S. saprophyticus*, 166 (98,2%) foram resistentes à oxacilina com a CIM<sub>50</sub> de 1 µg/mL e CIM<sub>90</sub> de 2 µg/mL. Além disso, 30 (17,7%) amostras foram resistentes ao trimetoprim/sulfametoxazol com a CIM<sub>50</sub> de 0,125/2,38 µg/mL e CIM<sub>90</sub> de 4/76 µg/mL. Duas amostras (1,2%) apresentaram resistência intermediária à norfloxacin, com a CIM<sub>50</sub> de 2 µg/mL e CIM<sub>90</sub> de 4 µg/mL. Todas as amostras foram sensíveis à vancomicina, com a CIM<sub>50</sub> de 1 µg/mL e CIM<sub>90</sub> de 2 µg/mL, e à ciprofloxacina, com a CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> de 0,25 µg/mL (tabela 8).

O gene *mecA* foi encontrado em cinco amostras, e quatro dessas amostras tiveram o SCC*mec* identificado e classificado como SCC*mec* tipo IV.

**Tabela 8. Sensibilidade antimicrobiana de amostras de *S. saprophyticus* (CIM).**

Antimicrobianos (µg/mL)					
	Van	Oxa	Nor	Cip	Trim/Sut
CIM <sub>50</sub>	1	1	2	0,25	0,125/2,38
CIM <sub>90</sub>	2	2	4	0,25	4/76
Variação	0,5 – 2	≤ 0,25-256	1-8	≤ 0,125 –	≤ 0,03/0,59 – 16/304

Van: Vancomicina; Oxa: Oxacilina; Nor: Norfloxacin; Cip: Ciprofloxacina; Trim/Sut: Trimetoprim/Sulfametoxazol.

## DISCUSSÃO

Com relação aos fatores de virulência, todos os quatro genes relacionados a adesão de *S. saprophyticus* às células do hospedeiro (*uafA*, *uafB*, *sdrI* e *aas*) foram encontrados nas amostras estudadas. O gene da adesina UafA, proteína que se adere às células

uroepiteliais do hospedeiro, e o gene da autolisina Aas, proteína autolisina que se liga à fibronectina (10), foram encontrados em 100% das amostras, enquanto o gene da adesina SdrI, proteína que se liga ao colágeno I e a fibronectina (32, 33), e o da UafB, proteína que se liga a fibronectina, fibrinogênio e às células uroepiteliais (9), foram encontrados com menos frequência (8,9% e 1,2%, respectivamente).

Esses resultados corroboram com os dados encontrados na literatura em que os genes das adesinas UafA e Aas estão presentes em todas as amostras de *S. saprophyticus*, enquanto *sdrI* se encontra em 5% a 10% dos isolados (24). Para King et al., (9) a prevalência do gene *uafB* foi de 5,5%, e a do gene *sdrI* foi de 6,6% para o mesmo conjunto de amostras de *S. saprophyticus*. Quanto ao gene da adesina *uafB*, essa foi a mais recente proteína de uroaderência descoberta em *S. saprophyticus*. O gene está localizado em um plasmídeo, e os estudos indicam a possibilidade de que esse gene possa ser transmitido entre as diferentes espécies de estafilococos (9).

Em todas as amostras foram encontrados pelo menos dois genes de adesinas, o que revela a importância dessas proteínas adesivas na fixação do microrganismo aos tecidos do hospedeiro, especialmente ao tecido uroepitelial, o que é um passo crucial na patogênese da ITU por *S. saprophyticus* (34).

Além da adesão ao tecido do hospedeiro para o desenvolvimento da ITU, essas adesinas encontradas podem funcionar com um primeiro passo para que o microrganismo possa produzir biofilme, pois, no processo de produção de biofilme, o microrganismo precisa inicialmente aderir a uma superfície para que posteriormente ocorra a adesão intercelular com proliferação e acumulação de células em multicamadas, resultando na formação do biofilme maduro (15,35).

Em comparação com *S. epidermidis* e *S. aureus*, infecções associadas ao biofilme com outras espécies de ECN são muito menos frequentes (15). De fato, a produção de

biofilme por *S. saprophyticus* e sua implicação em ITU ainda é pouco relatada na literatura. Entretanto, o resultado obtido nesse trabalho ressalta a importância desse fator de virulência nessa espécie, considerando que de um total de 169 amostras, a maioria (70,4%) foi produtora de biofilme. Esses resultados sugerem que na ITU por *S. saprophyticus* a formação de biofilme é provavelmente um determinante crucial da doença, embora mais pesquisas devam ser realizadas para uma conclusão definitiva.

Do total de amostras produtoras de biofilme, as 59 que apresentavam o *operon icaADBC* completo foram produtoras de biofilme. Esse resultado permite supor que, provavelmente, nessas amostras o PIA seja o principal responsável pela produção de biofilme, embora a avaliação da composição do biofilme tenha que ser realizada para confirmação, visto que estudos indicam diferenças na composição e na estrutura do biofilme dependente de PIA quando comparado ao biofilme proteico (36).

Com relação ao biofilme independente de PIA, em 67 amostras produtoras de biofilme 47 não apresentavam o *operon* completo e em 20 não foi encontrado genes de *operon ica*, o que indica a ocorrência de produção por mecanismos *ica*-independentes nessas amostras.

Estudos têm destacado a existência de mecanismos *ica*-independentes de PIA no gênero *Staphylococcus* (37,38). A primeira descrição do mecanismo de produção de biofilme *ica*-independente foi observada em uma amostra de *S. aureus* isolada de um caso de mastite bovina. A cepa em questão demonstrou que a proteína associada a adesão (Bap) foi essencial tanto para promover a aderência quanto para a adesão intercelular e acúmulo, resultando na formação do biofilme (39). A mutação no *locus ica* nessa cepa não impediu a produção de biofilme (35).

Em cepas de *S. epidermidis* também foi observada a produção de biofilme independente de PIA, sendo a adesina denominada proteína associada ao acúmulo (Aap) a responsável pela aderência e formação de biofilme (38).

Essas pesquisas demonstram que algumas das proteínas adesinas parecem ser as mais prováveis substitutas de PIA (37,40). Em *S. saprophyticus*, não há trabalhos que associem suas adesinas à formação de biofilme, portanto mais pesquisas devem ser realizadas com *S. saprophyticus* produtor de biofilme *ica*-independente para melhor compreensão dos mecanismos de produção de biofilme.

Com relação aos superantígenos, as EEs produzidas por *S. aureus* e seu papel tanto na intoxicação alimentar quanto em doenças em humanos têm sido exaustivamente descritos. Já os estudos do potencial toxigênico dos ECN e seu papel nas intoxicações alimentares e nas doenças em humanos ainda são escassos, pelo fato de serem considerados por muito tempo como microrganismos não patogênicos. Entretanto, mais atenção deveria ser dada a esse grupo, visto que fatores de virulência originalmente identificados somente em *S. aureus* como as EEs já foram identificados no genoma de diversas espécies de ECN (41,42).

Quanto à detecção dos genes de EEs em *S. saprophyticus*, são escassos os trabalhos envolvidos na pesquisa do potencial toxigênico dessa espécie, entretanto, Kuroda et al., (43) ao sequenciarem o genoma da cepa ATCC 15305, afirmaram que na espécie não é encontrado nenhum fator de virulência geralmente encontrado em *S. aureus*, incluindo os genes para EEs. Os resultados obtidos no presente trabalho contradizem essa afirmativa em relação aos genes para EEs, haja vista que 66,8% das amostras apresentaram algum gene para EE, entretanto é preciso considerar que o autor pesquisou apenas uma única cepa, enquanto nesse trabalho foram pesquisadas 169 amostras isoladas de casos de ITU.

Além dos fatores de virulência encontrados, a análise da PFGE mostrou a presença de um grupo bastante heterogêneo de *S. saprophyticus* associado a casos de ITU, além de vários clones associados a ITU. Várias amostras altamente relacionadas foram encontradas entre as amostras dos anos 2008, 2013 e 2014. Além disso, sete clones estiveram dispersos em diferentes cidades, e o clone 1 foi o que mais se dispersou, encontrado em seis cidades, o que é justificável pelo fato de ser o clone com maior número de amostras. Esses resultados permitem afirmar que alguns clones de *S. saprophyticus* estão espalhados a grandes distâncias geográficas e que esses clones podem persistir por longos períodos de tempo (2008 a 2014), pois, das 57 amostras de 2008, 45 (79%) estiveram distribuídas entre 10 dos 11 clones e agruparam com amostras de 2013 e/ou 2014.

Isso significa que esses isolados apresentam mecanismos que lhes permitem se disseminar e persistir por longos períodos. No presente trabalho, foram pesquisados alguns dos principais fatores de virulência e foi observado que todas as amostras do clone com maior número de isolados (clone 1) apresentavam o *operon ica* completo, e todas foram produtoras de biofilme, além de algumas amostras portarem o gene da adesina *sdrI*. O terceiro clone com mais isolados (clone 3) também apresentou amostras portadoras do gene *sdrI*, e os clones 6 e 7 também apresentaram o *operon ica* completo. Além disso, das 119 amostras produtoras de biofilme, 89 (74,8%) foram amostras que se agruparam em clones. Esses resultados mostram que a produção de biofilme é um importante fator de virulência que permite a persistência dos clones por longos períodos de tempo, com destaque para o *operon ica*ADBC completo e do gene da adesina *sdrI* que estiveram presentes no clone majoritário (clone 1 com 29 isolados).

Resultados semelhantes ao do presente trabalho em relação a dispersão de clones foram observados por Widerstrom et al., (44) ao realizarem um estudo comparando os

perfis obtidos na análise de PFGE de 76 isolados de *S. saprophyticus* isolado de mulheres com infecção urinária no norte da Suécia, no período de 1995 a 1997, com 50 amostras obtidas em 2006 de cinco locais diferentes do norte da Europa. Foram encontrados 47 perfis diferentes na PFGE entre os 126 isolados e também várias amostras altamente relacionadas foram encontradas entre as amostras do período de 1995 a 1997 e 2006, num total de dez clones dispersos por diferentes países do norte da Europa.

A dispersão de clones de *S. saprophyticus* por várias regiões pode ter ocorrido pelo fato de que o *S. saprophyticus* está amplamente difundido no ecossistema, e uma diversidade de produtos alimentares está contaminada pela espécie, o que conseqüentemente conduz à colonização do trato gastrintestinal humano (45-47). Como as origens de produtos alimentares são de vários lugares, tanto nacionais como internacionais, os seres humanos em uma área específica são provavelmente expostos a cepas de *S. saprophyticus* provenientes de diferentes regiões geográficas e talvez outros países. Viagens nacionais e internacionais também podem facilitar a aquisição de estirpes de *S. saprophyticus* de outras localizações geográficas (44)

Rupp et al., (48) determinaram que a prevalência de colonização de *S. saprophyticus* do trato urogenital em mulheres saudáveis foi de 6,9%, e o local mais comum de colonização foi o reto, o que explica o fato de a maior parte de casos de ITU por *S. saprophyticus* ocorrer em mulheres jovens, pois, por volta da adolescência, as alterações hormonais favorecem a colonização vaginal por bactérias que, migrando para a área periuretral, podem ascender pelo trato urinário, causando infecção (49,50). O trabalho de Hedman et al., (51) reforça essa afirmativa, pois os autores identificaram o mesmo clone de *S. saprophyticus* nas fezes e na urina de pacientes com ITU.

*S. saprophyticus* é o segundo microrganismo mais frequentemente isolado em mulheres jovens e sexualmente ativas, pois relações sexuais são um dos fatores de risco

mais importantes para o desenvolvimento de ITU atribuível a esse agente etiológico que raramente é isolado de pacientes hospitalizados (52,53). No presente trabalho, dos 169 casos de ITU, a maioria dos pacientes era do sexo feminino (97%) e 87,5% eram pacientes jovens, com idade entre 11 e 49 anos. Dos 164 isolados de mulheres, apenas sete foram isolados de pacientes que estavam internados nas enfermarias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu/Unesp. As demais 157 amostras foram isoladas de pacientes da comunidade.

Quanto aos isolados de pacientes do sexo masculino, apenas cinco amostras de *S. saprophyticus* foram isoladas desses pacientes, sendo que as idades variaram de 2 a 82 anos, o que mostra que, apesar de ser mais comum em mulheres, *S. saprophyticus* também pode causar infecção urinária em homens de todas as idades. Há relatos na literatura do microrganismo isolado em homens jovens (54) e em homens idosos com cateteres urinários (55). A espécie é relativamente rara em homens hospitalizados (56). Nesse estudo, apenas um paciente com ITU se encontrava internado na enfermaria da gastroenterologia e tinha 66 anos de idade.

Quanto ao perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, os isolados de *S. saprophyticus* foram sensíveis a quase todos os antibióticos testados. Esses resultados estão de acordo com dados anteriormente relatados em que a prevalência da resistência é geralmente baixa (57-60).

Entretanto, amostras resistentes a trimetoprim/sulfametoxazol foram encontradas, com taxas de resistência de 17,7% dos isolados. Esse percentual de amostras resistentes a trimetoprim/sulfametoxazol pode ser explicada pelo fato de a droga ser muito utilizada na terapia empírica para o tratamento de cistite não complicada (61).

Com isso, a detecção de isolados resistente a essa droga nesse estudo é preocupante, pois pode levar à falha terapêutica quando utilizada de modo empírico para

tratamento de ITU. Relatórios provenientes do Canadá e dos EUA indicam que a prevalência de resistência a trimetoprim/sulfametoxazol é superior a 15% e pode chegar a 25% (62). Por essa razão, o uso de fluoroquinolonas é recomendado para UTI não complicada em áreas onde a incidência de resistência a trimetoprim/sulfametoxazol é superior a 10%, bem como para o tratamento de infecções do trato urinário complicadas e pielonefrite aguda (62).

As fluoroquinolonas têm sido utilizadas com sucesso para tratar uma ampla gama de infecções comunitárias e adquiridas no hospital, e as taxas de resistência permanecem baixas (62). No presente trabalho, apenas duas amostras (1,2%) apresentaram resistência intermediária à norfloxacin, e todas as amostras foram sensíveis a ciprofloxacina, uma fluoroquinolona amplamente utilizada com elevada atividade bactericida contra uropatógenos e que apresenta uma eficácia clínica bem estabelecida no tratamento de infecções do trato urinário (62,63).

Quanto à oxacilina, 98,2% dos isolados foram classificados como resistentes no presente trabalho pelo método de microdiluição, entretanto apenas cinco amostras carregavam o gene *mecA*. Isso ocorreu devido ao *breakpoint* preconizado pelo CLSI superestimar a resistência à oxacilina em *S. saprophyticus*. Diante dessa situação, Higashide e colaboradores (64) propuseram um novo *breakpoint* para detecção da resistência mediada pela presença do gene *mecA* em *S. saprophyticus*. Assim, segundo os autores, para a oxacilina, a CIM  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$  é considerada resistente. Se considerarmos o valor da CIM proposto pelos autores, apenas as cinco amostras que foram positivas para *mecA* no presente trabalho seriam consideradas resistentes, já que foram as que apresentaram a CIM mais elevada, variando de 128  $\mu\text{g/mL}$  a 256  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto nas amostras negativas para o gene *mecA* (161 amostras), a CIM variou de  $\leq 0,25$   $\mu\text{g/mL}$  a 2  $\mu\text{g/mL}$ .

Isolados de *S. saprophyticus* resistentes aos antibióticos betalactâmicos carreadores do gene *mecA* têm sido relatados. O primeiro relato da espécie carreadora do gene *mecA* ocorreu no Japão, em 1991, (22) depois surgiram outros relatos em isolados clínicos de *S. saprophyticus*. No Canadá, Hussain et al., (65) encontraram duas amostras positivas para o gene *mecA*; no Brasil, Antunes et al., (66) encontraram cinco isolados de hemocultura, e Ferreira et al., (67) encontraram duas amostras de isolados de pacientes com ITU.

No presente trabalho, dos cinco isolados *mecA* positivos, quatro foram tipados e caracterizados com SCC*mec* tipo IV, e um isolado não foi tipado. As quatro amostras SCC*mec* tipo IV foram isoladas de pacientes de centros de saúde e possuíam o mesmo perfil de sensibilidade, sendo resistentes somente à oxacilina e sensíveis a todos os outros antimicrobianos testados, porém são linhagens distintas, conforme observado na tipagem por PFGE.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Golledge CL.** 1988. *Staphylococcus saprophyticus* bacteremia. J Infect Dis **157**: 215.
2. **Lee W, Carpenter RJ, Phillips LE, Faro S.** 1987. Pyelonephritis and sepsis due to *Staphylococcus saprophyticus*. J Infect Dis **155**: 1079-1080.
3. **Nicolle, L.E.** 2008. Uncomplicated urinary tract infection in adults including uncomplicated pyelonephritis. Urol Clin North Am **35**: 1-12.
4. **Raz R, Colodner R, Kunin CM.** 2005. Who are you—*Staphylococcus saprophyticus*? Clin Infect Dis **40**:896–8.
5. **Nicolle LE, Harding GK.** 1982. Susceptibility of clinical isolates of *Staphylococcus saprophyticus* to fifteen commonly used antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother **22**:895–896.
6. **Kahlmeter G.** 2003. An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO.SENS Project. J Antimicrob Chemother **51**: 69-76.

7. **Söderquist B, Berglund C.** 2009. Methicillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus* in Sweden carries various types of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec). *Clin Microbiol Infect* **15**: 1176-1178.
8. **Foster TJ, Höök M.** 1998. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* **6**: 484-488.
9. **King NP, Beatson SA, Totsika M, Ulett GC, Alm RA, Manning PA, Schembri MA.** 2011. UafB is a serine-rich repeat adhesin of *Staphylococcus saprophyticus* that mediates binding to fibronectin, fibrinogen and human uroepithelial cells. *Microbiol* **157**: 1161-1175.
10. **Hell W, Meyer HG, Gatermann SG.** 1998. Cloning of *aas*, a gene encoding a *Staphylococcus saprophyticus* surface protein with adhesive and autolytic properties. *Mol Microbiol* **29**: 871-881.
11. **Hanke ML, Kielian T.** 2012. Deciphering mechanisms of *staphylococcal* biofilm evasion of host immunity. *Front Cell Infect Microbiol* **2**: 62.
12. **Donlan RM.** 2001. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis* **33**: 1387-1392.
13. **Vuong C, Kocianova S, Voyich JM, Yao Y, Fischer ER, DeLeo FR, Otto M.** 2004. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem* **279**:54881-54886.
14. **Conlon KM, Humphreys H, O'Gara JP.** 2002. Regulation of *icaR* gene expression in *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol Lett.* **216**:171-177.
15. **Otto M.** *Staphylococcal Biofilms.* 2008. *Curr Top Microbiol Immunol.* **322**:207-28.
16. **Mehrotra M, Wang G, Johnson WM.** 2000. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J Clin Microbiol* **38**:1032-1035.
17. **Argudín MA, Mendoza MC, Rodicio MR.** 2010. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins* **2**:1751-1773.
18. **Podkowika M, Parkb JY, Seob KS, Bystrońa J. Bania J.** 2013. Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. *Int J Food Microbiol* **163**: 34-40.
19. **Kass EH.** 1956. Asymptomatic infections of the urinary tract. *Trans Assoc Am Phys* **69**: 56-64.
20. **Konemman EV, Allen SD, Sowell VR, Sommer HM.** 2001. Introdução à microbiologia médica. In: *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido.* 5 ed. Rio de Janeiro: Medsi.

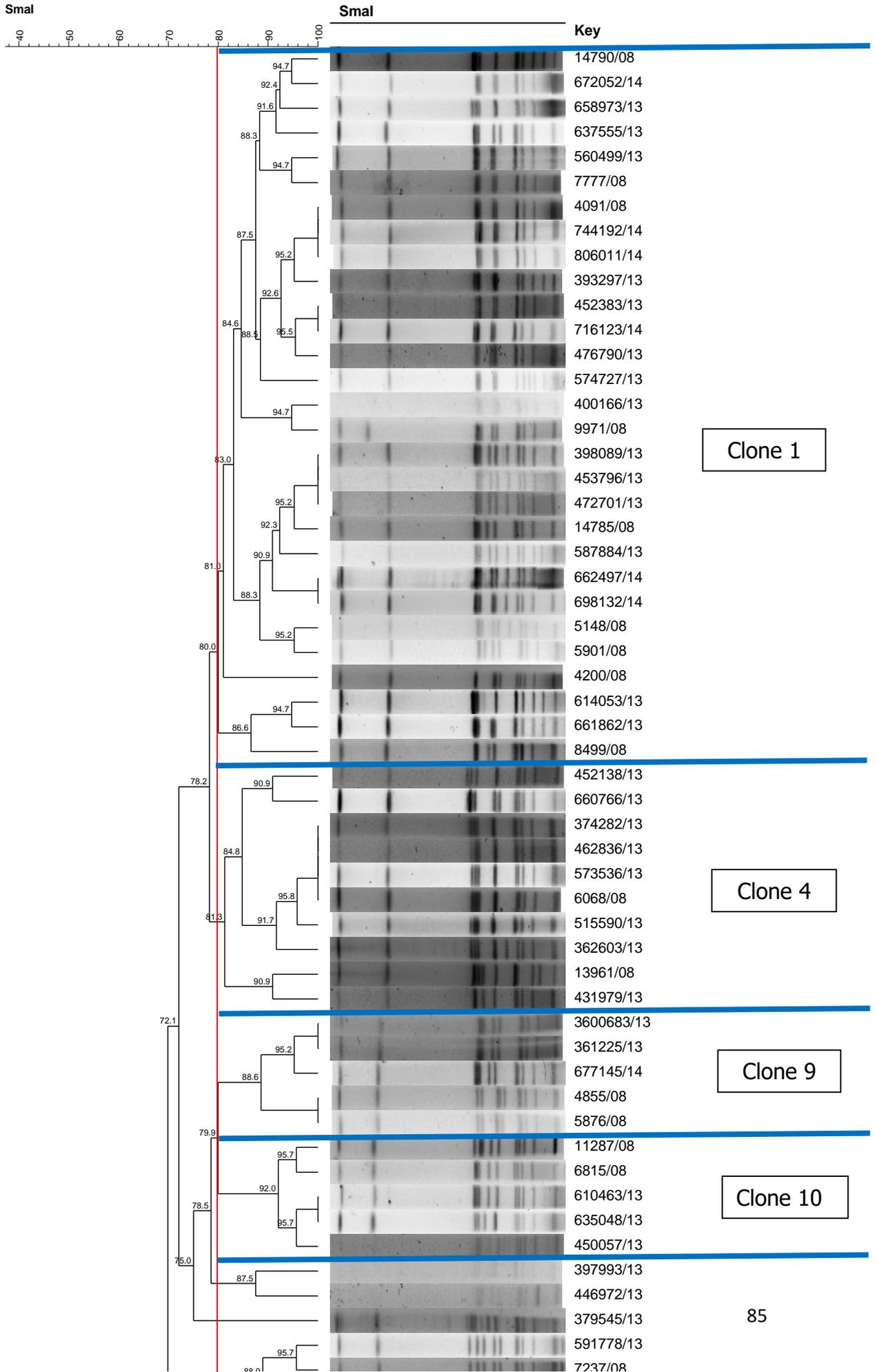
21. **Couto I, Pereira S, Miragaia M, Sanches IS, Lencastre H.** 2001. Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by internal transcribed spacer PCR. *J Clin Microbiol* **39**:3099-3103.
22. **Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S.** 1991. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **29**: 2240–2244.
23. **Machado ABMP, Reiter KC, Paiva RM, Barth AL.** 2007. 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* **56**: 1328–1333.
24. **Kleine B, Gatermann S, Sakiñç T.** 2010. Genotypic and phenotypic variation among *Staphylococcus saprophyticus* from human and animal isolates. *BMC Res Notes* **3**:163.
25. **Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L.** 2001. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol* **39**: 2151-2156.
26. **Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR, Rozee KR.**1991. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **29**: 426-430.
27. **Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugner H, Forey F, Nesme X, Etienne J, Vandenesch F.** 2002. Relationships between *Staphylococcus aureus* Genetic Backgrounds, Virulence Factors, agr Groups (Alleles), and Human Disease. *Infect Immun* **70**:631-641.
28. **Christensen GD, Simpson WA, Yonger 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* **22**:996-06.
29. **Olivira A, Cunha MLRS.** 2010. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. *BMC Res Notes* **3**: 260.
30. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Approved Standard M100-S22. (National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa).
31. **Mcdougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, Mcallister SK, Tenover FC.** 2003. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the United States: Establishing a National Database. *J Clin Mycrobiol* **41**: 5113-5120.

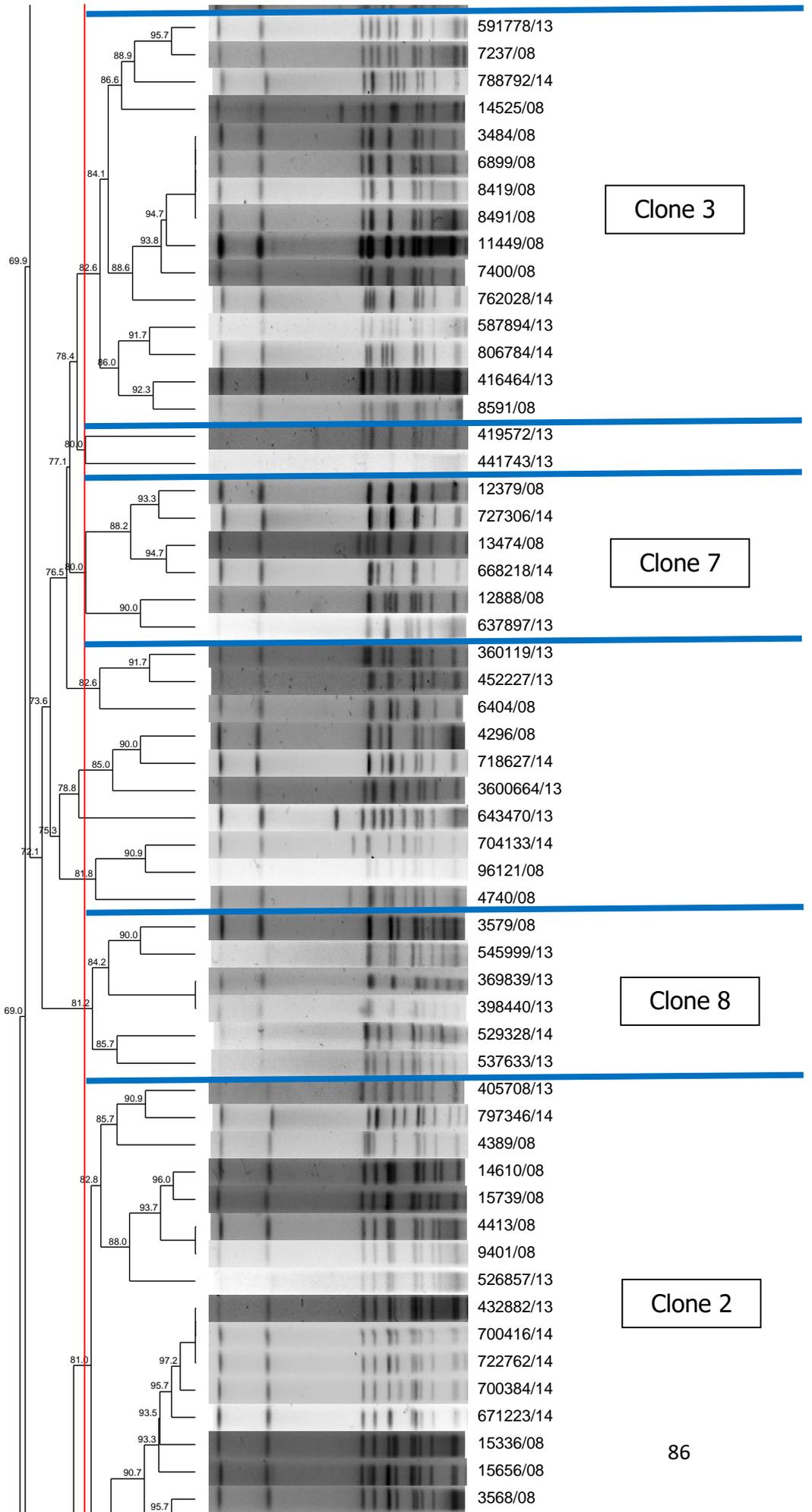
32. **Sakinç T, Kleine B, Gatermann SG.** 2006. SdrI, a serine-aspartate repeat protein identified in *Staphylococcus saprophyticus* strain 7108, is a collagen-binding protein. *Infect Immun* **74**: 4615–4623.
33. **Sakinç T, Kleine B, Michalski N, Kaase M, Gatermann SG.** 2009. SdrI of *Staphylococcus saprophyticus* is a multifunctional protein: localization of the fibronectin-binding site. *FEMS Microbiol Lett* **301**: 28–34.
34. **King NP, Sakinç T, Bem Zakour NL, Totsika M, Heras B, Simerska P, Shepherd M, Gatermann SG, Beatson SA, Schembri MA.** 2012. Characterisation of a cell wall-anchored protein of *Staphylococcus saprophyticus* associated with linoleic acid resistance. *BMC Microbiol* **15**:12.
35. **Cucarella C, Tormo MA, Ubeda C, Trotonda MP, Monzón M, Peris C, Amorena B, Lasa I, Penadés JR.** 2004. Role of biofilm associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **72**: 2177–2185.
36. **Hennig S, Nyunt Wai, S, Ziebuhr W.** 2007. Spontaneous switch to PIA-independent biofilm formation in an ica-positive *Staphylococcus epidermidis* isolate. *Int J Med Microbiol* **297**: 117-122.
37. **Fitzpatrick F, Humphreys H, O'Gara JP.** 2005. Evidence for icaADBC-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Clin Microbiol.* **43**: 1973-1976.
38. **Rohde H, Burandt EC, Siemssen N, Frommelt L, Burdelski C, Wurster S, Scherpe S, Davies AP, Harris LG, Horstkotte MA., Knobloch JK., Rangunath C, Kaplan JB, Mack D.** 2007. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials* **28**: 1711-1720.
39. **Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penades JR.** 2001. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* **183**: 2888–2896.
40. **O'Neill E, Pozzi C, Houston P, Smyth D, Humphreys H, Robinson DA, O'Gara JP.** 2007. Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. *J Clin Microbiol* **45**:1379-1388.
41. **Calsolari RAO, Pereira VC, Araújo Júnior JP, Cunha MLRS.** 2011. Determination of toxigenic capacity by reverse transcription polymerase chain reaction in coagulase negative staphylococci and *Staphylococcus aureus* isolated from newborns in Brazil. *Microbiol Immunol* **55**:394-407.
42. **Park JY, Fox LK, Seo KS, McGuire MA, Park YH, Rurangirwa FR, Sicho WM, Bohach GA.** 2011. Detection of classical and newly described staphylococcal superantigen genes in coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections. *Vet Microbiol* **147**: 149–154.

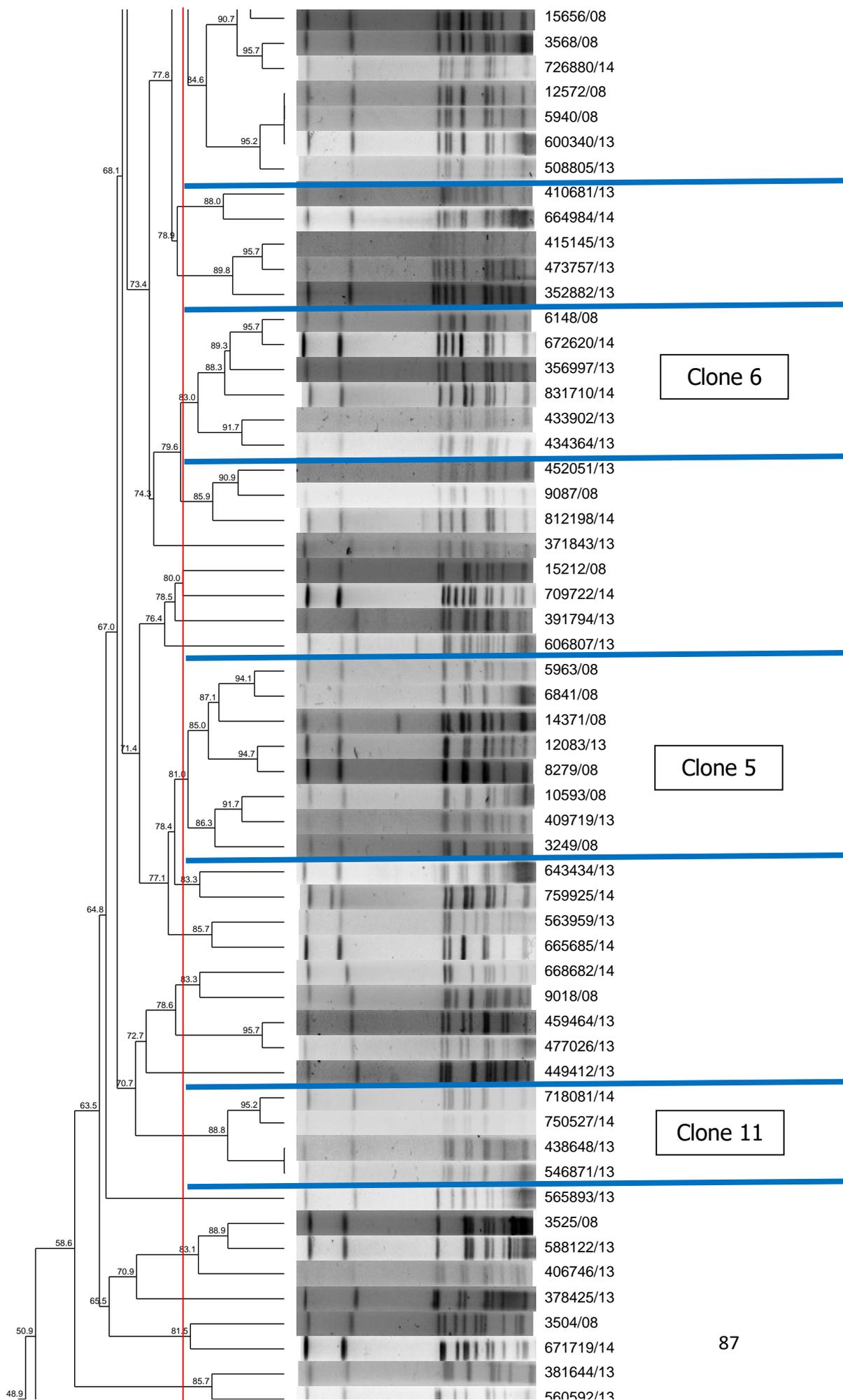
43. **Kuroda M, Yamashita A, Hirakawa H, Kumano M, Morikawa K, Higashide M, Maruyama A, Inose Y, Matoba K, Toh H, Kuhara S, Hattori M, Ohta T.** 2005. Whole genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection. *Proc Natl Acad Sci* **102**: 13272-13277.
44. **Widerström M, Wiström J, Ferry S, Karlsson C, Monsen T.** 2007. Molecular epidemiology of *Staphylococcus saprophyticus* isolated from women with uncomplicated community-acquired urinary tract infection. *J Clin Microbiol* **45**:1561-1564.
45. **Hedman P, Ringertz O, Eriksson B, Kvarnfors P, Andersson M, Bengtsson L, Olsson K.** 1990. *Staphylococcus saprophyticus* found to be a common contaminant of food. *J Infect* **21**:11-19.
46. **Hedman P, Ringertz O, Lindström M, Olsson K.** 1993. The origin of *Staphylococcus saprophyticus* from cattle and pigs. *Scand J Infect Dis* **25**: 57-60.
47. **Rall VL, Sforcin JM, de Deus MF, de Sousa DC, Camargo CH, Godinho NC, Galindo LA, Soares TC, Araújo JP Jr.** 2010. Polymerase chain reaction detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from Brazilian Minas cheese. *Foodborne Pathog Dis* **7**: 1121-1123.
48. **Rupp ME, Soper DE, Archer GL.** 1992. Colonization of the female genital tract with *Staphylococcus saprophyticus*. *J Clin Microbiol* **30**: 2975-2979.
49. **Winberg J, Anderson HJ, Bergstrom T, Jacobsson B, Larson H, Lincoln K.** 1974. Epidemiology of symptomatic urinary tract infection in childhood. *Acta Paediatr Scand Suppl* **252**:1-20.
50. **Latham RH, Running K, Stamm WE.** 1983. Urinary tract infections in young adult women caused by *Staphylococcus saprophyticus*. *JAMA* **250**: 3063-3066.
51. **Hedman P, Ringertz O, Olsson K, Wollin R.** 1991. Plasmid-identified *Staphylococcus saprophyticus* isolated from the rectum of patients with urinary tract infections. *Scand J Infect Dis* **23**: 659-572.
52. **Wallmark G, Arremark I, Telander B.** 1978. *Staphylococcus saprophyticus*: a frequent cause of acute urinary tract infection among female outpatients. *J Infect Dis* **138**: 791-797.
53. **Jordan PA, Irvani A, Richard GA, Baer H.** 1980. Urinary tract infection caused by *Staphylococcus saprophyticus*. *J Infect Dis* **142**: 510-515.
54. **Tolaymat A, al-Jayousi Z.** 1991. *Staphylococcus saprophyticus* urinary-tract infection in male children. *Child Nephrol Urol* **11**: 100-102.
55. **Hovellius B, Colleen S, Mårdh PA.** 1984. Urinary tract infections in men caused by *Staphylococcus saprophyticus*. *Scand J Infect Dis* **16**: 37-41.

56. **Kauffman CA, Hertz CS, Sheagren JN.** 1983. *Staphylococcus saprophyticus*: role in urinary tract infections in men. *J Urol* **130**: 493-494.
57. **Price SB, Flournoy DJ.** 1982. Comparison of antimicrobial susceptibility patterns among coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* **21**:436–40.
58. **Fass RJ, Helsel VL, Barnishan J, Ayers LW.**1986. In vitro susceptibilities of four species of coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* **30**:545–52.
59. **Andrews J, Ashby J, Jevons G, Marshall T, Lines N, Wise R. A.** 2000. Comparison of antimicrobial resistance rates in Gram-positive pathogens isolated in the UK from October 1996 to January 1997 and October 1997 to January 1998. *J Antimicrob Chemother* **45**:285–293.
60. **Gupta K, Hooton TM, Wobbe CL, Stamm WE.** 1999. The prevalence of antimicrobial resistance among uropathogens causing acute uncomplicated cystitis in young women. *Int J Antimicrob Agents* **11**:305–308.
61. **Gupta K.** 2003. Addressing antibiotic resistance. *Dis Mon* **49**: 99-110.
62. **Blondeau JM.** 2004. Current issues in the management of urinary tract infections: extended-release ciprofloxacin as a novel treatment option. *Drugs* **64**: 611-628.
63. **Hickerson AD, Carson CC.** 2006. The treatment of urinary tract infections and use of ciprofloxacin extended release. *Expert Opin Investig Drugs* **15**: 519-532.
64. **Higashide M, Kuroda M, Ohkawa S, Ohta T.** 2006. Evaluation of a cefoxitin disk diffusion test for the detection of *mecA*-positive methicillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus*. *Int J Antimicrob Agents* **27**: 500:504.
65. **Hussain Z, Stoakes L, Massey V, Diagre D, Fitzgerald El Sayed S, Lannigan R.** 2000. Correlation of oxacillin MIC with *mecA* gene carriage in coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* **38**: 752-754.
66. **Antune ALS, Secchi C, Reiter KC, Perez LRR, Freitas ALP, d'Azevedo P.** 2007. Evaluation of oxacillin and cefoxitin disks for detection of resistance in coagulase negative staphylococci. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **102**: 719–723.
67. **Ferreira AM, Bonesso MF, Mondelli AL, Camargo CH, Cunha MLRS.** 2012. Oxacilin Resistance and Antimicrobial Susceptibility Profile of *Satphylococcus saprophyticus* and Others Staphylococci Isolated from Patients with Urinary Tract Infections. *Chemotherapy* **58**:482-491.

## **Anexo 1. Figura complementar**







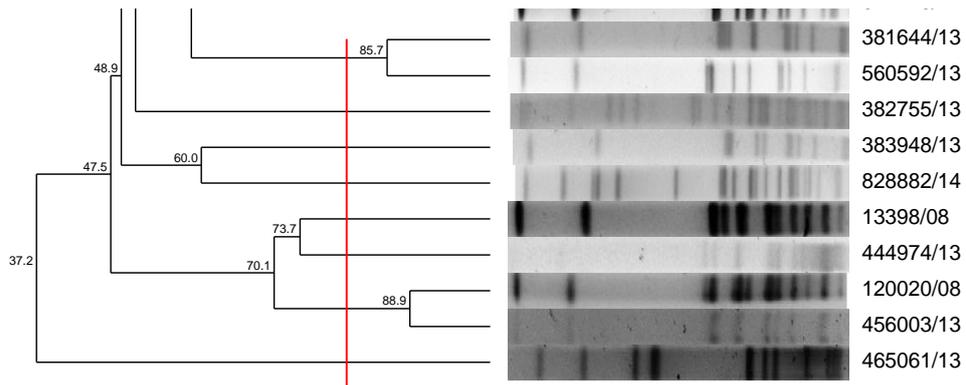


Figura 1. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics, Applied Maths) dos perfis PFGE – *SmaI* dos 169 isolados de *Staphylococcus saprophyticus* (similaridade  $\geq 80\%$ ).

### **5.3 Artigo III: Avaliação da capacidade de produção de enterotoxinas (EEs) e perfil proteômico em amostras de *S. saprophyticus* isoladas de pacientes com infecções do trato urinário.**

**\*Artigo nas normas do *Microbial Pathogenesis*.**

#### **Resumo**

*Staphylococcus saprophyticus* é um dos principais patógenos responsáveis por causar infecções do trato urinário (ITU), entretanto, pouco é conhecido a respeito da capacidade de produção de enterotoxinas (EEs) e TSST-1 pela espécie. Esse trabalho tem por objetivo avaliar a presença de genes que codificam EEs e TSST-1, além de avaliar a capacidade de produção desses superantígenos por isolados de *S. saprophyticus*. As amostras de *S. saprophyticus* foram coletadas e submetidas a identificação genotípica pela técnica Internal Transcribed Spacer PCR (ITS-PCR). A detecção de genes que codificam EEs e TSST-1 foi realizada através da técnica de reação em cadeia da polimerase. As amostras positivas para a presença de genes que codificam as toxinas foram submetidas à confirmação da capacidade de expressão desses genes pela técnica de eletroforese de proteínas (SDS-PAGE). A produção de EEs não foi encontrada em nenhuma das 113 amostras de *S. saprophyticus* portadoras de genes para enterotoxinas. Um grande número de amostras apresentava um ou mais genes para EEs, porém nenhuma expressou quaisquer dos genes, revelando que a presença de genes para produção de EEs não garante a produção desses, mesmo quando em meios de culturas sob condições ideais, como realizado no presente trabalho. Entretanto, outras proteínas ligadas a fatores de virulência, como lipase, autolisina bifuncional e resistência aos antimicrobianos (betalactamase 1)

foram encontradas no sobrenadante de nove amostras submetidas ao sequenciamento peptídico por espectrometria de massa.

**Palavras-chave:** ITU, *S. saprophyticus*, expressão de EEs, SDS-PAGE, sequenciamento peptídico, exoproteínas.

## **Introdução**

*Staphylococcus saprophyticus*, um estafilococo coagulase-negativa (ECN), é o segundo agente mais comum de infecções do trato urinário (ITU) na comunidade [1]. Um dos mais importantes fatores de virulência em estafilococos são as toxinas extracelulares, como as enterotoxinas (EEs) e a toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) que apresentam atividade de superantígenos [2].

Atualmente, são conhecidas 23 enterotoxinas sorologicamente distintas [3]. As EEs estão associadas aos casos de intoxicação alimentar, entretanto, alguns estudos têm relatado o papel das EEs na patogênese de infecções sistêmicas em humanos [4].

A pesquisa de genes e a avaliação da expressão desses superantígenos já foram investigadas para outras espécies de estafilococos, principalmente *S. aureus* e *S. epidermidis*. Em contraste, tais estudos são escassos para *S. saprophyticus*. Assim, este trabalho tem por objetivo avaliar a presença de genes que codificam EEs e TSST-1, além de avaliar a capacidade de produção desses superantígenos em *S. saprophyticus* isolado de casos de ITU e o perfil de exoproteínas em algumas amostras.

## **2 Materiais e métodos**

### *2.1 Amostras*

Foram utilizadas no estudo amostras de *S. saprophyticus* isolado da urina de diferentes pacientes. As amostras foram coletadas e encaminhadas ao Laboratório de

Microbiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HC-FMB).

Foram incluídos indivíduos de ambos os sexos e de todas as idades, que tiveram uroculturas positivas para *S. saprophyticus* consideradas compatíveis com ITU, com contagem de colônias igual ou superior a 100.000 unidades formadoras de colônias por mililitro de urina ( $\geq 10^5$  UFC/mL), segundo os critérios de avaliação de Kass [5].

Os isolados foram semeados em ágar sangue com 5% de sangue de carneiro (isolamento secundário) e corados pelo método do Gram, objetivando-se sua pureza e a observação de sua morfologia e coloração específica. Após a confirmação dessas características, as linhagens foram submetidas às provas de catalase, DNase e coagulase em tubo (padrão ouro), para distinção das espécies de *Staphylococcus aureus* e ECN, conforme preconizado por Koneman et al [6].

## 2.2 Extração de DNA e identificação de *S. saprophyticus*

Nas amostras identificadas como espécies de ECN foi realizada a extração de DNA com o Kit Illustra<sup>®</sup> (GE Healthcare), sendo as extrações realizadas segundo as instruções do fabricante.

As amostras identificadas como ECN foram submetidas a identificação genotípica usando *primers* de sequências conservadas adjacentes aos genes 16S e 23S pela técnica Internal Transcribed Spacer PCR (ITS-PCR) descrita por Couto et al [7] usando os *primers* G1 “GAAGTCGTAACAAGG” 16S e L1 “CAAGGCATCCACCGT” 23S. A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese em *agarose metaphor* 3% preparado em tampão 1,0 x TBE e corado com Saber Safe. Para controle dos resultados, foram utilizadas as seguintes linhagens de referência internacional: *S. epidermidis* (ATCC 12228), *S. epidermidis* (ATCC 35983), *S. haemolyticus* (ATCC 29970), *S. hominis*

(ATCC 27844), *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* (ATCC 700237), *S. lugdunensis* (ATCC 700328), *S. saprophyticus* (ATCC 15305) e *S. warneri* (ATCC 10209).

2.3 *Amplificação do DNA por PCR para detecção dos genes das toxinas (sea, seb, sec, sed, see, seg, seh, sei e tst).*

A detecção dos genes que codificam as enterotoxinas e TSST-1 foi realizada utilizando os *primers* (tabela 1) e os parâmetros conforme preconizado por Johnson et al., [8] e Jarraud et al., [9].

**Tabela 1** Primers utilizados na PCR para detecção dos genes das toxinas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* e *tst*).

Gene	Sequência de nucleotídeos 5' a 3'	Produto amplificado (pb)	Referências
<i>sea</i>	TTGGAAACGGTTAAAACGAA	120	8
	GAACCTTCCCATCAAAAACA		
<i>seb</i>	TCGCATCAAACCTGACAAACG	478	8
	GCAGGTACTCTATAAGTGCC		
<i>sec</i>	GACATAAAAGCTAGGAATTT	257	8
	AAATCGGATTAACATTATCC		
<i>sed</i>	CTAGTTTGGTAATATCTCCT	317	8
	TAATGCTATATCTTATAGGG		
<i>see</i>	CAAAGAAATGCTTTAAGCAATCTTAG	482	8
	GCCAC		
	CTTACCGCCAAAGCTG		
<i>seg</i>	AATTATGTGAATGCTCAACCCGATC	642	9
	AAACTTATATGGAACAAAAGGTACTA		
	G TTC		
<i>seh</i>	CAATCACATCATATGCGAAAGCAG	376	9
	CATCTACCCAAACATTAGCACC		
<i>sei</i>	CTCAAGGTGATATTGGTGTAGG	576	9
	AAAAAACTTACAGGCAGTCCATCTC		
<i>tst-1</i>	ATGGCAGCATCAGCTTGATA	350	8
	TTTCCAATAACCACCCGTTT		

#### 2.4 Análise da produção de EEs

As amostras de *S. saprophyticus* positivas para a presença de genes que codificam EEs foram submetidas à confirmação da capacidade de produção dessas proteínas pela técnica de eletroforese unidimensional em condições desnaturantes (SDS-PAGE).

#### 2.4.1 Obtenção do sobrenadante

As amostras de *S. saprophyticus* em que foram detectados a presença dos genes para superantígenos foram submetidas à técnica de produção de toxinas pelo método de saco de diálise de Donnelly et al., [10]. Os sobrenadantes obtidos foram conservados a -20°C até sua utilização.

#### 2.4.2 Quantificação de proteínas pelo método de Bradford

A quantificação de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (BioRad), utilizando-se albumina bovina (BSA) como padrão [11].

#### 2.4.3 SDS-PAGE

As eletroforeses unidimensionais foram realizadas em condições redutoras e desnaturantes, utilizando-se acrilamida à 12,5% (m/v), segundo por Laemmli [12].

#### 2.4.4 Aquisição e análises das imagens de géis

Para obtenção das imagens, os géis foram digitalizados utilizando escâner Image Scanner III (GE Healthcare Life Sciences) no modo de transmissão calibrado. As imagens dos géis foram analisadas pelo *software* Image Master 2D Platinun v 7.05 (Ge Healthcare) para avaliar as massas moleculares das proteínas.

#### 2.4.5 Digestão de proteínas *in gel*

A digestão protéica *in gel* foi realizada segundo Shevchenko e colaboradores [13]. Os *spots* de proteínas de interesse foram recortados dos géis de eletroforese, descoloridos com solução de bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0 e acetonitrila 50% (v/v). Em seguida, as proteínas contidas nos *spots* foram submetidas às etapas de redução e alquilação das pontes de dissulfeto na presença de DDT 10 mM e iodoacetamida (IAA) 55 mM, respectivamente. Após esta etapa, os géis foram desidratados com acetonitrila 100% (v/v), sendo então submetidos à centrifugação a vácuo. Os géis desidratados foram

incubados com uma solução 12,5 mmol/uL de tripsina (Promega) em tampão de bicarbonato de amônio 25 mM, pH 8,0 durante 18 horas a 37°C. A hidrólise foi interrompida com a adição de ácido fórmico 1% (v/v) em relação ao volume da amostra e os sobrenadantes foram coletados e secos por centrifugação a vácuo e posteriormente mantidos a -20°C até sua análise por espectrometria de massa.

#### 2.4.6 Sequenciamento peptídico por espectrometria de massa

As análises de espectrometria de massa foram realizadas em um equipamento do tipo electrospray (ESI) quadropolo, modelo MicrQ-TOF III (marca Bruker Daltonics), acoplado à um cromatógrafo líquido LC-20AT (marca Shimadzu). O cromatógrafo líquido foi equipado com um sistema binário de bombas e um aplicador de amostras automático. A fase móvel consistiu de água (A) e acetonitrila (B), contendo ácido fórmico 0,1% (v/v). Em adição, a separação cromatográfica foi realizada por meio de um coluna de fase reversa C18 (4,5 mm x 100 mm, 1,8 µm). As condições de eluição foram otimizadas num gradiente linear de 0% a 85% do solvente B por 60 minutos, num fluxo de 0,2 mL/min. A coluna e o aplicador automático de amostras foram mantidos a 25°C e 10°C, respectivamente. O volume de injeção dos compostos de referência e das amostras foi de 10 µL. O espectrômetro de massa utilizou os seguintes parâmetros: voltagem do capilar 4.5 kV, temperatura de secagem de 180°C, fluxo de nitrogênio de 6 L/min e pressão de 0,8 bar. A calibração externa foi realizada utilizando-se o *kit* Tunning MIX ESI (Agilent Technologies) antes das análises individuais. Os espectros de massa foram adquiridos no modo de ionização electrospray positiva (ESI) em um intervalo de ionização entre 100 m/z a 2.500 m/z. Cada amostra submetida às análises de espectrometria foi triplicada.

#### 2.4.7 Análise dos dados

Após a espectrometria de massa, os dados foram exportados e submetidos à

análise automática com a ferramenta de bioinformática MASCOT v.2.1 (www.matrixscience.com), utilizando os seguintes parâmetros: enzima tripsina; taxonomia bacteria (Eubacteria) sequenciais; banco de dados SwissProt; modificação fixa carbamidometilação; modificação variável de oxidação da metionina; uma clivagem perdida pela enzima; massa molecular do tipo monoisotópica; erro de tolerância de peptídeos (MS)  $\pm 0,3$  Da e erro de tolerância (MS/MS)  $\pm 0,5$  Da; protonação + 1 e tipo de instrumento ESI-Q-TOF.

### 3 Resultados

#### 3.1 Detecção dos genes de toxinas

Em 113 (66,8%) amostras foi encontrado pelo menos um gene de enterotoxina. O gene que codifica a toxina 1 da síndrome do choque tóxico (*tst-1*) não foi encontrado. A tabela 2 apresenta os genes encontrados nas 113 amostras de *S. saprophyticus*.

#### 3.2 Análise da produção de toxinas

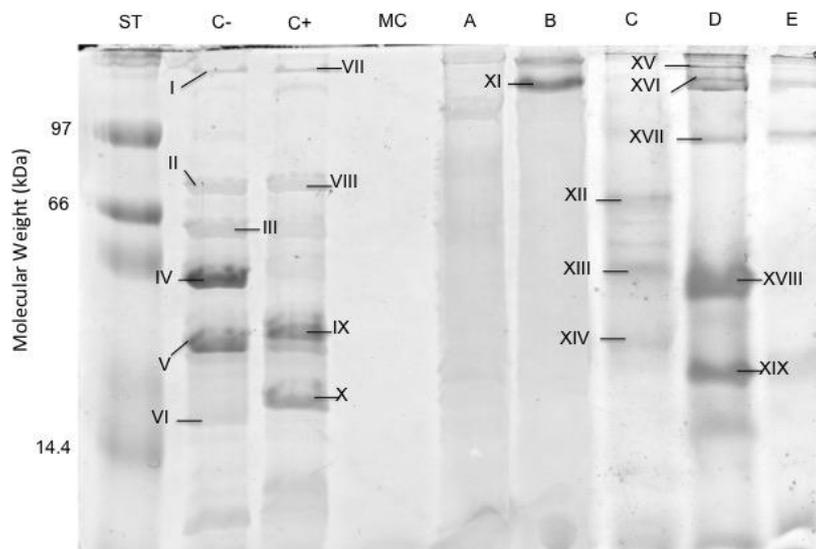
A produção de EEs não foi encontrada em nenhuma das 113 amostras de *S. saprophyticus* portadoras de genes para enterotoxinas. A figura 1 ilustra o gel de eletroforese unidimensional em condições desnaturantes (SDS-PAGE) do sobrenadante de algumas amostras de *S. saprophyticus* portador de genes de enterotoxinas. Representados pelas letras de A-E se encontram cinco amostras de *S. saprophyticus* representativas da eletroforese do sobrenadante de todas as 113 amostras. No sobrenadante das 113 amostras em que foi realizada a eletroforese, em 104 não foi encontrado nenhuma banda de proteína, como pode ser observado na amostra A. Nas demais nove amostras foram encontradas proteínas, como se pode notar nas amostras de gel representadas pelas letras B (quatro amostras), C (três amostras), D (uma amostra) e E (uma amostra). Todas essas proteínas encontradas nessas nove amostras foram

sequenciadas (apesar de não serem compatíveis com nenhuma das enterotoxinas) e como controle do teste também foram sequenciadas as proteínas do sobrenadante de duas amostras de *S. aureus* de padrão internacional, *S. aureus* ATCC 43300 (controle negativo para EE) e *S. aureus* ATCC 19095 (controle positivo para EEC). Na tabela 3 se encontram todas as proteínas identificadas nos sobrenadantes de *S. saprophyticus* e das linhagens de *S. aureus* ATCC 43300 e ATCC 19095 utilizadas como controles.

**Tabela 2** Genes das enterotoxinas encontrados nas amostras de *S. saprophyticus*.

<b>Gene</b>	<b>N (%)</b>
<i>sea</i>	10 (5,9)
<i>sec</i>	1 (0,6)
<i>sed</i>	2 (1,2)
<i>seg</i>	16 (9,4)
<i>sei</i>	7 (4,1)
<i>sea+seg</i>	5 (2,9)
<i>sea+sec</i>	3 (1,8)
<i>sea + sei</i>	4 (2,4)
<i>sea + sed</i>	1 (0,6)
<i>sec + seg</i>	4 (2,4)
<i>sec + sei</i>	1 (0,6)
<i>sed+ seg</i>	1 (0,6)
<i>seg+ sei</i>	12 (7,1)
<i>sea + seb + seg</i>	1 (0,6)
<i>sea + sec+ seg</i>	2 (1,2)
<i>sea + sed + seg</i>	3 (1,8)
<i>sea + seg + sei</i>	19 (11,2)
<i>sec + seg + sei</i>	2 (1,2)
<i>sea + seb + seg + sei</i>	7 (4,1)
<i>sea + sec + seg + sei</i>	12 (7,1)
<b>Total</b>	<b>113 (66,8)</b>

O sequenciamento das proteínas presentes nos sobrenadantes das nove amostras de *S. saprophyticus* revelou a expressão de proteínas importantes para o metabolismo celular: protease dependente de ATP (ATPase subunit HslU), fator de alongamento Ts, transglicosilase IsaA e transglicosilase SceD 1, além de proteínas relacionadas a virulência da bactéria (lipase, autolisina bifuncional) e resistência aos antimicrobianos (betalactamase 1).



**Figura 1.** Gel de eletroforese unidimensional em condições desnaturantes (SDS-PAGE). ST: peso molecular. C-: ATCC 43300 controle negativo para superantígenos, C+: ATCC 19095 controle positivo para superantígeno enterotoxina C. MC: meio de cultura caldo-infusão de cérebro-coração (BHI) estéril. A, B, C, D e E: amostras.

**Tabela 3.** Proteínas encontradas no sobrenadante de *S. saprophyticus* e *S. aureus* ATCC 43300 e ATCC 19095.

Número	Proteína/Organismo	Número de acesso	Peso molecular (kDa)	Função	Referências
I	Hemolisina alfa ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	Q2G1X0	212	Agente citotóxico	14
II	Autolisina bifuncional ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	P0C5Z8	76	Clivagem no peptideoglicano e adesão	15
III	Ácido lipoteicoicossintase ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	Q2FIS2	60	Síntese de ácido lipoteicoicolta	17
IV	Lipase 1 ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	P65288	52	Hidrólise de lipídeos	18
V	Hemolisina alfa ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	P09616	42	Agente citotóxico	14
VI	Inibidor da diferenciação de células epidérmicas ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	P24121	27	Inativação da GTPaseRhoA do hospedeiro	19
VII	Hemolisina alfa ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	P09616	212	Agente citotóxico	14

**Tabela 3** continuação

Número	Proteína/Organismo	Número de acesso	Peso molecular (kDa)	Função	Referências
VIII	Autolisina bifuncional ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	Q6GAG0	81	Clivagem no peptideoglicano e adesão	15
IX	Fosfolipase C ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	Q2FWP1	44	Degradam os fosfolípidos de inositol e libertar glicosil-PI (GPIO)	16
X	Enterotoxina tipo C-1 ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	P01553	35	Toxina superantígeno	20
XI	Protease dependente de ATP. ATPase subunit HslU ( <i>Hahellachejuensis</i> )	Q2S9P3	204	Degradação de proteínas	21
XII	Lipase ( <i>Staphylococcus epidermidis</i> )	P0C0R3	90	Hidrólise de lípidos	18
XIII	Lipase ( <i>Staphylococcus epidermidis</i> )	P0C0R3	60	Hidrólise de lípidos	18

**Tabela 3** continuação

Número	Proteína/Organismo	Número de acesso	Peso molecular (kDa)	Função	Referências
XIV	Fator de alongamentoTs ( <i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> )	Q49X42	39	Biossíntese de proteínas	22
XV	Autolisina bifuncional ( <i>Staphylococcus epidermidis</i> )	Q5HQB9	212	Clivagem no peptideoglicano e adesão	23, 24
XVI	Autolisina bifuncional ( <i>Staphylococcus epidermidis</i> )	Q5HQB9	204	Clivagem no peptideoglicano e adesão	23, 24
XVII	Transglicosilase IsaA ( <i>Staphylococcus saprophyticus</i> )	Q4A0G5	97	Hidrólise do peptideoglicano	25
XVIII	Transglicosilase SceD 1 ( <i>Staphylococcus saprophyticus</i> )	Q4A0X5	57	Hidrólise do peptideoglicano	25
XIX	Betalactamase 1 ( <i>Bacillus cereus</i> )	P00809	32	Hidrólise betalactâmicos	26

## 4 Discussão

As EEs e a TSST-1 são classicamente associadas a intoxicação alimentar e choque tóxico, respectivamente. O papel exato dos superantígenos na patogênese da infecção sistêmica ainda é pouco claro. Entretanto, pesquisas com superantígenos produzidos por *S. aureus* têm mostrado possível papel em outras doenças, tais como dermatite atópica (DA) [27-32] e certos distúrbios autoimunes, tais como artrite reumatoide (AR) [32-34].

As EEs produzidas por *S. aureus* e seu papel tanto na intoxicação alimentar quanto em outras doenças em humanos têm sido descritos. Por outro lado, estudos do potencial toxigênico dos estafilococos coagulase-negativa (ECN) e seu papel nas intoxicações alimentares e em outras doenças em humanos ainda são escassos pelo fato de terem sido considerados por muito tempo como microrganismos não patogênicos. Entretanto, mais atenção deveria ser dada a esse grupo, visto que fatores de virulência originalmente identificados somente em *S. aureus* como as EEs já foram identificados no genoma de ECN [35,36], inclusive no presente trabalho em que um grande número de amostras apresentava um ou mais genes para EEs.

Apesar de ter sido encontrado um grande número de amostras portadoras de genes para EEs, nenhuma expressou quaisquer dos genes, o que revela que a presença de genes para produção de EEs não garante a produção desses, mesmo quando em meios de culturas sob condições ideais, como realizado no presente trabalho.

Este é o primeiro estudo que avalia a capacidade de produção de EEs na espécie *S. saprophyticus* por meio da eletroforese unidimensional em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e o sequenciamento de todas as proteínas encontradas no sobrenadante. Apesar de não ter ocorrido produção de EEs nas amostras de *S. saprophyticus*, outros estudos relataram a produção de enterotoxinas por outras espécies de ECN. Barretti et al., [37] ao estudar os fatores de virulência dos estafilococos isolados de pacientes com

peritonite encontraram amostras de *S. epidermidis* produtoras de EEA, EEB, EEC e TSST-1 sozinhas ou em combinação, enquanto os isolados de *S. haemolyticus* e de *S. lugdunensis* produziram EEC. PCR para identificação dos genes *see*, *seg*, *seh*, e *sei* e RT-PCR para avaliação da expressão desses genes foram realizados por Vasconcelos et al., [38] em 90 amostras clínicas de ECN isolados de recém-nascidos. Em 29 isolados foram encontrados um ou mais genes, e a expressão do RNA mensageiro foi verificada em 34,5% dos isolados. Pesquisa realizada por Ataee e colaboradores [39] indicou que cepas de ECN isoladas dos casos de meningite bacteriana podem produzir EEs. Neste estudo, cepas de ECN foram submetidas ao teste de imunoensaio, o mesmo utilizado para a detecção de EEs clássicas (EEA-EEE) de *S. aureus*. Todos os ECN isolados a partir de pacientes com meningite bacteriana foram capazes de excretar pelo menos uma EE. Estes estudos indicam que o potencial toxigênico de ECN, bem como seu papel nas doenças em humanos não podem ser ignorados.

As amostras de *S. saprophyticus* utilizadas no presente estudo não produziram EEs, entretanto foi encontrada a produção de lipase em algumas das amostras estudadas. Essa proteína já foi caracterizada em muitas espécies de estafilococos, sendo a lipase produzida por *S. saprophyticus* denominada proteína associada a superfície (Ssp) [40]. A Ssp está envolvida com o metabolismo de lipídeos e parece também ser importante na patogenicidade do microrganismo [41]. A hipótese da participação dessa proteína no processo de adesão já foi levantada, entretanto, em estudos realizados a partir da lipase purificada de *S. saprophyticus* observou-se que a lipase não funciona como uma adesina nessa espécie, [42] mas pode contribuir com a persistência do microrganismo provendo uma fonte de energia ou promovendo a liberação de ácidos graxos livres que podem promover a adesão [43] A função dessa enzima na bexiga ainda é elusiva. Não se tem

conhecimento de qualquer agente patogênico urinário para o qual tenha sido sugerido o papel de uma lipase [44].

Além da lipase, a proteína autolisina bifuncional também foi encontrada. Essa enzima desempenha um papel muito importante no metabolismo celular, pois hidrolisa diferentes porções do peptidoglicano, permitindo a separação celular durante o processo de divisão [23]. Além disso, essa enzima é também importante para a virulência por suas propriedades adesivas. No caso da autolisina de *S. saprophyticus*, essa se liga avidamente à fibronectina, às proteínas dos eritrócitos de ovelhas e as células do tecido uroepitelial humano [24].

Os resultados do sequenciamento das proteínas também revelaram a presença da enzima betalactamase, que hidrolisa o anel betalactâmico das penicilinas, conferindo resistência aos antibióticos dessa classe [26]. De acordo com Ferreira e colaboradores, [45] existe uma alta prevalência de resistência a penicilina entre as espécie do gênero *Staphylococcus*, o que foi observado pelos autores quando pesquisaram a resistência à penicilina em 101 amostras de estafilococos de diferentes espécies isolados de casos de ITU e descobriram que 73 (72,3%) isolados eram resistentes à penicilina e carregavam o gene *blaZ*, sendo 35 (48%) dos isolados resistentes pertencentes à espécie *S. saprophyticus*.

### **Referências bibliográficas**

- [1] Hooton, T.M. Stamm, W.E. Diagnosis and treatment of uncomplicated urinary tract infection. *Infect Dis Clin North Am.* 11 (1997) 551-581.
- [2] Mehrotra, M. Wang, G. Johnson, W.M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, esfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J Clin Microbiol.* 38 (2000) 1032-1035.
- [3] Argudín, M.A. Mendoza, M.C. Rodicio, M.R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins.* 2 (2010) 1751-1773.

- [4] Podkowika, M. Parkb, J.Y. Seob, K.S. Bystroña, J. Bania, J. Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. *Int J Food Microbiol.* 163 (2013) 34-40.
- [5] Kass, E.H. Asymptomatic infections of the urinary tract. *Trans Assoc Am Phys.* 69 (1956) 56-64.
- [6] E.V. Konemman.,S.D. Allen. V.R. Sowell.,H.M. Sommer. *Introdução à microbiologia médica: Diagnóstico microbiológico: texto e Atlas colorido*, quinta ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.
- [7] Couto, I. Pereira, S. Miragaia, M, Sanches, I.S, Lencastre, H. Identification of clinical *staphylococcal* isolates from humans by internal transcribed spacer PCR. *J Clin Microbiol.* 39 (2001) 3099-3103.
- [8] Johnson, W.M. Tyler, S.D. Ewan, E.P. Ashton, F.E. Pollard, D.R. Rozee, K.R. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 29 (1991) 426-430.
- [9] Jarraud, S. Mougel, C. Thioulouse, J. Lina, G. Meugner, H. Forey, F. Nesme, X. Etienne, J. Vandenesch, F. Relationships between *Staphylococcus aureus* Genetic Backgrounds, Virulence Factors, agr Groups (Alleles), and Human Disease. *Infect Immun.* 70 (2002) 631-641.
- [10] Donnelly, C.B. Serological identification of enterotoxigenic staphylococci from cheese. *J Appl Microbiol.* 15 (1967) 1382-1387.
- [11] Bradford, M.M. Quantificação de microgramas de proteína utilizando o princípio da proteína de ligação de corante. *Anal Biochem.* 72 (1976) 248-254.
- [12] Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nat.* 227 (1970) 680-685.
- [13] Shevchenko, A. Tomas, H. Havlis, J. Olsen, J.V. Mann, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc.* 1 (2006) 2856-2860.
- [14] Bhakdi, S. Tranum-Jensel, J. Alfa-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Rev.* 55 (1991) 733-751.
- [15] S. Zoll, B. Patzold, M. Schlag, F. Gotz, H. Kalbacher, T. Stele. Structural Basis of Cell Wall Cleavage by a Staphylococcal Autolysin. *PLoS Pathog*, 6, 2010. <http://dxdoi:10.1371/journal.ppat.1000807>.
- [16] White, M.J. Boyd, J.M. Horswill, A.R. Nauseef, W.M. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C contributes to survival of *Staphylococcus aureus* USA 300 in human blood and neutrophils. *Infect Immun.* 82 (2014) 1559-1571.
- [17] Gründling, A Schneewind, O. Synthesis of glycerol phosphate lipoteichoic acid in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl AcadSci USA.* 104 (2007) 8478-8483.

- [18] Rosenstein, R. Götz, F. *Staphylococcal* lipases: biochemical and molecular characterization. *Biochimie*. 82 (2000) 1005-1014.
- [19] Munro, P. Benchetrit, M. Nahori, M.A. Stefani, C. Clément, R. Michiels, J.F. Landraud, L. Dussurget, O. Limichez, E. The *Staphylococcus aureus* Epidermal Cell Differentiation Inhibitor Toxin Promotes Formation of Infection Foci in a Mouse Model of Bacteremia. *Infect Immun*. 78 (2010) 3404-3411.
- [20] Chiang, Y.C. Liao, W.W. Fan, C.M. Pai, W.Y. Chiou, C.S. Tsen, H.Y. PCR detection of *Staphylococcal* enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. *Int J Food Microbiol*. 121 (2008) 66-73.
- [21] Burton, R.E. Baker, T.A. Sauer, R.T. Nucleotide dependent substrate recognition by the AAA+ HslUV protease. *Nat Struct Mol Biol*. 12 (2005) 245-251.
- [22] Baba, T. Bae, T. Schneewind, O. Takeuchi, F. Hiramatsu, K. Genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands. *J Bacteriol*. 190 (2008) 300-10.
- [23] Hell, W. Meyer, H.G. Gatermann, S.G. Cloning of *aas*, a gene encoding a *Staphylococcus saprophyticus* surface protein with adhesive and autolytic properties. *Mol Microbiol*. 29 (1998) 871-881.
- [24] Hell, W. Reichl, S. Anders, A. Gatermann, S. The autolytic activity of the recombinant amidase of *Staphylococcus saprophyticus* is inhibited by its own recombinant GW repeats. *FEMS Microbiol Lett*. 227 (2003) 47-51.
- [25] Stapleton, M.R. Horsburgh, M.J. Hayhurst, E.J. Wright, L. Jonsson, I.M. Tarkowski, A. Kokai-Kun, J.F. Mond, J.J. Foster, S.J. Characterization of IsaA and SceD, two putative lytic transglycosylases of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 189 (2007) 7316-7325.
- [26] Fuda, C.C. Fisher, J.F. Mobashery, S. Beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: the adaptive resistance of a plastic genome. *Cell Mol Life Sci*. 62 (2005) 2617-2633.
- [27] Leung, D.Y. Harbeck, R. Bina, P. Reiser, R.F. Yang, E. Norris, D.A. Hanifin, J.M. Sampson, H.A. Presence of IgE antibodies to staphylococcal exotoxins on the skin of patients with atopic dermatitis. Evidence for a new group of allergens. *J Clin Invest*. 92 (1993) 1374-1380.
- [28] Hauk, P.J. Hamid, Q.A. Chrousos, G.P. Leung, D.Y. Induction of corticosteroid insensitivity in human PBMCs by microbial superantigens. *J Allergy Clin Immunol*. 105 (2000) 782-787.
- [29] Boguniewicz, M. Schmid-Grendelmeier, P. Leung, D.Y. Atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 118 (2006) 40-43.
- [30] McGirt, L.Y. Beck, L.A. Innate immune defects in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 118 (2006) 202-208.

- [31] Schlievert, P.M. Strandberg, K.L. Lin, Y.C. Peterson, M.L. Leung, D.Y. Secreted virulence factor comparison between methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, and its relevance to atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 125 (2010) 39-49.
- [32] Salgado-Pabon, W. Case-Cook, L.C. Schlievert, P.M. Molecular analysis of staphylococcal superantigens. *Methods Mol Biol.* 1085 (2014) 169–185.
- [33] Nagai, H. Takaoka, Y. Kamada, H. Mori, H. The model of arthritis induced by superantigen in mice. *Life Sci.* 55 (1994) 233-237.
- [34] Colavite-Machado, P.M. Ishikawa, L.L. Franca, T.G. Zorzella-Pezavento, S.F. Rosa, L.C. Chiuso-Minicucci, F. Cunha, M.L. Garlet, G.P. Sartori, A. Differential arthritogenicity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from biological samples. *BMC Infect Dis.* 13 (2013) 400.
- [35] Calsolari, R.A.O. Pereira, V.C. Araújo Júnior, J.P. Cunha, M.L.R.S. Determination of toxigenic capacity by reverse transcription polymerase chain reaction in coagulase negative staphylococci and *Staphylococcus aureus* isolated from newborns in Brazil. *Microbiol Immunol.* 55 (2011) 394-407.
- [36] Park, J.Y. Fox, L.K. Seo, K.S. McGuire, M.A. Park, Y.H. Rurangirwa, F.R. Sicho, W.M. Bohach, G.A. Detection of classical and newly described staphylococcal superantigen genes in coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections. *Vet Microbiol.* 147 (2011) 149–154.
- [37] Barretti, P. Montelli, A.C. Batalha, J.E. Caramori, J.C. Cunha, M.L.R.S. The role of virulence factors in the outcome of staphylococcal peritonitis in CAPD patients. *BMC Infect Dis.* 9 (2009) 212.
- [38] Vasconcelos, N.G. Pereira, V.C. Araújo Júnior, J.P. Da Cunha, M.L.R.S. Molecular detection of enterotoxins E, G, H and I in *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci isolated from clinical samples of newborns in Brazil. *J Appl Microbiol.* 111 (2011) 749–762.
- [39] Ataee, R.A. Mehrabi-Tavana, A. Izadi, M. Hosseini, S.M. Ataee, M.H. Bacterial meningitis: a new risk factor. *J Res Med Sci.* 16 (2011) 207–210.
- [40] Gatermann, S. Meyer, H.G. Wanner, G. *Staphylococcus saprophyticus* hemagglutinin is a 160-kilodalton surface polypeptide. *Infect Immun.* 60 (1992) 4127–4132.
- [41] Hedström, S.Ä. Lipolytic activity of *Staphylococcus aureus* strains from cases of human chronic osteomyelitis and other infections. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect B Microbiol.* 83 (1975) 283–292.
- [42] Gatermann, S. Meyer, H.G. *Staphylococcus saprophyticus* hemagglutinin binds fibronectin. *Infect Immun.* 62 (1994) 4556-4563.
- [43] Gribbon, E.M. Cunliffe, W.J. Holland, K.T. Interaction of *Propionibacterium acnes* with skin lipids in vitro. *J Gen Microbiol.* 139 (1993) 1745-1751.

[44] Sakinc, T. Woznowski, M. Ebsen, M. Gatermann, S.G. The surface-associated protein of *Staphylococcus saprophyticus* is a lipase. *Infect Immun.*73 (2005) 6419-6428.

[45] A.M. Ferreira, K.B. Martins, V.R. Silva, A.L. Mondelli, M.L. Cunha, Correlation of phenotypic tests with the presence of the blaZ gene for detection of beta-lactamase. *Braz J Microbiol.* 16, [http://dx. doi: 10.1016/j.bjm.2016.10.011](http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.011).

#### **5.4 Artigo IV: Efeitos *in vitro* de agentes antimicrobianos nas formas planctônicas e em biofilme de *S. saprophyticus* isoladas de pacientes com infecção do trato urinário.**

**\* Artigo nas normas do *International Journal of Antimicrobial Agents***

##### **Resumo**

*Staphylococcus saprophyticus* é um dos mais importantes causadores de infecções do trato urinário (ITU), principalmente em mulheres. O antimicrobiano utilizado na terapia é geralmente selecionado de acordo com os testes de susceptibilidade convencional, mas esses dados podem ser insuficientes para detectar a verdadeira sensibilidade aos antibióticos no biofilme. Assim, este trabalho tem como objetivo avaliar a resposta de *S. saprophyticus* em biofilme frente a cinco agentes antimicrobianos. Foram utilizadas no estudo 169 amostras de *S. saprophyticus* isoladas da urina de diferentes pacientes com ITU. Foi realizada a identificação genotípica através da técnica de ITS-PCR (InternalTranscribedSpacer-PCR) para confirmação da espécie. A produção de biofilme foi avaliada pelo método de aderência em placa de poliestireno, e uma amostra produtora de biofilme foi selecionada para avaliação do biofilme por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Amostras produtoras de biofilme foram avaliadas quanto à sensibilidade antimicrobiana em suas formas planctônicas por meio da concentração inibitória mínima (CIM) e em biofilmes por meio de concentração inibitória mínima em biofilme (CIMB) e concentração bactericida mínima em biofilme (CBMB) frente aos agentes antimicrobianos vancomicina, oxacilina, sulfametoxazol/trimetoprim, ciprofloxacina e norfloxacina pela técnica de microdiluição. Das 169 amostras de *S. saprophyticus*, 119 (70,4%) produziram biofilme. Os isolados em sua forma planctônica

foram sensíveis à maioria dos agentes antimicrobianos, já as amostras em biofilme apresentaram um considerável aumento da CIM quando comparadas com as planctônicas, chegando esse aumento a mais de 32 vezes nos valores para algumas drogas, com algumas amostras passando da categoria de sensíveis na condição de planctônicas para resistentes quando em biofilme. A formação de biofilme diminuiu a susceptibilidade dos *S. saprophyticus* aos antimicrobianos testados.

**Palavras chave:** ITU, *S. saprophyticus*, biofilme, resistência antimicrobiana.

## 1 Introdução

Para que as bactérias possam sobreviver em ambientes hostis, como o que se encontra nos tecidos do hospedeiro (anticorpos, fagócitos, etc.) ou sobre uma superfície inerte, expostos a condições inóspitas (luz UV, dessecação, calor, frio) os microrganismos se adaptaram por existirem como populações aderentes (bactérias sésseis), organizadas em uma estrutura chamada biofilme [1].

Nos laboratórios, a avaliação da eficácia de um antibiótico é feita com o microrganismo em sua forma planctônica (células livres). Entretanto, esses ensaios revelam apenas a concentração de agente quimioterapêutico necessário para inibir o crescimento ou matar as bactérias planctônicas [2]. Quando os microrganismos concluem a formação do biofilme maduro, atingem a máxima resistência aos antibióticos [3]. Para alguns antibióticos, a concentração necessária para matar bactérias sésseis pode ser até mil vezes maior que a concentração necessária para matar exatamente a mesma estirpe quando esta se encontra em estado planctônico [4,5]. Portanto, o uso de bactérias planctônicas para a seleção de agentes quimioterápicos pode ser inadequado em algumas circunstâncias.

*S. saprophyticus* é um dos principais agentes etiológicos das infecções do trato urinário (ITU), entretanto, para essa espécie, pouco se sabe a respeito da produção de biofilme e principalmente de sua resposta aos agentes antimicrobianos utilizados para o tratamento das ITU quando essa se encontra em biofilme. Por essa razão, este trabalho tem como objetivo avaliar a resposta de *S. saprophyticus* em biofilme frente a cinco agentes antimicrobianos.

## **2 Materiais e métodos**

### *2.1 Amostras*

Foram utilizadas no estudo amostras de *S. saprophyticus* isoladas da urina de diferentes pacientes. As amostras utilizadas no estudo foram obtidas em estudo prospectivo conforme isolamento no Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HC-FMB) nos anos 2013 e 2014 e um banco de amostras previamente coletadas em 2008. As amostras foram coletadas de paciente procedentes de enfermarias, ambulatórios, pronto-socorro e unidades básicas de saúde de Botucatu e região.

Foram incluídos indivíduos de ambos os sexos e de todas as idades, que tiveram uroculturas positivas para *S. saprophyticus* consideradas compatíveis com ITU, com contagem de colônias igual ou superior a 100.000 unidades formadoras de colônias por mililitro de urina ( $\geq 10^5$  UFC/mL) segundo critérios de avaliação de Kass [6] e coletas realizadas conforme o protocolo de coleta de urina do serviço.

Os isolados foram semeados em ágar sangue com 5% de sangue de carneiro (isolamento secundário) e corados pelo método de coloração de Gram, objetivando-se sua pureza e a observação de sua morfologia e coloração específica. Após a confirmação dessas características, as linhagens foram submetidas às provas de catalase, DNase e

coagulase em tubo (padrão ouro), para distinção das espécies de *Staphylococcus aureus* e ECN, conforme preconizado por Koneman et al., [7].

## 2.2 Extração de DNA e identificação de *S. saprophyticus*

Nas amostras identificadas como espécies de ECN foi realizada a extração de DNA com o Kit Illustra® (GE Healthcare), sendo as extrações realizadas segundo as instruções do fabricante.

As amostras identificadas como ECN foram submetidas a identificação genotípica usando *primers* de sequências conservadas adjacentes aos genes 16S e 23S pela técnica Internal Transcribed Spacer PCR (ITS-PCR) descrita por Couto et al., [8] usando os *primers* G1 “GAAGTCGTAACAAGG” 16S e L1 “CAAGGCATCCACCGT” 23S. A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese em *agarose metaphor* 3% preparado em tampão 1,0 x TBE e corado com Saber Safe. Para controle dos resultados, foram utilizadas as seguintes linhagens de referência internacional: *S. epidermidis* (ATCC 12228), *S. epidermidis* (ATCC 35983), *S. haemolyticus* (ATCC 29970), *S. hominis* (ATCC 27844), *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* (ATCC 700237), *S. lugdunensis* (ATCC 700328), *S. saprophyticus* (ATCC 15305) e *S. warneri* (ATCC 10209).

## 2.3 Detecção do gene *mecA* de resistência à oxacilina.

Para a detecção do gene *mecA* foram realizadas reações de PCR utilizando os *primers* *mecA1* (AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG) e *mecA2* (AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG) – 533 (pb), empregando os parâmetros descritos por Murakami et al., [9] Em todas as reações realizadas foram utilizadas linhagens de referência internacional: *S. aureus* ATCC 33591 (positivo) e *S. aureus* ATCC 25923 (negativo).

Os géis de agarose foram preparados em concentração de 2% em TBE 1X, corados com SYBER SAFE DNA Gel Stain® (Invitrogen) e visualizadas em transiluminador de luz UV.

#### *2.4 Pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em placa de poliestireno (Christensen et al. 1985) modificado por Oliveira e Cunha (2010).*

O método da pesquisa da produção de biofilme em placas de cultura proposto por Christensen et al., [10] foi utilizado com modificações propostas por Oliveira e Cunha [11] Esse método apresenta bases espectrofotométricas, baseando-se na leitura da densidade óptica (DO) do material aderente produzido pela bactéria.

Em todos os testes foram utilizadas linhagens de referência internacional como controles positivos (*S. aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 35983) e negativos (*S. aureus* ATCC 33591, *S. epidermidis* ATCC12228) e TSB estéril. Foi utilizada leitura da densidade óptica no leitor de Elisa, da marca Labsystem, modelo Multiskan EX, em filtro de 540 nm. As amostras foram classificadas como negativas, quando o valor do ponto de corte correspondia à classificação de não aderente ( $\leq 0,111$ ), e como positivas, quando o valor do ponto de corte correspondia a classificação fraco-aderente ( $> 0,111$  ou  $\leq 0,222$ ) ou forte-aderente ( $> 0,222$ ).

#### *2.5 Avaliação da formação de biofilme com visualização através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) em uma amostra de *S. saprophyticus* produtora de biofilme.*

Uma amostra de *S. saprophyticus* produtora de biofilme no teste em placa de poliestireno foi selecionada para comprovação da produção de biofilme através da MEV.

A amostra produtora de biofilme foi primeiramente isolada em caldo BHI, a seguir foi transferida  $10^8$  UFC de bactérias em um tubo cônico (Falcon-CORNING) contendo 2 mL de meio de cultura TSB preparado com 2% de glicose e um segmento de 0,5 cm de cateter umbilical VYGON (referência 1270.04, 0,8 mm x 1,5 mm de diâmetro). O tubo foi incubado em agitação constante a 100 rpm/37°C por 48 horas para crescimento bacteriano e formação do biofilme. Após esse período o segmento de cateter foi retirado, lavado com PBS e imerso em solução de glutaraldeído 2,5% fixado em uma série de alcoóis (15%, 30%, 50%, 70%, 90% e 100%) por 15 minutos cada um, respectivamente; secos em centrífuga a vácuo por cinco minutos; metalizados com ouro e visualizados em microscópio eletrônico de varredura para evidenciação da produção de biofilme

*2.6 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de vancomicina, oxacilina, norfloxacin, ciprofloxacina e trimetropim/sulfametoxazol pelo método de microdiluição em caldo em células plactônicas de Staphylococcus saprophyticus.*

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em células plactônicas de *Staphylococcus saprophyticus* foi utilizado o método de microdiluição em caldo. Foram utilizadas placas de microtitulação estéreis, com caldo Müeller-Hinton ajustado com cátions (Oxoid, 1 U.K.), conforme recomendado pelo CLSI [12]. Uma solução-estoque de cada droga foi preparada em água destilada na concentração de 3.200 µg/mL. Em placa de microtitulação foram feitas diluições seriadas nas concentrações de uma escala logarítmica de 2, compreendendo os *breakpoints* [12] em caldo Müeller-Hinton, com um volume final de 100µL. Para o preparo do inóculo, as amostras foram inicialmente semeadas em ágar sangue e, após incubação por 24 horas, colônias isoladas foram semeadas em caldo BHI e suspensão bacteriana com turvação correspondente à escala 0,5 de McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL) foi preparada e diluída em 1:1.000, adicionada

nos poços com volume final de 200  $\mu\text{L}$ , e concentração final bacteriana de  $5 \times 10^4$ . As placas foram incubadas em estufa a  $35^\circ\text{C}$  e a leitura do MIC feita após 24 e 48 horas de incubação. Foram utilizados um controle positivo, contendo o caldo e a suspensão bacteriana, e um controle negativo, contendo apenas o caldo Müller-Hinton. Adicionalmente, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *S. aureus* ATCC 29213, suscetíveis à vancomicina, foram utilizados como controle negativo, e *E. faecalis* ATCC 51299, resistente à vancomicina, e *S. aureus* ATCC 33591, resistente à oxacilina, foram utilizados como controle positivo. O MIC foi considerado como a menor concentração de antimicrobiano que inibiu completamente o crescimento do microrganismo, conforme detectado a olho nu: foram classificados com crescimento positivo os poços que apresentaram turvação e/ou presença de bactérias no fundo do poço.

*2.7 Determinação da concentração inibitória mínima em biofilme (CIMB) e concentração bactericida mínima em biofilme (CBMB) de vancomicina, oxacilina, norfloxacin, ciprofloxacina e trimetropim/sulfametoxazol pelo método de microdiluição em caldo em biofilme de S. saprophyticus.*

As concentrações bactericidas para o biofilme (CBMB) foram determinadas adaptando um método de ensaio utilizado por Frank et al., [13]. Os isolados cultivados por 22 horas em TSB adicionado de 2% de glicose foram ajustados para uma turbidez de 1,0 da Escala de McFarland (correspondendo a  $1 \times 10^8$  a  $2 \times 10^8$  UFC/mL) e diluído a 1:50 em TSB com glicose 2%. Alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  foram colocadas em placas de 96 poços de fundo plano (Nuclon Delta, Nunc, Dinamarca), cobertas com uma tampa de 96 pinos (Nunc-TSP; nunc) e incubadas por 24 horas para permitir a formação de biofilme sobre os pinos. Para remover as células não aderentes, os biofilmes formados nos pinos foram lavados por imersão em uma série de três placas de 96 poços preenchidos com 200  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato salina estéril. A tampa com os pinos foi colocada sobre uma placa

de fundo plano preparado para testes de suscetibilidade de microdiluição em caldo, e os poços continham 200 µL de agente antimicrobiano diluído em CAMHB (Caldo Mueller Hinton suplementado com cátions, 100 mg/mL de cálcio e 50 mg/mL de magnésio) ou 200 µL de CAMHB sem drogas para o controle de crescimento positivo. Os biofilmes foram submetidos aos antimicrobianos durante 24 horas, a tampa com os pinos foi retirada e lavada três vezes em tampão fosfato, como descrito acima, e colocada em placas de 96 poços contendo 200 µL de TSB glicose 2%. Nesse momento, antes do descarte da placa com os antibióticos, foi realizada uma leitura “a olho nu” para determinar o MIC dos antibióticos em células do biofilme (CIMB). Em seguida, as células do biofilme formado nos pinos da tampa foram desalojadas por sonicação durante cinco minutos a 40 kHz (Hielscher, ultrasonic technology, UIP250MTP) em placas de 96 poços contendo um novo meio de cultura para recuperação das células. A tampa com os pinos foi descartada e substituída com uma tampa normal, e a densidade óptica medida em um leitor de placa em filtro de 600 nm. Foram utilizados poços contendo TSB glicose a 2% puro (sem inoculação) para controles de esterilidade espectrofotométrica. A placa foi incubada por 24 horas, e uma segunda DO em 600 nm medida foi tomada. A CBMB foi definida como a menor concentração da droga que apresentou uma alteração na DO a 600 nm de 10% da leitura obtida para o controle de crescimento positivo entre as leituras realizadas antes da incubação e após 24 horas. Para um melhor controle da eficácia do teste foram utilizadas as linhagens de controle *S. epidermidis* ATCC 35983 produtora de biofilme e *S. epidermidis* ATCC 12228 não produtora.

## 2.8 Análises estatísticas

Foram realizadas análises de correlação entre os testes de sensibilidade a antimicrobianos e a concentração inibitória das bactérias planctônicas e no biofilme. Todos os dados foram inseridos em Excell e analisados pelo software SPSS® versão 13.0.

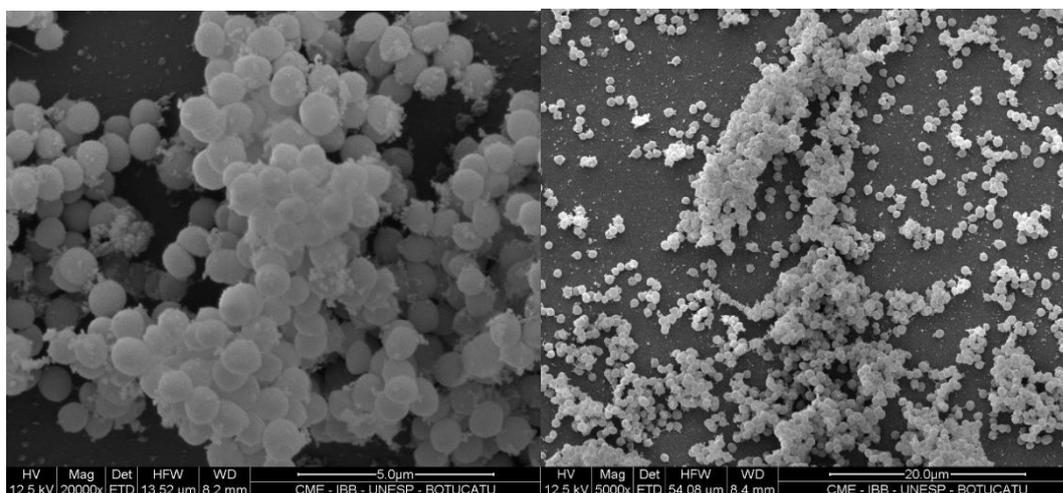
### 3 Resultados

#### 3.1 Pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em placa de poliestireno.

Foram estudadas 169 amostras de *S. saprophyticus* isoladas de pacientes com ITU. Das 169 amostras de *S. saprophyticus*, 119 (70,4%) produziram biofilme, sendo 88 (52,1%) amostras classificadas como forte-aderentes e 31 (18,3%) fraco-aderentes.

#### 3.2 Avaliação da formação de biofilme com visualização através da microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Um isolado de *S. saprophyticus* classificado como forte-aderente na avaliação da produção de biofilme em placa de poliestireno foi selecionado para avaliação da produção de biofilme na MEV. A figura 1 mostra a estrutura do biofilme produzido por *S. saprophyticus* isolado de um caso de ITU.



A

B

Figura 1. Micrografia eletrônica de varredura mostrando a estrutura do biofilme em *S. saprophyticus*. A. Aumento 20.000x; B. 5.000x.

### 3.3 Avaliação da sensibilidade antimicrobiana de células de *S. saprophyticus* planctônicas e em biofilme.

A avaliação da sensibilidade antimicrobiana em biofilme foi realizada com as 119 amostras produtoras de biofilme em placa de poliestireno. As mesmas drogas utilizadas para avaliação da sensibilidade antimicrobiana nas amostras planctônicas pela determinação da CIM foram utilizadas para a avaliação da sensibilidade antimicrobiana em biofilme através da determinação da concentração inibitória mínima em biofilme (CIMB) (tabela 1).

A determinação da CIM das células planctônicas frente aos cinco antimicrobianos revelou que 117 (98,3%) amostras foram resistentes à oxacilina, com a CIM<sub>50</sub> de 1 µg/mL e a CIM<sub>90</sub> de 2 µg/mL, entretanto, somente três amostras (2,5%) foram positivas para a pesquisa do gene *mecA*, sendo que essas três amostras foram as que apresentaram a CIM mais elevada (256 µg/mL), e as demais 116 apresentaram a CIM variando de ≤ 0,25 µg/mL a 2 µg/mL.

Além disso, 21 (17,7%) amostras apresentaram resistência a trimetoprim/sulfametoxazol, com a CIM<sub>50</sub> de 0,125/2,38 µg/mL e a CIM<sub>90</sub> de 4/76 µg/mL. Todos os isolados foram sensíveis à vancomicina, com a CIM<sub>50</sub> de 1 µg/mL e a CIM<sub>90</sub> de 2 µg/mL, norfloxacin, com a CIM<sub>50</sub> de 2 µg/mL e a CIM<sub>90</sub> de 4 µg/mL, e a ciprofloxacina com a CIM<sub>50</sub> e a CIM<sub>90</sub> de 0,25 µg/mL (tabela 2).

Utilizando os critérios para interpretação dos testes de sensibilidade preconizados pelo CLSI para determinação da CIM em amostras de ECN planctônicas como diretriz para a avaliação da sensibilidade antimicrobiana dos isolados em biofilme, foi observado que nenhuma das drogas foi totalmente eficaz contra os isolados em biofilme.

A análise estatística dos resultados revelou aumento significativo da CIMB ( $p < 0,0001$ ) para todas as cinco drogas testadas em biofilme em relação às planctônicas (tabela 2).

Ocorreu um aumento considerável de amostras planctônicas sensíveis que passaram a ser resistentes no biofilme (tabela 1). Das 119 amostras analisadas em biofilme, 28 (23,5%) apresentaram resistência intermediária ou resistência à vancomicina (CIMB 1 a 64  $\mu\text{g/mL}$ ). Todas as amostras foram resistentes à oxacilina (CIMB 0,5 a 2048), 41 (34,4%) amostras apresentaram resistência intermediária ou resistência à norfloxacina (CIMB 2 a 64  $\mu\text{g/mL}$ ), 30 (25,2%) apresentaram resistência intermediária ou resistência à ciprofloxacina (CIMB 0,125 a 64  $\mu\text{g/mL}$ ), e 58 (48,7) amostras foram resistentes a trimetoprim/sulfametoxazol (CIMB 0,06/1,18  $\mu\text{g/mL}$  a 64/1216  $\mu\text{g/mL}$ ), considerando o ponto de corte do CLSI para resistência na CIM planctônica (tabelas 1 e 2).

É importante destacar que, quanto a resistência a trimetoprim/sulfametoxazol, das 58 (48,7%) amostras resistentes na CIMB, 21 (17,7%) amostras já eram resistentes na avaliação da CIM para essa droga. Sendo assim, 37 (31,1%) das amostras passaram de sensível para resistente em biofilme.

As amostras em biofilme apresentaram um considerável aumento da CIM quando comparadas com as planctônicas, chegando esse aumento a mais de 32 vezes nos valores para algumas drogas, com algumas amostras passando da categoria de sensíveis na condição de planctônicas para resistentes quando em biofilme (tabela 3).

Quanto à determinação da concentração bactericida mínima em biofilme (CBMB), todas as drogas tiveram isolados que apresentaram CBMB igual ou superior à maior concentração testada (tabela 2), com destaque para norfloxacina com 33 (27,7%)

amostras com CBMB > 128 µg/mL e trimetoprim/sulfametoxazol com 36 (30,2%) amostras com CBMB > 128/2.432 µg/mL (tabela 4).

**Tabela 1** Comparação do perfil de resistência às drogas em células planctônicas e em biofilme de *S. saprophyticus*.

<b>Drogas</b>	<b>Bactérias planctônicas</b>		<b>Bactérias em biofilme</b>	
	R (%)	RI (%)	RI (%)	R (%)
<b>Vancomicina</b>	0 (0)	0 (0)	19 (16,0)	9 (7,6)
<b>Oxacilina</b>	117 (98,3)	●	●	119 (100,0)
<b>Norfloxacina</b>	0 (0)	0 (0)	15 (12,6)	26 (21,8)
<b>Ciprofloxacina</b>	0 (0)	0 (0)	6 (5,0)	24 (20,2)
<b>Trim/Sut</b>	21 (17,7)	●	●	58 (48,7)

●: Droga sem CIM de resistência intermediária; R: Resistente; RI: Resistência Intermediária; Trim/Sut: Trimetoprim/Sulfametoxazol.

**Tabela 2** CIM( $\mu\text{g/mL}$ ) de amostras de *S. saprophyticus* planctônicas, CIMB ( $\mu\text{g/mL}$ ) e CBMB ( $\mu\text{g/mL}$ ) em biofilme.

Antibióticos	Bactéria planctônica			Bactéria em biofilme					
	Variação	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	Variação	CIMB <sub>50</sub>	CIMB <sub>90</sub>	Variação	CBMB <sub>50</sub>	CBMB <sub>90</sub>
<b>Van</b>	0,5 – 2	1	2	1 – 64	4	16	2 - > 128	16	64
<b>Oxa</b>	$\leq 0,25 - 256$	1	2	0,5 – 2048	2	16	2 - > 2048	16	128
<b>Nor</b>	1 – 4	2	4	2 – 64	4	64	8 - > 128	32	> 128
<b>Cip</b>	$\leq 0,125 - 1$	0,25	0,25	0,125 – 64	0,5	16	2 - > 128	16	> 128
<b>Trim/Sut</b>	$\leq 0,03/0,59 - 16/304$	0,125/2,38	4/76	0,06/1,18- 64/1216	2/38	32/608	0,25/4,75 - > 128/2432	16/304	> 128/2432

Van: Vancomicina; Oxa: Oxacilina; Nor: Norfloxacina; Cip: Ciprofloxacina; Trim/Sut: Trimetoprim/Sulfametoxazol.

**Tabela 3** Variação do aumento dos valores da CIMs e alteração da categoria de sensíveis para resistentes em relação às células planctônicas e em biofilme.

	2X (%)	4X(%)	8X(%)	16X(%)	32X(%)	64X(%)	128X(%)	256X (%)	S-I(%)	S-R(%)
<b>Van</b>	59 (49,5)	32 (26,9)	10 (8,4)	9 (7,6)	7 (5,9)	2 (1,7)	-	-	19 (16,0)	9 (7,6)
<b>Oxa</b>	71 (59,7)	21 (17,6)	9 (7,6)	8 (6,7)	7 (5,9)	2 (1,7)	1 (0,8)	-	•	2 (1,7)
<b>Nor</b>	83 (69,7)	10 (8,4)	7 (5,9)	10 (8,4)	9 (7,6)	-	-	-	15 (12,6)	26 (21,8)
<b>Cip</b>	57 (47,9)	27 (22,7)	11 (9,3)	3 (2,5)	5 (4,2)	6 (5,0)	5 (4,2)	5 (4,2)	6 (5,0)	24 (20,2)
<b>Trim/Sut</b>	28 (23,5)	28 (23,5)	14 (11,8)	14 (11,8)	13 (10,9)	7 (5,9)	7 (5,9)	8 (6,7)	•	37 (31,1)

Van: Vancomicina; Oxa: Oxacilina; Nor: Norfloxacinina; Cip: Ciprofloxacina; Trim/Sut: Trimetoprim/Sulfametoxazol; • Droga sem CIM de resistência intermediária; R: Resistente; RI: Resistência intermediária. X: Número de vezes que aumentou a CIM nas amostras em biofilme S-I: Sensível-resistente intermediário: percentagem de isolados que apenas na presença do biofilme são resistentes intermediários; S-R: Sensível-resistente: percentagem de isolados que apenas na presença do biofilme são resistentes.

**Tabela 4** Perfil da concentração bactericida em biofilme ( $\mu\text{g/mL}$ ) de *S. saprophyticus*.

Van		Oxa		Nor		Cip		Trim/Sut	
N (%)	CBMB	N (%)	CBMB	N (%)	CBMB	N (%)	CBMB	N (%)	CBMB
3 (2,5)	2	1 (0,9)	2	1 (0,9)	8	1 (0,9)	2	1 (0,9)	0,25/4,75
17 (14,3)	4	2 (1,7)	4	28 (23,5)	16	20 (16,8)	4	2 (1,7)	0,5/9,5
14 (11,8)	8	28 (23,5)	8	48 (40,3)	32	36 (30,2)	8	1 (0,9)	1/19
29 (24,4)	16	32 (26,9)	16	9 (7,6)	64	35 (29,4)	16	11 (9,2)	4/76
34 (28,6)	32	23 (19,3)	32	33 (27,7)	>128	7 (5,9)	32	22 (18,5)	8/152
12 (10,0)	64	11 (9,2)	64	-	-	3 (2,5)	64	24 (20,2)	16/306
10 (8,4)	> 128	12 (10,1)	128	-	-	17 (14,3)	> 128	13 (10,9)	32/608
-	-	5 (4,2)	256	-	-	-	-	3 (2,5)	64/1.216
-	-	1 (0,9)	2.048	-	-	-	-	6 (5,0)	128/2.432
-	-	4 (3,3)	> 2.048	-	-	-	-	36 (30,2)	>128/2.432

Van: Vancomicina; Oxa: Oxacilina; Nor: Norfloxacina; Cip: Ciprofloxacina; Trim/Sut: Trimetoprim/Sulfametoxazol.

#### 4 Discussão

A formação de biofilmes bacterianos é a base de muitas doenças infecciosas persistentes. A persistência destas infecções é atribuída principalmente ao aumento da resistência aos antibióticos exibida pelas células em biofilmes [14].

A CIM tem sido utilizada como padrão ouro para determinar a sensibilidade antimicrobiana de bactérias patogênicas [15]. Reconhece-se que quando a droga não é eficiente para inibir o crescimento de um determinado organismo utilizando a CIM, a droga em questão também será clinicamente ineficiente [16]. Entretanto, se um microrganismo é considerado sensível *in vitro*, não significa necessariamente que esse terá o mesmo efeito *in vivo* [17].

Isso foi claramente observado nos resultados do presente estudo. A determinação da CIM para avaliar a sensibilidade de células de *S. saprophyticus* planctônicas revelou que a maioria foi sensível aos antibióticos testados, sendo todos sensíveis a vancomicina, norfloxacin e ciprofloxacina, e apenas 17,7% foram resistentes a trimetoprim/sulfametoxazol. A determinação da CIMB mostrou aumento significativo dos valores da CIM, com isolados que passaram de sensíveis para resistentes em relação às células planctônicas para todas as drogas testadas, com aumento que variou de duas a 32 vezes para todas as drogas e aumento de até 256 vezes para algumas drogas.

Quanto à resistência à oxacilina, 98,3% das células planctônicas foram resistentes no método de microdiluição, porém somente três isolados foram positivos para a presença do gene *mecA*. Apenas as três amostras que foram positivas para a pesquisa do gene *mecA* apresentaram a CIM mais elevadas (256 µg/mL), e as demais 116 apresentaram a CIM variando de  $\leq 0,25$  µg/mL a 2 µg/mL. Outros estudos detectaram resultados similares e isso pode ter ocorrido porque o *breakpoint* recomendado pelo CLSI acaba superestimando a resistência nessa espécie [18].

De maneira geral, os antibióticos testados se mostraram ineficazes em biofilme de *S. saprophyticus*, pois foram encontradas amostras resistentes para todas as drogas testadas, o que é preocupante, pois seriam necessárias altas doses de antibióticos para eliminar esses microrganismos organizados em biofilmes, o que é clinicamente impraticável.

Os antibióticos mais prescritos para o tratamento de infecções do trato urinário são trimetoprim/sulfametoxazol, fluoroquinolonas (ciprofloxacina ou norfloxacina), primeira e segunda gerações de cefalosporinas, amoxicilina + clavulanato e nitrofurantoina [19].

No presente trabalho, 17,7% das amostras já eram resistentes na avaliação da CIM planctônica para trimetoprim/sulfametoxazol, e em biofilme 48,7% das amostras foram resistentes, sendo que 31,1% das amostras passaram de sensível para resistente em biofilme, o que é preocupante, já que a associação trimetoprim/sulfametoxazol é considerada o fármaco de primeira linha para o tratamento de ITU não complicada [20]. Assim, o uso frequente da droga na terapia empírica está associado com um aumento da taxa de falha clínica, principalmente se o microrganismo estiver em biofilme, como pôde ser observado no presente estudo.

O uso de fluoroquinolonas é recomendado para UTI não complicada em áreas onde a incidência de resistência a trimetoprim/sulfametoxazol é superior a 10%, bem como para o tratamento de infecções do trato urinário complicadas e pielonefrite aguda [21].

As fluoroquinolonas têm sido utilizados com sucesso para tratar uma ampla gama de infecções comunitárias e adquiridas no hospital, e as taxas de resistência à fluoroquinolona permanecem baixas [21]. De fato, no presente trabalho, todas as amostras planctônicas foram sensíveis a norfloxacina e a ciprofloxacina, entretanto, isso não

ocorreu com as amostras em biofilme, pois 34,4% das amostras apresentaram resistência intermediária ou resistência à norfloxacin e 25,2% apresentaram resistência intermediária ou resistência à ciprofloxacina.

Oliveira et al., [22] avaliaram a CIM das células planctônicas e em biofilme de *Staphylococcus* spp. frente a seis drogas, sendo que 20 amostras pertenciam a espécie *S. saprophyticus* isoladas de casos de ITU. Os autores observaram que, para essa espécie, nenhuma amostra planctônica foi resistente à vancomicina e à linezolida, mas com relação a CIMB o percentual de amostras que passaram de sensíveis para resistentes ou resistentes intermediárias foi de 53,8% para vancomicina e 30,8% para eritromicina.

Quanto à determinação da CBMB do presente trabalho, todas as drogas tiveram isolados que apresentaram CBMB igual ou superior à maior concentração testada. Outros autores também observaram altas taxas de resistência aos antimicrobianos em biofilme. Molina-Manso e colaboradores, [23] ao avaliar a CBMB em biofilme de *S. epidermidis* e *S. aureus* isolados de infecções de próteses articulares frente a diversas drogas, entre elas vancomicina, clindamicina e trimetoprim-sufametoxazol, observaram que nenhum dos antibióticos provou ser totalmente eficaz contra biofilmes em ambas as espécies, com a CBMB muito acima das CIM das células planctônicas para a maior parte dos antibióticos (> 1.024 µg/mL na maioria dos casos). Frank e colaboradores [13] também observaram altas taxas de resistência ao avaliar o perfil de sensibilidade de 15 isolados de *S. lugdunensis* em biofilme frente a dez agentes antimicrobianos. Nas amostras planctônicas, os isolados foram sensíveis a todos os agentes estudados, mas em biofilmes foram resistentes a altas concentrações da maioria das drogas, com destaque para vancomicina com CBMB > 128 µg/mL em 12 amostras e trimetoprim-sufametoxazol com CBMB > 8/152 µg/mL também em 12 amostras.

Os resultados observados no presente trabalho, juntamente com os resultados obtidos pelos autores supracitados, corroboram com a afirmativa de que microrganismos que apresentam suscetibilidade a determinados antimicrobianos em testes laboratoriais convencionais podem ser, na verdade, altamente resistentes aos mesmos antimicrobianos, quando em biofilme, e, como consequência, doenças infecciosas envolvendo biofilmes são geralmente difíceis de tratar.

Esse aumento da CIM em biofilme ocorre pelo fato de que as bactérias que vivem nessas comunidades são frequentemente de 10 a 1.000 vezes mais tolerantes aos antimicrobianos do que quando na forma planctônica [5], indicando que alguns dos mecanismos envolvidos na resistência dos biofilmes aos antimicrobianos diferem dos mecanismos responsáveis pela resistência de bactérias planctônicas aos mesmos agentes [24]. De acordo com Mah, [14] a resistência aos antimicrobianos é multifatorial; existem vários mecanismos de resistência que agem em conjunto de modo a proporcionar um aumento da resistência em biofilme.

Dentre os principais fatores postulados para explicar a baixa suscetibilidade antimicrobiana de células em biofilme, se destacam a combinação de uma fraca penetração do antibiótico, em que o biofilme atua como barreira física para difusão, retendo grande parte dos agentes antimicrobianos e, assim, reduzindo a quantidade desses agentes para agir sobre as células e a interação química de componentes do biofilme com os agentes antimicrobianos, sequestrando os antimicrobianos hidrofílicos e carregando positivamente, tais como os aminoglicosídeos [25].

Um microambiente alterado também contribui para a resistência em biofilme. Gradientes de nutrientes e oxigênio existem a partir do topo para o fundo de biofilmes e as células bacterianas localizadas em zonas pobres em nutrientes diminuem a atividade metabólica e aumentam o tempo de duplicação. Assim, as bactérias em biofilmes

constituem populações heterogêneas com variada taxa de crescimento e variada suscetibilidade aos antimicrobianos [26].

Assim, a tolerância aos antimicrobianos pode resultar da presença de população de células bacterianas, conhecidas como células dormentes ou persistentes. Essa população apresenta reduzida taxa metabólica e comumente encontra-se na base da estrutura dos biofilmes, onde há limitada oferta de oxigênio e nutrientes. O baixo metabolismo dessas células persistentes garante a sua resistência ao tratamento com antimicrobianos, haja vista que os antimicrobianos geralmente agem na fase de crescimento bacteriano, como síntese proteica, síntese de ácidos nucleicos e de parede celular. Dessa forma, o tratamento pode conduzir à erradicação da maior parte da população do biofilme, mas a fração de células persistentes não é atingida e atua, portanto, como um núcleo para reinfecção, após a descontinuação terapêutica [24,27].

Além disso, os mesmos gradientes químicos que levam a uma limitação do crescimento bacteriano em biofilmes podem ser suficientes em si mesmos para alterar a potência antibiótica. Por exemplo, a disponibilidade de oxigênio por si só é conhecida por modular a ação dos aminoglicosídeos [28]. Assim, bactérias em uma região anaeróbia de um biofilme podem ser diferencialmente protegidas contra estes antibióticos.

Walters e colaboradores [29] compararam a capacidade de penetração de antimicrobianos, com a limitação de oxigênio e com os efeitos da atividade metabólica de *P. aeruginosa* em biofilmes na tolerância à ciprofloxacina e à tobramicina. Os resultados sugerem que a limitação de oxigênio e a baixa atividade metabólica no interior dos biofilmes, mais do que a penetração do antimicrobiano, sejam os responsáveis pela tolerância a esses fármacos.

Os gradientes de pH podem igualmente impactar negativamente sobre a eficácia de antibióticos [30,31]. Venglarcik et al. e colaboradores [30] avaliaram os efeitos

bactericidas da oxacilina em diferentes pH e mostraram que os efeitos bactericidas dos antibióticos que agem na síntese de parede em células de bactérias, incluindo *S. aureus*, podem ser suprimidos, dependendo do pH. Os autores observaram no experimento que o comportamento tolerante não estava presente nos 20 isolados de *S. aureus* quando o pH do inóculo foi acima de 7,0. Quando o pH do inóculo era ácido, 35% dos mesmos isolados apresentaram tolerância à oxacilina.

A formação de biofilmes está frequentemente associada às infecções que envolvem o uso de dispositivos biomédicos implantáveis e sabe-se que de 60% a 70% das infecções hospitalares estão associadas ao uso desses dispositivos [32]. Esse é o primeiro trabalho que avaliou a produção de biofilme em *S. saprophyticus* isolado de casos de ITU e a ação dos antibióticos frente a esses microrganismos em biofilme.

A produção de biofilme por grande parte das amostras, além da resistência aos agentes antimicrobianos quando tais amostras se encontram em biofilme, sugere que esse fator de virulência é muito importante para que *S. saprophyticus* consiga se estabelecer e desenvolver ITU persistente.

### **Referências bibliográficas**

- [1] Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends Microbiol 2001; 9: 34-9.
- [2] Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. Clin Infect Dis 2009; 49: 1749-55.
- [3] Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. Int J Antimicrob Agents 2010; 35: 322-32.
- [4] Nickel JC, Ruseska I, Wright JB, Costerton JW. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. Antimicrob Agents Chemother 1985; 27: 619-24.
- [5] Aslam S. Effect of antibacterials on biofilms. Am J Infect Control 2008; 36: 9-11.
- [6] Kass EH. Asymptomatic infections of the urinary tract. Trans Assoc Am Phys. 1956;69: 56-64.

- [7] Koneman EV, Allen SD, Sowell VR., Sommer HM. Introdução à microbiologia médica. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 5° ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.
- [8] Couto I, Pereira S, Miragaia M, Sanches IS, Lencastre H. Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by internal transcribed spacer PCR. J Clin Microbiol 2001; 39:3099-3103.
- [9] Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1991; 29: 2240–44.
- [10] Christensen GD, Simpson WA, Yonger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton, DM, Beachey, EH. Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices. J Clin Microbiol 1985; 22:996-06.
- [11] Olivira A, Cunha MLRS. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. BMC Res Notes 2010; 3: 260.
- [12] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Approved Standard M100-S22. (National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa), 2012.
- [13] Frank KL, Reichert EJ, Piper KE, Patel R. In vitro effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51: 888-95.
- [14] Mah TF. Biofilm-specific antibiotic resistance. Future Microbiol 2012; 7: 1061-72.
- [15] Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell De Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. Annu Rev Microbiol 1995; 49: 711-745.
- [16] Potera C. Forging a link between biofilms and disease. Science 1999; 283: 1837-39.
- [17] Pratt LA, Kolter R. Genetic analyses of bacterial biofilm formation. Curr Opin Microbiol 1999; 2: 598-603.
- [18] Ferreira AM, Bonesso MF, Mondelli AL, Camargo CH, Cunha MLRS. Oxacilin Resistance and Antimicrobial Susceptibility Profile of *Staphylococcus saprophyticus* and Others Staphylococci Isolated from Patients with Urinary Tract Infections. Chemotherapy 2012; 58:482-91.
- [19] Lee M, Bozzo P, Einarson A, Koren G. Urinary tract infections in pregnancy. Can Fam Physician 2008; 54: 853-54.
- [20] Drekonja DM, Johnson JR. Urinary tract infections. Prim Care 2008; 35: 345-67.
- [21] Blondeau JM. Current issues in the management of urinary tract infections: extended-release ciprofloxacin as a novel treatment option. Drugs 2004; 64: 611-28.
- [22] Oliveira A, Cataneli, VC, Pinheiro L, Riboli DFM, Martins KB, Cunha, M.L.R.S. Antimicrobial Resistance Profile of Planktonic and Biofilm Cells of *Staphylococcus*

*aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci. Int J Mol Sci, 17; 2016<http://dx.doi:10.3390/ijms17091423>.

[23] Molina-Manso D, del Prado G, Ortiz-Pérez A, Manrubia-Cobo M, Gómez-Barrena E, Cordero-Ampuero J, Esteban J. In vitro susceptibility to antibiotics of staphylococci in biofilms isolated from orthopaedic infections. Int J Antimicrob Agents. 2013; 41: 521-23.

[24] Stewart PS. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. Int J Med Microbiol 2002; 292: 107-113.

[25] Nichols WW, Dorrington SM, Slack MP, Walmsley HL. Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. Antimicrob Agents Chemother 1988; 32: 518-23.

[26] Stewart PS, Franklin MJ. Physiological heterogeneity in biofilms. Nat Rev Microbiol 2008; 6: 199-210.

[27] Lewis K. Persister cells: molecular mechanisms related to antibiotic tolerance. Handb Exp Pharmacol 2012; 211: 121-33.

[28] Tack KJ, Sabath LD. Increased minimum inhibitory concentrations with anaerobiasis for tobramycin, gentamicin, and amikacin, compared to latamoxef, piperacillin, chloramphenicol, and clindamycin. Chemotherapy 1985; 31: 204-10.

[29] Walters MC, Roe F, Bugnicourt A, Franklin M.J, Stewart PS. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 317-23.

[30] Venglarcik JS, Blair LL, Dunkle LM. pH-dependent oxacillin tolerance of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1983; 23: 232-35.

[31] Retsema JA, Brennan LA, Girard, AE. Effects of environmental factors on the in vitro potency of azithromycin. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1991; 10: 834-42.

[32] Wenzel R.P. Health care-associated infections: major issues in the early years of the 21st century. Clin Infect Dis 2007; 15: 85-88.

## 6. Conclusões

- ✓ O MALDI-TOF MS é mais preciso do que o sistema automatizado Vitek 2 para identificar em nível de espécie os ECN isolados de ITU, particularmente isolados urinários de *S. saprophyticus*.
- ✓ Vários grupos de isolados altamente relacionados foram encontrados entre amostras coletadas em diferentes anos e em diferentes cidades, indicando persistência e propagação geográfica de alguns clones de *S. saprophyticus*.
- ✓ *S. saprophyticus* foi sensível aos agentes antimicrobianos utilizados, com maior percentual de resistência apenas frente a trimetoprim-sulfametoxazol.
- ✓ Apesar da alta prevalência de amostras resistentes à oxacilina pelo método de microdiluição em caldo, poucas amostras carregaram o gene *mecA* e foram consideradas resistentes a antibióticos betalactâmicos. Por essa razão, a microdiluição em caldo para determinar a suscetibilidade de *S. saprophyticus* à oxacilina não é recomendada, porque a maior parte das cepas *mecA* negativas foi considerada resistente ao aplicar os critérios de interpretação do CLSI atualmente recomendadas para ECN.
- ✓ O estudo de fatores de virulência em *S. saprophyticus* mostrou que, apesar do potencial toxigênico observado pela presença de genes para EEs, a produção de EEs não é um fator de virulência relevante para a espécie, entretanto, *S. saprophyticus* mostrou um grande potencial para aderir e crescer de forma persistente no trato urinário, o que pode ser afirmado pela grande quantidade de amostras produtoras de adesinas e biofilme. Dessa forma, fatores de virulência relacionados à adesão às células da bexiga, bem como a produção de biofilme, parecem ser os mais importantes para a colonização e o estabelecimento da infecção no trato urinário humano.

- ✓ A formação de biofilme diminuiu a susceptibilidade dos *S. saprophyticus* aos antibióticos testados. Os resultados dos testes de susceptibilidade antimicrobiana convencional (CIM) não se aplicam a infecções associadas ao biofilme, já que o uso de antimicrobianos testados não conseguiram erradicar as bactéria ligada ao biofilme.

