

ARIANE FARIA DE SOUZA

Caracterização da susceptibilidade a saneantes e relação com clonalidade em amostras de *Staphylococcus haemolyticus* isoladas de hemoculturas



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
Dezembro/ 2020**

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Profa. Dra. Kátia Regina Netto dos Santos e coorientação da Dra. Tamara Lopes Rocha de Oliveira.

FICHA CATALOGRÁFICA**CIP - Catalogação na Publicação**

S729c Souza, Ariane Faria de
Caracterização da susceptibilidade a saneantes e
relação com clonalidade em amostras de
Staphylococcus haemolyticus isoladas de
hemoculturas / Ariane Faria de Souza. -- Rio de
Janeiro, 2020.
75 f.

Orientadora: Kátia Regina Netto dos Santos.
Coorientadora: Tamara Lopes Rocha de Oliveira.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2020.

1. Staphylococcus haemolyticus . 2. Digluconato
de Clorexidina . 3. Genes qac . 4. Bombas de
efluxo. 5. Resistência Cruzada. I. Santos, Kátia
Regina Netto dos, orient. II. Oliveira, Tamara
Lopes Rocha de, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
 NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
 BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
 IMUNOLOGIA**

ALUNO: Ariane Faria de Souza
DRE: 117043620

BANCA EXAMINADORA: Prof. Sergio Eduardo Longo Fracalanza (Presidente)
 Profa. Karla Rodrigues Miranda
 Profa. Fernanda Sampaio Cavalcante
 Profa. Lorryne Cardoso Guimarães (Suplente)

**Título da Monografia: "Caracterização da susceptibilidade a saneantes e
 relação com clonalidade em amostras de *Staphylococcus haemolyticus*
 isoladas de hemoculturas"**

Local: Sala virtual <https://meet.google.com/off-ymtb-qua>
Data e hora de início: 11 de dezembro de 2020 às 10:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 11 de dezembro de 2020.

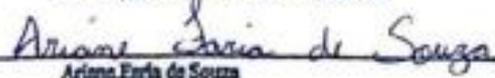
NOTA
10,0
10,0
10,0

Banca Examinadora:
 Prof. Sergio Eduardo Longo Fracalanza
 Profa. Karla Rodrigues Miranda
 Profa. Fernanda Sampaio Cavalcante
 Profa. Lorryne Cardoso Guimarães

Presidente da banca


 Prof. Sergio Eduardo Longo Fracalanza

Aluno:


 Ariane Faria de Souza

Orientador:


 Profa. Tereza Lopes Rocha de Oliveira
 (Tereza Lopes Rocha de Oliveira - coorientadora)

**Coordenador
 de TCC**


 Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

DEDICATÓRIA

A minha família,
por todo amor e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus por me guiar e proteger.

A minha família, que me permitiu buscar meu próprio caminho, sempre me incentivando.

Aos meus amigos da faculdade, espero que consigamos ultrapassar cada barreira e evoluir, nos tornando profissionais ainda melhores, sendo esta a primeira etapa de muitas que virão.

A Thaís, por fazer meu caminho mais fácil e tranquilo, devido suas inúmeras caronas e estudos compartilhados.

A Evely, não sei como seria passar por todos os momentos da faculdade sem você, que sempre esteve do meu lado nos bons e nos maus momentos.

A professora Dra. Kátia, gostaria de agradecer à senhora, por aceitar me orientar e permitir, durante os anos no qual estive no laboratório, poder fazer parte de um projeto tão interessante, no qual cada conhecimento trocado me permitiu crescer, tanto profissionalmente quanto pessoalmente. A senhora é um grande exemplo e inspiração na pesquisa.

A minha orientadora Tamara, não há palavras para dizer o quão grata sou a você. A paciência e dedicação que teve comigo, ajudando-me a amadurecer e criar um pensamento crítico forte, assim como todos os ensinamentos que levarei para a vida.

As pessoas e pesquisadores que conheci no LIH, Nathália, Rayne, Mariana, Raiane, Fernanda, Dennis, por sempre estarem dispostos a ajudar e compartilhar suas experiências.

As amigas que formei no laboratório Lorryne, Isabella, Bruna e Carol. Nunca deixaremos a chama apagar, esta sempre resplandecerá. Ps: Saibam que não vão se livrar de mim tão facilmente.

Ao Marlei, que me auxiliou em diversos momentos, sendo alguém tão dedicado ao trabalho, e sempre madrugando no Fundão junto comigo.

Ao Laboratório de Micobactérias e Laboratório de Bacteriologia Molecular Marinha, que permitiram gentilmente o uso dos equipamentos, tornando a realização desse estudo possível.

Ao INCQS e a professora Renata Picão, por cederem amostras utilizadas como controles neste estudo.

Ao professor Sergio e professoras Karla e Fernanda, que aceitaram fazer parte da minha banca, mesmo em uma época tão complicada como a que vivemos atualmente.

Ao Instituto de Microbiologia e a UFRJ, que foi o meu lar nesse tempo, me permitindo alcançar tantos sonhos e transpor tantos obstáculos.

Aos órgãos financiadores CAPES, CNPq e FAPERJ, que proporcionaram o desenvolvimento desse estudo.

“Não se pode ir reto quando a estrada é curva.”

Provérbio Cigano

RESUMO

ARIANE FARIA DE SOUZA

Caracterização da susceptibilidade a saneantes e relação com clonalidade em amostras de *Staphylococcus haemolyticus* isoladas de hemoculturas

Orientadora: Kátia Regina Netto dos Santos

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Staphylococcus haemolyticus é um patógeno oportunista multirresistente que tem sido isolado de infecções de corrente sanguínea. A pressão seletiva pelo uso de biocidas em instituições de saúde pode levar a indução de resistência cruzada aos antimicrobianos, através da expressão de bombas de efluxo. O objetivo deste estudo é avaliar a Concentração Mínima Bactericida (CMB) de digluconato de clorexidina (DC), e a presença de genes relacionados à sua tolerância, relacionando-os com a clonalidade das amostras de *S. haemolyticus* isoladas de hemoculturas em um hospital do Rio de Janeiro; e realizar estudo piloto de resistência cruzada com amostras de referência de *S. aureus*. Foram avaliadas 71 amostras de *S. haemolyticus* previamente caracterizadas quanto a espécie, Concentração Mínima Inibitória (CMI) para DC, presença do gene *qacA/B* e expressão fenotípica de bombas de efluxo (método de *Cartwheel*). O gene *smr* (*qacC*) foi detectado pela técnica de PCR e a clonalidade foi avaliada pela técnica de PFGE para todas as amostras. A CMB, na ausência e presença de matéria orgânica (SFB, soro fetal bovino), foi determinada para amostras clínicas selecionadas de *S. haemolyticus* e para as amostras ATCC de *S. aureus* 6538 e 29213. As amostras ATCCs também foram expostas, *in vitro*, a doses crescentes de DC e, em seguida, as CMIs foram determinadas para ciprofloxacina, moxifloxacina, gentamicina e vancomicina pela técnica de microdiluição em caldo, e a expressão de bombas de efluxo foi verificada pelo método de *Cartwheel*, em caráter piloto. Os dados clínicos dos pacientes foram avaliados e associados com os resultados microbiológicos. Todas as 71 amostras de *S. haemolyticus* foram agrupadas em 25 clonalidades, sendo 13 (18,3%) amostras incluídas no clone A. Todas também foram positivas para o gene *smr*. A CMB sem e com SFB, respectivamente, foi de 8 e 16 µg/ml para a amostra ATCC 6538 e de 16 µg/ml para a ATCC 29213, em ambas as condições. Entre as amostras de *S. haemolyticus* testadas (n=6) foram encontrados valores de 2 e 4 µg/ml para 2 amostras, e de 2 µg/ml e 8 µg/ml para as demais, respectivamente. Ao analisarmos a possível resistência cruzada aos antimicrobianos foi visto que para a ATCC 29213 houve um aumento de 64X na CMI para ciprofloxacina e 16X para moxifloxacina, enquanto para a ATCC 6538 o aumento foi de 8X na CMI para ciprofloxacina. A presença do gene *qacA/B* e de valores altos de *Cartwheel* foram relacionadas significativamente com valores de CMI $\geq 0,5$ µg/mL do DC. Além disso, amostras do clone prevalente A foram associadas a altos valores de *Cartwheel* ($p= 0.0038$) e de CMI para DC ($p= 0.0344$). A variável idade avançada (≥ 60 anos) foi associada ao clone A ($p=0.008$) e a altos valores de *Cartwheel* das amostras ($p=0.0189$). Os resultados indicam alto potencial de tolerância a saneantes entre amostras de *S. haemolyticus*, destacando que sua indução pelo aumento de expressão de bombas de efluxo pode levar a resistência aos antimicrobianos. Ressalta-se que os valores de CMB para DC foram muito inferiores à concentração usada na rotina clínica, a qual pode manter níveis residuais de DC no ambiente, mantendo a pressão seletiva sobre o patógeno.

Palavras-chave: *Staphylococcus haemolyticus*, multirresistência, digluconato de clorexidina, bombas de efluxo, genes *qac*, resistência cruzada.

ABSTRACT

ARIANE FARIA DE SOUZA

Characterization of susceptibility to biocides and relationship with clonality in *Staphylococcus haemolyticus* samples isolated from blood culture

Orientadora: Kátia Regina Netto dos Santos

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Staphylococcus haemolyticus is an opportunistic and multidrug resistant pathogen isolated from bloodstream infections. The selective pressure exercised by the use of biocides in health institutions has been associated with tolerance based on the presence and expression of efflux pumps. This situation can induce cross resistance to antimicrobials. This study aims to evaluate the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) to chlorhexidine digluconate (CHX) and the presence of genes associated with its tolerance and its relationship with the clonality of *S. haemolyticus* isolates from blood cultures in a hospital in Rio de Janeiro; conduct a cross-resistance pilot study with reference *S. aureus* strains. The 71 *S. haemolyticus* isolates were previously characterized in species, CHX Minimum Inhibitory Concentration (MIC), presence of the *qacA/B* gene and the phenotypic expression of efflux pumps (Cartwheel method). The detection of the *smr* (*qacC*) gene was performed by PCR and the clonality was determined by PFGE technique. The MBC in the absence and presence of organic matter (FBS, fetal bovine serum) was determined for selected clinical isolates of *S. haemolyticus* and for *S. aureus* strains ATCCs 6538 and 29213. In addition, in a pilot project, the cross resistance between antimicrobials and CHX was determined for these ATCCs strains when exposed to increasing doses of CHX. Changes in susceptibility profiles were determined by analyzing the MIC of ciprofloxacin, moxifloxacin, gentamicin and vancomycin and by the expression of efflux pumps by the Cartwheel method. The microbiological data were correlated with the clinical data obtained from the patients. All 71 *S. haemolyticus* isolates were grouped into 25 clonalities, with 13 (18.3%) isolates included in clone A. All isolates were also positive for the *smr* gene. The MBC without and with FBS, respectively, was 16 µg/ml and 8 µg/ml for the ATCC 6538 strain and 16 µg/ml for the ATCC 29213 strain, in both conditions. Among the *S. haemolyticus* isolates tested (n = 6) were found values of 2 and 4 µg/ml for 2 of them, and of 2 µg/ml and 8 µg/ml for the others, respectively. Exposure to increasing doses of CHX in ATCC 29213 showed an increase of 64X and 16X to ciprofloxacin and moxifloxacin MICs, respectively. For the ATCC 6538 there was an increase of 8X in ciprofloxacin MIC. The presence of the *qacA/B* gene and high Cartwheel values were significantly related to CHX MIC values ≥ 0.5 µg/mL. Furthermore, *S. haemolyticus* isolates from clone A were associated with high Cartwheel values (p=0.0038) and CHX MIC values (p=0.0344). The variable advanced age (≥ 60 years) was associated with clonality (p=0.008) and high values of Cartwheel (p=0.0189). The results indicate a high potential for sanitizing tolerance among *S. haemolyticus* isolates, highlighting that its induction by increasing the expression of efflux pumps can lead to resistance to antimicrobials. It is noteworthy that the MBC values for CHX were much lower than the CHX concentration used in the clinical routine, which can maintain residual levels of CHX in the environment, maintaining the selective pressure on the pathogen.

Key-words: *Staphylococcus haemolyticus*, multidrug resistant, chlorhexidine digluconate, efflux pumps, *qac* genes, cross resistance.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fluxograma da metodologia utilizada no presente estudo. 17
- Figura 2.** Esquema representativo da placa de 96 poços para determinação da CMB de DC na presença e ausência de matéria orgânica. 23
- Figura 3.** Esquema representativo da metodologia de indução de amostras estafilocócicas em concentrações crescentes de digluconato de clorexidina..... 24
- Figura 4.** Esquema representativo da metodologia de *Cartwheel*.....27
- Figura 5.** Gel de eletroforese para detecção do segmento do gene *mvaA*.....31
- Figura 6.** Gel de eletroforese para detecção do segmento do gene *smr*. 31
- Figura 7.** Ilustração do alinhamento das bases após o sequenciamento do gene *smr* da amostra 1033s de *S. haemolyticus* comparado com a amostra referência JCSC 1435. 32
- Figura 8.** CMB de clorexidina para a amostra controle de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 34
- Figura 9.** CMB de clorexidina para a amostra clínica 109s de *Staphylococcus haemolyticus* 35
- Figura 10.** Dendrograma com os pulsotipos de PFGE das 71 amostras de *Staphylococcus haemolyticus* avaliadas no presente estudo 38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Amostras utilizadas como controles no presente estudo.....	16
Tabela 2. Valores estabelecidos no MALDI-TOF-MS para identificação microbiana	19
Tabela 3. Iniciadores e ciclo de amplificação utilizados na PCR convencional para identificação da espécie <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	20
Tabela 4. Iniciadores e ciclo de amplificação utilizados na PCR convencional para detecção do gene <i>smr</i> em <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	21
Tabela 5. Resultados obtidos após a identificação da espécie <i>Staphylococcus haemolyticus</i> por meio da metodologia de MALDI-TOF-MS	30
Tabela 6. Características das amostras de <i>Staphylococcus haemolyticus</i> selecionadas para a determinação da CMB de DC.....	33
Tabela 7. Avaliação da resistência cruzada a antimicrobianos em amostras referência de <i>Staphylococcus aureus</i> parentais (sem indução) e após a exposição a doses crescentes de digluconato de clorexidina.	36
Tabela 8. Valores de <i>Cartwheel</i> antes e após a indução das amostras com digluconato de clorexidina	37
Tabela 9. Distribuição clonal das 71 amostras de <i>Staphylococcus haemolyticus</i> em relação aos valores de <i>Cartwheel</i> , CMIs de digluconato de clorexidina e presença dos genes <i>qacA/B</i> e <i>smr</i>	39
Tabela 10. Correlação entre os resultados microbiológicos e os dados clínicos dos pacientes	41

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABC	Do inglês: <i>ATP-binding cassette superfamily</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCs	Do inglês: <i>antigen-presenting cell</i>
ATCC	Do inglês: <i>American Type Culture Collection</i>
BHI	Do inglês: <i>Brain Heart Infusion</i>
BSA	Do inglês: <i>Bovine Serum Albumin</i>
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
caMHB	Do inglês: <i>Cation Adjusted Mueller Hinton Broth</i>
CAMP	Christie, Atkins e Munch-Petersen
CDC	Do inglês: <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CMB	Concentração Mínima Bactericida
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CLSI	Do inglês: <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CVC	Cateter Venoso Central
CRISPR	Do inglês: <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
Da	Dalton
DC	Digluconato de Clorexidina
DO	Densidade Óptica
ECDC	Do inglês: <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
ECN	Estafilococos coagulase negativos
EtBr	Do inglês: <i>Ethidium bromide</i>
h	Horas
HUCFF	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
Hz	Hertz
IBCCF	Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
ICS	Infecções de Corrente Sanguínea
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IRAS	Infecções relacionadas à assistência à saúde
kV	Kilovolt
LIH	Laboratório de Infecção Hospitalar
M	Molar
MALDI-TOF-MS	Do inglês: <i>Matrix Associated Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry</i>
MATE	Do inglês: <i>Multidrug and Toxic Compound Extrusion Family</i>
MDR	Do inglês: <i>Multidrug-resistant</i>
MFS	Do inglês: <i>Major Facilitator Superfamily</i>
MHC	Do inglês: <i>major histocompatibility complex</i>
mg	Microgramas
mM	Micromolar
μL	Microlitros
mL	Mililitros
MRSA	Do inglês: <i>Methicillin Resistant Staphylococcus aureus</i>
MRSH	Do inglês: <i>Methicillin Resistant Staphylococcus haemolyticus</i>
MRSE	Do inglês: <i>Methicillin Resistant Staphylococcus epidermidis</i>
MSCRAMM	Do inglês: <i>microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules</i>
MSSA	Do inglês: <i>Methicillin Susceptible Staphylococcus aureus</i>
MSSE	Do inglês: <i>Methicillin Susceptible Staphylococcus epidermidis</i>

m/z	Do inglês: <i>Mass-to-charge ratio</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
NCBI	Do inglês: <i>National Center for Biotechnology Information</i>
nm	Nanômetros
pb	Pares de base
PACE	Do inglês: <i>Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux Family</i>
PBP	Do inglês: <i>Penicillin-Binding Proteins</i>
PCR	Do inglês: <i>Polimerase Chain Reaction</i>
PCR-RFLP	Do inglês: <i>Restriction Fragment Length Polymorphism,</i>
PFGE	Do inglês: <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
PIA	Do inglês: <i>polysaccharide intercellular adhesin</i>
p	p valor
p/v	Peso/ Volume
RND	Do inglês: <i>Resistance-Nodulation-Cell Division Superfamily</i>
Rpm	rotações por minuto
rRNA	Do inglês: <i>Ribosomal ribonucleic acid</i>
RT-qPCR	Do inglês: <i>Real-Time quantitative PCR</i>
TBE	Tris/Borato/EDTA
TSA	Do inglês: <i>Trypticase Soy Agar</i>
TSB	Do inglês: <i>Trypticase Soy Broth</i>
SCCmec	Do inglês: <i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SMR	Do inglês: <i>Small Multidrug Resistance Family</i>
U	Unidade
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
V	Volts
V/cm	Volt/cm
v/v	Volume/ Volume
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem

SUMÁRIO

ABSTRACT	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xiii
SUMÁRIO	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Infecções relacionadas à assistência à saúde	1
1.2. <i>Staphylococcus spp.</i>	2
1.2.1. <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	3
1.2.2. Susceptibilidade aos antimicrobianos	6
1.3. Biocidas utilizados em instituições de saúde	8
1.3.1. Digluconato de clorexidina	9
1.3.2. Detecção fenotípica e molecular de bombas de efluxo	11
2. JUSTIFICATIVA	14
3. OBJETIVO	15
4. METODOLOGIA	16
4.1. Desenho do estudo e características das amostras utilizadas	16
4.2. Confirmação fenotípica da identificação das amostras de <i>S. haemolyticus</i> através da metodologia de MALDI-TOF-MS (<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight – Mass Spectrometry</i>)	18
4.3. Caracterização molecular das amostras de <i>S. haemolyticus</i>	19
4.3.1. Obtenção de DNA bacteriano pelo método de lise utilizando <i>chelex</i> e proteinase K ...	19
4.3.2. Confirmação da identificação das amostras através de PCR <i>uniplex</i>	20
4.3.3. Detecção do gene <i>smr</i>	21
4.4. Determinação da Concentração Mínima Bactericida do digluconato de clorexidina na presença e ausência de matéria orgânica	22
4.5. Indução da superexpressão de bombas de efluxo e da resistência cruzada entre antimicrobianos e o digluconato de clorexidina em amostras de <i>S. aureus</i> – Estudo Piloto ...	23
4.5.1. Indução da superexpressão de bombas de efluxo em concentrações crescentes de digluconato de clorexidina	23
4.5.2. Avaliação da resistência cruzada a antimicrobianos pela determinação das CMI's após exposição bacteriana a doses crescentes de digluconato de clorexidina	25
4.5.3. Determinação dos valores de <i>Cartwheel</i> para as amostras de <i>S. aureus</i> induzidas	26
4.6. Determinação do perfil clonal das amostras de <i>S. haemolyticus</i> através da análise dos perfis de fragmentação do DNA por PFGE	27
4.7. Análise dos dados clínicos dos pacientes	29
4.8. Análise Estatística	29
5. RESULTADOS	30
5.1. Confirmação da espécie <i>S. haemolyticus</i>	30
5.2. Confirmação da identificação das amostras através de PCR <i>Uniplex</i>	30
5.3. Presença do gene <i>smr</i>	31
5.4. CMB de clorexidina nas condições de ausência e presença de matéria orgânica	33
5.5. Verificação da capacidade de superexpressão de bombas de efluxo após indução bacteriana em concentrações crescentes de DC – Estudo piloto com amostras de referência de <i>S. aureus</i>	35
5.5.1. Indução da superexpressão de bombas de efluxo em concentrações crescentes de digluconato de clorexidina	35
5.5.2. Avaliação da resistência cruzada a antimicrobianos após a exposição a doses crescentes de digluconato de clorexidina pela determinação das CMI's	36

5.5.3. Determinação dos valores de <i>Cartwheel</i> para as amostras induzidas	37
5.6. Perfil clonal das amostras de <i>S. haemolyticus</i>	37
5.7. Correlação entre clonalidade e os valores de <i>Cartwheel</i> , CMI de DC e presença dos genes <i>qacA/B</i> e <i>smr</i>	39
5.8. Correlação entre os resultados microbiológicos e os dados clínicos dos pacientes	40
6. DISCUSSÃO	42
7. CONCLUSÕES	48
8. REFERÊNCIAS.....	49

1. INTRODUÇÃO

1.1. Infecções relacionadas à assistência à saúde

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) ocorrem em ambientes de cuidados médicos fornecidos aos indivíduos, como os hospitais ou *home care*, não estando presente no momento da internação ou em incubação (Magill *et al.*, 2014). As IRAS constituem um grave problema de saúde pública, uma vez que contribuem para morbidade, mortalidade, aumento do tempo de internação e custo hospitalar (Mehta *et al.*, 2014). Tais infecções estão associadas a diferentes fatores de risco, como a realização de procedimentos médicos invasivos, o imunocomprometimento do paciente, a resistência bacteriana aos antimicrobianos e a contaminação cruzada, a qual pode ser controlada pela lavagem das mãos ou uso de soluções alcoólicas (Marcel *et al.*, 2008; ANVISA, 2017b).

As IRAS podem ser classificadas quanto à sua natureza como: infecções de corrente sanguínea (ICS), infecções urinárias associadas a cateteres, infecções de sítio cirúrgico e pneumonias (Haque *et al.*, 2018). As ICS são comumente referidas como bacteremias, sendo este termo utilizado como um sinônimo. São definidas como aquelas que em pacientes com sintomas clínicos de infecção apresentam hemocultura positiva confirmada após análise laboratorial. Podem ser classificadas em primárias (sem origem identificada) ou secundárias (confirmação de infecção em um local definido) (Laupland, 2013).

Em 2019, o relatório anual do *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), sobre dados de 2017, mostrou os estafilococos coagulase negativos (ECN) como a maior causa de infecções da corrente sanguínea (23,6%), seguido de *Enterococcus spp.* (14,9%) (ECDC, 2019a). Em outro relato do ECDC, do mesmo período, *Staphylococcus aureus* foi o principal responsável por IRAS em pacientes no pós-operatório em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) (21,5%), enquanto os ECN responderam por 11% dos casos (ECDC, 2019b). Em um estudo realizado em Israel, por Belark e colaboradores, 2018, em que foram coletadas amostras provenientes de hemoculturas durante o período de 2008 a 2015 em uma UTI neonatal, foi visto que os ECN eram os principais patógenos, causando 52,3% dos quadros de sepse (Berlak *et al.*, 2018).

No Brasil, dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de 2017 mostram os ECN como os principais agentes de infecções em UTIs neonatais (35%) e pediátricas (19,2%), seguido de *Klebsiella pneumoniae* (17,5%). Já em UTIs de pacientes

adultos *K. pneumoniae* (19%), ECN (18,6%) e *S. aureus* (15%) foram os agentes mais isolados (ANVISA, 2017a). Em 2020, Silveira e colaboradores realizaram um estudo em uma UTI neonatal no Rio Grande do Sul, Brasil, onde foram analisadas 41 amostras isoladas de hemoculturas, durante o ano de 2017. Os autores verificaram que os ECN foram os principais patógenos, ocasionado 82,9% (34/41) das infecções nestes pacientes (Silveira *et al.*, 2020).

Recentemente, a ANVISA voltou a destacar os ECN como um dos principais patógenos em IRAS, assim como seu amplo perfil de resistência como um fator relevante, uma vez que em pelo menos 71% dos casos estes microrganismos apresentaram resistência à oxacilina (ANVISA, 2018). Braga e colaboradores, 2018, avaliaram episódios de IRAS nas UTIs de 28 hospitais localizados em Minas Gerais, Brasil. Os autores detectaram a ocorrência dessas infecções em 51,2% dos casos, sendo esta frequência maior quando comparada a encontrada em países europeus e nos Estados Unidos. O estudo destacou os quadros de pneumonia (53%), causados em 30,4% dos casos por *Pseudomonas aeruginosa*, seguido das infecções de corrente sanguínea (27,6%), das quais os ECN e as enterobactérias foram os mais isolados e em mesma proporção, 23,4% (Braga *et al.*, 2018).

1.2. *Staphylococcus spp.*

Os *Staphylococcus spp.* pertencem a família *Staphylococcaceae*, com 62 espécies e 30 subespécies (Euzéby, 2020). Apresentam-se como cocos Gram positivos agrupados em cachos, característica que pode ser vista por meio da coloração de Gram. São anaeróbios facultativos, não fastidiosos, imóveis, apresentando tolerância a 7,5% de NaCl, com temperatura ideal para crescimento na faixa de 35 °C a 37 °C (Santos *et al.*, 2007).

Em laboratório, esses microrganismos podem ser identificados através da realização de testes bioquímicos. Com exceção de *S. aureus* subespécie *anaerobius* e *S. saccharolyticus*, todos os microrganismos deste grupo são capazes de produzir a catalase, uma enzima capaz de catalisar a quebra de peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, permitindo a diferenciação deste gênero de outros grupos de microrganismos Gram positivos, como *Streptococcus* e *Enterococcus*, classificados como catalase negativa (Grüner *et al.*, 2007; Nowakowski e Mamizuka, 2013). Já o teste de susceptibilidade à bacitracina, na concentração de 0,04U, no qual os estafilococos são resistentes, permite à diferenciação da família *Micrococcaceae*, grupo de microrganismos Gram-positivos que possuem a enzima catalase e que são sensíveis a este antimicrobiano (Cunha, Sinzato e Silveira, 2004; Bannerman e Peacock, 2007).

Ademais, esses microrganismos ainda podem ser identificados através do uso de diversos sistemas comerciais como, por exemplo, *Slidex® Staph Kit* (bioMérieux), *Pastorex Staph Plus test®* (Bio-Rad) e *Slidex Staph Plus®* (bioMérieux, Durham, NC), que permitem uma rápida identificação de *S. aureus*. Sistemas automatizados, como o Vitek-2® e o *MicroScan WalkAway Systems* também têm sido muito utilizados na rotina laboratorial (Weist *et al.*, 2006; Iorio *et al.*, 2007; Namvar *et al.*, 2014; Ayeni, Andersen e Nørskov-Lauritsen, 2017). A identificação molecular pode ser realizada através de reação em cadeia da polimerase (PCR), pela amplificação da região 16S rRNA e genes espécie-específicos (Pereira *et al.*, 2010; Ayeni, Andersen e Nørskov-Lauritsen, 2017).

Os estafilococos podem ser divididos em dois grupos: os estafilococos coagulase positivos, com destaque para o *S. aureus*, e os ECN, onde se destacam as espécies prevalentes *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus* (Barros *et al.*, 2012; Namvar *et al.*, 2014; Becker *et al.*, 2020). A proteína coagulase é capaz de converter fibrinogênio em fibrina, dessa forma, consegue interferir na cascata de coagulação, levando a formação de coágulos em plasma ou sangue (McAdow, Missiakas e Schneewind, 2012; Becker, Heilmann e Peters, 2014). Enfatizando a importância clínica, o *Centers for Disease Control and Prevention* – CDC aponta o patógeno *S. aureus* resistente à metilina (MRSA) como um dos microrganismos mais relevantes pela dificuldade de tratamento (CDC, 2019). Contudo, o grupo dos ECN tem sido cada vez mais relacionado com IRAS associadas a dispositivos médicos invasivos, como cateteres e próteses (Becker, Heilmann e Peters, 2014; Asai *et al.*, 2020).

1.2.1. *Staphylococcus haemolyticus*

Staphylococcus haemolyticus é um microrganismo comumente encontrado na microbiota da pele e de mucosas, possuindo diversos fatores de virulência e variados genes de resistência, que o permite causar diferentes quadros de infecções (Becker, Heilmann e Peters, 2014). Destaca-se sua importância em diferentes IRAS, mas principalmente como causa de infecções de corrente sanguínea (Hitzenbichler *et al.*, 2016; Asai *et al.*, 2020).

Alguns fatores de virulência contribuem para a patogenicidade do microrganismo (Czekaj, Ciszewski e Szewczyk, 2015) e, dentre eles podemos citar lipases, proteases, ácido teicóico e adesinas, como as proteínas MSCRAMM (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*), que permitem a adesão às proteínas de matriz nos tecidos do hospedeiro (Becker *et al.*, 2020). Em um estudo recente realizado nos Estados

Unidos, Chon e colaboradores, 2020, mostraram que todas as amostras de ECN eram produtoras de DNase e apresentavam o gene para Enolase, uma proteína que auxilia na ligação a laminina (Chon *et al.*, 2020).

Enterotoxinas também desempenham um papel importante na patogenicidade, sendo considerados superantígenos devido a sua capacidade de se ligar a moléculas de MHC classe II nas células de apresentação de antígeno (APCs), estimulando grandes populações de células T e gerando uma elevada resposta inflamatória (Pinchuk, Beswick e Reyes, 2010). Em um estudo de Pinheiro e colaboradores, 2015, realizado em São Paulo, Brasil, foram analisadas 84 amostras de *S. haemolyticus* e 79,8% delas carregavam pelo menos um gene de enterotoxina, com destaque para os genes *sei* (61%), *seg* (56%) e *sea* (48%). Além disso, *hla/yidD*, um gene relacionado a uma hemolisina foi detectado em 91,7% das amostras. Os autores também investigaram a presença de genes que codificam toxinas e, demonstraram que 83,3% das amostras carregavam o gene da α -toxina, 81% da β -toxina e, em menor proporção, 40,5% possuíam o gene da δ -toxina (Pinheiro *et al.*, 2015). Também Nasaj e colaboradores, em 2020, demonstraram que ECN, incluindo a espécie *S. haemolyticus* carregavam vários genes para hemolisinas, com destaque para o gene *hla* (94,6%) (Nasaj *et al.*, 2020). Szemraj e colaboradores, 2020, em estudo realizado na Polônia, mostraram que entre as 23 amostras de *S. haemolyticus* testadas para o fator CAMP, ensaio que possibilita a avaliação da produção de δ hemolisina, 74% delas foram positivas (Szemraj *et al.*, 2020).

Amostras de *S. haemolyticus* podem produzir biofilme, um agregado de células microbianas envoltas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares, sendo capazes de se aderir a superfícies bióticas e/ou abióticas (Flemming *et al.*, 2016). O processo de formação de biofilme geralmente é constituído de três etapas principais: adesão, maturação e dispersão (Otto, 2013). Este é um importante fator de virulência, que dificulta a entrada de antimicrobianos na célula bacteriana, facilita a aderência às superfícies e fornece proteção contra os mecanismos de defesa do hospedeiro (López, Vlamakis e Kolter, 2010). A presença do operon *icaADBC*, responsável pela produção de PIA (*polysaccharide intercellular adhesin*) tem sido demonstrado entre os ECN, principalmente na espécie *S. epidermidis* (Mack *et al.*, 1996; Otto, 2018).

A produção de biofilme por espécies de *Staphylococcus spp.* causando infecções associadas a cateter venoso central foi avaliada em um estudo de Antunes e colaboradores, 2011, no Rio Grande do Sul, Brasil. O estudo avaliou 224 amostras de *Staphylococcus spp.*, das quais 63,8% de ECN e 92,3% de *S. aureus* eram produtoras de biofilme. Entre os *S. haemolyticus*, das três amostras isoladas, duas eram produtoras fracas e uma era não

produtora (Antunes *et al.*, 2011). Em outro estudo, desenvolvido por Szemraj e colaboradores, 2020, e realizado na Polônia, a produção de biofilme foi observada em 78,2 % das 23 amostras de *S. haemolyticus* analisadas (Szemraj *et al.*, 2020).

Silva e colaboradores, 2013, em um estudo realizado no Rio de Janeiro, Brasil, ao analisarem 27 amostras de *S. haemolyticus* encontraram 66% como produtoras de biofilme e associadas a um perfil de multirresistência, com uma relação significativa ($p < 0,01$). Contudo, nenhuma amostra produtora de biofilme carregava os genes *ica* (Silva *et al.*, 2013). Já Pereira-Ribeiro e colaboradores, 2019, em estudo recente também realizado no Rio de Janeiro, similarmente demonstraram a formação de biofilme independente do gene *ica*. Ademais, houve aumento na formação de biofilme quando as amostras foram expostas a concentrações subinibitórias de diferentes antimicrobianos (Pereira-Ribeiro *et al.*, 2019).

S. haemolyticus é uma espécie que apresenta grande diversidade genotípica, e a técnica de PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) pode ser empregada como ferramenta para a determinação da relação clonal entre diferentes amostras (Parizad, Parizad e Valizadeh, 2016). Um dendrograma é construído pelo método de agrupamento pareado não ponderado baseado em ligações médias aritméticas (*unweighted-pair group method using average linkages*- UPGMA) através de um *software*, relacionando o quão próximo são as amostras. Essa metodologia permite o agrupamento genômico definindo as clonalidades (tipos e subtipos) por meio de pontos de corte a partir de um coeficiente de similaridade (Dice). São designados aos tipos letras maiúsculas, enquanto aos subtipos, um número (Faria *et al.*, 2008; Bouchami, Lencastre e Miragaia, 2016).

Apesar da grande diversidade clonal observada entre amostras de *S. haemolyticus* é possível verificar que alguns clones predominantes no ambiente hospitalar. Yu e colaboradores, 2010, em um estudo realizado na China, avaliaram a clonalidade de 90 de *S. haemolyticus* resistentes a metilina, provenientes de diferentes espécimes clínicos, sendo 40% delas agrupadas em uma única clonalidade (Yu *et al.*, 2010). Outro estudo realizado por Chang e colaboradores, 2018, em Taiwan, envolvendo 69 amostras de *S. haemolyticus* provenientes de diferentes espécimes em pacientes com queimaduras, mostrou que as amostras foram agrupadas em 11 clonalidades, com destaque para um clone prevalente associado a 52,2% das amostras (Chang *et al.*, 2018).

No Rio de Janeiro, Silva e colaboradores, em 2013, agruparam 27 amostras de *S. haemolyticus* provenientes de hemoculturas em 15 clonalidades diferentes, sendo que para duas destas não foi possível determinar a clonalidade (Silva *et al.*, 2013). Salgueiro e colaboradores, 2019, identificaram 31 amostras de *S. haemolyticus* isoladas de neonatos

internados em uma UTI carioca que foram agrupadas em 14 clonalidades. Sendo que apenas um dos clones foi responsável por agrupar 26% do total de amostras. Os autores relacionaram a predominância de algumas clonalidades com a capacidade de adaptação, persistência e circulação das cepas no ambiente hospitalar. Essa capacidade pode estar relacionada com diversos fatores, como a resistência antimicrobiana, a capacidade de formar biofilme e a presença de proteínas de superfície com maior propriedade adesiva (Salgueiro *et al.*, 2019).

A mortalidade de infecções por *S. haemolyticus* é pouco relatada na literatura. No entanto, um estudo realizado por Chang e colaboradores, 2018, em Taiwan, com a participação de 50 pacientes internados após episódios de queimaduras graves mostrou o desfecho do quadro, no qual 48 (96%) obtiveram alta e 2 (4%) vieram a óbito (Chang *et al.*, 2018).

As infecções por *S. haemolyticus* são tratadas com os antimicrobianos de escolha para os ECNs. Para cepas sensíveis à meticilina, os fármacos prescritos são as cefalosporinas, como cefazolina ou ceftriaxona (Becker, Heilmann e Peters, 2014; Silveira *et al.*, 2020). Entretanto, comumente esse grupo de microrganismos apresenta resistência à meticilina, sendo assim, é empregada, empiricamente, a vancomicina como fármaco de escolha (Sánchez *et al.*, 2016). Contudo, a vancomicina tem sido associada a diversos efeitos colaterais e a um crescente relato de heterorresistência (Berlak *et al.*, 2018; Dao *et al.*, 2020). Por esses motivos este fármaco está tendo o seu uso reservado a casos graves ou de resposta não satisfatória como, por exemplo, em sepse em UTIs neonatais (Hemels *et al.*, 2011). Alguns hospitais vêm adotando como protocolo de uso da vancomicina a constatação de dois episódios de culturas positivas, minimizando, assim, o risco de disseminação da resistência ao limitar o uso da vancomicina na terapêutica (Berlak *et al.*, 2018).

Como tratamento alternativo à vancomicina pode-se utilizar daptomicina, linezolida ou a combinação da rifampicina associada a outro antimicrobiano (Becker, Heilmann e Peters, 2014). Em alguns casos é prescrito, de forma empírica, a combinação de um beta-lactâmico com um aminoglicosídeo, como gentamicina, a fim de diminuir a possibilidade de falha terapêutica (McConeghy, Bleasdale e Rodvold, 2013; Silveira *et al.*, 2020).

1.2.2. Susceptibilidade aos antimicrobianos

A susceptibilidade a um antimicrobiano é definida como a capacidade de se inibir o crescimento microbiano por doses usuais para tratar um sítio de infecção, garantindo assim a eficácia terapêutica (CLSI, 2019). Já a resistência a uma droga é a habilidade de um

microrganismo em crescer em altas concentrações desse antimicrobiano, independente da duração do tratamento, sendo quantificado através da concentração mínima inibitória (CMI) (Brauner, 2016).

Os mecanismos de resistência aos antimicrobianos podem ocorrer de diferentes formas como: alterações no sítio-alvo da droga, superexpressão da molécula alvo, redução da permeabilidade celular, destruição ou modificação da droga e efluxo da droga através de bombas de efluxo (Dzidic, Suskovic e Kos, 2008).

Amostras de *S. haemolyticus*, frequentemente, apresentam resistência aos beta-lactâmicos, uma classe de antimicrobianos que atua inibindo a síntese da parede celular através da ligação com a PBP (*penicillin-binding proteins*), impedindo a transpeptidação (Watkins e Bonomo, 2017). A resistência pode ocorrer através de alteração da molécula alvo, por meio da produção de uma PBP alterada, a PBP2a, codificada, principalmente, pelo gene *mecA*. Este se encontra inserido em um elemento genético móvel, conhecido como *SCCmec* (*staphylococcal cassette chromosome mec*). Além disso, já foi descrito em amostras da espécie *S. aureus* um análogo do gene *mecA*, o gene *mecC*. Até o presente momento, foram identificados quatorze tipos de *SCCmec* (Paterson, Harrison e Holmes, 2014; Saber *et al.*, 2017; Turner *et al.*, 2019; Urushibara *et al.*, 2020). Ainda pode ocorrer modificação em porinas e a destruição do antimicrobiano, através da produção de betalactamases (Fernandes, Amador e Prudêncio, 2013).

A resistência à metilina entre amostras de *Staphylococcus* tem sido mostrada em diversos estudos. Salgueiro e colaboradores, 2019, em estudo realizado, no Rio de Janeiro, Brasil, encontrou uma alta taxa de *Staphylococcus spp.* resistentes à metilina colonizando neonatos, com destaque para *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, com 87,5% e 90,3% das amostras sendo carreadoras do gene *mecA*, respectivamente (Salgueiro *et al.*, 2019). Em outro estudo realizado por Taha e colaboradores, em 2019, foram analisadas 30 amostras de *S. haemolyticus* provenientes de hemoculturas de neonatos em um hospital em Bagdá, Iraque. O estudo mostrou a resistência à oxacilina, benzilpenicilina e metilina em todas as amostras por meio do sistema Vitek-2[®]. Ademais, o gene *mecA* foi detectado em 28 (93,3%) das amostras (Taha *et al.*, 2019).

Além dos beta-lactâmicos, os *S. haemolyticus* podem carrear resistência a macrolídeos, aminoglicosídeos e quinolonas, sendo um fator relevante, pois acarreta limitação na escolha terapêutica, dificultando assim o tratamento clínico (Barros *et al.*, 2012; Czekaj, Ciszewski e Szewczyk, 2015). A multirresistência é frequentemente associada a essa espécie, sendo definida pela resistência concomitante a pelo menos três classes distintas de

antimicrobianos (Siegel *et al.*, 2007). Em 2013, no estudo de Silva e colaboradores, no Rio de Janeiro, Brasil, a análise de 27 amostras de *S. haemolyticus* mostrou que 96,3% carregavam o gene *mecA* (Silva *et al.*, 2013). Em 2014, em outro estudo também realizado no Rio de Janeiro, Pereira e colaboradores isolaram 31 amostras de *S. haemolyticus* de infecção da corrente sanguínea em uma UTI neonatal, mostrando um elevado percentual de resistência à oxacilina (90,3%) e multirresistência em 70,4 % dos casos (Pereira *et al.*, 2014).

Em dois estudos recentes envolvendo amostras de *S. haemolyticus* foi demonstrada a multirresistência marcante deste microrganismo. Na Índia, em estudo onde foram coletadas 356 amostras de *S. haemolyticus* de diferentes sítios de infecção foi relatada resistência à meticilina em 91,3% e à eritromicina em 85,4% das amostras. A multirresistência foi vista em 87,1% das amostras (Manoharan, Sistla e Ray, 2020). No estudo de Suhartono e colaboradores, em 2019, foram coletadas 693 amostras de *Staphylococcus spp.* de diferentes espécimes clínicos em um hospital na região de Achém, Indonésia. *Staphylococcus haemolyticus* foi a espécie prevalente, isolada em 32,2% (233) dos casos, sendo 95,9% resistentes à meticilina. Entre os MRSH (*methicillin-resistant Staphylococcus haemolyticus*) foi visto que mais de 85% apresentaram um perfil de resistência a uma ampla gama de antimicrobianos, como beta-lactâmicos, fluoroquinolonas, carbapenemas e macrolídeos (Suhartono, Hayati e Mahmuda, 2019).

A resistência de algumas cepas de *S. haemolyticus* à mupirocina, um antimicrobiano comumente utilizado na descolonização de *S. aureus*, foi demonstrada por Do Carmo Ferreira e colaboradores, em trabalho realizado no Brasil, em 2011. As amostras eram carreadoras do plasmídeo Mup^R, que continha o gene *mupA*. Destaca-se a questão do envolvimento desses plasmídeos na disseminação da resistência à mupirocina e a possível transmissão horizontal do mesmo para outras espécies (Do Carmo Ferreira *et al.*, 2011). Em estudo posterior, Rossi e colaboradores, 2016, corroboraram esses dados (Rossi *et al.*, 2016).

Os ECN, com destaque para *S. haemolyticus*, podem servir como um reservatório de genes de resistência a outras espécies, propiciando a disseminação de resistência, como foi observado em um estudo de Rossi e colaboradores, 2017, através de CRISP-Cas (Rossi *et al.*, 2017). Os autores ao analisarem 122 genomas de 15 espécies de ECN demonstraram que 15% abrigava o Sistema CRISPR/Cas. Apesar da baixa abundância de CRISPRs em *S. haemolyticus* (3%, 1/32), os autores ressaltaram a importância de sua presença já que pode contribuir para a transferência horizontal de genes entre os estafilococos (Rossi *et al.*, 2017).

1.3. Biocidas utilizados em instituições de saúde

Biocidas são agentes físicos ou químicos capazes de eliminar o crescimento microbiano, podendo ser utilizados para a antissepsia, desinfecção, esterilização e conservação (McDonnell e Russell, 1999). Esse termo é empregado mundialmente, no entanto, a ANVISA, o órgão responsável pela fiscalização e normatização desses compostos no Brasil, preconiza o uso do termo saneante (RDC n° 255, de 10 de dezembro de 2018). Os saneantes são substâncias ou preparações destinadas à higienização, desinfecção, conservação, sanitização ou desinfestação, sendo utilizados em objetos, tecidos, superfícies inanimadas, ambientes coletivos e/ou públicos e no tratamento de água (Lei n° 6.360, de 23 de setembro de 1976; ANVISA, 2016).

É importante ressaltar que o processo de desinfecção é definido como a eliminação de agentes patogênicos de uma superfície inerte mediante a aplicação de agentes químicos ou físicos (Ministério da Saúde e ANVISA, 2010). Alguns dos principais biocidas utilizados para desinfecção de superfície são o álcool etílico e o isopropílico, o hipoclorito de sódio, o ácido peracético e o quaternário de amônia (ANVISA, 2010). O processo de antissepsia, por outro lado, tem por finalidade a eliminação ou inibição do crescimento microbiano quando utilizado sobre pele e mucosas, podendo ser bacteriostático ou bactericida (Moriya e Módena, 2008). Destacam-se os compostos cetrimide, iodopovidona, cloreto de benzalcônio, digluconato de clorexidina e triclosan usados em hospitais (Pearce, Messenger e Maillard, 1999; Smith e Hunter, 2008).

A ANVISA recomenda o uso de saneantes inclusive em situações onde há a presença de matéria orgânica e a presença de microrganismos multirresistentes (ANVISA, 2010). Contudo, a matéria orgânica pode inativar saneantes e diferentes tipos podem ser utilizados em experimentos *in vitro*, como a albumina, sangue de carneiro e mucina (Pitten, Werner e Kramer, 2003). Em um estudo de Worthing e colaboradores, 2018, realizado na Austrália, os autores demonstraram a redução da atividade do cloreto de benzalcônio e da clorexidina, quando na presença de matéria orgânica, ao analisar 31 amostras de MRSA e de *Staphylococcus pseudintermedius* também resistentes à metilina. Quando o BSA (*bovine serum albumin*) foi utilizado 50% das amostras MRSA e 43% dos *S. pseudintermedius* tiveram uma Concentração Mínima Bactericida (CMB) para o cloreto de benzalcônio acima da concentração recomendada para a desinfecção (Worthing *et al.*, 2018).

1.3.1. Digluconato de clorexidina

A clorexidina é um saneante que vem sendo amplamente utilizado no ambiente hospitalar, desde a antissepsia em procedimentos médicos até banhos de leito (Denny e Munro, 2017). Esse biocida é uma bi-bisguanida catiônica e possui atividade bactericida. Por ser uma molécula carregada positivamente se liga na superfície celular bacteriana, que possui carga negativa, desestabilizando-a, interferindo na osmose e ocasionando a morte celular (Horner, Mawer e Wilcox, 2012).

No Brasil, a clorexidina como solução antisséptica é utilizada em instituições de saúde, podendo ser encontrada em concentrações variando de 0,5% a 4% (Ministério da Saúde e ANVISA, 2016). Em cosméticos e produtos de higiene pessoal pode ser utilizada como conservante a 0,3 % (Ministério da Saúde e ANVISA, 2012).

O uso de clorexidina alcoólica é recomendado para antissepsia da pele antes da inserção do cateter venoso central (CVC) e cateter periférico, durante a higienização e troca de curativos, sendo utilizada em concentrações superiores a 0,5% (O'grady *et al.*, 2011). Já, na concentração de 2%, é usada para limpeza diária de pele no combate as infecções de corrente sanguínea associadas a cateteres (O'grady *et al.*, 2011). A ANVISA recomenda a realização de banhos com clorexidina a 2% em pacientes maiores de 2 meses de idade internados em UTI em situações especiais, como em unidades com taxas elevadas de infecções primárias da corrente sanguínea, em pacientes de alto risco para consequências desfavoráveis (presença de próteses, imunossupressão grave, etc.) ou pacientes com infecções recorrentes (ANVISA, 2017b).

Em unidades neonatais a clorexidina é encontrada sob diferentes formas de solução e concentrações, como a degermante (2 a 4%), sendo utilizada para lavagem das mãos, degermação da pele em procedimentos cirúrgicos e banhos de recém nascidos internados. Já, a alcoólica a 0,5 % emprega-se para a antissepsia do campo operatório e das coletas de sangue para cultura, em curativos diários após a realização do procedimento de cateterização de veia ou artéria umbilical. A forma aquosa a 0,2 % é usada para a antissepsia da passagem de sonda vesical e irrigação do canal de parto (Ministério da Saúde, 2014).

Os banhos com clorexidina são muito utilizados para redução de IRAS (Popp *et al.*, 2014; Musuuza *et al.*, 2019). No entanto, o seu uso em demasia trouxe a discussão sobre a diminuição da susceptibilidade a esse saneante (Suwantarat *et al.*, 2014). A redução da susceptibilidade a clorexidina já foi relatada em *Staphylococcus spp.*, sendo um fator preocupante uma vez que autores sugerem uma significância entre a presença dos genes de tolerância a clorexidina e a resistência a diversas classes de antimicrobianos (Horner, Mawer e Wilcox, 2012; Hardy *et al.*, 2018). Em ECN a mesma problemática tem sido levantada,

dando destaque à espécie *S. epidermidis*, como um dos principais alvos investigados nessa temática (Prag *et al.*, 2014; Hijazi *et al.*, 2016; Do Vale *et al.*, 2019).

É importante destacar o fato de a clorexidina possuir uma baixa biodegradabilidade, permanecendo no ambiente por algum tempo mesmo após a sua aplicação (Rosenthal, 2004). Desta forma, os resíduos que ficam no ambiente podem causar uma pressão seletiva microbiana e, assim estimular o aumento da expressão de bombas de efluxo, um dos principais fatores associados à tolerância a clorexidina. O aumento na expressão de sistemas de bombas de efluxo pode ser associado, por exemplo, a possíveis mecanismos de resistência cruzada entre o saneante e o antimicrobiano, uma vez que estas bombas podem transportar diversos substratos para o exterior das células bacterianas (Fraise, 2002; Kampf, 2016).

Em estudo de Wu e colaboradores, em 2016, amostras de *S. aureus* foram expostas a doses crescentes de clorexidina e, ao fim do processo, foi realizada a comparação dos perfis de susceptibilidade pela determinação das CMI's a diversos antimicrobianos entre as amostras parentais e as induzidas. Os autores observaram um aumento nas CMI's para ciprofloxacina, clorexidina, tetraciclina, gentamicina, amicacina, cefepima e meropenem, demonstrando assim uma possível resistência cruzada entre a clorexidina e estes antimicrobianos (Wu *et al.*, 2016). Em um estudo realizado por nosso grupo (De Oliveira, 2019) 10 amostras de *S. aureus* foram expostas a doses crescentes de ciprofloxacina e de digluconato de clorexidina. Ao analisar a susceptibilidade das amostras parentais e induzidas, foi observado um aumento nos valores de CMI's para ciprofloxacina (9 amostras), moxifloxacina (n=7), gentamicina (n=6), clorexidina (n=2) e tetraciclina (n=1) após exposição à ciprofloxacina, sendo um indicativo de resistência cruzada. Quando as amostras foram expostas à clorexidina, foi observado aumento nos valores das CMI's para ciprofloxacina, moxifloxacina e/ou tetraciclina, reforçando assim, o pressuposto de resistência cruzada entre saneante e antimicrobianos, *in vitro* (De Oliveira, 2019 – dados não publicados).

1.3.2. Detecção fenotípica e molecular de bombas de efluxo

As bombas de efluxo são proteínas transportadoras envolvidas na extrusão ativa de compostos tóxicos para o exterior da célula, conseguindo transportar uma ampla variedade de substâncias como antimicrobianos, biocidas, metais pesados, dentre outros (Webber e Piddock, 2003; Blanco *et al.*, 2016). Essas são encontradas em todas as espécies bacterianas e os genes responsáveis por codificá-las podem estar localizadas no DNA cromossômico ou em plasmídeos (Sun, Deng e Yan, 2014, Alcalde-Rico *et al.*, 2016).

As bombas de efluxo têm sua expressão fortemente regulada por um equilíbrio complexo entre os reguladores locais e globais. Perante diferentes condições de estresse os mecanismos regulatórios globais podem promover a superexpressão de bombas de efluxo, colaborando para a aquisição do fenótipo MDR (*Multidrug-resistant*) (Alibert *et al.*, 2017). Essas podem ser expressas em níveis baixos de forma constitutiva, contribuindo para a resistência em níveis baixos de antimicrobianos. Também podem ser superexpressas permitindo altos níveis de resistência (CMI's mais altas) de forma transitória ou constitutiva por meio de mutações nos elementos que regulam sua expressão (resistência adquirida) (Alcalde-Rico *et al.*, 2016).

As bombas de efluxo podem ser classificadas em 6 famílias: a MFS (*major facilitator superfamily*), ABC (*ATP-binding cassette superfamily*), SMR (*small multidrug resistance family*), MATE (*multi drug and toxic compound extrusion family*), PACE (*proteobacterial antimicrobial compound efflux family*) e RND (*resistance-nodulation-cell division superfamily*) (Kumar e Schweizer, 2005; Du *et al.*, 2018). Relata-se que a família RND é exclusiva de bactérias Gram negativas (Sun, Deng e Yan, 2014), no entanto, há debates acerca disto, pois há descrições de características estruturais no genoma de algumas bactérias Gram positivas, como, *S. aureus* (Schindler e Kaatz, 2016; Alnaseri *et al.*, 2015).

Em *Staphylococcus spp.* são conhecidos diferentes genes que codificam bombas de efluxo associadas a tolerância a saneantes, sendo elas, *qacA*, *qacB*, *qacC* (ou *smr*) *qacG*, *qacH*, *qac J* (Horner, Mawer e Wilcox, 2012, Wassenaar *et al.*, 2015). Com destaque para o *S. aureus*, a espécie mais estudada do gênero, onde foram identificadas 20 bombas de efluxo, que podem transportar antimicrobianos e/ou biocidas (Hassanzadeh *et al.*, 2019).

Em *Staphylococcus haemolyticus* já foram descritos alguns genes que codificam bombas de efluxo, como o *qacA/B*, *smr* (*qacC*), *qacG*, *qacH* e *qacJ* (Correa *et al.*, 2008; Do Vale, 2019). Entre as bombas de efluxo, destaca-se a proteína QacA/B, pertencente à família MFS, sendo associada a tolerância de biocidas, como quaternários de amônios e outras substâncias desinfetantes, como a clorexidina (Lekshmi *et al.*, 2018). O gene *smr* (*qacC*), pertencente à família SMR, foi associado também a resistência aos antimicrobianos, como às fluoroquinolonas e à clindamicina (McNeil *et al.*, 2015).

A detecção de sistemas de efluxo pode ocorrer de forma fenotípica por meio da determinação da concentração mínima inibitória (CMI) do brometo de etídeo (EtBr), assim como, através da técnica de *Cartwheel*, que verifica os sistemas de bomba de efluxo ativos na célula bacteriana através da extrusão de um composto extremamente tóxico a célula, como o EtBr, um intercalante de DNA (Patel *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2011). No *Cartwheel* são

utilizadas diferentes concentrações de EtBr, onde quanto maior for a concentração do composto ao qual a célula bacteriana é capaz de suportar, maior a capacidade de expressar sistemas de bombas de efluxo (Martins *et al.*, 2013).

A identificação dessas bombas também pode ser realizada molecularmente verificando-se a presença de genes que codificam bombas de efluxo, por meio de PCR, PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RT-qPCR (*Real-Time quantitative PCR*) e através do sequenciamento parcial ou total da amostra e análise de similaridade (Correia *et al.*, 2008; Zmantar *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2017; Worthing *et al.*, 2018).

Portanto, é imprescindível investigar a presença de bombas de efluxo em microrganismos multirresistentes, uma vez que a pressão seletiva exercida pelo uso de saneantes, como o digluconato de clorexidina, pode levar ao aumento na expressão destas bombas e culminar na resistência cruzada entre saneantes e antimicrobianos, podendo impactar no tratamento e no prognóstico de quadros clínicos de IRAS (Costa *et al.*, 2013; Buffet-Bataillon *et al.*, 2016).

2. JUSTIFICATIVA

Staphylococcus haemolyticus é um patógeno oportunista da microbiota associado a infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), com prevalência em infecções da corrente sanguínea. No entanto, sua multirresistência a uma ampla gama de antimicrobianos tem dificultado a terapêutica utilizada. Na prevenção de IRAS tem se utilizado a clorexidina para a antissepsia da pele em procedimentos invasivos e na higienização do indivíduo. Contudo, o uso frequente desse saneante no ambiente hospitalar pode levar a diminuição de sua susceptibilidade pelo aumento na expressão de sistemas de bombas de efluxo, já que estas são responsáveis pela manutenção dos níveis de tolerância a antissépticos. Além disso, o transporte de mais de um tipo de substrato pode culminar em resistência cruzada entre saneante e antimicrobiano. Entretanto, há raros estudos sobre a ação da clorexidina em amostras de *S. haemolyticus*, sendo também escassos os estudos caracterizando a presença de genes de bombas de efluxo e sua relação com a tolerância aos antissépticos em diferentes perfis clonais desta espécie. Deve-se ressaltar que o presente estudo envolve uma coleção de amostras de *S. haemolyticus* bem caracterizada e isolada de infecções invasivas de indivíduos internados em um hospital no Rio de Janeiro.

3. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar a susceptibilidade ao digluconato de clorexidina (DC) e a presença de genes relacionados à sua tolerância (família *qac*), relacionando-os com a clonalidade das amostras de *Staphylococcus haemolyticus* isoladas de hemoculturas em um hospital universitário do Rio de Janeiro, e relacionar os resultados com os dados clínicos dos indivíduos.

3.1. Estratégias

- Confirmar a identificação das amostras através da metodologia de MALDI-TOF-MS e por PCR *uniplex*;
- Detectar o gene *smr* através de PCR convencional;
- Determinar a Concentração Mínima Bactericida para o DC na presença e ausência de matéria orgânica;
- Realizar estudo piloto com amostras de *S. aureus* de referência através da exposição bacteriana a concentrações crescentes de DC, seguida por avaliação da resistência cruzada com antimicrobianos pela determinação das Concentrações Mínimas Inibitórias e pela expressão de bombas de efluxo;
- Determinar as linhagens clonais das amostras através da análise dos perfis de fragmentação do DNA por PFGE;
- Relacionar os dados microbiológicos com os dados clínicos dos indivíduos.

4. METODOLOGIA

4.1. Desenho do estudo e características das amostras utilizadas

Esse estudo tem caráter transversal e laboratorial, em que foram avaliadas 71 amostras de *S. haemolyticus* isoladas de hemoculturas, entre 2011 e 2013, no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUCFF, sob o número: CAAE 40652714.0.0000.5257.

As amostras encontram-se estocadas no Laboratório de Infecção Hospitalar (LIH) em criotubos contendo caldo *Trypsicase Soy Broth* (TSB, BD, *Becton, Dickinson and Company; Sparks, Maryland, EUA*) e com 20% (v/v) de glicerol (Sambrook, Fritsch, Maniatis, 1989). As amostras foram previamente caracterizadas quanto a espécie, resistência à meticilina (Rodrigues, 2015), CMI para o digluconato de clorexidina (DC), expressão de bombas de efluxo avaliada pelo método de *Cartwheel* e presença do gene *qacA/B* (Aguiar, 2018).

A tabela 1 apresenta as amostras utilizadas como controles no estudo. Além das amostras controles foi empregada uma estirpe de *Escherichia coli* (DH5 α), como calibrador da técnica de MALDI-TOF-MS (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight – Mass Spectrometry*). A Figura 1 ilustra o fluxograma da metodologia utilizada no estudo.

Tabela 1. Amostras utilizadas como controles no presente estudo

Amostra	Espécie	Características	Referência
ATCC 29213	<i>S. aureus</i>	Controle padrão de sensibilidade aos antimicrobianos em testes de diluição	CLSI 2019
ATCC 6538 (INCQS 00039)	<i>S. aureus</i>	Controle padrão de sensibilidade aos saneantes	Fiocruz, 1987 (cedida pelo INCQS)
JCSC 1435	<i>S. haemolyticus</i>	Controle positivo para identificação de espécie	Takeuchi <i>et al.</i> , 2005
1033s*	<i>S. haemolyticus</i>	Positiva para o gene <i>smr</i> (<i>qacC</i>) (parcialmente sequenciado)	Este Estudo
PaO1XY++	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cepa geneticamente modificada para expressar sistemas de bombas de efluxo	Cedida pela Prof ^a Dra Renata Picão

ATCC: *American Type Culture Collection*, CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*, INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, *: Amostra clínica.

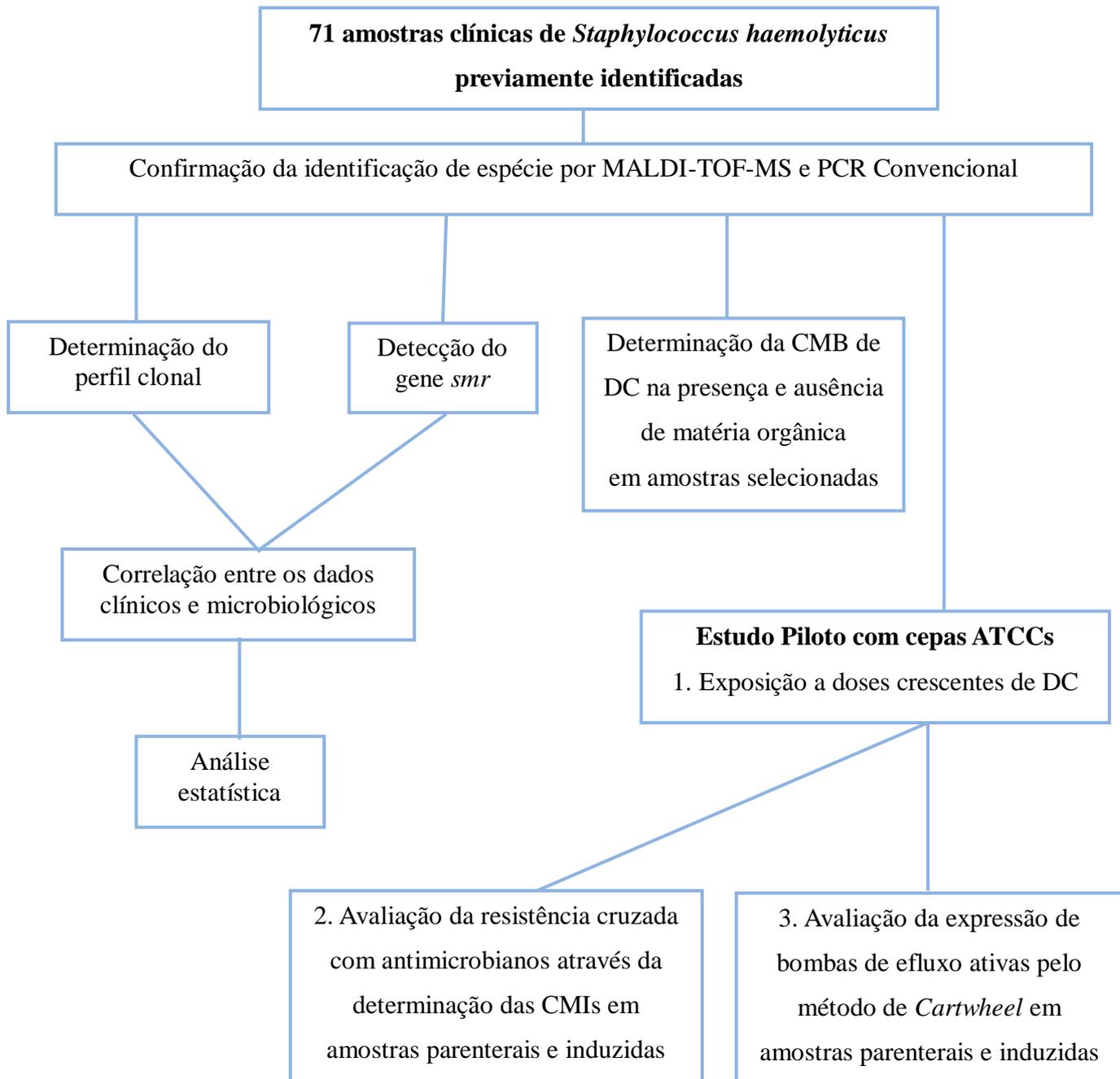


Figura 1. Fluxograma da metodologia utilizada no presente estudo.

CMB: Concentração Mínima Bactericida; DC: Digluconato de clorexidina; MALDI-TOF-MS: *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight – Mass Spectrometry*; PCR: *polimerase chain reaction*.

4.2. Confirmação fenotípica da identificação das amostras de *S. haemolyticus* através da metodologia de MALDI-TOF-MS (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight – Mass Spectrometry*)

A confirmação de espécie *S. haemolyticus* foi realizada através da técnica de *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF-MS). O espectrômetro de massa realiza a ionização de biomoléculas e permite à rápida e confiável determinação do gênero e espécie das amostras testadas (Chabriere *et al.*, 2018).

A metodologia foi realizada de acordo com o proposto por Chung e colaboradores, 2019, com modificações. As amostras foram semeadas ágar TSA (*Tryptase Soy Agar*, BD, *Becton, Dickinson and Company*; Sparks, Maryland, EUA) e incubadas por 16 h, a 35 °C. Com o auxílio de um palito estéril, cerca de três a cinco colônias foram colocadas na placa de metal fornecida pelo fabricante MALDI-TOF Microflex LT (*Bruker Daltonics*), sendo o procedimento feito em duplicata. Em seguida, foi aplicado 1 µl de ácido fórmico a 70% (v/v) sobre cada amostra. Após a secagem em temperatura ambiente, foi adicionado 1 µl de matriz, composta por ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA, *Sigma Chemical Company*; Saint Louis, Missouri, EUA) preparado em acetonitrila 50% e ácido trifluoro acético a 2,5 % (*Sigma*).

A placa foi novamente submetida a uma etapa de secagem à temperatura ambiente e, logo depois, inserida no aparelho para leitura das amostras, através de laser, em modo linear, com uma frequência de 20 Hz. Os parâmetros usados pelo aparelho foram a tensão das fontes iônicas 1 e 2, 20 kV e 18,6 kV, respectivamente; faixa de peso molecular 2.000 a 20.000 Da. Foi realizado 4 grupos de 60 disparos lançado sem regiões distintas, aleatoriamente selecionadas, por poço amostral na placa, resultando na somatória de 240 disparos do laser. Esse laser ioniza as partículas que seguirão até o detector, por meio do tubo de vácuo, provendo assim, uma relação proporcional a raiz quadrada da razão massa sobre a carga (m/z). Cada molécula leva um tempo diferente, ou seja, um tempo de voo distinto, e, cada vez que uma é detectada, um pico acontece. Isso gera um espectro de massas, que foi comparado com a base de dados do aparelho e, processado pelo *software* de bioinformática MALDI *Biotyper* versão 3.1 (*BrukerDaltonics*) em modo operacional padrão. Em seguida, o espectro gerado foi comparado com os espectros de referência existentes na biblioteca do equipamento e, indicou o mais semelhante. Um *score* foi gerado, através da pontuação atribuída à amostra. A estirpe de *Escherichia coli* DH5 α foi utilizada como calibrador do equipamento.

Para esse estudo, apenas os *scores* sinalizados em verde, com valores superiores a 2.000 foram aceitos. A tabela 2 representa os *scores* estabelecidos pela técnica de MALDI-TOF.

Tabela 2. Valores estabelecidos no MALDI-TOF-MS para identificação microbiana

Faixas	Descrição	Símbolos	Cores
2.300 - 3.000	Alta confiabilidade da espécie identificada	(+++)	Verde
2.000 - 2.299	Uma identificação segura de gênero e provável espécie	(++)	Verde
1.700 - 1.999	Uma identificação segura de gênero e provável espécie	(+)	Amarelo
0 - 1.699	Não houve uma identificação confiável	(-)	Vermelho

Tabela adaptada de *Bruner Daltonik MALDI Biotyper Classification Results*

4.3. Caracterização molecular das amostras de *S. haemolyticus*

4.3.1. Obtenção de DNA bacteriano pelo método de lise utilizando *chelex* e proteinase K

A metodologia foi realizada de acordo com o proposto por Walsh, Metzger e Higuchi, 1991. As amostras foram cultivadas em ágar TSA (BD, *Becton, Dickinson and Company*; Sparks, Maryland, EUA) e incubadas por 24 h a uma temperatura de 35 °C. Posteriormente, foi preparada uma solução de *chelex* a 5 % (p/v) e 200 µL desta solução foram aliquoteados em um microtubo e, adicionados 2 µL de proteinase K a 20 mg/mL (*Invitrogen*; Carlsbad, EUA). Com auxílio de uma alça bacteriológica, foram acrescentadas três a cinco colônias do crescimento bacteriano ao tubo.

Na sequência, o microtubo foi incubado em banho-maria a 56 °C por uma hora, e agitado em *vortex* por 10 segundos. Em seguida, o material foi submetido à fervura por 10 minutos e, subsequentemente, agitado por 10 segundos. Por fim, passou por centrifugação a 4 °C em 12.000 rpm, por três minutos. Após essa etapa, o sobrenadante foi removido e transferido para um novo microtubo. Ao final do processo, todas as amostras foram quantificadas utilizando o aparelho NanoVue (*Biochrom*; Holliston, MA, EUA) e o DNA foi armazenado a - 20 °C.

4.3.2. Confirmação da identificação das amostras através de PCR *uniplex*

Foi realizada a amplificação do gene *mvaA*, o qual codifica uma coenzima HMG-CoAredutase, para a identificação da espécie *S. haemolyticus* através de PCR *uniplex*, de acordo com o proposto por Schuenck *et al.*, 2008, com modificações. Esta metodologia foi utilizada apenas para as amostras que obtiveram o *score* menor que 2.000 pela técnica de MALDI-TOF-MS, descrito no item 4.2.

As amplificações foram realizadas por meio de um termociclador (*Eppendorf Mastercycler Gradient*, Hamburgo, Alemanha), seguindo o ciclo de amplificação de acordo com o descrito na tabela 3. As reações foram compostas de água de injeção de modo a completar o volume final de 25 μ L, 1 μ L de DNA, 200 μ M de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), 0,4 μ M dos oligonucleotídeos, 1 U de *Taq* DNA polimerase, 4 μ L do tampão da enzima 5x (10 mM Tris HCl, 25mM KCl), 2 mM de MgCl₂ (*Biotools*, Flórida, EUA).

Tabela 3. Iniciadores e ciclo de amplificação utilizados na PCR convencional para identificação da espécie *Staphylococcus haemolyticus*

Gene	Primers (5'-3')	Tamanho do Amplicon	Ciclo de Amplificação	Referência
<i>mvaA</i>	SHF: GGTCGCTTAGTCGGAACAAT SHR: CACGAGCAATCTCATCACCT	271 pb	Di: 94°C 3min D: 94°C 1 min A: 55°C 1 min E: 72°C 1 min Ef: 72°C 1 min } 30X	Schuenck <i>et al.</i> , 2008

SHF: *Forward*, SHR: *Reverse*, pb: pares de base; Di: Desnaturação inicial; D: Desnaturação; A: Anelamento; E: Extensão, Ef: Extensão Final.

O fragmento amplificado foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose a 2 % em tampão TBE (Tris/Borato/EDTA) a 0,5 X a 80 V. O gel foi corado com 2,5 μ L de Unisafe[®] (20.000x) em 100 mL de TBE 1X, sendo a concentração final de 0,5X de Unisafe[®]. Para a análise dos produtos de DNA foi utilizado padrão de tamanho molecular de 100 pb (*Life Technologies*, Califórnia, EUA) e as bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta por meio de fotodocumentador (*Vilber Lourmat, Collégien*, França). Como controle da reação foi usada a amostra JCSC 1435 (Takeuchi *et al.*, 2005).

4.3.3. Detecção do gene *smr*

Foi realizada a amplificação do gene *smr* associado à expressão de bombas de efluxo e à tolerância ao DC, para as 71 amostras de *S. haemolyticus*.

Os primers foram desenhados usando os programas *OligoAnalyzer* e *Primer3* (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). A especificidade do primer foi avaliada utilizando o programa *BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

As amplificações foram realizadas por meio de um termociclador (*Eppendorf Mastercycler Gradient*, Hamburgo, Alemanha), seguindo o ciclo descrito na tabela 4. As reações, condições de amplificação do fragmento e visualização das bandas em gel de agarose foram realizadas de acordo com o descrito no item 4.3.2.

Tabela 4. Iniciadores e ciclo de amplificação utilizados na PCR convencional para detecção do gene *smr* em *Staphylococcus haemolyticus*

Gene	Primers (5'-3')	Tamanho do Amplicon	Ciclo de Amplificação	Referência
<i>smr</i>	F: GCTGGCCTAATTGAAGTTATTTGG R:CTAGTAACAGAAGCAGTAATACA ACTTTC	222 pb	Di: 95°C 5 min D: 94°C 1 min A: 52°C 1 min E:72°C 1 min Ef: 72°C 1 min } 30X	Esse Estudo

F: *Forward*, R: *Reverse*, pb: pares de base; Di: Desnaturação inicial; D: Desnaturação; A: Anelamento; E: Extensão, Ef: Extensão Final.

Como controle da reação foi usada a amostra clínica 1033s de *S. haemolyticus*. Para validar a metodologia proposta, essa amostra teve seu produto de amplificação purificado por meio de um Kit comercial, *GTX PCR and band purification* (*GE Healthcare*, Illinois, EUA), seguindo as orientações informadas pelo fabricante. Após essa etapa, foi realizada a quantificação do DNA através do aparelho *NanoVue Plus* (*GE Healthcare*). Os fragmentos gerados para a amostra 1033s foram sequenciados parcialmente para o gene *smr*, tanto a fita *forward* como a *reverse*, no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF), utilizando o sistema Mega BACE1000 (Biotech, EUA) com 96 poços. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o sistema comercial “*DYEnamic ET Dye Terminator*” (com Thermo Sequenase TM II DNA Polymerase). O resultado foi analisado pelo *software* BioEdit v7.2. a partir do alinhamento das sequências por meio do algoritmo *ClustalW Multiple Alignment*, ferramenta que permite o alinhamento e a comparação das sequências

obtidas com a sequência já depositada no banco de dados *GenBank*. Para este estudo, *S. haemolyticus* JCSC 1435, *GenBank* acesso No. NC_007168.1, foi utilizada como cepa referência para comparação das sequências e validação da metodologia proposta.

4.4. Determinação da Concentração Mínima Bactericida do digluconato de clorexidina na presença e ausência de matéria orgânica

Foi determinada a Concentração Mínima Bactericida (CMB) no tempo fixo de 5 minutos na presença e ausência de matéria orgânica, de acordo com a metodologia proposta por de Worthing e colaboradores, 2018, com adaptações. Nesse estudo, como matéria orgânica foi utilizado o Soro Fetal Bovino (SFB, Bio Campo 2000 Produtos Biológicos LTDA, Bom Jardim, RJ) a 3% (v/v).

Essa metodologia foi realizada em duplicata para 6 amostras clínicas de *S. haemolyticus* selecionadas a partir dos dados coletados nos estudos prévios (Rodrigues, 2015; Aguiar, 2018) conforme a presença/ausência de *qacA/B*, *Cartwheel* e CMI de digluconato de clorexidina. Também foram utilizadas as amostras controles ATCC 29213 e ATCC 6538. Todas as amostras foram cultivadas em ágar TSA e incubadas por 24 h, a 35 °C. Na montagem da placa foram utilizadas concentrações do DC correspondentes ao intervalo de 32 a 0,25 µg/mL.

A metodologia foi realizada em placa de 96 poços com fundo em U (CRALPLAST, Cotia, São Paulo). Na condição de ausência de matéria orgânica, a primeira fileira (A), como exposto na figura 2, apresenta as concentrações de DC de 32 a 0,25 µg/mL, sendo o volume final de 200 µL. Na fileira B foi adicionada a solução neutralizante (Lecitina a 0,3 % diluída em Tween 80 a 3%), preparada como o descrito por Liu *et al.*, 2015. Os poços das fileiras C e D foram preenchidos com solução salina a 0,85 % (p/v). Na condição de presença de matéria orgânica, a montagem das fileiras E, F, G e H, foi feita de forma semelhante aos procedimentos descritos anteriormente, respectivamente, sendo que, foi adicionado o SFB a 3% (v/v) nos poços da fileira E.

As amostras foram crescidas em ágar TSA e incubadas por 24 h a temperatura de 35 °C. Em seguida, 2 a 3 colônias foram retiradas e transferidas para solução salina a 0,85% (p/v), de forma a obter o inóculo na escala 0,5 McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, valor correspondente à uma $DO_{600\text{ nm}}$ entre 0,08 e 0,1).

Com a placa montada, foram inoculados 20 µL da suspensão bacteriana na primeira fileira (A), aguardando-se o tempo de 5 minutos. Na sequência, foram homogeneizados e

retirados 20 μL de cada poço dessa fileira e, em seguida, transferidos para a fileira B, que contém o neutralizante, inibindo, assim, a ação do DC. Novamente, a placa foi mantida em repouso por 5 minutos. Por fim, foram realizadas as diluições seriadas 10^{-1} e 10^{-2} , onde 20 μL do conteúdo de cada poço da fileira B foram homogeneizados e transferidos para os poços contendo 180 μL da solução salina estéril (fileiras C e D). Os mesmos procedimentos foram realizados nos poços contendo matéria orgânica (fileira E até H).

Posteriormente, foi realizado o plaqueamento de 25 μL em *spots*, em triplicata, das fileiras D e H em ágar TSA. As placas foram incubadas a temperatura de 35° C, por 24 h para posterior contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL).

Em ambas as condições, a CMB considerada no estudo foi aquela capaz de reduzir o crescimento bacteriano em até 99,9%.

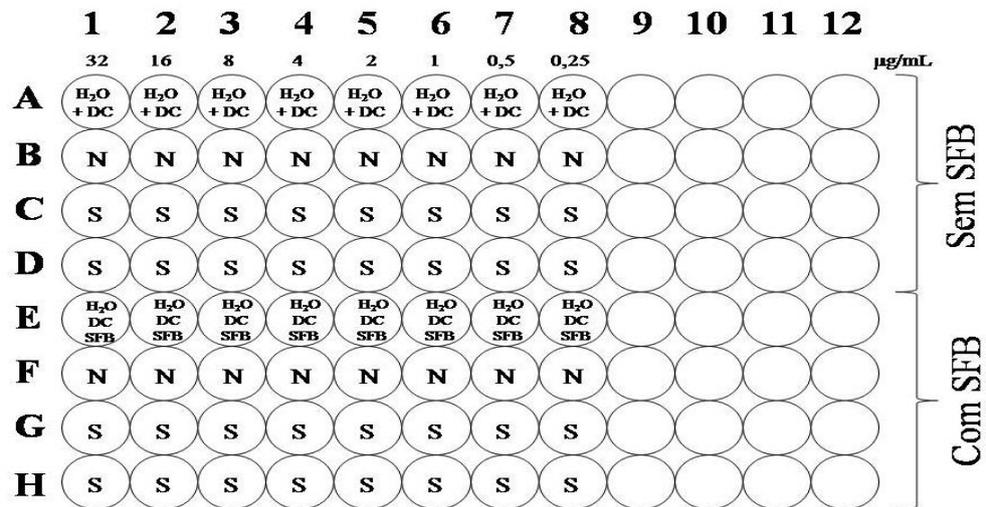


Figura 2. Esquema representativo da placa de 96 poços para determinação da CMB de DC na presença e ausência de matéria orgânica.

H₂O: Água de Injeção, DC: Digluconato de clorexidina, N: Neutralizante; S: Solução salina a 0,85 %, SFB: Soro Fetal Bovino

4.5. Indução da superexpressão de bombas de efluxo e da resistência cruzada entre antimicrobianos e o digluconato de clorexidina em amostras de *S. aureus* – Estudo Piloto

4.5.1. Indução da superexpressão de bombas de efluxo em concentrações crescentes de digluconato de clorexidina

A indução da superexpressão de bombas de efluxo foi realizada através da exposição das amostras a concentrações crescentes de DC, de acordo com Wu e colaboradores, 2016,

com modificações. Nesta técnica sucessivas passagens de crescimento bacteriano foram realizadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*, BD, *Becton, Dickinson and Company*; *Sparks*, Maryland, EUA) acrescido de concentrações crescentes de DC (0,25X CMI, 0,5X CMI, 1X CMI e 2X CMI), por até 8 dias. Após esse período, a pressão seletiva foi retirada e mais duas passagens foram realizadas somente em caldo BHI.

Inicialmente, de 3 a 5 colônias crescidas em ágar TSA foram transferidas para um tubo contendo 3 mL de caldo BHI, com turbidez correspondente a escala 0,5 McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, valor correspondente à uma $DO_{600\text{ nm}}$ entre 0,08 e 0,1), e incubadas para o crescimento bacteriano, durante 24 h, a 35 °C. Em seguida, 50 µL desse crescimento foram transferidos para um novo tubo contendo BHI e DC na concentração de 0,25X a CMI da amostra. Logo após, o tubo foi incubado em estufa bacteriológica por 48 horas, a 35°C. As sucessivas passagens em caldo BHI foram realizadas até atingir a concentração correspondente a 2X a CMI para o DC (4° passagem). Nessa etapa, foi retirada a pressão seletiva e a amostra passou por mais duas passagens consecutivas somente em caldo BHI, como ilustrado na figura 3.

As amostras referência de *S. aureus* ATCC 29213 e ATCC 6538 foram utilizadas neste ensaio, em caráter piloto, para a posterior reprodução em amostras clínicas de *S. haemolyticus*. Para garantir a pureza das amostras foi realizada a semeadura em ágar sangue (LB, Laborclin, Pinhais/PR, Brasil) do crescimento obtido após cada passagem.

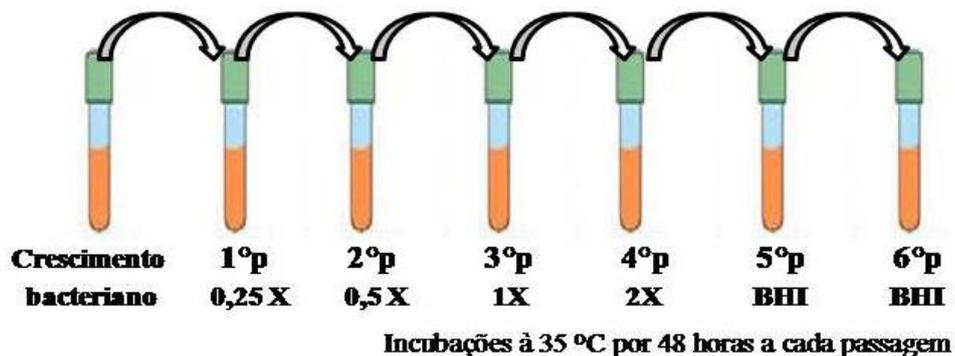


Figura 3. Esquema representativo da metodologia de indução de amostras estafilocócicas em concentrações crescentes de digluconato de clorexidina.

BHI: *Brain Heart Infusion*, P: passagem, (1P= 0,25X CMI; 2P= 0,5X CMI; 3P= 1X CMI; 4P= 2X CMI; 5ºp a 6ºp passagens somente em caldo BHI).

4.5.2. Avaliação da resistência cruzada a antimicrobianos pela determinação das CMI após exposição bacteriana a doses crescentes de digluconato de clorexidina

Em paralelo a metodologia anteriormente descrita em 4.5.1., foi testada a hipótese de possível resistência cruzada entre alguns antimicrobianos e o digluconato de clorexidina, por meio da exposição bacteriana a concentrações crescentes do saneante. A pressão seletiva imposta através do DC possivelmente induz um aumento na expressão de bombas de efluxo e, como estas podem exportar diversos substratos, podem como consequência, aumentar a capacidade de liberação de antimicrobianos, aumentando as CMI dos mesmos, o que pode indicar resistência cruzada entre saneante e antimicrobiano, *in vitro*.

Os antimicrobianos utilizados no presente estudo foram escolhidos de acordo com o critério de uso na clínica e pelo conhecimento prévio acerca da literatura sobre o mecanismo de resistência descrito por meio da extrusão dos compostos por bombas de efluxo. Aqui, a vancomicina foi utilizada como um controle da técnica, uma vez que esta droga age sobre a parede celular e espera-se que não ocorra o aumento em seus valores de CMI.

Sendo assim, a possível resistência cruzada foi avaliada através da determinação das CMI para vancomicina, gentamicina, ciprofloxacina e moxifloxacina, por meio da técnica de microdiluição em caldo, de acordo como *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI 2019), sendo realizada para todas as passagens.

Primeiramente, foi preparada uma solução estoque (1000 µg/mL) para cada antimicrobiano, que foram mantidas a -20 °C. Em uma placa de poliestireno contendo 96 poços com fundo em U (CRALPLAST) foram distribuídos 100 µL de caMHB (*Cation Adjusted Mueller Hinton Broth*, BD, *Becton, Dickinson and Company*; Sparks, Maryland, EUA). Em seguida, foi acrescido o antimicrobiano à primeira coluna e, por meio de diluição seriada, disposto horizontalmente pela placa de forma a obter concentrações entre 256 a 0,25 µg/mL, com exceção da última coluna que serviu para o controle de crescimento, e era composta apenas por caMHB. Para a moxifloxacina e a vancomicina as concentrações de uso foram de 16 a 0,25 µg/mL. O volume final de cada poço foi de 100 µL.

A suspensão bacteriana (amostras referência de *S. aureus* ATCC 29213 e ATCC 6538) correspondente inicialmente a escala 0,5 *McFarland* (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL valor correspondente a uma DO_{600nm} entre 0,08 e 0,1) foi diluída, em seguida, na proporção 1:10 (v/v) em solução salina a 0,85% (p/v). Na placa previamente montada, foram distribuídos 5 µL de inóculo e, em seguida, a placa foi incubada a 35 °C, por 24 h para a vancomicina e de 16 a 20 h para os demais antimicrobianos (CLSI 2019).

A leitura do teste foi realizada visualmente, sendo considerada a última concentração na qual não há turvação do meio ou a formação de “botão” como a concentração mínima capaz de inibir o crescimento bacteriano (CMI). A amostra ATCC 29213, parental, foi utilizada como controle de susceptibilidade aos antimicrobianos de acordo com o estabelecido pelo CLSI, 2019.

Ao final do processo, os valores das CMIs para os 4 antimicrobianos nas amostras induzidas foram comparados aos valores de CMIs sem a indução prévia, determinados previamente. O aumento nos valores de CMIs foram considerados indicativos de resistência cruzada. A alteração em somente uma diluição nos valores das CMIs para os antimicrobianos não foi considerada como significativa na avaliação dos resultados.

4.5.3. Determinação dos valores de *Cartwheel* para as amostras de *S. aureus* induzidas

A técnica de *Cartwheel* avalia o potencial de expressão de bombas de efluxo com base na extrusão de brometo de etídeo (EtBr). Essa técnica foi realizada de acordo como proposto por Martins e colaboradores, 2011. Sendo realizado nas amostras parentais (antes da indução) e após a última passagem (6º p).

Foram preparadas placas de TSA contendo concentrações crescentes de brometo de etídeo (0,5 µg/mL, 1,0 µg/mL, 1,5 µg/mL, 2,0 µg/mL e 2,5 µg/mL). Uma placa contendo apenas o meio TSA foi utilizada como controle do crescimento do inóculo bacteriano.

A suspensão bacteriana foi realizada em solução salina a 0,85% (p/v) na escala 0,5 *McFarland* (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL valor correspondente a uma DO_{600nm} entre 0,08 e 0,1). Posteriormente, com auxílio de um *swab* estéril, as amostras em solução salina foram aplicadas nas placas contendo diferentes concentrações de EtBr, na forma de estrias lineares, como o ilustrado na figura 4. Logo após, as placas foram incubadas por 16 horas a 35 °C, sendo mantidas abrigadas da luz.

Após esse período, a leitura do teste foi realizada por um fotodocumentador (*Vilber Lourmat, Collégien*, França) que, por meio de luz ultravioleta, possibilita a visualização da emissão de fluorescência.

A emissão de fluorescência sob luz ultravioleta implica na entrada do composto EtBr na célula bacteriana e sua interposição ao DNA. Por outro lado, a ausência de fluorescência implica em mecanismos de extrusão do brometo de etídeo do interior celular, sem interposição ao DNA bacteriano, indicando a presença de sistemas de bombas de efluxo ativos na

membrana da célula. Como controle do experimento foram utilizadas as amostras ATCC 6538 e PaO1XY⁺⁺ (*P.aeruginosa*), como controles negativo e positivo, respectivamente.

Ao final do processo, os valores de *Cartwheel* nas amostras induzidas foram comparados aos valores de *Cartwheel* sem a indução prévia. O aumento nos valores de *Cartwheel* foram considerados indicativos de aumento no potencial de expressão de sistemas de bombas de efluxo.

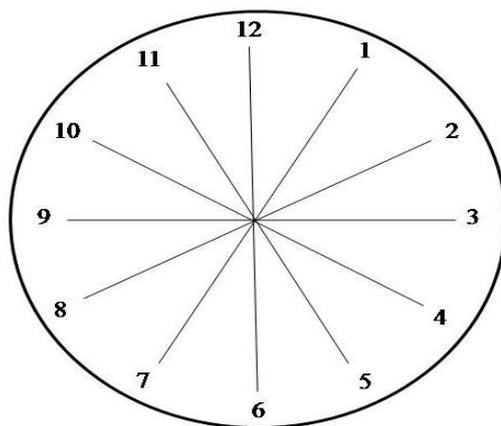


Figura 4. Esquema representativo da metodologia de *Cartwheel*

1: ATCC 6538, controle negativo, 2 :PaO1XY⁺⁺, controle positivo, 3 a 12: Amostras utilizadas na indução.

4.6. Determinação do perfil clonal das amostras de *S. haemolyticus* através da análise dos perfis de fragmentação do DNA por PFGE

A análise do perfil de fragmentação do DNA cromossômico através da separação dos fragmentos gerados após tratamento com a enzima de restrição *Sma*I (New England Biolabs, Ipswich, Inglaterra) para as amostras de *Staphylococcus haemolyticus* foi realizada por meio da técnica de PFGE (Vivoni *et al.*, 2006). Inicialmente, as amostras foram cultivadas em ágar sangue a 35 °C por 24 h. Após, cerca de cinco colônias isoladas de *S. haemolyticus* foram inoculadas em 3 mL de caldo TSB (BD, EUA), sendo incubadas por cerca de 2 horas sob agitação de 250 rpm a 35 ± 2 °C, até atingir a escala 2 de McFarland (equivalente a aproximadamente 6 x10⁸ UFC/ml , valor correspondente a uma DO_{600nm} de 0,4 – 0,5).

Posteriormente, 500 µL desta suspensão foram transferidos para um microtubo, e centrifugados a 7000 xg durante 5 minutos, sendo este sedimento dissolvido em 125 µL de tampão PIV (NaCl 1 M, Tris-HCl 10 mM, pH 7,6). A esta suspensão foi adicionado o mesmo volume de agarose de baixo ponto de fusão (“*Low Melting Point Agarose*”, IBI Technical,

New Heaven, EUA) a 2% (p/v), dissolvida em tampão PIV e mantida a 58 °C. Após homogeneização, a agarose foi distribuída em moldes, os quais foram posteriormente mantidos a 4 °C por cerca de 10 minutos, para serem cortados em pequenos blocos. Em seguida, os blocos de agarose foram cortados e colocados em 1 mL de solução de lise EC (Tris-HCl 6 mM, NaCl 1 M, EDTA 100 mM, 0,5% (p/v) de Brij 58 e 0,5% lauril sarcosinato de sódio, pH 7,5), contendo lisozima a 0,5 mg/mL e lisostafina a 0,05 mg/mL, e foram incubados a 37 °C sob agitação lenta durante 18 horas.

Após este período, os tubos foram resfriados a 4 °C, e a solução substituída por 1 mL de solução ES [EDTA 0,4 M, pH 9,5, 1% (p/v) de lauril sarcosinato de sódio] contendo 0,1 mg/mL de proteinase K (*Sigma-Aldrich Chemical Company*). Essa solução foi incubada a 50 °C, durante 18 horas, em banho-maria. A digestão do DNA cromossômico foi realizada utilizando um único bloco de agarose contendo DNA, que foi lavado cinco vezes em tampão TE a 37 °C, em banho-maria, onde as quatro primeiras lavagens foram realizadas a cada 1 h e a última de 18 horas. Após este processo, o bloco de agarose foi transferido para uma solução contendo 125 µL do tampão específico da enzima de restrição SmaI e incubado a 25 °C, por 4 horas. Em seguida, o bloco de agarose foi novamente transferido para um novo tampão da enzima de restrição (125µL), contendo 20 U da enzima SmaI e incubado a 25 °C durante 18 horas. Após esse período, a solução contendo a enzima foi retirada e o bloco de agarose fundido a 70 °C, sendo aplicado no gel de agarose (Invitrogen, Carlsbad, EUA) a 1% (p/v) feito em tampão TBE 0,5 X.

O gel foi submetido à eletroforese em campo pulsado (CHEF DR III, Bio-Rad, Hercules, EUA), utilizando um tempo de pulso crescente de 1 a 35 segundos, durante 21 horas, a 6 V/cm, 13 °C, com ângulo de 120°. Após a corrida, o gel foi corado em solução com brometo de etídio (0,5 µg/mL) durante 40 minutos. A imagem foi observada em um fotodocumentador (*Vilber Lourmat*) sob luz ultravioleta. Foi utilizado o marcador 50-1.000 kb *Lambda* Ladder PFGE Marker (New England BioLabs) como padrão de tamanho molecular de DNA. Os padrões dos fragmentos obtidos foram analisados através da comparação visual entre as amostras e por meio do programa *Bionumerics*, versão 7.1 (*Applied Maths*, Bélgica), sendo utilizado o Dice de similaridade de 1,5. Foi considerado um percentual de no mínimo 80% de similaridade e até quatro bandas de diferença entre as amostras para inclusão em um mesmo genótipo (Van Belkum *et al.*, 2009).

4.7. Análise dos dados clínicos dos pacientes

As variáveis clínicas analisadas nesse estudo foram idade, gênero, desfecho do caso, tipo de bacteremia, infecção polimicrobiana, clínica de origem, tempo de internação, presença de cateter e o tratamento prévio com antimicrobianos.

4.8. Análise Estatística

A análise de variáveis categóricas e contínuas foram comparadas pelo *Kruskal-Wallis test* e *Fisher's exact test*, respectivamente. A análise estatística foi realizada por meio da ferramenta de *software GraphPad 2018* e *GraphPad Prism 8.0* (Versão *Prism 8.0.1*).

Um evento foi considerado estatisticamente significativo quando *p* valor for $\leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Confirmação da espécie *S. haemolyticus*

As 71 foram submetidas à confirmação de espécie por meio de MALDI-TOF-MS. Todas as amostras foram identificadas como *S. haemolyticus* em diferentes níveis de segurança através do MALDI-TOF-MS, como pode ser observado na tabela 5.

Tabela 5. Resultados obtidos após a identificação da espécie *Staphylococcus haemolyticus* por meio da metodologia de MALDI-TOF-MS

Faixas	Descrição	N	%
2.300 - 3.000	Alta confiabilidade da espécie identificada	8	11,27
2.000 - 2.299	Uma identificação segura de gênero e provável espécie	58	81,69
1.700 - 1.999	Uma identificação segura de gênero e provável espécie	5	7,04
0 - 1.699	Não houve uma identificação confiável	0	0

N: Número de amostras, %: porcentagem.

5.2. Confirmação da identificação das amostras através de PCR *Uniplex*

Como mencionado anteriormente, as amostras que obtiveram o *score* menor que 2.000 pela técnica de MALDI-TOF-MS foram confirmadas por PCR *uniplex*. Ademais, duas amostras apresentaram resultados discordantes na duplicata, tendo sido submetidas ao PCR para confirmação de espécie. Todas as amostras submetidas a PCR para confirmação de espécie foram positivas para o gene *mvaA* (271pb), como apresentado na figura 5.

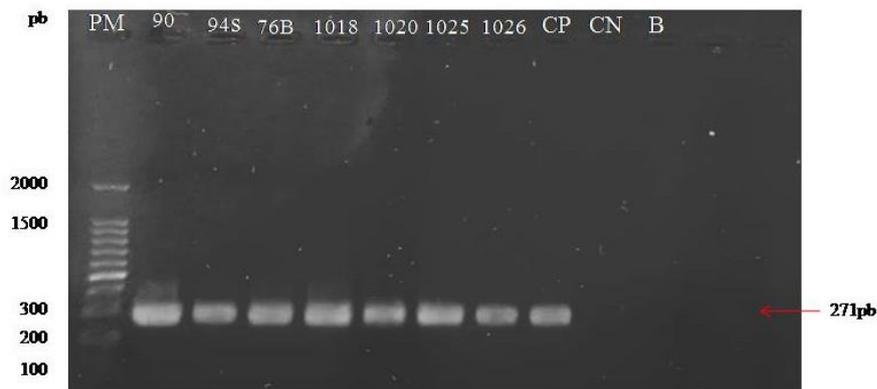


Figura 5. Gel de eletroforese para detecção do segmento do gene *mvaA*.

PM: peso molecular; 90 a 1026: amostras clínicas de *S. haemolyticus* positivas para o gene *mvaA*; CP: Controle positivo (amostra JCSC 1435), CN: Controle negativo (amostra 1759a); B: branco

5.3. Presença do gene *smr*

Todas as 71 (100%) amostras clínicas de *S. haemolyticus* submetidas à amplificação apresentaram o gene *smr* (222pb), como pode ser observado na figura 6.

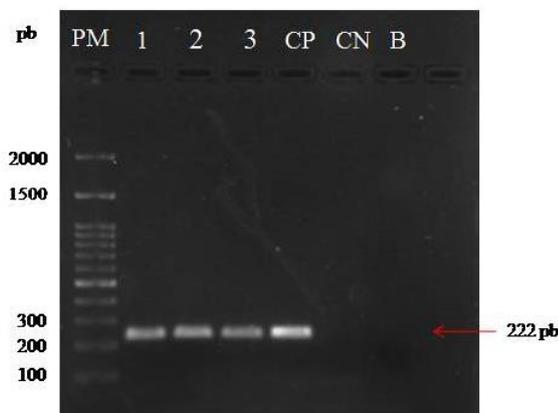


Figura 6. Gel de eletroforese para detecção do segmento do gene *smr*.

PM: peso molecular; 1 a 3: amostras clínicas de *Staphylococcus haemolyticus* positivas para o gene *smr*; CP: Controle positivo (amostra 1033s), CN: Controle negativo (amostra 1759a); B: branco

No intuito de validar a metodologia proposta, a amostra clínica de *S. haemolyticus* 1033s teve seu produto de amplificação purificado e sequenciado. A análise do sequenciamento foi realizada através do alinhamento da amostra com uma amostra referência (JCSC 1435 – *GenBank* acesso No. NC_007168.1). Como ilustrado na figura 7, pode ser observado o alinhamento completo entre as amostras, com 100% de similaridade pelo BLAST. A partir disso, a amostra 1033s passou a ser utilizada como controle positivo nas reações de PCR *uniplex* para a detecção do gene *smr*.



Figura 7. Ilustração do alinhamento das bases após o sequenciamento do gene *smr* da amostra 1033s de *S. haemolyticus* comparado com a amostra referência JCSC 1435.

5.4. CMB de clorexidina nas condições de ausência e presença de matéria orgânica

Os valores de CMB para as amostras de *S. haemolyticus* e de referência de *S. aureus*, ATCC 29213 e ATCC 6538, foram determinados nas duas condições: com e sem a presença de matéria orgânica (SFB). As amostras de *S. haemolyticus* foram selecionadas com base em seu perfil de susceptibilidade aos saneantes, onde a maioria apresentava genes de tolerância a saneantes (*qacA/B* e *smr*), com variados valores de *Cartwheel* e de CMI para DC, como pode ser observado na tabela 6.

Tabela 6. Características das amostras de *Staphylococcus haemolyticus* selecionadas para a determinação da CMB de DC.

Amostra	Clonalidade	<i>Cartwheel</i> *	CMI de DC*	<i>qacA/B</i>	<i>smr</i>
1017	A4	0,5	0,12	-	+
109	A5	2	0,5	+	+
30	B1	2	0,5	+	+
93	B6	0,5	0,5	+	+
6	C2	0,5	0,5	+	+
121	F1	0,5	0,25	-	+

*em µg/ml; CMI: Concentração Mínima Bactericida; DC: digluconato de clorexidina

Foi visto que para a ATCC 29213, a concentração de 16 µg/ml (0,0016%) foi suficiente para eliminar o crescimento bacteriano tanto na presença quanto na ausência de matéria orgânica. No entanto, a contagem de colônias (UFC/ml) na concentração anterior a CMB foi inferior na condição sem matéria orgânica ($4 \times 10^3 < 2,6 \times 10^4$ UFC/ml). Em relação à amostra ATCC 6538, ilustrada na figura 8, a determinação da CMB na ausência da matéria orgânica mostrou valores correspondentes a 8 µg/ml (0,0008%), enquanto, na sua presença esse valor foi de 16 µg/ml (0,0016%).

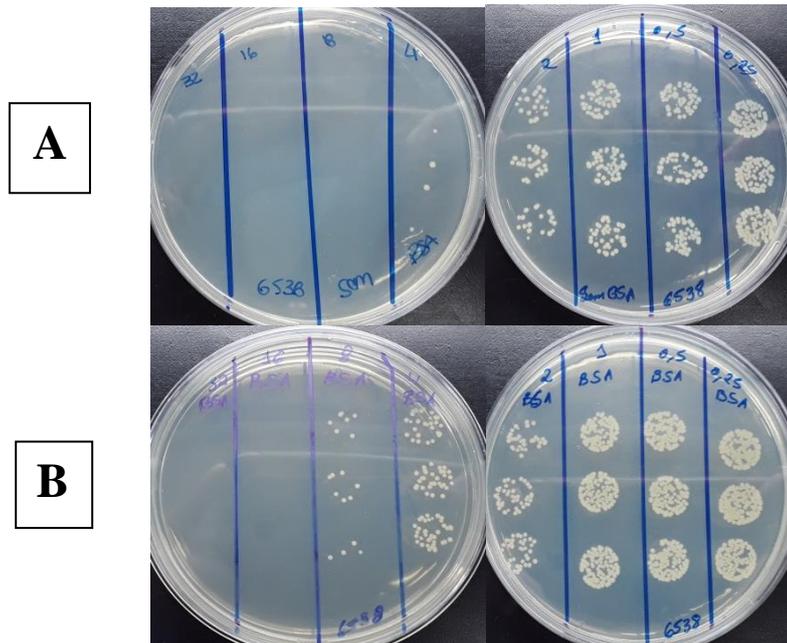


Figura 8. CMB de clorexidina para a amostra controle de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

(A) CMB de DC na ausência de matéria orgânica (BSF), da esquerda para a direita, as placas correspondem às concentrações de 32 a 4 µg/ml; 2 a 0,25 µg/ml de DC, respectivamente; (B) CMB de DC na presença de matéria orgânica (BSF), da esquerda para a direita, 32 a 4 µg/ml; 2 a 0,25 µg/ml de DC, respectivamente.

Com relação às amostras clínicas de *S. haemolyticus* testadas (n=6) foram encontrados valores de 2 µg/ml (0,0002%) e 4 µg /ml (0,0004%) para 2 amostras, nas condições de ausência e presença de matéria orgânica, respectivamente; enquanto para as outras 4 amostras os valores foram de 2 µg/ml (0,0002%) e 8 µg/ml (0,0008%), nas condições de ausência e presença de matéria orgânica, respectivamente, como o ilustrado na figura 9, para a amostra clínica representativa 109s de *S. haemolyticus*.

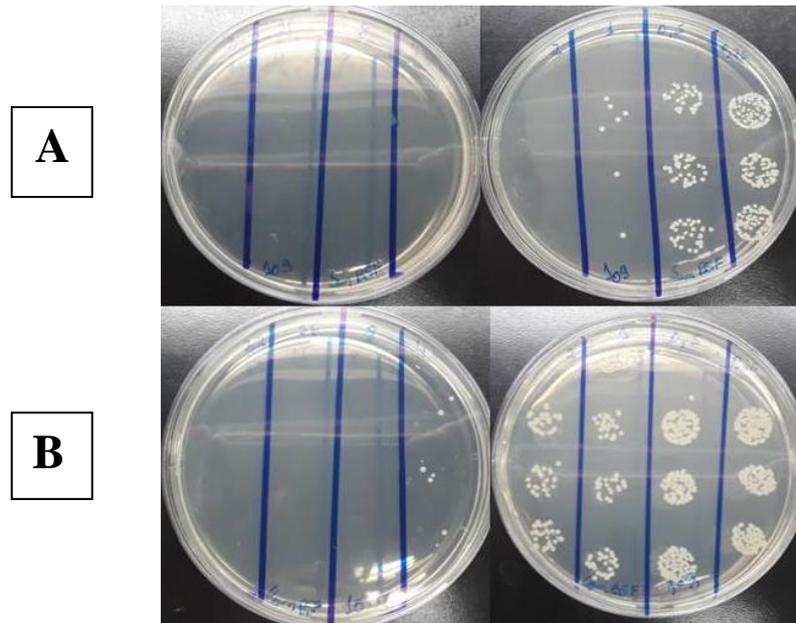


Figura 9. CMB de clorexidina para a amostra clínica 109s de *Staphylococcus haemolyticus*

(A) CMB de DC na ausência de matéria orgânica (BSF), da esquerda para a direita, as placas correspondem às concentrações de 32 a 4 µg/ml; 2 a 0,25 µg/ml de DC, respectivamente; (B) CMB de DC na presença de matéria orgânica (BSF), da esquerda para a direita, 32 a 4 µg/ml; 2 a 0,25 µg/ml de DC, respectivamente.

5.5. Verificação da capacidade de superexpressão de bombas de efluxo após indução bacteriana em concentrações crescentes de DC – Estudo piloto com amostras de referência de *S. aureus*.

5.5.1. Indução da superexpressão de bombas de efluxo em concentrações crescentes de digluconato de clorexidina

Para as amostras padrões verificou-se a capacidade de superexpressar os sistemas de bombas de efluxo por meio de passagens sucessivas do crescimento bacteriano em caldo BHI com concentrações crescentes de digluconato de clorexidina (0,25x, 0,5X, 1X, 2X), indicando a indução dos sistemas de bombas de efluxo. Ademais, foram realizadas duas passagens somente em meio BHI, para averiguar se os valores das CMI's se manteriam após a retirada da pressão seletiva exercida através do saneante.

Ao longo do período de 8 dias de indução, ambas as amostras apresentaram crescimento nas concentrações propostas, até o valor de 2X a CMI de digluconato de clorexidina. Ademais, no intuito de verificar a pureza das amostras, as mesmas foram semeadas a cada passagem nas placas de ágar sangue, tendo sido observado colônias características e isoladas, sem presença de contaminante.

5.5.2. Avaliação da resistência cruzada a antimicrobianos após a exposição a doses crescentes de digluconato de clorexidina pela determinação das CMIs

Em paralelo a cada passagem onde foram empregadas crescentes doses de digluconato de clorexidina (0,25X CMI, 0,5X CMI, 1X CMI e 2X CMI) e nas passagens somente em caldo BHI, foi realizado a determinação das CMIs para ciprofloxacina, moxifloxacina, gentamicina e vancomicina.

Ao analisarmos uma possível indução de resistência cruzada entre o DC e 4 antimicrobianos em relação à cepa controle de *S. aureus* verificamos um aumento de 8X na CMI para ciprofloxacina para a ATCC 6538, enquanto para a cepa ATCC 29213 houve um aumento de 64X nesta CMI e de 16X para moxifloxacina (Tabela 7), indicando uma possível resistência cruzada *in vitro*. Em relação à gentamicina, para a ATCC 29213, houve o aumento de 4X a CMI até a quarta passagem, no entanto, logo após a retirada da pressão seletiva a CMI retornou aos valores correspondentes a amostra parental, sendo um indicativo de que não ocorreu processos de mutação adquirida. Não houve alteração nas CMIs de vancomicina entre as amostras induzidas.

Tabela 7. Avaliação da resistência cruzada a antimicrobianos em amostras referência de *Staphylococcus aureus* parentais (sem indução) e após a exposição a doses crescentes de digluconato de clorexidina.

Amostra	Antimicrobianos	CMI						
		Sem Indução	0,25X CMI	0,5X CMI	1X CMI	2X CMI	BHI	BHI
ATCC 6538	Ciprofloxacina	0,25	0,5	2	2	2	2	2*
	Moxifloxacina	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
	Gentamicina	0,5	1	0,5	0,5	1	0,25	0,25
	Vancomicina	1	1	1	0,5	1	1	0,5
ATCC 29213	Ciprofloxacina	0,5	0,5	2	8	16	32	32*
	Moxifloxacina	<0,25	<0,25	0,25	1	2	2	4*
	Gentamicina	0,5	1	1	2	2*	0,25	0,5
	Vancomicina	0,5	1	1	1	1	1	1

ATCC: American Type Culture Collection; CMI: Concentração Mínima Inibitória em µg/mL; 0,25X CMI a 2X: 1º a 4º passagens consecutivas em caldo BHI acrescido com doses crescentes de digluconato de clorexidina; BHI: 5º a 6º passagens somente em meio BHI; * Amostras com aumento nos valores da CMI quando comparadas às amostras parentais.

5.5.3. Determinação dos valores de *Cartwheel* para as amostras induzidas

Ao final do processo de indução de bombas de efluxo através da técnica de exposição a doses crescentes de DC, o método de *Cartwheel* foi empregado para a verificação do potencial de bombas de efluxo para as amostras, sendo realizado em duplicata.

As ATCCs 6538 e 29213 demonstraram um aumento no valor de *Cartwheel* após a indução, de 0,5 µg/ml (sem indução) para 1 µg/ml (após indução), apontando o aumento na expressão de sistemas ativos de efluxo na célula bacteriana, como pode ser observado na tabela 8. Os valores de *Cartwheel* das amostras parentais foram obtidos em trabalho prévio (Aguiar, 2018).

Tabela 8. Valores de *Cartwheel* antes e após a indução das amostras com digluconato de clorexidina

Amostras	Valores de <i>Cartwheel</i> (em µg/mL)	
	Amostras parentais *	Amostras após indução
ATCC 6538	0,5	1
ATCC 29213	0,5	1

ATCC: *American Type Culture Collection*. * Resultado obtido previamente por Aguiar, 2018.

5.6. Perfil clonal das amostras de *S. haemolyticus*

Ao analisarmos o perfil clonal das 71 amostras de *S. haemolyticus*, foi observado o agrupamento das amostras em 25 clonalidades, destacando-se o fato de 57,7% (41/71) das amostras serem reunidas em apenas cinco clones, como pode ser observado na figura 10. O clone A foi prevalente e responsável por 18,3% (n=13) das amostras.

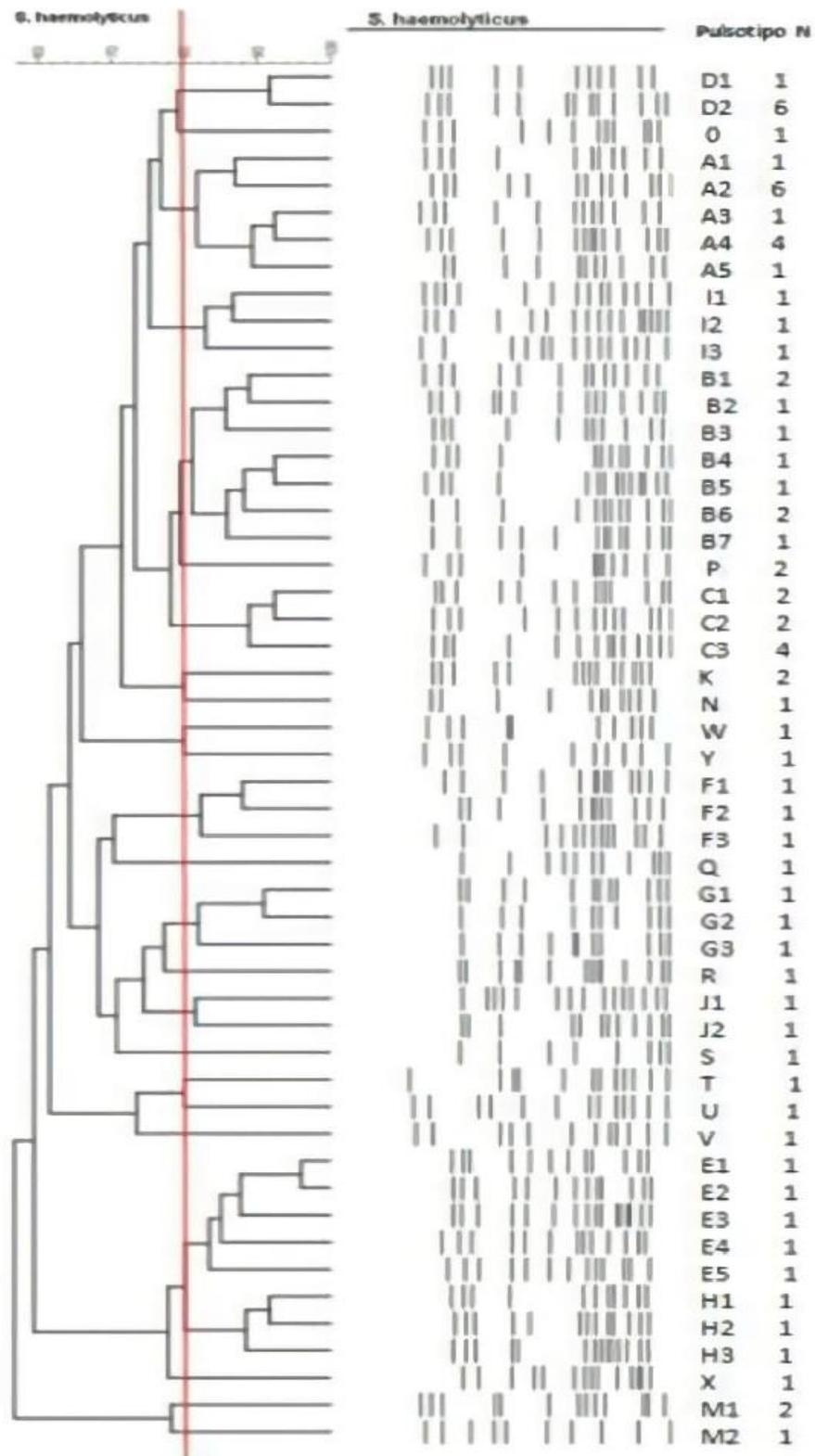


Figura 10. Dendrograma com os pulsotipos de PFGE das 71 amostras de *Staphylococcus haemolyticus* avaliadas no presente estudo

N: Número de amostras. As letras equivalem ao genótipo, enquanto os números os subtipos.

5.7. Correlação entre clonalidade e os valores de *Cartwheel*, CMI de DC e presença dos genes *qacA/B* e *smr*.

Os resultados de estudos prévios, realizados por Rodrigues, 2015 e Aguiar, 2018, mostraram que as 71 amostras de *S. haemolyticus* carregam os *SCCmec* tipos I (1 amostra; 1,4%), II (1; 1,4%), V (24; 33,8%) e as outras 45 (63,4%) amostras foram classificadas como não-tipáveis. Entre as 71 amostras, 53 (74,65%) foram classificadas como resistentes à meticilina. A tabela 9 descreve as características das amostras clínicas relacionadas à presença dos genes *qac* e *smr*, expressão de bombas de efluxo e CMI para DC, correlacionando com o perfil clonal. Os resultados mostram que o clone prevalente A foi associado a altos valores de *Cartwheel* (10 de 13 amostras com valores ≥ 2) e de CMI para o DC (entre 0,5 e 1 $\mu\text{g/mL}$). Contudo, esse clone não foi associado com a presença do gene *qacA/B*. Já a presença do gene *qacA/B* foi relacionada com altos valores de *Cartwheel* e de CMI para clorexidina, independente da clonalidade.

Tabela 9. Distribuição clonal das 71 amostras de *Staphylococcus haemolyticus* em relação aos valores de *Cartwheel*, CMI de digluconato de clorexidina e presença dos genes *qacA/B* e *smr*.

Valores de <i>Cartwheel</i> * em $\mu\text{g/mL}$ (n total=71)	Presença/ausência de genes <i>qacA/B</i> *	CMI de DC* em $\mu\text{g/mL}$			
		0,125	0,25	0,5	1
0,5 (n=28)	<i>qacA/B</i> +/ <i>smr</i> +	E (1)	B (1) C (1)	B (1) C (2) Esp (1)	Esp (1)
	<i>qacA/B</i> -/ <i>smr</i> +	A (1) B (3) C(4) E(1) Esp (2)	A (1) Esp (7)	Esp (1)	-
1,0 (n=8)	<i>qacA/B</i> +/ <i>smr</i> +	-	D (1)	D (1) E (1) Esp (1)	-
	<i>qacA/B</i> -/ <i>smr</i> +	-	Esp (4)	-	-
1,5 (n=7)	<i>qacA/B</i> +/ <i>smr</i> +	-	Esp (1)	A(1) B(1) Esp (3)	E(1)
	<i>qacA/B</i> -/ <i>smr</i> +	-	-	-	-
2,0 (n=19)	<i>qacA/B</i> +/ <i>smr</i> +	-	D (2)	A(7) B (3) C(1) D (2) Esp(1)	A (1) Esp (2)
	<i>qacA/B</i> -/ <i>smr</i> +	-	-	-	-
2,5 (n=9)	<i>qacA/B</i> +/ <i>smr</i> +	-	Esp (1)	A (1) E (1) Esp (3)	A (1) Esp (2)
	<i>qacA/B</i> -/ <i>smr</i> +	-	-	-	-

*: Resultados obtidos previamente por Aguiar, 2018; Esp: esporádico; A a E: clonalidades das amostras; CMI: Concentração Mínima Inibitória em $\mu\text{g/mL}$; DC: Digluconato de clorexidina; n: número de amostras.

5.8. Correlação entre os resultados microbiológicos e os dados clínicos dos pacientes

A tabela 10 mostra a correlação entre os dados clínicos dos pacientes e os resultados microbiológicos relacionados as 71 amostras de *S. haemolyticus* isoladas de hemoculturas no HUCFF. Foi realizada comparação entre os resultados associados à presença de amostras do clone A e aqueles relacionados a outras clonalidades. A coleta dos dados clínicos foi realizada a partir da consulta aos prontuários dos pacientes disponibilizados pela equipe médica do hospital universitário. Contudo, não foi possível o resgate de dados de alguns pacientes durante o desenvolvimento do estudo. Portanto, as análises estatísticas das variáveis foram realizadas somente para os dados que foram disponibilizados. Para as variáveis, sexo, tipo de bacteremia e desfecho clínico foram utilizados os dados coletados de 69 pacientes. Para as variáveis: clínica de origem, idade, tempo de internação e presença de CVC foram utilizados dados de 66, 64, 63 e 61 pacientes, respectivamente. As variáveis, infecção polimicrobiana e uso prévio de antimicrobianos incluíram dados de 56 e 52 pacientes, respectivamente. Como resultados foi confirmada através de análise estatística a associação do clone prevalente A com altos valores de *Cartwheel* ($p= 0,0038$) e de CMI $\geq 0,5\mu\text{g/mL}$ para o DC ($p = 0,0344$), e a não associação com a presença dos genes *qacA/B* ($p= 0,1947$). Porém, a presença do gene *qacA/B* foi correlacionada com altos valores de *Cartwheel* ($p= 0,0001$) e de CMI $\geq 0,5\mu\text{g/mL}$ para clorexidina ($p= 0,0001$) (dados não mostrados). Altos valores de *Cartwheel* foram associados significativamente com elevados valores de CMI para clorexidina ($p= 0,0001$) (dados não mostrados). Destaca-se que a variável idade apresentou relação estatisticamente significativa como clone A ($p=0,008$) e com altos valores de *Cartwheel* ($p=0,0189$). No entanto, não foi possível estabelecer uma relação estatisticamente significativa com outras variáveis clínicas.

Tabela 10. Correlação entre os resultados microbiológicos e os dados clínicos dos pacientes

Dados	% de amostras	Clone A	Demais clones	P Valor
Gene <i>qacA/B</i> (71)^{*1}		(13)[*]	(58)[*]	
<i>qacA/B</i> positivo (47)	66,2	11 (84,6%)	36 (62,1%)	0,1947
<i>qacA/B</i> negativo (24)	33,8	2 (15,4%)	22 (37,9%)	
<i>Cartwheel</i> (71)^{*2}		(13)[*]	(58)[*]	
<i>Cartwheel</i> ≥ 2,0g/L ² (28)	39,4	10 (76,9%)	18 (31%)	0,0038
<i>Cartwheel</i> ≤ 2,0g/L ² (43)	60,6	3 (23,1%)	40 (69%)	
CMI DC (71)^{*1}		(13)[*]	(58)[*]	
CMI DC ≥ 0,5 g/L (41)	57,7	11 (84,6%)	30 (51,7%)	0,0344
CMI DC ≤ 0,5 g/L (30)	43,3	2 (15,4%)	41 (48,3%)	
Sexo (69)[*]		(13)[*]	(56)[*]	
Feminino (31)	44,9	8 (61,5%)	23 (41,1%)	0,2241
Masculino (38)	55,1	5 (38,5%)	33 (58,9%)	
Idade (64)[*]		(12)[*]	(52)[*]	
≥ 60 anos (35)	54,7	11 (91,7%)	24 (46,2%)	0,008
< 60 anos (29)	45,3	1 (8,3%)	28 (53,8%)	
Presença de CVC (61)[*]		(13)[*]	(48)[*]	
Sim (46)	75,4	11 (84,6%)	35 (72,9%)	0,4885
Não (15)	24,6	2 (15,4%)	13 (27,1%)	
Tipo de bacteremia (69)[*]		(13)[*]	(56)[*]	
Primária (17)	24,6	2 (15,4%)	15 (26,8%)	0,4951
Contaminação (52)	75,4	11 (84,6%)	41 (73,2%)	
Infecção Polimicrobiana (56)[*]		(13)[*]	(43)[*]	
Sim (8)	14,3	0 (0%)	8 (18,6%)	0,1765
Não (48)	85,7	13 (100%)	35 (83,4%)	
Uso prévio de ATBs (52)[*]		(10)[*]	(42)[*]	
Sim (47)	90,4	8 (80%)	39 (92,9%)	0,2420
Não (5)	9,6	2 (20%)	3 (7,1%)	
Tempo de internação (63)[*]		(12)[*]	(51)[*]	
Até 7 dias (6)	9,5	0 (0%)	6 (11,8%)	
7 a 14 dias (9)	14,3	1 (8,3%)	8 (15,7%)	0,4095
15 a 30 dias (15)	23,8	3 (25%)	12 (23,5%)	
> 30 dias (33)	52,4	8 (66,7%)	25 (49%)	
Clínica de origem (66)[*]		(13)[*]	(53)[*]	
9º andar (25)	37,9	4 (30,8%)	21 (39,6%)	>0,9999
CTI (19)	28,8	5 (38,4%)	14 (26,4%)	
Outros andares (22)	33,3	4 (30,8%)	18 (34%)	
Desfecho (69)[*]		(13)[*]	(56)[*]	
Alta clínica (32)	46,4	4 (30,8%)	28 (50%)	0,2364
Óbito (37)	53,4	9 (69,2%)	28 (50%)	

n*: corresponde ao número de amostras utilizadas no cálculo estatístico de cada variável; %: percentual; ATBs: antibióticos; CVC: Cateter Venoso Central; CMI: Concentração Mínima Inibitória; DC: Diguconato de Clorexidina. ¹: Não foi possível estabelecer uma relação estatisticamente relevante em relação as variáveis clínicas presentes no estudo, ²: A variável idade foi relacionada estatisticamente significativa para os altos valores de *Cartwheel* ($p=0,0189$).

6. DISCUSSÃO

Staphylococcus haemolyticus é um microrganismo da microbiota e oportunista, cuja multirresistência a antimicrobianos o torna relevante clinicamente, sendo uma das principais espécies de ECN responsável por infecções de corrente sanguínea (Szczuka *et al.*, 2016; Hosseinkhani *et al.*, 2018, Ahmed *et al.*, 2019). Esse tipo de IRAS constitui um grave problema de saúde pública sendo relacionada, principalmente ao uso de dispositivos médicos invasivos, como cateteres (Mpinda-Joseph *et al.*, 2019; Baier *et al.*, 2020). Na prevenção de IRAS tem-se utilizado a clorexidina para a antisepsia da pele em procedimentos invasivos e na higienização do indivíduo (Anvisa, 2010; Anvisa, 2017b). Contudo, o uso frequente desse saneante pode levar ao aumento de sua tolerância pela maior expressão de sistemas de bombas de efluxo. Em adição, o transporte de diferentes substratos pode culminar em resistência cruzada entre saneante e antimicrobiano (Buffet-Bataillon *et al.*, 2016; Spengler *et al.*, 2017). Portanto, estudos que envolvam amostras bacterianas de importância clínica e a ação de saneantes apresentam relevância, e podem ajudar a esclarecer diferentes aspectos associados aos principais agentes bacterianos presentes no ambiente hospitalar.

Para a identificação de microrganismos em geral podem ser empregadas diferentes metodologias, como o MALDI-TOF e PCR (Franco-Duarte *et al.*, 2019). No presente estudo, 71 amostras de *S. haemolyticus* isoladas de hemoculturas em um hospital universitário do Rio de Janeiro, entre 2011 e 2013, foram submetidas à técnica de MALDI-TOF, onde 92,96% das amostras foram classificadas com *score* superior a 2.0, com uma identificação segura de gênero e provável espécie. A técnica não foi capaz de realizar a confirmação de gênero e espécie para cinco amostras, e, desta forma foi necessária a realização de PCR espécie-específico para confirmação da espécie bacteriana. Em 2011, Ferreira e colaboradores, em estudo realizado na Espanha, ao realizarem a identificação de 61 amostras de Gram negativos, 239 de Gram-positivos e de 18 amostras fúngicas originárias de 318 hemoculturas, demonstraram que 96,6% foram identificadas em nível de gênero e 83,3% apresentaram *score* superior a 2,3, com confirmação segura de gênero e espécie. Contudo, ao analisarem amostras de *S. haemolyticus* esse percentual foi de apenas 36,4%, (Ferreira *et al.*, 2011). Em 2020, na China, Wang e colaboradores, compararam a identificação bacteriana por MALDI-TOF-MS diretamente de dois diferentes frascos de hemoculturas: *VersaTREK*[®] *REDOX*[®] (*ThermoFisher*) e *Scenker* (*Scenker*, China). Observou-se a identificação correta de amostras Gram negativas, variando de 96,9% a 97,9%, e de 94,5% de amostras Gram positivas. Destaca-se que para as amostras de *S. haemolyticus* (n=5) houve a identificação com um

score seguro de gênero e espécie. Os autores ressaltam que foi possível o reconhecimento da espécie bacteriana em poucas horas, diferentemente dos métodos tradicionais de crescimento em laboratório, que levariam de 48 a 72 horas. Sendo assim, a aplicação dessa técnica na rotina hospitalar poderia levar ao emprego de uma terapêutica mais rápida de bacteremias (Wang *et al.*, 2020). O MALDI-TOF é uma ferramenta utilizada na clínica para a identificação rápida e confiável de microrganismos, com menor custo e auxílio no direcionamento de tratamento clínico adequado, sendo empregado frequentemente na identificação de ECN (Trevisoli *et al.*, 2018; Hou, Chiang-Ni e Teng, 2019)

A clorexidina é um saneante amplamente utilizado em instituições de assistência à saúde na prevenção de infecções de corrente sanguínea e descontaminação de superfícies bióticas e abióticas (Climo *et al.*, 2013; Bouadma, Karpanen e Elliott, 2018). A tolerância pode ocorrer pelo transporte primário desse composto por sistemas de efluxo nas células bacterianas, sendo estes codificados por genes plasmidiais, como *qacA/B* e *smr* (ou *qacC*) (Costa *et al.*, 2013; Buffet-Bataillon *et al.*, 2016; Lekshmi *et al.*, 2018). Os estudos envolvendo esses genes são em sua maioria realizados com amostras de *S. aureus*, havendo poucos relatos na literatura acerca de sua presença em ECNs (Ignak, Nakipoglu e Gurler, 2017). No presente estudo, o gene *smr* foi investigado nas 71 amostras de *S. haemolyticus* selecionadas, e todas as amostras foram positivas. Correa e colaboradores, 2008, em estudo realizado em Buenos Aires, Argentina, ao avaliarem 21 amostras de *S. haemolyticus* também detectaram a presença do gene *smr* em todas as amostras (Correa *et al.*, 2008). Já Zmantar e colaboradores, 2011, em estudo realizado na Cairuão, Tunísia, analisaram 117 amostras provenientes de fluidos de diálise, sendo 71 amostras identificadas como ECNs. Por meio da técnica de *Multiplex PCR* foi visto que 35% dessas amostras possuíam o gene *smr* e que 66,7% das amostras de *S. haemolyticus* eram positivas para este gene (Zmantar *et al.*, 2011).

Estudos em outras espécies estafilocócicas têm mostrado uma menor prevalência do gene *smr*. Prag e colaboradores, 2014, Suécia, encontraram taxas de 6% em amostras de *S. epidermidis*, ao passo que Tang e colaboradores, 2020, China, encontraram 25,7% das amostras de *S. epidermidis* resistentes à metilicina positivos para esse gene (Prag *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2020). Estudos com *S. aureus* mostram taxas variadas: Smith e colaboradores, 2008, Reino Unido, identificaram 4,25% (4/94) das amostras de *S. aureus* carreando o gene (Smith, Gemmell e Hunter, 2008), enquanto na Malásia, Shamsudin e colaboradores, 2012, observaram uma frequência bem inferior em amostras MRSA (1,6%) (Shamsudin *et al.*, 2012). Também em Trinidad e Tobago, Akpaka e colaboradores, em 2017, observaram uma baixa taxa de amostras de *S. aureus* carreando o gene *smr* (2,3%) (Akpaka, Roberts e

Monecke, 2017). Já McNeil e colaboradores, em 2016, Texas, Estados Unidos, relataram uma frequência de 33,1% (82/247) de positividade (McNeil *et al.*, 2016). Os dados apresentados acima indicam que a presença do gene *smr* em amostras estafilocócicas está associado a epidemiologia local, variando sua distribuição de acordo com a região geográfica e com a espécie estafilocócica envolvida. No entanto, são necessários mais estudos envolvendo a detecção do gene *smr* em amostras de *S. haemolyticus* para confirmar sua frequência elevada encontrada nesta espécie.

A identificação do perfil de susceptibilidade a saneantes pode ser realizada através da determinação do tempo de morte - *Time Kill* e da determinação da concentração mínima bactericida – CMB. Nesse estudo seis amostras de *S. haemolyticus* e duas amostras referência de *S. aureus* foram avaliadas para determinação da CMB para digluconato de clorexidina e o valor da CMB foi de 2 µg/ml para as amostras de *S. haemolyticus*. Contudo, quando expostas a matéria orgânica a CMB subiu para a faixa de 4 a 8 µg/ml. Esse experimento teve o intuito de mimetizar as condições encontradas na clínica, onde a matéria orgânica é comumente encontrada e sua presença pode reduzir ou inativar a ação da clorexidina (Karpiński e Szkaradkiewicz, 2015). Furi e colaboradores, em 2013, avaliaram 1602 amostras de *S. aureus* do Reino Unido e encontraram valores iguais para a CMI e CMB de digluconato de clorexidina, variando de 2 a 8 µg/mL, mas a maioria das amostras apresentou uma concentração intermediária (4 µg/mL). Os autores relatam ainda que não houve relação entre a presença dos genes *qac* com as CMBs apresentadas (Furi *et al.*, 2013). Já, na China, Liu e colaboradores, 2015, avaliaram a CMB para 53 amostras MRSA na ausência e presença de matéria orgânica (BSA) e a média encontrada foi de 32 µg/mL e de 256 µg/mL, respectivamente (Liu *et al.*, 2015). Ademais, Hardy e colaboradores, 2018, no Reino Unido, analisaram 160 amostras MSSA e MRSA, entre 1928 e 2014. Os autores observaram CMBs entre 2 e 64 µg/mL, assim como, observaram um aumento significativo na redução da susceptibilidade à clorexidina nas amostras de locais em que havia significativo uso da clorexidina quando comparado com aqueles locais sem uso do saneante ($p < 0.0001$) (Hardy *et al.*, 2018). O presente estudo testou poucas amostras de *S. haemolyticus*, e desta forma, não foi possível estabelecer alguma relação estatística. No entanto, deve-se ressaltar que os valores de CMB para o DC, na presença e na ausência de matéria orgânica foram muito inferiores à concentração usada na rotina clínica, correspondente a 0,5% ou 50.000 µg/ml, no Brasil (RDC N°107, de 5 de Setembro de 2016) e a 0,1% no Reino Unido (Smith, Gemmell e Hunter; 2008).

Cabe destacar que diversos estudos realizam a determinação da CMB a partir da CMI. No entanto, o tempo de contato da amostra com a clorexidina seria expressivamente superior ao indicado pela ANVISA, que determina que degermação impregnada ou não com antisséptico, como a clorexidina, seja realizada por 3 a 5 minutos, enquanto, o tempo de aplicação deste saneante para assepsia de pele na inserção de cateteres seja de 30 segundos (ANVISA, 2009; ANVISA, 2017b). Além disso, ocorre comumente no ambiente hospitalar a presença de matéria orgânica que pode influenciar na concentração necessária para a eliminação dos microrganismos (Russell e Day, 1993). É necessário salientar a importância do uso em concentrações adequadas desse saneante no ambiente hospitalar, uma vez que concentrações residuais podem induzir a resistência cruzada a antimicrobianos. A baixa biodegradabilidade do saneante DC pode estar relacionada a este efeito residual que pode induzir a expressão de bombas de efluxo. Uma vez que estas são capazes de transportar diferentes substratos, pode assim, culminar na resistência cruzada entre a clorexidina e antimicrobianos (Spengler *et al.*, 2017)

O efeito residual do digluconato de clorexidina tem sido relatado por diversos autores. Esse saneante possui efeito residual de aproximadamente 6 a 8 horas (Ministério da Saúde, 2014). Rhee e colaboradores, em 2018, testaram três condições de aplicação da clorexidina: lenços impregnados com clorexidina a 2% com aplicação na testa, e pano ou algodão com solução de clorexidina a 4% com aplicação em ambos os antebraços. Para a análise, a coleta foi realizada em três momentos distintos: antes da aplicação do digluconato de clorexidina, logo após sua aplicação e decorridas 6 horas. Observou-se que a concentração de 2% clorexidina foi responsável pelo maior efeito residual na pele após o período de 6 horas, sendo significativa quando comparada aos outros métodos ($p < 0,001$). Ressalta-se que, independentemente do método, havia efeito residual em todas as condições testadas (Rhee *et al.*, 2018). Em adição, Jutkina e colaboradores, 2018, em um estudo realizado na Suíça, relataram que a exposição a baixas concentrações dos biocidas, como exemplos, a clorexidina e o triclosan, podem estimular a transferência de genes de tolerância entre os microrganismos (Jutkina *et al.*, 2018). Além disso, banhos de clorexidina são realizados diariamente em pacientes internados, situação que pode estar intimamente relacionada ao aumento da pressão seletiva (Sangal *et al.*, 2012). Portanto, é possível que a ocorrência de concentrações subinibitórias do saneante, *in vivo*, induzam ao aumento na expressão de sistemas de bombas de efluxo bacteriano, e, conseqüentemente a resistência cruzada com antimicrobianos.

Nesse estudo, duas amostras referência de *S. aureus* foram submetidas, em caráter piloto, a passagens sucessivas do crescimento bacteriano em caldo BHI com concentrações

crecientes de digluconato de clorexidina, a fim de avaliar a capacidade de superexpressar os sistemas de bombas de efluxo. Concomitantemente, foi avaliada a possível resistência cruzada a antimicrobianos *in vitro*, pela determinação de suas CMI's nas amostras com e sem indução, e do potencial de bombas de efluxo pelo método de *Cartwheel*. Como resultado foi observado uma possível indução da expressão de sistemas de bombas de efluxo nas cepas de *S. aureus* avaliadas, visto que houve um aumento de até 64X a CMI para fluoroquinolonas. Maiores valores de *Cartwheel* também foram descritos nas amostras após a exposição às doses crescentes de clorexidina, indicando um elevado potencial de expressão de bombas de efluxo pela célula bacteriana. Há relatos do ano de 1993, onde Nicoletti e colaboradores observaram a exposição de *S. aureus* a doses subinibitórias e crescentes de clorexidina durante 12 semanas, sendo visto um aumento de 16 X a CMI para o saneante (Nicoletti *et al.*, 1993). Cowley e colaboradores, 2015, no Reino Unido, após 14 passagens com doses crescentes de clorexidina, demonstram um aumento maior que 4X a CMI para a clorexidina para a amostra de *S. aureus* ATCC 6538 (Cowley *et al.*, 2015). Já, em 2020, Dopcea e colaboradores, na Romênia, realizaram a exposição a doses crescentes de clorexidina em quatro amostras padrões de *Staphylococcus spp*: *S. aureus*: ATCC43300 (MRSA) e ATCC 25923 (MSSA), e *S. epidermidis*: ATCC 51625 (MRSE) e ATCC 12228 (MSSE). Os autores descreveram um aumento de 4X a CMI para a amostra MSSE, 0,8X a CMI para MRSE e de 2X a CMI para as demais amostras. Ao avaliar uma possível resistência cruzada, os autores observaram redução da susceptibilidade a tetraciclina, gentamicina, topeneciclina, ciprofloxacina, doxaciclina, ticarciclina, tobramicina e ofloxacina nas amostras testadas. Destaca-se que a cepa de MSSA apresentou redução da susceptibilidade de forma significativa para ampicilina, ceftazidima, penicilina e tetraciclina ($p < 0,05$) (Dopcea *et al.*, 2020). Esses dados demonstram a importância do uso adequado de saneantes no meio hospitalar e a influência que seu uso pode exercer na antibioticoterapia utilizada nos pacientes.

No presente estudo, ao analisarmos o perfil clonal das amostras de *S. haemolyticus* foi possível agrupar as 71 amostras em 25 clonalidades, sendo 57,7% (41/71) representativas de apenas cinco clones, incluindo o clone prevalente A com 18,3% do total de amostras. Em 2005, Nunes e colaboradores, no Rio de Janeiro, avaliaram a clonalidade de 25 amostras de *S. haemolyticus* resistentes à oxacilina, sendo observado 15 clonalidades diferentes, entre estes 24% (n=6) e 12% (n=3) pertencentes aos clones predominantes, respectivamente (Nunes *et al.*, 2005). Fredheim e colaboradores, no ano de 2009, na Noruega, analisaram 72 amostras de *S. haemolyticus* provenientes de UTI neonatal (n=32), pacientes imunossuprimidos com câncer (n=22) e pacientes adultos de outras unidades (n=18). Foram definidas sete clonalidades, com

16 (22,2%) amostras sendo agrupadas na mesma linhagem clonal e com a mesma origem, a UTI neonatal (Fredheim *et al.*, 2009). Já em 2012, Bouchami e colaboradores, em Portugal, agruparam 36 amostras MRSH em nove genótipos, sendo incluídos 77,8% das amostras em apenas quatro clonalidades, e o clone prevalente continha 13 (36%) amostras (Bouchami *et al.*, 2012). Em 2014, Pereira e colaboradores, no Rio de Janeiro, ao avaliarem 47 amostras de hemoculturas de uma UTI neonatal, encontraram seis genótipos, sendo 32,2% (n=10) representantes de um único clone (Pereira *et al.*, 2014). Como relatado nos artigos supracitados é possível notar extensa variabilidade de linhagens clonais relacionadas à espécie *S. haemolyticus*, de diferentes regiões geográficas. Contudo, a presença de um clone prevalente foi comum nos relatos, variando esta prevalência de 10 a 30%, sendo um aspecto importante a ser destacado, uma vez que alguns clones desempenham um papel importante na persistência de uma cepa bacteriana no ambiente hospitalar.

Características intrínsecas relacionadas à espécie *S. haemolyticus* podem impactar no prognóstico do paciente. Nesse estudo foram avaliados dados clínicos dos pacientes e associados aos resultados microbiológicos encontrados e àqueles avaliados em estudos prévios. Foi possível associar significativamente a idade avançada do paciente com o clone prevalente ($p < 0,008$) e com o potencial elevado de expressão de bombas de efluxo devido aos altos valores de *Cartwheel* encontrados ($p < 0,0189$). Em um estudo de Klingenberg e colaboradores, 2007, realizado na Noruega, foram avaliadas 180 amostras de ECNs isoladas de hemoculturas de uma UTI. Entre as amostras de *S. haemolyticus* (n=19), 13 foram agrupadas em um único genótipo, que foi associado a infecções em neonatos prematuros ($p < 0,001$) (Klingenberg *et al.*, 2007). Contudo, a pouca disponibilidade de dados clínicos associados a infecções por esse microrganismo na literatura dificulta análises comparativas.

Em nosso estudo, demonstramos a presença do gene *qacA/B* foi relacionada à tolerância aos saneantes, com altos valores de *Cartwheel* e de CMI para clorexidina em amostras de *S. haemolyticus*. Além disso, demonstramos taxas de CMB consideravelmente inferiores às concentrações utilizadas em ambientes hospitalares. Avaliamos ainda o impacto que a superexpressão de bombas de efluxo é capaz de causar em amostras estafilocócicas, sendo identificado uma possível resistência cruzada entre antimicrobianos e biocidas, *in vitro*. A presença de antimicrobianos e/ou saneantes no ambiente hospitalar exerce pressão seletiva, fato que influencia diretamente na dinâmica de clones prevalentes neste ambiente, reforçando, mais uma vez, a necessidade de estudos que avaliem o uso destes compostos no ambiente hospitalar.

7. CONCLUSÕES

- Os resultados do estudo indicam alto potencial de tolerância a saneantes entre amostras de *S. haemolyticus* e tendência a permanência destas amostras no ambiente hospitalar.
- Os valores de CMB para digluconato de clorexidina, na presença e na ausência de matéria orgânica, para amostras clínicas de *S. haemolyticus* e amostras referência de *S. aureus* foram muito inferiores à concentração usada deste biocida na rotina clínica, destacando a importância de seu uso em concentrações adequadas no ambiente hospitalar, uma vez que concentrações residuais podem induzir a resistência.
- O teste piloto de indução de resistência cruzada utilizando amostras referência de *S. aureus* confirmou a pressão seletiva exercida pelo saneante sobre amostras estafilocócicas, com evidência de resistência cruzada para quinolonas e gentamicina, *in vitro*.
- O estudo mostrou a presença de 25 perfis clonais de *S. haemolyticus*, com a prevalência de cinco linhagens clonais e destaque para o clone A, presente em 18,3% das amostras.
- Associações estatisticamente significativas foram observadas entre o clone A de *S. haemolyticus* e a idade avançada dos pacientes, assim como com altos valores de *Cartwheel* e com valores elevados de CMI para clorexidina. A presença do gene *qacA/B* foi associada com amostras apresentando altos valores de *Cartwheel* e de CMI para clorexidina.

8. REFERÊNCIAS

- Aguiar, V.A. (2018). Ação de saneantes em amostras de *Staphylococcus haemolyticus* multirresistentes isoladas de hemoculturas em um hospital no Rio de Janeiro. Dissertação (Graduação em Ciências Biológicas – Microbiologia e Imunologia), Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Ahmed, A., Satti, L., Zaman, G., Gardezi, A., Sabir, N. e Khadim, M. T. (2019). Catheter related recurrent blood stream infection caused by linezolid-resistant, methicillin resistant *Staphylococcus haemolyticus*; an emerging super bug. J. PMA. 69, 261-263
- Akpaka, P. E., Roberts, R. e Monecke, S. (2017). Molecular characterization of antimicrobial resistance genes against *Staphylococcus aureus* isolates from Trinidad and Tobago. J. Infect. Public Health. 10, 316-323.
- Alcalde-Rico, M., Hernando-Amado, S., Blanco, P. e Martínez, J. L. (2016). Multidrug Efflux Pumps at the Crossroad between Antibiotic Resistance and Bacterial Virulence. Front. Microbiol. 7, 1483.
- Alibert, S., N'gompaza Diarra, J., Hernandez, J., Stutzmann, A., Fouad, M., Boyer, G. e Pagès, J. M. (2017). Multidrug efflux pumps and their role in antibiotic and antiseptic resistance: a pharmacodynamic perspective. Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. 13, 301-309.
- Alnaseri, H., Arsic, B., Schneider, J. E., Kaiser, J. C., Scinocca, Z. C., Heinrichs, D. E. e McGavin, M. J. (2015). Inducible expression of a resistance-nodulation-division-type efflux pump in *Staphylococcus aureus* provides resistance to linoleic and arachidonic acids. J. Bacteriol. 197, 1893-1905.
- Antunes, A. L. S., Bonfanti, J. W., Perez, L. R. R., Pinto, C. C. F., Freitas, A. L. P. D., Macedo, A. J. e Barth, A. L. (2011). High vancomycin resistance among biofilms produced by *Staphylococcus* species isolated from central venous catheters. Mem. I. Oswaldo Cruz. 106, 51-55.
- ANVISA. (2009). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Segurança do paciente em serviços de saúde: Higienização das mãos. ANVISA. Brasília. Brasil.
- ANVISA. (2010). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Segurança do paciente em serviços de saúde: limpeza e desinfecção de superfícies. ANVISA. Brasília. Brasil.
- ANVISA. (2016). Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Manual do usuário: Petição eletrônico de registro de produto saneante. Brasília. Brasil.
- ANVISA. (2017a). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 18: Incidentes Relacionados à Assistência à Saúde. Disponível em: <<https://bit.ly/2Is5KPf>>. Acesso em: 25/06/2020.
- ANVISA. (2017b). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Série Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde. ANVISA. Brasília.
- ANVISA. (2018). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 20: Avaliação dos indicadores nacionais das IRAS e RM 2018. Disponível em: <<https://bit.ly/2MRfYvE>>. Acesso em: 25/06/2020.
- Asai, N., Sakanashi, D., Suematsu, H., Kato, H., Hagihara, M., Watanabe, H., Shiota, A., Koizumi, Y., Yamagishi, Y. e Mikamo, H. (2020). Clinical characteristics and relevance of coagulase-negative *Staphylococci* other than *S. epidermidis* by positive blood culture. J. Microbiol, Immunol. Infect. *Epub ahead of print*.

- Ayeni, F. A., Andersen, C. e Nørskov-Lauritsen, N. (2017). Comparison of growth on mannitol salt agar, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, VITEK® 2 with partial sequencing of 16S rRNA gene for identification of coagulase-negative *staphylococci*. *Microb. Pathog.* 105, 255-259.
- Baier, C., Linke, L., Eder, M., Schwab, F., Chaberny, I. F., Vonberg, R. P. e Ebadi, E. (2020). Incidence, risk factors and healthcare costs of central line-associated nosocomial bloodstream infections in hematologic and oncologic patients. *PLoS one.* 15, e0227772.
- Bannerman, T.L. e Peacock, S.J. (2007). *Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase-Positive Cocci That Grow Aerobically*. In: Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Tenover, M.A. and Tenover, R.H., Eds., *Manual of Clinical Microbiology*, 9th Edition, American Society for Microbiology, Washington DC. 390-411.
- Barros, E. M., Ceotto, H., Bastos, M. C. F., Dos Santos, K. R. N. e Giambiagi-Demarval, M. (2012). *Staphylococcus haemolyticus* as an important hospital pathogen and carrier of methicillin resistance genes. *JCM*, 50, 166-168.
- Becker, K., Heilmann, C. e Peters, G. (2014). Coagulase-negative *staphylococci*. *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 870-926.
- Becker, K., Both, A., Weißelberg, S., Heilmann, C. e Rohde, H. (2020). Emergence of coagulase-negative *staphylococci*. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 18, 349-366.
- Berlak, N., Shany, E., Ben-Shimol, S., Chertok, I. A., Goldinger, G., Greenberg, D. e Melamed, R. (2018). Late onset sepsis: comparison between coagulase-negative *staphylococci* and other bacteria in the neonatal intensive care unit. *J. Infect. Dis.* 50, 764-770.
- Blanco, P., Hernando-Amado, S., Reales-Calderon, J. A., Corona, F., Lira, F., Alcalde-Rico, M., Bernardini, A., Sanchez, M. B. e Martinez, J. L. (2016). Bacterial multidrug efflux pumps: much more than antibiotic resistance determinants. *Microorganisms.* 4, 14.
- Bouadma, L., Karpanen, T. e Elliott, T. (2018). Chlorhexidine use in adult patients on ICU. *Intensive Care Med.* 44, 2232-2234.
- Bouchami, O., Hassen, A. B., De Lencastre, H. e Miragaia, M. (2012). High prevalence of *mec* complex C and *ccrC* is independent of *SCCmec* type V in *Staphylococcus haemolyticus*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31, 605-614.
- Bouchami, O., de Lencastre, H. e Miragaia, M. (2016). Impact of Insertion Sequences and Recombination on the Population Structure of *Staphylococcus haemolyticus*. *PLOS ONE.* 11, e0156653.
- Braga, I. A., Campos, P. A., Gontijo-Filho, P. P. e Ribas, R. M. (2018). Multi-hospital point prevalence study of healthcare-associated infections in 28 adult intensive care units in Brazil. *J. Hosp. Infect.* 99, 318-324.
- Brasil. (1976). Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a Vigilância Sanitária a que ficam sujeitos os Medicamentos, as Drogas, os Insumos Farmacêuticos e Correlatos, Cosméticos, Saneantes e Outros Produtos, e dá outras Providências. *Diário Oficial da União*.
- Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O. e Balaban, N. Q. (2016). Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 320-330.
- Buffet-Bataillon, S., Tattevin, P., Maillard, J.-Y., Bonnaure-Mallet, M. e Jolivet-Gougeon, A. (2016). Efflux pump induction by quaternary ammonium compounds and fluoroquinolone resistance in bacteria. *Future Microbiol.* 11, 81-92.

- CDC. (2019). Antibiotic Resistance Threats in the United States. AR Threats Report. Biggest Threats and Data. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html>>. Acesso em: 18/11/2020.
- Chabriere, E., Bassène, H., Drancourt, M. e Sokhna, C. (2018). MALDI-TOF MS and point of care are disruptive diagnostic tools in Africa. *NMNI*. 26, 83-88.
- Chang, P. H., Liu, T. P., Huang, P. Y., Lin, S. Y., Lin, J. F., Yeh, C. F., Chang, S.C., Wu, T.S. e Lu, J. J. (2018). Clinical features, outcomes, and molecular characteristics of an outbreak of *Staphylococcus haemolyticus* infection, among a mass-burn casualty patient group, in a tertiary center in northern Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 51, 847-855.
- Chon, J. W., Lee, U. J., Bensen, R., West, S., Paredes, A., Lim, J. Khan, S., Hart, M. E., Phillips, K. S. e Sung, K. (2020). Virulence Characteristics of *mecA*-Positive Multidrug-Resistant Clinical Coagulase-Negative *Staphylococci*. *Microorganisms*. 8, 659.
- Chung, C. R., Wang, H. Y., Lien, F., Tseng, Y. J., Chen, C. H., Lee, T. Y., Liu, T.P., Horng, J.T. e Lu, J. J. (2019). Incorporating statistical test and machine intelligence into strain typing of *Staphylococcus haemolyticus* based on matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Front. Microbiol.* 10, 2120.
- Climo, M. W., Yokoe, D. S., Warren, D. K., Perl, T. M., Bolon, M., Herwaldt, L. A., Herwaldt, L. A., Weinstein, R. A., Sepkowitz, K. A., Jernigan, J.A., Sanogo, K. e Wong, E. S. (2013). Daily chlorhexidine bathing-effect on healthcare-associated BSI and MDRO acquisition. *NEJM*. 368, 533-542
- CLSI. (2019). Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 29th ed. CLSI document M100- S29. Wayne, Pennsylvania, USA.
- Correa, J. E., De Paulis, A., Predari, S., Sordelli, D. O. e Jeric, P. E. (2008). First report of *qacG*, *qacH* and *qacJ* genes in *Staphylococcus haemolyticus* human clinical isolates. *JAC*, 62, 956-960.
- Costa, S. S., Viveiros, M., Amaral, L. e Couto, I. (2013). Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: an update. *Open Microbiol. J.* 7, 59-71.
- Costa, S. S., Viveiros, M., Pomba, C. e Couto, I. (2017). Active antimicrobial efflux in *Staphylococcus epidermidis*: building up of resistance to fluoroquinolones and biocides in a major opportunistic pathogen. *JAC*. 73, 320–324.
- Cowley, N. L., Forbes, S., Amézquita, A., McClure, P., Humphreys, G. J. e McBain, A. J. (2015). Effects of formulation on microbicide potency and mitigation of the development of bacterial insusceptibility. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 7330-7338.
- Cunha, M. D. L. R., Sinzato, Y. K. e Silveira, L. V. (2004). Comparison of methods for the identification of coagulase-negative *staphylococci*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 99, 855-860.
- Czekaj, T., Ciszewski, M. e Szewczyk, E. M. (2015). *Staphylococcus haemolyticus*-an emerging threat in the twilight of the antibiotics age. *Microbiology*. 161, 2061-2068.
- Dao, T. H., Alsallaq, R., Parsons, J., Ferrolino, J., Hayden, R. T., Rubnitz, J. E., Rafiqullah, I. M., Robinson, D. A., Margolis, E. B., Rosch, J. W. e Wolf, J. (2020). Vancomycin Heteroresistance and Clinical Outcomes in Coagulase-Negative *Staphylococcal* Bloodstream Infections. *Antimicrob. Agents Chemother. Epub ahead of print*.

Denny, J. e Munro, C. L. (2017). Chlorhexidine Bathing Effects on Health-Care-Associated Infections. *Biol. Res. Nurs.* 19, 123–136.

De Oliveira, T.L.R. (2019). Caracterização fenotípica e molecular da resistência às fluoroquinolonas e saneantes em amostras de *Staphylococcus aureus* de diferentes linhagens isoladas em hospitais do Rio de Janeiro. Tese (Doutorado em Ciências – Microbiologia), Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Do Carmo Ferreira, N., Schuenck, R. P., dos Santos, K. R. N., de Freire Bastos, M. do C. e Giambiagi-deMarval, M. (2011). Diversity of plasmids and transmission of high-level mupirocin *mupA* resistance gene in *Staphylococcus haemolyticus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 61, 147–152.

Dopcea, G. N., Dopcea, I., Nanu, A. E., Diguță, C. F. e Matei, F. (2020). Resistance and cross-resistance in *Staphylococcus spp.* strains following prolonged exposure to different antiseptics. *JGAR.* 21, 399-404.

Do Vale, B. C. M., Nogueira, A. G., Cidral, T. A., Lopes, M. C. S. e de Melo, M. C. N. (2019). Decreased susceptibility to chlorhexidine and distribution of *qacA/B* genes among coagulase-negative *Staphylococcus* clinical samples. *BMC Infect. Dis.* 19, 199.

Du, D., Wang-Kan, X., Neuberger, A., van Veen, H. W., Pos, K. M., Piddock, L. J. V. e Luisi, B. F. (2018). Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 523–539.

Džidić, S., Šušković, J. e Kos, B. (2008). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. *Food Technol. Biotechnol.* 46, 11-21.

ECDC. (2019a). European Centre for Disease Prevention and Control. Healthcare-associated infections acquired in intensive care units. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm.

ECDC. (2019b). European Centre for Disease Prevention and Control. Healthcare-associated infections: surgical site infections. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm.

Euzéby, J.P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Disponível em: <http://www.bacterio.net/>. Acesso em 29/04/2020.

Faria, N. A., Carrico, J. A., Oliveira, D. C., Ramirez, M. e de Lencastre, H. (2008). Analysis of typing methods for epidemiological surveillance of both methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microb.* 46, 136-144.

Fernandes, R., Amador, P. e Prudêncio, C. (2013). β -Lactams. *Rev. Med. Microbiol.* 24, 7–17.

Ferreira, L., Sánchez-Juanes, F., Porrás-Guerra, I., García-García, M. I., García-Sánchez, J. E., González-Buitrago, J. M. e Muñoz-Bellido, J. L. (2011). Microorganisms direct identification from blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 546-551.

Flemming, H.C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A. e Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.*, 14, 563–575.

Fraise, A.P. (2002). Biocide abuse and antimicrobial resistance—a cause for concern? *JAC*, 49, 11-12.

Franco-Duarte, R., Černáková, L., Kadam, S., S Kaushik, K., Salehi, B., Bevilacqua, A., Corbo, M.R., Antolak, H., Dybka-Stepián, K., Leszczewicz, M., Tintino, S.R., Souza, V.C.A, Sharifi-Rad, J., Coutinho, H.D.M.,

- Martins, N. e Rodrigues, C.F. (2019). Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms—from past to present. *Microorganisms*, 7, 130.
- Fredheim, E. G. A., Klingenberg, C., Rohde, H., Frankenberger, S., Gaustad, P., Flægstad, T., e Sollid, J. E. (2009). Biofilm formation by *Staphylococcus haemolyticus*. *J. Clin. Microbiol.* 47, 1172-1180.
- Furi, L., Ciusa, M. L., Knight, D., Di Lorenzo, V., Tocci, N., Cirasola, D., Aragonés, L., Coelho, J.R., Freitas, A.T., Marchi, E., Moce, L., Visa, P., Northwood, J. B., Viti, C., Borghi, E., Orefici, G., the BIOHYPO Consortium, Morrissey, I. e Oggionia, M. R. (2013). Evaluation of reduced susceptibility to quaternary ammonium compounds and bisbiguanides in clinical isolates and laboratory-generated mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 3488-3497.
- Grüner, B. M., Han, S. R., Meyer, H. G., Wulf, U., Bhakdi, S. e Siegel, E. K. (2007). Characterization of a catalase-negative methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2684-2685.
- Haque, M., Sartelli, M., McKimm, J. e Bakar, M.A. (2018). Health care-associated infections- na overview. *Infect. Drug Res.* 11, 2321-2333.
- Hardy, K., Sunnucks, K., Gil, H., Shabir, S., Trampari, E., Hawkey, P. e Webber, M. (2018). Increased Usage of Antiseptics Is Associated with Reduced Susceptibility in Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*. *mBio.* 9, e00894-18.
- Hassanzadeh, S., ganjloo, S., Pourmand, M. R., Mashhadi, R. e Ghazvini, K. (2019). Epidemiology of efflux pumps genes mediating resistance among *Staphylococcus aureus*; A systematic review. *Microbial Pathogenesis.* 139: 103850.
- Hemels, M. A. C., van den Hoogen, A., Verboon-Macielek, M. A., Fleer, A. e Krediet, T. G. (2011). A Seven-Year Survey of Management of Coagulase-Negative *Staphylococcal* Sepsis in the Neonatal Intensive Care Unit: Vancomycin May Not Be Necessary as Empiric Therapy. *Neonatology.* 100, 180–185.
- Hijazi, K., Mukhopadhyaya, I., Abbott, F., Milne, K., Al-Jabri, Z. J., Oggioni, M. R. e Gould, I. M. (2016). Susceptibility to chlorhexidine amongst multidrug-resistant clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* from bloodstream infections. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 48, 86–90.
- Hitzenbichler, F., Simon, M., Salzberger, B. e Hanses, F. (2016). Clinical significance of coagulase-negative *staphylococci* other than *S. epidermidis* blood stream isolates at a tertiary care hospital. *Infection.* 45, 179–186.
- Horner, C., Mawer, D. e Wilcox, M. (2012). Reduced susceptibility to chlorhexidine in *staphylococci*: is it increasing and does it matter? *JAC.* 67, 2547–2559.
- Hosseinkhani, F., Buirs, M. T., Jabalameli, F., Emaneini, M. e Van Leeuwen, W. B. (2018). High diversity in *SCCmec* elements among multidrug-resistant *Staphylococcus haemolyticus* strains originating from paediatric patients; characterization of a new composite island. *J. Med. Microbiol.* 67, 915-921.
- Hou, T. Y., Chiang-Ni, C. e Teng, S. H. (2019). Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *J. Food Drug Anal.* 27, 404-414.
- Ignak, S., Nakipoglu, Y. e Gurler, B. (2017). Frequency of antiseptic resistance genes in clinical *staphylococci* and *enterococci* isolates in Turkey. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* 6. 88
- Iorio, N. L. P., Ferreira, R. B. R., Schuenck, R. P., Malvar, K. L., Brillhante, A. P., Nunes, A. P. F., Bastos, C.C.R. e Dos Santos, K. R. N. (2007). Simplified and reliable scheme for species-level identification of *Staphylococcus* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2564-2569.

Jutkina, J, Marathe, N.P., Flach, C.F. e Larsson, D.G.J. (2018). Antibiotics and common antibacterial biocides stimulate horizontal transfer of resistance at low concentrations. *Sci. Total Environ.* 616, 172-178.

Kampf, G. (2016). Acquired resistance to chlorhexidine – is it time to establish an “antiseptic stewardship” initiative? *J. Hosp. Infecti.* 94, 213–227.

Karpiński, T. M. e Szkaradkiewicz, A. K. (2015). Chlorhexidine–pharmaco-biological activity and application. *Eur. Ver. Med. Pharmacol. Sci.* 19, 1321-6.

Klingenberg, C., Rønnestad, A., Anderson, A. S., Abrahamsen, T. G., Zorman, J., Villaruz, A., Flægstad, T., Otto, M. e Sollid, J. E. (2007). Persistent strains of coagulase-negative *staphylococci* in a neonatal intensive care unit: virulence factors and invasiveness. *Clin. Microbiol. Infect.* 13, 1100-1111.

Kumar, A. e Schweizer, H. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 1486–1513.

Laupland, K. B. (2013). Incidence of bloodstream infection: a review of population-based studies. *Clin. Microbiol. Infect.* 19, 492-500.

Lekshmi, M., Ammini, P., Jones Adjei, L. M. S., Shrestha, U., Kumar, S. e Varela, M. F. (2018). Modulation of antimicrobial efflux pumps of the major facilitator superfamily in *Staphylococcus aureus*. *AIMS Microbiology.* 4, 1-18.

Liu, Q., Zhao, H., Han, L., Shu, W., Wu, Q. e Ni, Y. (2015). Frequency of biocide-resistant genes and susceptibility to chlorhexidine in high-level mupirocin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MuH MRSA). *Diagn. Micr. Infec. Dis.* 82, 278-283.

López, D., Vlamakis, H., Kolter, R. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harb. Perspec. Biol.*, 2, 1-11.

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

Magill, S. S., Edwards, J. R., Bamberg, W., Beldavs, Z. G., Dumyati, G., Kainer, M. A., Lynfield, R., Maloney, M., MacAllister-Hollod, L., Nadle, J., Ray, S. M., Thompson, D.L., Wilson, L.E. e Scott, .K..F. (2014). Multistate point-prevalence survey of health care–associated infections. *N. Engl. J. Med.* 370, 1198-1208.

Manoharan, M., Sistla, S. e Ray, P. (2020). Prevalence and Molecular Determinants of Antimicrobial Resistance in Clinical Isolates of *Staphylococcus haemolyticus* from India. *Microb. Drug Resist. Epub ahead of print.*

Marcel, J. P., Alfa, M., Baquero, F., Etienne, J., Goossens, H., Harbarth, S. Hryniewicz, W., Jarvis, W., Kaku, M., Leclercq, R., Levy, S., D. Mazel, Nercelles, P., Perl, T., Pittet, D., Vandembroucke-Grauls, C., Woodford, N. e Jarlier, V. (2008). Healthcare-associated infections: think globally, act locally. *Clin. Microbiol. Infect.* 14, 895-907.

Martins, M., Viveiros, M., Couto, I., Costa, S. S., Pacheco, T., Fanning, S., Pages, J. M. e Amaral, L. (2011). Identification of efflux pump-mediated multidrug-resistant bacteria by the ethidium bromide-agar cartwheel method. *In vivo.* 25, 171-178.

Martins, M., McCusker, M. P., Viveiros, M., Couto, I., Fanning, S., Pagès, J. M. e Amaral, L. (2013). A simple method for assessment of MDR bacteria for over-expressed efflux pumps. *Open Microbiol. J.* 7, 72-82.

McAdow, M., Missiakas, D. M. e Schneewind, O. (2012). *Staphylococcus aureus* secretes coagulase and von Willebrand factor binding protein to modify the coagulation cascade and establish host infections. *J. Innate Immune*. 4, 141-148.

McConeghy, K. W., Bleasdale, S. C. e Rodvold, K. A. (2013). The empirical combination of vancomycin and a β -lactam for *staphylococcal* bacteremia. *Clin. Infect. Dis.* 57, 1760-1765.

McDonell, G. e Russel, A.D. (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 147-179.

McNeil, J. C., Kok, E., Vallejo, J. G., Campbell, J. R., Hulten, K. G., Mason, E. O. e Kaplan, S. L. (2015). Decreased susceptibility to chlorhexidine among nosocomial *Staphylococcus aureus* of Texas Children's Hospital: Clinical and Molecular Features. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 1121- 1128.

McNeil, J.C, Kok E.Y, Vallejo, J.G., Campbell, J.R, Hulten K.G, Mason E.O. e Kaplan S.L. (2016). Clinical and molecular features of decreased chlorhexidine susceptibility among nosocomial *Staphylococcus aureus* isolates at Texas Children's Hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 1121–1128.

Mehta, Y., Gupta, A., Todi, S., Myatra, S., Samaddar, D., Patil, V., Bhattacharya, P.K. e Ramasubban, S. (2014). Guidelines for prevention of hospital acquired infections. *Indian J. Crit. Care Med.* 18, 149-163.

Ministério da Saúde e ANVISA. (2010). Resolução de Diretoria Colegiada – RDC nº35, de 16 de agosto de 2010. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para produtos com ação antimicrobiana utilizados em artigos críticos e semicríticos. *Diário Oficial da União*. Página 44. Seção 1.

Ministério da Saúde e ANVISA. (2012). Resolução de Diretoria Colegiada – RDC nº29, de 1 de junho de 2012. Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre “Lista de Substâncias de Ação Conservante permitidas para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes” e dá outras providências. Publicada em DOU nº 107, de 04 de junho de 2012. *Diário Oficial da União*. Seção: 1; Página: 81.

Ministério da Saúde. (2014). Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Atenção à saúde do recém-nascido: guia para os profissionais de saúde / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. – 2. ed. atual. – Brasília, Brasil. Ministério da Saúde.

Ministério da Saúde e ANVISA. (2016). Resolução de Diretoria Colegiada – RDC nº107, de 5 de setembro de 2016. Altera a resolução da diretoria colegiada – RDC nº 199, de 26 de outubro de 2006, que dispõe sobre os medicamentos de notificação simplificada. *Diário Oficial da União*. Edição: 172; Seção: 1; Página: 31.

Ministério da Saúde, ANVISA e Diretoria Colegiada. (2018). Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 255, de 10 de dezembro de 2018. Aprova e promulga o Regimento Interno da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA e dá outras providências. *Diário Oficial da União*. Edição: 237. Seção: 1. Página: 159

Moriya, T. e Módena, J. L. P. (2008). Assepsia e antissepsia: Técnicas de esterilização. *Medicina (Ribeirão Preto)*. 41, 265-273.

Mpinda-Joseph, P., Anand Paramadhas, B. D., Reyes, G., Maruatona, M. B., Chise, M., Monokwane-Thupiso, B. B., Souda, S., Tiroyakgosi, C. e Godman, B. (2019). Healthcare-associated infections including neonatal bloodstream infections in a leading tertiary hospital in Botswana. *Hosp. Pract.* 47, 203-210.

Musuuza, J. S., Guru, P. K., O'Horo, J. C., Bongiorno, C. M., Korobkin, M. A., Gangnon, R. E. e Safdar, N. (2019). The impact of chlorhexidine bathing on hospital-acquired bloodstream infections: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect. Dis.* 19, 416.

Namvar, A. E., Bastarahang, S., Abbasi, N., Ghehi, G. S., Farhadbakhtiarian, S., Arezi, P., Hosseini, M., Baravati, S. Z., Jokar, Z. e Chermahin, S. G. (2014). Clinical characteristics of *Staphylococcus epidermidis*: a systematic review. *GMS Hyg. Infect. Control.* 9, 23.

Nasaj, M., Saeidi, Z., Asghari, B., Roshanaei, G. e Arabestani, M. R. (2020). Identification of hemolysin encoding genes and their association with antimicrobial resistance pattern among clinical isolates of coagulase-negative *Staphylococci*. *BMC Res. Notes.* 13: 68.

Nicoletti, G., Boghossian, V., Gurevitch, F., Borland, R. e Morgenroth, P. (1993). The antimicrobial activity in vitro of chlorhexidine, a mixture of isothiazolinones (“Kathon” CG) and cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB). *J. Hosp. Infect.* 23, 87–111.

Nowakowski, Â. V. e Mamizuka, E.M. (2013). Capítulo 1: Estafilococos, Estreptococos, Enterococos e outros. Módulo 6 : Detecção e identificação de bactérias de importância médica. In *Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde*. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).– Brasília, Brasil. pp: 13-16

Nunes, A. P. F., Teixeira, L. M., Bastos, C. C. R., Silva, M. G., Ferreira, R. B. R., Fonseca, L. S. e Santos, K. R. N. (2005). Genomic characterization of oxacillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* isolated from Brazilian medical centres. *J. Hosp. Infect.* 59, 19-26

O'grady, N. P., Alexander, M., Burns, L. A., Dellinger, E. P., Garland, J., Heard, S. O., Lipsett, P.A., Masur, H., Mermel, L.A., Pearson, M. L., Raad, I. I., Randolph, A., Rupp, M. E., Saint, S. e Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. (2011). Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. *Clin.Infect. Dis.* 52, 162-193.

Otto, M. (2013). *Staphylococcal* Infections: Mechanisms of Biofilm Maturation and Detachment as Critical Determinants of Pathogenicity. *Annu. Rev. Med.* 64, 175–188.

Otto, M. (2018). *Staphylococcal* Biofilms. *Microbiol. Spectrum.* 6, 10.

Parizad, E. G., Parizad, E. G. e Valizadeh, A. (2016). The application of pulsed field gel electrophoresis in clinical studies. *JCDR.* 10, DE01.

Patel, D., Kosmidis, C., Seo, S. M. e Kaatz, G. W. (2010). Ethidium bromide MIC screening for enhanced efflux pump gene expression or efflux activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 5070-5073.

Paterson, G. K., Harrison, E. M. e Holmes, M. A. (2014). The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 22, 42-47.

Pearce, H., Messenger, S. e Maillard, J.-Y. (1999). Effect of biocides commonly used in the hospital environment on the transfer of antibiotic-resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *J. Hosp. Infect.* 43, 101–107.

Pereira, E. M., Schuenck, R. P., Malvar, K. L., Iorio, N. L. P., Matos, P. D. M., Olendzki, A. N. Oelemann, W.M.R. e dos Santos, K. R. N. (2010). *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*: Methicillin-resistant isolates are detected directly in blood cultures by multiplex PCR. *Microbiol. Res.* 165, 243-249.

Pereira, P. M. A., Binatti, V. B., Sued, B. P. R., Ramos, J. N., Peixoto, R. S., Simões, C., Castro, E. A., Duarte, J. L. M. B., Vieira, V.V., Hirata Jr., R., Santos, K. R. N., Mattos-Guaraldi, A. L e Pereira, J.A. A. (2014). *Staphylococcus haemolyticus* disseminated among neonates with bacteremia in a neonatal intensive care unit in Rio de Janeiro, Brazil. *Diagn. Micr. Infec. Dis.* 78, 85-92.

- Pereira-Ribeiro, P. M., Sued-Karam, B. R., Faria, Y. V., Nogueira, B. A., Colodette, S. S., Fracalanza, S. E., Duarte, J. L.M.B., Júnior, R. H. e Mattos-Guaraldi, A. L. (2019). Influence of antibiotics on biofilm formation by different clones of nosocomial *Staphylococcus haemolyticus*. *Future Microbiol.* 14, 789-799.
- Pinchuk, I. V., Beswick, E. J. e Reyes, V. E. (2010). *Staphylococcal* enterotoxins. *Toxins.* 2, 2177-2197.
- Pinheiro, L., Brito, C. I., De Oliveira, A., Martins, P. Y. F., Pereira, V. C. e Da Cunha, M. D. L. R. D. S. (2015). *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*: molecular detection of cytotoxin and enterotoxin genes. *Toxins.* 7, 3688-3699.
- Pitten, F.A., Werner, H.P. e Kramer, A. (2003). A standardized test to assess the impact of different organic challenges on the antimicrobial activity of antiseptics. *J. Hosp. Infect.* 55, 108–115.
- Popp, J. A., Layon, A. J., Nappo, R., Richards, W. T. e Mazingo, D. W. (2014). Hospital-acquired infection sandthermally injured patients: Chlorhexidine gluconate baths work. *Am. J. Infect. Control.* 42, 129–132.
- Prag, G., Falk-Brynhildsen, K., Jacobsson, S., Hellmark, B., Unemo, M. e Söderquist, B. (2014). Decreased susceptibility to chlorhexidine and prevalence of disinfectant resistance genes among clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *APMIS.* 122, 961–967.
- Rhee, Y., Palmer, L. J., Okamoto, K., Gemunden, S., Hammouda, K., Kemble, S. K., Lin, M. Y., Lolans, K., Fogg, L., Guanaga, D., Yokoe, D.S., Weinstein, R.A. e Frendl, G. (2018). Differential Effects of Chlorhexidine Skin Cleansing Methods on Residual Chlorhexidine Skin Concentrations and Bacterial Recovery. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 39, 405–411.
- Rodrigues, B.G. (2015). Epidemiologia de amostras multirresistentes da espécie *Staphylococcus haemolyticus* isoladas de hemoculturas de um hospital na cidade do Rio de Janeiro. Dissertação (Mestrado em Ciências – Microbiologia), Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Rosenthal, S., Spangberg, L. e Safavi, K. (2004). Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol., Oral Radiol. Endod.*, 98, 488-492.
- Rossi, C. C., Ferreira, N. C., Coelho, M. L., Schuenck, R. P., Bastos, M. D. C. D. F. e Giambiagi-Demarval, M. (2016). Transfer of mupirocin resistance from *Staphylococcus haemolyticus* clinical strains to *Staphylococcus aureus* through conjugative and mobilizable plasmids. *FEMS Microbiol. Lett.* 363, fnw121.
- Rossi, C. C., Souza-Silva, T., Araújo-Alves, A. V. e Giambiagi-Demarval, M. (2017). CRISPR-Cas systems features and the gene-reservoir role of coagulase-negative *staphylococci*. *Front. Microbiol.* 8, 1-9.
- Russell, A. D. e Day, M. J. (1993). Antibacterial activity of chlorhexidine. *J. Hosp. Infect.* 25, 229–238.
- Saber, H., Jasni, A. S., Jamaluddin, T. Z. M. T. e Ibrahim, R. (2017). A review of *Staphylococcal* cassette chromosome *mec* (*SCCmec*) types in coagulase-negative *staphylococci* (CoNS) species. *MJMS.* 24, 7-18.
- Salgueiro, V. C., Seixas, M. D. A. L., Guimarães, L. C., de Carvalho Ferreira, D., da Cunha, D. C., Nouér, S. A. e Dos Santos, K. R. N. (2019). High rate of neonates colonized by methicillin-resistant *Staphylococcus* species in an Intensive Care Unit. *JIDC.* 13, 810-816.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. e Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 3v.

- Sánchez, P. J., Moallem, M., Cantey, J. B., Milton, A. e Michelow, I. C. (2016). Empiric therapy with vancomycin in the neonatal intensive care unit: let's " get smart" globally!. *J. Pediatr. (Rio J)*. 92, 432-435.
- Sangal, V., Girvan, E. K., Jadhav, S., Lawes, T., Robb, A., Vali, L., Edwards, G. F., Yua, J. e Gould, I. M. (2012). Impacts of a long-term programme of active surveillance and chlorhexidine baths on the clinical and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in an Intensive Care Unit in Scotland. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 40, 323–331.
- Santos, A. L. D., Santos, D. O., Freitas, C. C. D., Ferreira, B. L. A., Afonso, I. F., Rodrigues, C. R. e Castro, H. C. (2007). *Staphylococcus aureus*: visiting a strain of clinical importance. *J. Bras.Patol. Med. Lab*. 43, 413-423.
- Schindler, B. D. e Kaatz, G. W. (2016). Multidrug efflux pumps of Gram-positive bacteria. *Drug Resist. Update*. 27, 1–13.
- Schuenck, R. P., Pereira, E. M., Iorio, N. L. e Dos Santos, K. R. (2008). Multiplex PCR assay to identify methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *FEMS Immunol. Med. Mic.*, 52, 431-435.
- Shamsudin, M. N, Alreshidi, M. A., Hamat, R. A., Alshrari, A. S., Atshan, S. S., e Neela, V. (2012). High prevalence of *qacA/B* carriage among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Malaysia. *J. Hosp. Infect*. 81, 206–208.
- Siegel, J. D., Rhinehart, E., Jackson, M. e Chiarello, L. (2007). Management of multidrug-resistant organisms in health care settings, 2006. *Am. J. Infect. Control*. 35, 165-193.
- Silva, P. V., Cruz, R. S., Keim, L. S., Paula, G. R. D., Carvalho, B. T. F., Coelho, L. R., Carvalho, M. C. S., Rosa, J. M. C., Figueiredo, A. M. S. e Teixeira, L. A. (2013). The antimicrobial susceptibility, biofilm formation and genotypic profiles of *Staphylococcus haemolyticus* from bloodstream infections. *Mem. I. Oswaldo Cruz*. 108, 812-813.
- Silveira, R. H., Santos-Borowicz, C. H., Schwambach, K. H. e Hugo, B. O. C. K. (2020). Resistance to antimicrobials and vancomycin treatment in neonatal sepsis in a hospital in Brazil. *RBFHSS*. 11, 472-472.
- Smith, K., Gemmell, C. G. e Hunter, I. S. (2008). The association between biocide tolerance and the presence or absence of *qac* genes among hospital-acquired and community-acquired MRSA isolates. *JAC*. 61, 78-84.
- Smith, K. e Hunter, I. S. (2008). Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. *J. Med. Microbiol*. 57, 966–973.
- Spengler, G., Kincses, A., Gajdács, M. e Amaral, L. (2017). New Roads Leading to Old Destinations: Efflux Pumps as Targets to Reverse Multidrug Resistance in Bacteria. *Molecules*. 22, 468.
- Suhartono, S., Hayati, Z. e Mahmuda, M. (2019). Distribution of *Staphylococcus haemolyticus* as the most dominant species among *Staphylococcal* infections at the ZainoelAbidin Hospital in Aceh, Indonesia. *Biodiversitas*.20.2076-2080.
- Sun, J.; Deng, Z. e Yan, A. (2014) Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem.Biophys. Res. Commun*. 453, 254-267.
- Suwantarat, N., Carroll, K. C., Tekle, T., Ross, T., Maragakis, L. L., Cosgrove, S. E. e Milstone, A. M. (2014). High Prevalence of Reduced Chlorhexidine Susceptibility in Organisms Causing Central Line–Associated Bloodstream Infections. *Infect. Control Hosp. Epidemiol*. 35, 1183–1186.

- Szczuka, E., Krajewska, M., Lijewska, D., Bosacka, K. e Kaznowski, A. (2016). Diversity of *staphylococcal* cassette chromosome *mec* elements in nosocomial multiresistant *Staphylococcus haemolyticus* isolates J. Appl. Genetics. 57, 543-547.
- Szemraj, M., Grazul, M., Balcerczak, E. e Szewczyk, E. M. (2020). *Staphylococcal* species less frequently isolated from human clinical specimens-are they a threat for hospital patients?. BMC Infect. Dis. 20, 1-10.
- Taha, B. M., Hussein, N. H., Rasool, K. H., Maliki, S. A. J. e Hussein, J. D. (2019). Detection of *mecA* Gene in Methicillin-Resistant *Staphylococcus haemolyticus* isolated from Blood cultures of Neonates in Baghdad. Indian J. Public Health Res. Dev. 10, 634-637.
- Takeuchi, F., Watanabe, S., Baba, T., Yuzawa, H., Ito, T., Morimoto, Y., Kuroda, M., Cui, L., Takahashi, M., Ankai, A., Baba, S., Fukui, S., Lee, J.C. e Hiramatsu, K. (2005). Whole-genome sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* uncovers the extreme plasticity of Its genome and the evolution of human-colonizing *Staphylococcal* species. J. Bacteriol. 187, 7292-7308.
- Tang, B., Gong, T., Cui, Y., Wang, L., He, C., Lu, M., Chen, J., Jing, M., Zhang, A. e Li, Y. (2020). Characteristics of oral methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolated from dental plaque. Int. J. Oral Sci 12. 1-10.
- Trevisoli, L. E., Bail, L., Rodrigues, L. S., Conte, D., Palmeiro, J. K. e Dalla-Costa, L. M. (2018). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight: a promising alternative method of identifying the major coagulase-negative *Staphylococci* species. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 51, 85-87.
- Turner, N. A., Sharma-Kuinkel, B. K., Maskarinec, S. A., Eichenberger, E. M., Shah, P. P., Carugati, M., Holland, T.L. e Fowler, V. G. (2019). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. Nat. Rev. Microbiol., 17, 203-218.
- Urushibara, N., Aung, M. S., Kawaguchiya, M. e Kobayashi, N. (2020). Novel *staphylococcal* cassette chromosome *mec* (*SCC mec*) type XIV (5A) and a truncated *SCC mec* element in *SCC* composite islands carrying *speG* in ST5 MRSA in Japan. JAC, 75, 46-50.
- Van Belkum, A., Tassios, P. T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N. K., Fussing, V., Green, J., Feil, E., Gemmer-Smidt, P., Brisse, S. e Struelens, M. (2007). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. Clin. Microbiol. Infect. 13, 1-46.
- Vivoni, A. M., Diep, B. A., de Gouveia Magalhaes, A. C., Santos, K. R. N., Riley, L. W., Sensabaugh, G. F. e Moreira, B. M. (2006). Clonal composition of isolates at a Brazilian university hospital: identification of international circulating lineages. J. Clin. Microbiol. 44, 1686-1691.
- Walsh, P. S., Metzger, D. A. e Higuchi, R. (1991). *Chelex* 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques, 10, 506-513.
- Wang, Y., Jin, Y., Bai, Y., Song, Z., Chu, W., Zhao, M., Hao, Y. e Lu, Z. (2020). Rapid method for direct identification of positive blood cultures by MALDI-TOF MS. Exp. Ther. Med. 20: 235.
- Wassenaar, T., Ussery, D., Nielsen, L. e Ingmer, H. (2015). Review and phylogenetic analysis of *qac* genes that reduce susceptibility to quaternary ammonium compounds in *Staphylococcus* species. Eur. J. Microbiol. Immunol. 5, 44-61.
- Watkins, R. R. e Bonomo, R. A. (2017). β -Lactam Antibiotics. In Infectious Diseases. Elsevier.1203-1216.

- Webber, M. A. e Piddock, L. J. V. (2003). The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *JAC.* 51, 9-11.
- Weist, K., Cimbal, A. K., Lecke, C., Kampf, G., Rüden, H. e Vonberg, R. P. (2006). Evaluation of six agglutination tests for *Staphylococcus aureus* identification depending upon local prevalence of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). *J. Med. Microbiol.* 55, 283-290.
- Worthing, K. A., Marcus, A., Abraham, S., Trott, D. J. e Norris, J. M. (2018). *Qac* genes and biocide tolerance in clinical veterinary methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius*. *Vet. Microbiol.* 216, 153-158.
- Wu, D., Lu, R., Chen, Y., Qiu, J., Deng, C. e Tan, Q. (2016). Study of cross-resistance mediated by antibiotics, chlorhexidine and *Rhizomacoptidis* in *Staphylococcus aureus*. *JGAR.* 7, 61-66.
- Yu, M.-H., Chen, Y.-G., Yu, Y.-S., Chen, C.-L. e Li, L.-J. (2010). Antimicrobial resistance and molecular characterization of *Staphylococcus haemolyticus* in a Chinese hospital. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 29, 613–616.
- Zmantar, T., Kouidhi, B., Miladi, H. e Bakhrouf, A. (2011). Detection of macrolide and disinfectant resistance genes in clinical *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *staphylococci*. *BMC Res. Notes.* 4, 453.