

ANNA BEATRIZ B. VASCONCELOS

**ANÁLISE DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A
ANTIMICROBIANOS E DA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM
CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DE CIPROFLOXACINA
EM CEPAS DE *Staphylococcus saprophyticus* UROPATOGÊNICAS**



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, 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/2016**

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Marcia Giambiagi-deMarval e coorientação do doutorando MSc Wesley de Paiva Santos.

FICHA CATALOGRÁFICA**CIP - Catalogação na Publicação**

B328a Bomfim de Vasconcelos, Anna Beatriz
Análise do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e da formação de biofilme em concentrações subinibitórias de ciprofloxacina por cepas de *Staphylococcus saprophyticus* uropatogênicas / Anna Beatriz Bomfim de Vasconcelos. -- Rio de Janeiro, 2016.
71 f.

Orientadora: Marcia Giamgiabi de Marval.
Coorientador: Wesley de Paiva Santos.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2016.

1. *Staphylococcus saprophyticus*. 2. Resistência. 3. Antimicrobianos. 4. Concentrações subinibitórias. 5. Biofilme. I. Giamgiabi de Marval, Marcia , orient. II. de Paiva Santos, Wesley, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

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: **Anna Beatriz Bonfim de Vasconcelos**
 DRE: 113027452

BANCA EXAMINADORA: Profa. Renata Martins do Souto (Presidente)
 MSc. Raiane Cardoso Chamon
 Dra. Livia Helena Justo da Silva
 Profa. Raquel Regina Bonelli (Suplente)

Título da Monografia: **“Análise do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e da formação de biofilme em concentrações subinibitórias de ciprofloxacina por cepas de *Staphylococcus saprophyticus* uropatogênicas”**

Local: **Sala de Seminários do Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes /CCS/ UFRJ**

Data e hora de início: **19 de dezembro de 2016 às 13:00h**

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 pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, de de 2016.

NOTA

10,0

Banca Examinadora:

Renata Martins do Souto

Profa. Renata Martins do Souto

10,0

Raiane Cardoso Chamon

MSc. Raiane Cardoso Chamon

10,0

Livia Helena Justo da Silva

Dra. Livia Helena Justo da Silva

Profa. Raquel Regina Bonelli

Aluno:

Anna Beatriz Bonfim de Vasconcelos

Anna Beatriz Bonfim de Vasconcelos

Orientador:

Marcia Giambiagi-deMarval

Profa. Marcia Giambiagi-deMarval

Co-orientador:

Wesley de Paiva Santos

MSc. Wesley de Paiva Santos

Coordenador
de TCC

Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus por todas as graças concedidas ao longo dessa caminhada e em todos os momentos da minha vida.

À minha mãe Monica, por ter caminhado ao meu lado durante toda minha jornada até aqui, mesmo que em alguns momentos tenha sido à distância. Meu amor maior, meu equilíbrio, meu exemplo. É nela que eu me inspiro todos os dias, nela que eu me espelho na tentativa de ser uma pessoa melhor. Fez o papel de mãe, pai, amiga, companheira, conselheira e até vidente (principalmente nas horas que sabia que eu estava indo pelo caminho errado rs). A mulher mais guerreira que eu conheço, muitas vezes passou por dias difíceis para que o meu dia fosse melhor. Meu peito aperta de saudade cada vez que eu lembro que estamos tão longe uma da outra, mas foi necessário. Não tenho palavras pra agradecer o mundo que você me deu. Eu tenho certeza que o nosso amor vem de outras vidas.

À minha avó Aparecida, que ajudou na minha criação, agradeço pela dedicação, paciência, preocupação, por todos os sacrifícios feitos e pelo enorme carinho dado ao longo de toda a minha vida.

Aos meus avós Janito e Lusete, pelos grandiosos conselhos, pelas longas conversas na mesa de almoço que perduravam até o café da tarde (com direito a vários doces), pela casa concedida a mim e à minha mãe em Foz do Iguaçu, pela ajuda financeira durante a minha graduação e por todo o carinho.

À minha madrinha Ana Claudia, minha companheira, minha amiga que mesmo estando em outro país, sempre me ajudou e esteve presente em todos os momentos da minha vida, até nos mais difíceis, me dando força e ânimo para continuar em frente.

Ao meu tio/primo Matheus, por toda a nossa amizade desde a infância, pelas nossas risadas, pelas nossas férias juntos, pelo nosso companheirismo desde sempre.

À minha bisá Eli (*in memoriam*), minha dinda Janira e ao meu tio Alexandre, por todo carinho que têm por mim e por me acolherem nos meus momentos difíceis.

À minha orientadora Prof. Dra. Marcia Giambiagi de Marval, pela confiança depositada nesses anos, pelos ensinamentos, pelo carinho e ajuda oferecida nos momentos difíceis.

Ao meu co-orientador Wesley.

À todos os amigos dos laboratórios MM07 e BMM14, em especial à Amanda pelas hoooras de conversas e muitas risadas no MM07, sem você o laboratório fica sem vida. Pelos conselhos amorosos, profissionais (e sobre o Wesley também rs) e por toda ajuda que já me deu, que não foi pouca. À Suzanne pela imensa ajuda nos protocolos e por toda paciência comigo, me ensinou cada detalhe que sabe, pela sua risada gostosa que eu adoro, rs, pelo acolhimento na sua casa quando eu precisei. Melzinha, pelo senso de humor negro que eu AMO e por todas as brincadeiras. Ao Ciro por todos os almoços no bandeirão analisando as pessoas, ouvindo conversas alheias, procurando os gatos do CCS (e não achando), por todos os deboches em relação aos meus boys magias, até porque eu mereço mesmo rs. Ao Thiago cão, que me faz rir todos os dias, as vezes não entendo o que ele fala mas rio mesmo assim. À Lari, que apesar de não ser oficialmente do laboratório mais, nos visita sempre que pode e, mesmo não nos contando nada, eu ainda gosto muito rs. Ao meu amigo Wesley, que teve a árdua tarefa de ser meu co-orientador também. Eu só conheço duas pessoas que tiram o Wesley do sério, e são muito boas nisso, Mirela e eu. Eu tenho o dom de irritar o meu lindo co, quase todos os dias. Nós brigamos, gritamos, ficamos sem nos falar, mas no final a gente sempre se entende. Eu falava que éramos apenas amigos de laboratório, mas sou uma ingrata, ja aprendi que é totalmente ao contrário, nossa amizade vai além da faculdade. Esteve sempre presente de corpo e alma em todos os meus momentos bons e ruins, mesmo eu estando certa ou errada, na maioria das vezes errada. Um co-orientador que me explica a mesma coisa milhares de vezes e não consegue entender a minha memória de Dory, mas mesmo assim repete sempre que eu peço. Me ensina tudo nos mínimo detalhes, faz questão que meus trabalhos fiquem tão bons que até cogitou corrigir meus agradecimentos rs. Eu agradeço por todo companheirismo tanto profissional como pessoal. Amigos, vocês fizeram com que a minha iniciação científica no laboratório fosse a melhor possível.

À todos os amigos, professores e funcionários do IMPG, pela agradável convivência ao longo desses anos, pela dedicação, por estarem sempre dispostos a ajudar e por todo conhecimento transmitido. Em especial ao André que sempre se pôs à nossa disposição para ajudar com os problemas relacionados ao SIGA e burocracias da secretaria.

Ao Felipe Miceli e Marcinha pelas incontáveis vezes me ajudando com minhas plaquinhas de biofilme.

Aos amigos que eu fiz durante a vida, por estarem presentes em todos os momentos, por toda ajuda oferecida, por todas as brincadeiras, pelas risadas e pelo apoio ao longo desses anos.

Aos amigos da faculdade, em especial ao Sid, Fábio, Ana Gabi, Bomba, Jean, Helver, Dudu, Bruno, Gio, Dedê, Marina, Mirela, Vinnie, Crackinho, Hallana, Isa e Victor, cada um com sua particularidade, sem vocês a vida acadêmica seria muito mais difícil, mais chata, mais pesada. Os amigos são o meu alicerce, a família que eu escolhi.

E, por fim, ao CNPq, pela bolsa de iniciação científica a mim concedida e ao meu pai pelo auxílio financeiro e somente financeiro.

RESUMO

Anna Beatriz Bomfim de Vasconcelos

Análise do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e formação de biofilme em concentrações subinibitórias de ciprofloxacina em cepas de *Staphylococcus saprophyticus* uropatogênicas

Orientadora: Marcia Giambiagi de Marval

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 saprophyticus é um uropatógeno, pertencente à microbiota anfibiótica humana, que ocupa o segundo lugar como organismo causador de infecções do trato urinário (ITU) não-complicadas em mulheres. Devido à alta prevalência das ITU e dos tratamentos empíricos utilizados, há um uso excessivo de antimicrobianos que contribui para a seleção da resistência. Nesse contexto, o conhecimento atualizado dos padrões de susceptibilidade aos antimicrobianos é fundamental. Cabe ressaltar que as infecções urinárias recorrentes (ITUr) são, geralmente, tratadas com o uso, a longo prazo, de baixas doses de antimicrobianos. Essas concentrações subinibitórias, além de influenciarem na seleção da resistência, também estão relacionadas à alterações no comportamento celular, dentre as quais um aumento na formação de biofilme que, por sua vez, pode contribuir para o sucesso da infecção e dificultar o tratamento. Desta forma o presente estudo tem como objetivo determinar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos utilizados na prática clínica, verificar a presença do gene *mecA*, avaliar a formação de biofilme na presença e ausência de concentrações subinibitórias de ciprofloxacina, assim como analisar a presença de genes envolvidos na formação de biofilme em cepas de *S. saprophyticus*. Foram utilizadas 47 cepas clínicas de *S. saprophyticus*, obtidas de pacientes atendidos no Hospital Naval Marcílio Dias, identificadas através de PCR espécie-específica. Através do teste de difusão a partir de disco foi detectada a resistência a eritromicina (n=19), ampicilina (n=5), penicilina (n=4), tetraciclina (n=2), sulfazotrim (n=1) e cefoxitina (n=1). Para a cepa de *S. saprophyticus* que apresentou resistência à cefoxitina, foi detectada, através de PCR, a presença do gene *mecA*. A tipagem do *cassete cromossômico* estafilocócico *mec* (SCC*mec*) foi realizada através de PCR-multiplex. Após a eletroforese, foram identificados segmentos gênicos compatíveis com o SCC*mec* do tipo IIIB. As concentrações mínimas inibitórias (CMI) para o antimicrobiano ciprofloxacina foram determinadas através da técnica de microdiluição em caldo, conforme descrita pelo CLSI (2015). Entre as cepas testadas, todas foram consideradas sensíveis ao antimicrobiano (*breakpoint* ≤1), sendo 32 (68%) com CMI de 0,5 µg/ml e 15 (32%) com CMI de 1µg/ml. A análise da formação de biofilme em microplacas de poliestireno revelou que 26 cepas (55%) foram fortes produtoras, 6 (13%) produtoras moderadas e 15 (32%) apresentaram fraca produção de biofilme. Através de eletroforese foi

detectado a presença do gene *bap* em 36 (76,5%) cepas de *S. saprophyticus*. Dentre essas, 20 foram classificadas como fortes produtoras de biofilme, 4 como produtoras moderadas e 12 como fracas produtoras de biofilme. Não foi detectada a amplificação do gene *icaA* em nenhuma das cepas analisadas. A análise da formação de biofilme na presença de concentrações subinibitórias de ciprofloxacina, para 16 cepas de *S. saprophyticus*, revelou um relação cepa-dependente onde sete cepas apresentaram um aumento na formação de biofilme. Os resultados obtidos fornecem um melhor entendimento acerca das características de cepas de *S. saprophyticus* e dos efeitos de concentrações subinibitórias de antimicrobianos para essa espécie.

Palavras-chave: *Staphylococcus saprophyticus*, perfil de susceptibilidade, SCCmec, concentrações subinibitórias, biofilme.

ABSTRACT

Anna Beatriz Bomfim de Vasconcelos

Analysis of antimicrobial susceptibility profile and biofilm formation in subinhibitory concentrations of ciprofloxacin in strains of uropathogenic *Staphylococcus saprophyticus*

Orientadora: Marcia Giambiagi de Marval

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 saprophyticus is an uropathogen, belongs to the normal human microbiota, which ranks second as the causative organism of uncomplicated urinary tract infections (UTI) in women. Due to the high prevalence of UTI and empiric treatments there is an excessive use of antibiotics that contributes to the selection of resistant strains. In this context, the updated knowledge of the susceptibility patterns to antimicrobials is critical. It should be noted that the recurrent urinary tract infections (rUTI) are generally treated with the long-term of low doses of antimicrobials. These subinhibitory concentrations besides influencing the resistance selection are also related to changes in cell behavior, as found in biofilm formation, which can contribute to the success of the infection and interfere in the treatment. The present study aims to determine the susceptibility profile to antimicrobials used in clinical practice, verify the presence of the *mecA* gene, evaluate the biofilm formation in the presence and absence of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin, and to analyze the presence of genes involved in biofilm formation in clinical strains of *S. saprophyticus*. We used 47 clinical strains of *S. saprophyticus*, obtained from patients treated at the Naval Hospital Marcilio Dias, identified by species-specific PCR. In disk diffusion test it was detected resistance to erythromycin (n = 19), ampicillin (n = 5), penicillin (n = 4), tetracycline (n = 2), sulfazotrim (n = 1) and cefoxitin (n = 1). For the *S. saprophyticus* strain which showed resistance to cefoxitin, it was detected by PCR the presence of *mecA* gene. The typing of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) was performed by a multiplex PCR. By electrophoresis, it was identified gene segments compatible with the SCC*mec* type IIIB. The minimum inhibitory concentrations (CMI) for the antibiotic ciprofloxacin were determined by broth microdilution technique as described by CLSI (2015). Among the strains tested, all were considered sensitive to the antimicrobial (breakpoint ≤ 1), being 32 (68%) with CMI 0.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ and 15 (32%) with CMI 1 $\mu\text{g} / \text{ml}$. The analysis of the biofilm formation in microtiter microplates revealed that 26 (55%) strains were strong, 6 (13%) were moderate and 15 (32%) presented weak biofilm production. By electrophoresis the presence of the *bap* gene was detected in 36 (76.5%) strains of *S. saprophyticus*. Among these, 20 were classified as strong, four as moderate and 12 as weak biofilm producers. No amplification was detected for the *icaA* gene in any strain analyzed. The biofilm formation in the presence of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin in 16 strains of *S. saprophyticus* revealed a strain-dependent relationship in which seven strains showed an increased in biofilm formation.

The results obtained provide a better understanding of the characteristics of *S. saprophyticus* strains and the effects of subinhibitory concentrations of antimicrobials for this species.

Key-words: *Staphylococcus saprophyticus*, susceptibility profile, SCC*mec*, subinhibitory concentrations, biofilm.

LISTA DE FIGURAS		Página
Figura 1	Fases de desenvolvimento do biofilme estafilocócico (adaptado de Otto, 2012).	15
Figura 2	Detecção do gene <i>mecA</i> nas cepas clínica de <i>S. saprophyticus</i> . PM– Padrão de tamanho de DNA (“1Kb-DNA Plus Ladder”); 1 - <i>S. saprophyticus</i> MD9; 2 – Controle positivo da reação (<i>S. haemolyticus</i> MD2); 3 – Branco da reação ; CN – Controle negativo da reação (<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305); B – controle de contaminação da reação de PCR.	32
Figura 3	Detecção das sequências gênicas que codificam o tipo de SCC <i>mec</i> na cepa de <i>S. saprophyticus</i> . PM – Padrão de tamanho de DNA (“1Kb-DNA Plus Ladder”); 1 - <i>S. saprophyticus</i> MD9; 2 - Amostra controle com SCC <i>mec</i> tipo III (<i>S. aureus</i> 63a); CN – controle negativo (<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305); B – controle de contaminação da reação de PCR.	33
Figura 4	Representação da concentração mínima inibitória das 47 cepas testadas para o antimicrobiano ciprofloxacina.	33
Figura 5	Classificação das cepas de <i>S. saprophyticus</i> quanto à capacidade de produção de biofilme.	34
Figura 6	Detecção dos genes <i>bap</i> (A) e <i>icaA</i> (B) nas cepas de <i>S. saprophyticus</i> . PM: padrão de tamanho de DNA (100-pb DNA Ladder – Gibco/BioLabs); B – branco da reação de PCR. (A) CP- controle positivo (<i>S. aureus</i> V329); CN- controle negativo (<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228). (B) CP- controle positivo (<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984); CN- controle negativo (<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228).	35
Figura 7	Formação de biofilme em capas de <i>S. saprophyticus</i> na presença de concentrações subinibitórias de ciprofloxacina. Cada barra indica os valores médios \pm DP. Controle: sem adição de antimicrobiano. * Indica diferenças significativas entre a concentração testada e o controle. (A) cepa MD 13, (B) cepa MD 25, (C) cepa MD 31, (D) cepa MD 510S, (E) cepa MD 29 e (F) cepa MD 35S.	37

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Cepas de referência e controles utilizados nesse estudo.	22
Tabela 2 Sequência, tamanho do <i>amplicon</i> e tipo do <i>SCCmec</i> detectado na reação de PCR-multiplex. Adaptado segundo Milheiriço, Oliveira e de Lencastre, 2007.	27
Tabela 3 Parâmetros para classificação das estirpes quanto à produção de biofilme.	28
Tabela 4 Sequência e tamanho dos amplicons esperados na detecção dos genes <i>bap</i> e <i>icaA</i> por PCR.	29
Tabela 5 Perfil de resistência das cepas de <i>S. saprophyticus</i> .	31
Tabela 6 Cepas utilizadas para a análise da formação de biofilme na presença de concentrações subinibitórias de ciprofloxacina.	38

ÍNDICE

Páginas

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
1- INTRODUÇÃO	1
1.1 Gênero <i>Staphylococcus</i>	1
1.1.1 <i>Staphylococcus</i> coagulase-positivos	2
1.1.2 <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos	2
1.2 <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	3
1.2.1 <i>S. saprophyticus</i> e as ITU	5
1.2.1.1 Tratamento das ITU	7
1.2.2 Resistência a antimicrobianos em <i>S. saprophyticus</i>	11
1.3 Biofilme	13
1.3.1 Formação do biofilme	14
1.3.2 Biofilme em <i>Staphylococcus</i> spp.	15
1.4 Papel das concentrações subinibitórias de antimicrobianos nos mecanismos de virulência	17
JUSTIFICATIVA	20
2- OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3- MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Cepas utilizadas	22
3.2 Condições de cultivo e armazenamento das cepas	22
3.3 Análise da susceptibilidade aos antimicrobianos das cepas de <i>S. saprophyticus</i>	22
3.3.1 Teste de difusão a partir de disco	22
3.3.2 Determinação da concentração mínima inibitória	23
3.4 Metodologia para a detecção do gene <i>mecA</i> nas cepas clínicas de <i>S. saprophyticus</i>	24
3.4.1 Extração do DNA total com tiocianato de guanidina	24
3.4.2 PCR para detecção do gene <i>mecA</i>	25

3.4.3 Eletroforese de DNA em gel de agarose	25
3.5 PCR multiplex para tipagem do SCCmec de <i>S. saprophyticus</i>	26
3.6 Análise da formação de biofilme na presença e ausência de concentrações subinibitória de antimicrobianos	27
3.7 PCR para a detecção dos genes <i>bap</i> e <i>icaA</i>	29
3.8 Análise estatística	29
4- RESULTADOS	31
4.1 Análise da susceptibilidade aos antimicrobianos das cepas de <i>S. saprophyticus</i>	31
4.2 Detecção do gene <i>mecA</i> nas cepas de <i>S. saprophyticus</i>	32
4.3 Caracterização do tipo de SCCmec nas cepas de <i>S. saprophyticus</i>	32
4.4 Concentração mínima inibitória das cepas de <i>S. saprophyticus</i>	33
4.5 Avaliação da produção de biofilme em placa de microdiluição de poliestireno	34
4.6 Detecção dos genes <i>bap</i> e <i>icaA</i> através da PCR	34
4.7 Análise da formação de biofilme em concentrações subinibitórias de ciprofloxacina	36
5- DISCUSSÃO	40
6- CONCLUSÕES	46
4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1.1 Gênero *Staphylococcus*

Primeiramente descrito em 1878, o gênero *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae*, sendo caracterizado por apresentar morfologia esférica (cocos). São bactérias Gram-positivas que possuem de 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, podendo ocorrer sozinhas ou na forma de cachos irregulares. São imóveis, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, resistentes à 0,04 U de bacitracina e possuem baixo conteúdo G+C no genoma. Possuem a temperatura ótima de crescimento entre 30-37°C e são capazes de crescer em meios com até 10% de NaCl. Suas colônias são opacas, podendo ser de cor branca, creme ou amarelada (Kloos e Schleifer, 1986; Bannerman e Peacock, 2007). São capazes de produzir a enzima catalase, com exceção de *Staphylococcus aureus* subespécie *anaerobius* e *Staphylococcus saccharolyticus*. A presença ou ausência dessa enzima é amplamente utilizada na diferenciação das espécies de *Staphylococcus* (Lagos *et al.*, 2015).

Atualmente, esse gênero apresenta 50 espécies e 26 subespécies conforme a classificação mais recente da *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (LPSN, 2016)¹. De modo geral, essas espécies estão amplamente disseminadas no ambiente, podendo ser isoladas da pele e de membranas mucosas de alguns animais e humanos. Os membros desse gênero geralmente têm um relacionamento benigno ou simbiótico com o hospedeiro, porém podem se tornar patogênicos. Os fatores de risco para o desenvolvimento dessas infecções envolvem principalmente hospitalização, imunocomprometimento ou a realização de algum procedimento invasivo (Bennett e Brachman, 1998; Heikens *et al.*, 2005; Bannerman e Peacock, 2007). Assim, *Staphylococcus* sp. são os agentes de uma grande diversidade de doenças em animais e humanos, variando de infecções cutâneas, como impetigo, furúnculo e abscessos subcutâneos, a infecções sistêmicas, como a osteomielite (Iwatsuki *et al.*, 2006). Além disso, têm sido responsáveis pelo aumento das complicações médicas e pela emergência do número de infecções relacionadas a procedimentos médicos, incluindo uso de próteses articulares, cateteres e imunossupressores (Casey, Lambert e Elliott, 2007).

¹ O site da LPSN considera todas as espécies já descritas como *Staphylococcus*, inclusive aquelas que foram realocadas em outros gêneros em estudos posteriores.

As espécies de *Staphylococcus* podem ser divididas de acordo com sua capacidade de coagular o fibrinogênio do plasma em fibrina, através da enzima coagulase. Dessa forma, podemos dividir esse gênero em dois grandes grupos: *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN) ou *Staphylococcus* coagulase-positivos (SCP) (Kloos e Bannerman, 1999; Bannerman e Peacock, 2007).

1.1.1 *Staphylococcus* coagulase-positivos

Atualmente, oito espécies pertencentes ao grupo dos SCP foram identificadas: *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. delphini*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. lutrae*, *S. argenteus* e *S. schweitzeri* (LPSN, 2016; Tong *et al.*, 2015). Nesse grupo, *S. aureus* é a espécie de maior importância médica e considerada a mais patogênica, sendo capaz de produzir diversas toxinas que contribuem para a virulência, aumentando sua capacidade de invadir e danificar os tecidos do hospedeiro. O grande potencial de virulência de *S. aureus*, associado à sua presença na microbiota humana, colonizando a pele e mucosas, torna este microrganismo um importante patógeno envolvido em infecções nosocomiais e comunitárias. Desse modo, esta espécie é responsável por diversas enfermidades, provocando desde infecções superficiais, como foliculite e abscessos, até infecções sistêmicas (Santos *et al.*, 2007).

Entre as estirpes de *S. aureus*, aquelas que apresentam resistência à meticilina (MRSA – do inglês “methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*”), representam um dos maiores problemas na prática clínica, uma vez que, frequentemente, são resistentes a uma ampla variedade de antimicrobianos (Faria *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005). Assim, a disseminação de cepas MRSA em hospitais em todo mundo é um importante problema de saúde pública. Alguns países do continente europeu mantêm um número preocupante em relação à prevalência de cepas MRSA isoladas, atingindo taxas de, em 2014, 56% na Romênia, 47% em Portugal e 43% em Malta (ECDC, 2014).

1.1.2 *Staphylococcus* coagulase-negativos

A primeira descrição dos SCN foi feita em 1884 por Rodenbach relatando sobre *Staphylococcus albus*, uma espécie avirulenta (Piette e Verschraegen, 2008). De fato, até a década de 1970, os SCN não eram considerados microrganismos patogênicos (Mason *et al.*, 2001). Desde o começo da década de 1980, 34 espécies pertencentes ao grupo dos SCN

foram descritas, sendo 18 isoladas a partir de seres humanos (Becker, Heilmann e Peters, 2014). As principais espécies envolvidas em infecções humanas são: *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. saccharolyticus*, *S. saprophyticus* e *S. warneri* (Otto, 2008; Becker, Heilmann e Peters, 2014).

Atualmente os SCN vêm sendo reconhecidos por seu importante papel como agentes patogênicos e sua incidência crescente em infecções (Piette e Verschraegen, 2008). A colonização de várias partes do corpo do hospedeiro, como a pele e membranas mucosas, é crucial para as infecções endógenas causadas por esses microrganismos, uma vez que facilita o acesso a esses sítios. No entanto, eles são transmitidos principalmente por procedimentos relacionados à saúde, podendo estar entre os principais agentes causadores de Infecções Relacionada à Assistência à Saúde (IRAS), sendo considerados patógenos oportunistas importantes (Becker, Heilmann e Peters, 2014). Desse modo, as infecções causadas pelos SCN estão, geralmente, relacionadas com o acometimento de pacientes imunocomprometidos, com tratamentos hospitalares intensivos e com o uso de dispositivos invasivos, como as infecções relacionadas a cateter, endocardite de prótese valvar e de próteses articulares (Hirotaki *et al.*, 2011).

Dentre as espécies de SCN, *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* são reconhecidas como importantes patógenos e, frequentemente, estão relacionados às IRAS (Huebner e Goldmann, 1999; Elouennass *et al.*, 2008; Raz, Colodner e Kunin, 2005; Ben-ami *et al.*, 2003; Chiang *et al.*, 2012). No entanto, *S. saprophyticus* destaca-se pela sua prevalência em infecções comunitárias, sendo o segundo agente mais frequentemente encontrado em infecções do trato urinário (ITU), principalmente em mulheres entre 15 a 44 anos (Martineau *et al.*, 2000; Orden-Martínez, Martínez-ruiz e Millán-Pérez, 2008).

1.2 *Staphylococcus saprophyticus*

Em 1962, Torres Pereira (*apud* Raz, Colodner e Kunin, 2005) isolou a partir da urina, um grupo de microrganismos que compartilhavam várias características fenotípicas, incluindo resistência a novobiocina (5 µg/ml), com outros SCN. Postulou-se que esses SCN representavam um novo patógeno do trato urinário. O microrganismo encontrado foi associado ao subgrupo 3 de *Micrococcus* e, posteriormente, foi reclassificado como *S. saprophyticus*.

S. saprophyticus é um uropatógeno, anaeróbio facultativo, catalase-positivo, coagulase negativo que apresenta diâmetro compreendido entre 0,5 a 1µm. É capaz de produzir a enzima de urease e é resistente à novobiocina (Murray *et al.*, 2004). Pertencente à microbiota anfibiótica humana, esse microrganismo está presente em uma grande variedade de sítios na superfície do corpo (Raz, Colodner e Kunin, 2005), colonizando frequentemente a região periuretral e mucosas do trato geniturinário.

Em 2005 foi realizado o primeiro sequenciamento completo do genoma de *S. saprophyticus* ATCC 15305 por Kuroda e colaboradores. Através de análises genômicas comparativas com estirpes de *S. aureus* e *S. epidermidis* foi revelada a presença de 582 quadros de leitura aberta (*open read frames* - ORFs) específicas de *S. saprophyticus*, estando algumas delas envolvidas com fatores de virulência (Kuroda *et al.*, 2005).

Entre os fatores de virulência de *S. saprophyticus* inclui-se a adesão às células uroepiteliais e, nesse contexto, quatro principais proteínas de superfície foram caracterizadas: a proteína associada à superfície de *S. saprophyticus* (Ssp), (Gatermann *et al.*, 1992; Sakinç *et al.*, 2005); uma autolisina (Aas) (Hell *et al.*, 1998); o fator de uroadesão A (UafA) (Kuroda *et al.*, 2005); e uma proteína ligadora de colágeno (SdrI) (Sakinç *et al.*, 2006). Todas essas proteínas de superfície são, provavelmente, importantes para a fixação, e possivelmente internalização, de *S. saprophyticus* nas células do hospedeiro, podendo auxiliar na sua patogênese (Sakinç *et al.*, 2009). Além de proteínas de superfície, *S. saprophyticus* produz grande quantidade de urease. A presença abundante dessa enzima contribui para o crescimento persistente e invasivo dessa bactéria na bexiga, uma vez que essa espécie não é capaz de obter amônia por redução de nitrito a nitrato. Assim, essa enzima hidrolisa a ureia, liberando amônia, que poderá ser utilizada pelo microrganismo (Kuroda *et al.*, 2005). *S. saprophyticus* também dispõem de um importante sistema de transporte envolvido tanto no processo de osmotolerância quanto no transporte de íons inorgânicos. Esse sistema facilita à adaptação do microrganismo na urina, onde o pH, osmolaridade, concentração de ureia, íons inorgânicos e outras substâncias orgânicas são instáveis e variáveis (Kuroda *et al.*, 2005). Outros determinantes de virulência incluem a hidrofobicidade celular, produção de muco extracelular e de D-serina deaminase (King *et al.*, 2012). A D-serina é um aminoácido encontrado em altas concentrações na urina humana e é tóxico, nessas condições, para bactérias não-uropatogênicas, podendo levar a inibição da proliferação celular desses microrganismos. Desse modo, a adesão uroepitelial através de proteínas de superfície, um complexo sistema de transporte, a produção de

urease e de D-serina deaminase, por *S. saprophyticus*, são considerados fatores de virulência cruciais para a sua uropatogenicidade. Isso sugere que essa espécie possa ter passado por um processo de evolução para se adaptar ao ambiente urinário (Kuroda *et al.*, 2005).

1.2.1 *Staphylococcus saprophyticus* e as ITU

As ITU estão entre as doenças infecciosas mais comuns na prática clínica e, depois das infecções respiratórias, é a doença mais frequente em humanos, apresentando uma incidência global estimada em 250 milhões de casos por ano (Stapleton, 2014; Ronald *et al.*, 2001). Somente nos Estados Unidos, estima-se que as despesas com as ITU, incluindo os custos de saúde e o tempo de afastamento das atividades laborais, se aproximem dos US\$ 3,5 bilhões anuais (Flores-Meireles *et al.*, 2015). Apesar de não apresentarem significativa mortalidade, as ITU são caracterizadas por uma alta morbidade, principalmente em países de baixa e média renda, onde não há acesso adequado a tratamentos durante o curso da infecção. Desse modo, essas infecções são responsáveis por elevados encargos econômicos e de saúde pública (August e De Rosa, 2012). Nesse contexto, qualquer avanço no diagnóstico e tratamento desta enfermidade poderia ter um grande impacto econômico. A melhoria do processo de diagnóstico também poderia diminuir a morbidade dos pacientes acometidos pelas ITU (Mehnert-kay, 2005).

S. saprophyticus ocupa o segundo lugar como organismo causador de infecções do trato urinário (ITU) não-complicadas em mulheres jovens (Latham *et al.*, 1983; Becker e von Eiff, 2011). De fato, mais de 40% das mulheres sexualmente ativas, em algum momento da vida, podem vir a ser colonizadas por *S. saprophyticus* (Rupp, Soper e Archer, 1992). Esse microrganismo compartilha muitos aspectos clínicos das ITU causadas por *Escherichia coli*, mas possui características distintas na patogênese, distribuição geográfica e variação sazonal (Raz, Colodner e Kunin, 2005). Vale ressaltar que as complicações mais graves das ITU causadas por *S. saprophyticus* incluem, raramente, pielonefrite aguda, septicemia, nefrolitíase e endocardite. Essa espécie pode também causar uretrite, epididimite e prostatite (Raz, Colodner e Kunin, 2005). A grande maioria das infecções ocorre em mulheres sexualmente ativas, podendo também acometer homens de todas as idades. O microrganismo tem sido isolado ainda em crianças, homossexuais masculinos, e em homens idosos com cateteres urinários. Cabe ressaltar que há um padrão sazonal nas ITU por *S. saprophyticus*, onde a prevalência de colonização e infecção é mais frequente

no final do verão e no outono, padrão semelhante ao observado para doenças sexualmente transmissíveis (Kline *et al.*, 2010).

Por definição, a ITU é estabelecida quando há invasão de tecidos por meio da colonização bacteriana em qualquer parte do trato urinário, que engloba a região uretral até os rins (Saadeh e Mattoo, 2011). Algumas ITU são, por natureza, polimicrobianas podendo compreender mais de uma bactéria Gram-positiva. Essa origem polimicrobiana pode provocar equívocos no momento da detecção do microrganismo dominante no diagnóstico laboratorial de rotina. Desta forma, a ocorrência de *S. saprophyticus* nessas infecções pode ser subestimada. As infecções polimicrobianas são mais comuns entre idosos, pessoas com o sistema imunológico comprometido, diabéticos e portadores de câncer. Ainda são necessárias mais pesquisas acerca das possíveis consequências da infecção microbiana mista nas vias genitourinárias (Kline *et al.*, 2010; Kline e Lewis, 2016).

As ITU são, geralmente, classificadas quanto aos sítios de infecção: bexiga ou trato inferior (cistite), rim ou trato superior (pielonefrite) ou urina (bacteriúria) (Nerurkar, Solanky e Naik, 2012). A cistite é caracterizada por sintomas de disúria (dor e dificuldade ao urinar), estrangúria (eliminação lenta e dolorida da urina), frequência e urgência urinária, hematúria microscópica e dor suprapúbica. A pielonefrite constitui o quadro mais grave e é caracterizada pelos sintomas de cistite, além de febre, dor no flanco, náuseas e/ou vômito (Gesu e Marchetti, 2007).

Clinicamente, as ITU podem ser divididas em duas categorias: ITU complicadas e não-complicadas. As ITU não-complicadas são observadas em indivíduos saudáveis, que não apresentam anormalidades, por causas fisiológicas ou neurológicas, no trato urinário, não possuem nenhum dispositivo invasivo e em mulheres que não estejam grávidas. Por sua vez, as demais apresentações das ITU são consideradas complicadas (Foxman, 2010; Hooton, 2012). A susceptibilidade a aquisição das ITU é complexa, podendo envolver fatores biológicos, comportamentais e predisposição genética. Além disso, mulheres são mais propensas a adquirirem ITU do que os homens, fato que se deve a questões anatômicas, tais como uretra mais curta, favorecendo a fácil invasão por patógenos, e uma maior proximidade da vagina com o ânus. A uretra masculina, por sua vez, facilita a remoção das bactérias pela urina sendo este, talvez, o fator mais significativo de proteção contra a infecção (Dielubanza *et al.*, 2011). Além da anatomia, outros aspectos aumentam a ocorrência de ITU no sexo feminino, tais como: episódios prévios de cistite, atividades

sexuais frequentes ou recentes, o uso de géis espermicidas, infecção vaginal, diabetes e maus hábitos de higiene (Fihn, 2003; Hooton, 2012). Anualmente, cerca de 15% das mulheres sexualmente ativas desenvolverão essa infecção e até 60% de todas as mulheres apresentará pelo menos 1 caso de ITU em algum momento de suas vidas (Schaeffer *et al.*, 2001; Valiquette, 2001; Lindsay, 2005).

De fato, uma em cada três mulheres irá desenvolver uma ITU, exigindo tratamento com antibióticos, até os seus 24 anos e 50% apresentará pelo menos 1 caso de ITU durante a sua vida (Dielubanza *et al.*, 2011)

1.2.1.1 Tratamento das ITU

Os antimicrobianos utilizados no tratamento das ITU são, geralmente, capazes de atingir altas concentrações na urina, apresentando uma maior probabilidade de serem clinicamente efetivos. Esse aspecto é fundamental, especialmente, em casos de cistites não-complicadas, onde a bactéria estará mais presente na urina armazenada na bexiga do que no tecido adjacente (Drago *et al.*, 2001; Wagenlehner *et al.*, 2009). As fluoroquinolonas são antimicrobianos sintéticos, amplamente utilizadas no tratamento de ITU, que atuam em enzimas essenciais para a viabilidade bacteriana. Esse antimicrobiano inibe a atividade das subunidades “A” da DNA girase ou topoisomerase II, enzimas que atuam na divisão celular, sendo responsáveis pela divisão da cadeia de DNA. A inibição dessas enzimas faz com que as extremidades da molécula de DNA fiquem livres, acarretando em um síntese descontrolada de RNA mensageiro e proteínas, culminando na morte bacteriana (Reis *et al.*, 2016). As fluoroquinolonas possuem ótima absorção via oral e são rapidamente excretadas na urina em condições normais. (Rocha, Tuon e Johnson, 2011; Reis *et al.*, 2016). A ciprofloxacina é uma fluoroquinolona indicada para o tratamento de infecções complicadas e não complicadas causadas por microrganismos susceptíveis. Este antimicrobiano tem um amplo espectro de atividade e é utilizado para tratar infecções bacterianas em vários sítios anatómicos, tais como infecções do trato respiratório, otite média, sinusite, infecções oculares e sepse (Reis *et al.*, 2016). Além disso, é o antimicrobiano mais prescrito para ITU, possuindo fórmulas que podem ser administradas tanto por via oral como por via intravenosa. Além das fluoroquinolonas, outros antimicrobianos também são bastante recomendados, tais como trimetropim-sulfametrazol e ampicilina (Shao *et al.*, 2003; Flores-Meireles *et al.*, 2015).

Apesar da eficiência desses antimicrobianos, a resistência às fluoroquinolonas têm aumentado expressivamente desde a sua introdução para o tratamento de ITU. Um estudo realizado no Brasil por Santana e colaboradores (2012) evidenciaram que 10% das cepas de *E. coli* e 19% das cepas de *Klebsiella pneumoniae*, isoladas de amostras de urinas, eram resistentes à ciprofloxacina. Em outro estudo, também realizado no Brasil, D'addazio e Moraes (2015) observaram que 35% das cepas de *E. coli* eram resistente à ciprofloxacina. Em um trabalho mais recente, Reis e colaboradores (2016), no nordeste do Brasil, constataram uma baixa taxa de resistência à ciprofloxacina em *S. saprophyticus* em relação à outros uropatógenos como *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*.

Atualmente, o tratamento das ITU é a segunda razão mais comum para a prescrição de antimicrobianos, seguido de otite média. Essa terapia é escolhida empiricamente, antes que os resultados da cultura de urina ou do teste de susceptibilidade estejam disponíveis (Nerurkar, Solanky e Naik, 2012). A ausência dessas informações pode acarretar apenas na cura parcial da infecção por conta de um tratamento sub-ótimo (Drekonja e Johnson, 2008; Naber *et al.*, 2008; Hooton, 2012). Devido ao uso de antimicrobianos na prática clínica, a prevalência de uropatógenos resistentes a antimicrobianos tem aumentado em todo o mundo. No Brasil, até 2011, a população tinha livre acesso, sem necessidade de prescrição médica, aos antimicrobianos. Esse cenário conduziu ao uso indiscriminado dos antimicrobianos que acarretou no aumento da seleção de cepas resistentes na população brasileira (Cunha, Assunção e Medeiros, 2016). A distribuição e susceptibilidade de uropatógenos aos antibióticos variam regionalmente, por isso torna-se necessária a vigilância da resistência antimicrobiana em níveis locais, nacionais e internacionais para a utilização da terapia adequada em ambientes específicos (Farrel *et al.*, 2003; Nerurkar, Solanky e Naik, 2012).

Embora, geralmente consideradas como auto-limitantes e facilmente tratáveis com antimicrobianos, as ITU muitas vezes não são completamente curadas pela antibioticoterapia e frequentemente se repetem (Barber *et al.*, 2013). Apesar da administração de antibióticos aparentemente interromper a infecção, a probabilidade do paciente vir a desenvolver uma segunda ITU dentro de 6 meses é de 25%, com a possibilidade de recorrência de 46% no período de 1 ano (Bower, Eto e Mulvey, 2005). O episódio de infecção urinária recorrente (ITUr) pode ser recidivo, atribuído ao mesmo patógeno da primeira contaminação, a partir de qualquer reintrodução de um reservatório externo ou interno (como persistência no interior de células do hospedeiro) ou uma

reinfecção, se causada por uma espécie bacteriana diferente daquela isolada do primeiro episódio. Os estudos variam consideravelmente em relação à proporção de episódios de ITUr que representam uma infecção recidiva ou uma reinfecção (Ikaheimo *et al.*, 1996; Vosti, 2007). Foi descrito que o principal fator de risco para ITU recorrente em mulheres na fase pré-menopausa é a relação sexual, além de outros fatores, como o uso de espermicida e o fato do primeiro episódio de ITU ter ocorrido antes dos 15 anos de idade (Scholes *et al.*, 2000). Outro fator relacionado com a recorrência envolve o estabelecimento de reservatórios bacterianos intracelulares na mucosa da bexiga (Barber *et al.*, 2013). Apesar de ser considerada como uma condição benigna, as ITUr podem ter um impacto significativo na qualidade de vida e contribuem significativamente para os encargos financeiros relacionados as ITU (Dielubanza *et al.*, 2011).

As infecções recorrentes são, geralmente, tratadas profilaticamente pela antibioticoterapia através da utilização, a longo prazo, de baixas doses de antimicrobianos, dosagens pós-coito ou através do autotratamento, iniciado pelo paciente em um estágio inicial de cada episódio (Wagenlehner *et al.*, 2009). Em 1941, Helmholtz e colaboradores, pela primeira vez, recomendaram a administração, a longo prazo, de baixas doses de antimicrobianos para o tratamento de ITU “crônica”. No entanto, somente nos anos de 1970 a profilaxia antimicrobiana para ITUr foi descrita em ensaios clínicos controlados (Smellie *et al.*, 1964; Lohr *et al.*, 1977). Atualmente, já se sabe que, embora a profilaxia seja geralmente eficaz na redução dos sintomas durante sua aplicação, ela não diminui os riscos, a longo prazo, de recorrência e a taxa de infecção tende a voltar aos níveis de pré-tratamento uma vez que a profilaxia é interrompida (Nickel, 2005; Epp *et al.*, 2010; Hoberman *et al.*, 2014). Além disso, Conway e colaboradores (2007) revelaram que a terapia persistente de baixa dose aumentou o risco de desenvolvimento de ITUr resistentes aos antimicrobianos. Assim, a elevada frequência de ITUr, combinada com o constante aumento de estirpes resistentes aos antibióticos, destaca a necessidade de uma melhor compreensão destas infecções para orientar o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficientes (Barber *et al.*, 2013).

De fato, com a crescente preocupação com a difusão da resistência em todo mundo, muitas terapias alternativas para o tratamento de ITU vêm sendo desenvolvidas. Assim, uma abordagem integrada para prevenir a recorrência de ITU é almejada, visando melhorar a saúde e o bem-estar dos pacientes e diminuir a necessidade de doses repetidas de antimicrobianos ou outras intervenções clínicas (Hanson, *et al.*, 2016). Diversas terapias

promissoras estão em desenvolvimento, tendo como alvo as vias de virulência dos patógenos. Esses tratamentos antivirulência, teoricamente, permitiriam neutralizar ou desarmar a capacidade do microrganismo de causar a doença sem alterar a microbiota comensal. Seus alvos seriam vias cruciais na patogênese de ITU e não processos essenciais de crescimento e divisão celular, como o que ocorre no caso dos antimicrobianos (Flores-Meireles *et al.*, 2015).

O uso de antimicrobianos perturba a ecologia do microbioma humano, que, por sua vez, é crítico na manutenção da saúde e no desenvolvimento do indivíduo (Whiteside *et al.*, 2015). Assim, um microbioma disbiótico pode não desempenhar funções vitais como o fornecimento de nutrientes, produção de vitaminas e proteção contra patógenos. Os probióticos, referem-se a microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (Schlundt, 2001). Eles têm sido amplamente utilizados para restauração da microbiota, auxiliando no combate a diversas enfermidades (Drisko, Giles e Bischoff, 2003; Abad e Safda, 2009).

Existe uma ligação clara entre a microbiota vaginal e infecções urogenitais. Independente da higiene pessoal, a grande variedade de microrganismos que habitam a vagina origina-se do trato gastrointestinal. Diversos estudos evidenciaram que as microbiotas gastrointestinais e vaginais podem ser modificadas com a suplementação de probióticos para tratar e prevenir infecções genitourinárias (Donders, 1999; Reid, Dols e Miller 2009). A justificativa desses estudos parte do princípio que a restauração da microbiota normal leva ao retorno do estado onde há uma maior predominância de lactobacilos, condição encontrada na microbiota de mulheres saudáveis. Esse conceito pode ser empregado para a prevenção e tratamento de vaginose bacteriana e ITU. No caso das ITU, os patógenos emergem da área vaginal e ascendem para a bexiga, em alguns casos, formando uma constante fonte de reinfecção (Reid, Dols e Miller, 2009). Stapleton e colaboradores (2011) realizaram um estudo duplo-cego avaliando 100 mulheres jovens com histórico de ITUr. Foi observada uma redução no número de casos de ITUr em mulheres que receberam o tratamento com o probiótico (*Lactobacillus crispatus*) em relação àquelas tratadas com o placebo. Apesar das incertezas em relação aos efeitos dos probióticos, das estirpes apropriadas e dosagens eficazes, a profilaxia probiótica pode ser uma abordagem promissora para prevenir casos de ITU em uma era de aumento da resistência aos antimicrobianos (Reid e Bruce, 2001).

1.2.2 Resistência a antimicrobianos em *S. saprophyticus*

S. saprophyticus é sensível aos antibióticos comumente prescritos para o tratamento de ITU, excetuando-se o ácido nalidíxico e fosfomicina. No entanto, a vigilância constante e o conhecimento periódico e atualizado dos padrões de susceptibilidade aos antimicrobianos é fundamental. Como mencionado, essa informação ajuda na escolha de um tratamento empírico eficaz, otimiza os custos, evita o aparecimento de resistência e contribui, em última instância, no uso mais racional dos antibióticos (Orden-Martínez, Martínez-Ruiz e Millán-Pérez, 2008).

Um aspecto importante associado à resistência de *S. saprophyticus* é a presença de cepas resistentes à meticilina. A meticilina é um antimicrobiano betalactâmico que pertence ao grupo das penicilinas semi-sintéticas. Em *Staphylococcus*, a resistência a esse antimicrobiano foi atribuída à aquisição do gene *mecA*, um segmento de DNA de 2,1 Kb que codifica uma proteína de ligação à penicilina 2a (PBP2a), uma transferase que apresenta menor afinidade a antibióticos β -lactâmicos. Esta proteína confere um elevado padrão de resistência em *Staphylococcus*, provocando inibição de todos os antimicrobianos betalactâmicos (Dzidic *et al.*, 2007; Koneman, 2008).

O gene *mecA* está localizado em um elemento genético móvel, de 30-60kb, denominada cassete cromossômico estafilocócico *mec* (*staphylococcal cassette chromosome - SCCmec*), que pode conter também outros genes de resistência a antimicrobianos (Lowy, 2003; Zong, Peng e Lu, 2011). O cassete *SCCmec* carrega tanto o complexo gênico *mec* quanto o complexo gênico *ccr*. O complexo *mec* é composto pelo gene *mecA* e seus genes regulatórios, como os genes *mecI* e *mecRI*, que regulam a transcrição do *mecA*. Por sua vez, o complexo gênico *ccr* é composto por genes que codificam recombinases (*ccrA* e *ccrB*), que estão envolvidas na sua inserção e excisão no cromossomo (Hiramatsu *et al.*, 2002; IWG-SCC, 2016). Atualmente, são descritos 11 tipos de *SCCmec*, do I ao XI, classificados de acordo com o tipo do complexo *mec* e do complexo *ccr* (IWG-SCC, 2016). Os *SCCmec* tipos II, III, VI e VIII estão, normalmente, relacionados a amostras de origem hospitalar, enquanto amostras com o *SCCmec* dos tipos IV, V, VII, IX, X e XI apresentam origem comunitária (Katayama, Ito e Hiramatsu, 2001; Oliveira, Milheiriço e De Lencastre, 2007). Em 2016, um estudo em um hospital no sul do Brasil realizado por Oliveira e colaboradores demonstrou alta diversidade entre tipos de *SCCmec* em SCN na mesma instituição. Nesse estudo, foi observado uma mudança

drástica na prevalência dos tipos de SCC*mec*, dentro da população de SCN, com o passar dos anos.

A presença de cepas de *S. saprophyticus mecA*-positivas foi relatada pela primeira vez no Japão (Murakami *et al*, 1991) e, posteriormente, foram notificados casos no Canadá (Hussain *et al*, 2000), nos EUA (Swenson e Tenover, 2005) e no Brasil (Antunes *et al*, 2007). Em um estudo recente, Małyszko e colaboradores (2014) relataram a presença de um novo alótipo do gene *mecC* (gene homólogo ao *mecA*), designado *mecC2*, em uma cepa de *S. saprophyticus* resistente à meticilina.

Muitos estudos foram realizados a fim de verificar a correlação entre a detecção da resistência à oxacilina, através de testes de suscetibilidade por diferentes métodos, e a presença do gene *mecA*, detectada através de PCR. Esses estudos demonstraram que em muitas cepas de *S. saprophyticus*, consideradas resistentes através dos testes de disco difusão e diluição em ágar, não foi detectada a presença do gene *mecA*. Somente o teste de triagem em ágar Mueller-Hinton contendo 6 µg/mL de oxacilina demonstrou ter uma boa correlação com a presença ou ausência do *mecA* (York *et al*, 1996; Hussain *et al*, 2000; Ramotar, Woods e Toye, 2001; Ferreira *et al*, 2003).

Em 2006, o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) modificou a recomendação da realização de teste de disco-difusão, utilizando discos de 1 µg de oxacilina, para detectar a resistência à oxacilina mediada por *mecA* para os SCN, passando a recomendar o teste de disco-difusão com discos de 30 µg de cefoxitina. Higashide e colaboradores (2006), através da avaliação de 101 amostras de *S. saprophyticus* quanto à susceptibilidade à oxacilina (1 µg) e cefoxitina (30 µg), concluíram que este último método é uma alternativa adequada para a detecção da resistência mediada por *mecA*.

1.3 Biofilme

Os biofilmes são estruturas comunitárias formadas pela aglomeração multicelular de microrganismos, envoltos por uma matriz polimérica extracelular (EPS), que se forma sobre uma superfície biótica ou abiótica (Haaber *et al.*, 2012). A presença da matriz extracelular protege as células constituintes de agressões externas, dos mecanismos de defesa do hospedeiro, além de atuar como uma barreira de difusão de pequenas moléculas nos biofilmes (Kim *et al.*, 2008; Hall-Stoodley e Stoodley, 2009). No interior do biofilme,

a densidade celular bacteriana é elevada, aumentando a frequência de mutação, a troca horizontal de genes e induzindo o aumento do número de bactérias resistentes, que podem ser selecionadas sob pressão dos antimicrobianos (Lazar e Chifiriuc, 2010). O desenvolvimento de biofilme é uma adaptação de organismos procariotos e representa um modo de crescimento bacteriano que permite a sobrevivência desses microrganismos em ambientes hostis e a colonização de novos nichos através dos mecanismos de dispersão (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Hall-Stoodley e Stoodley, 2005; Purevdorj-Gage *et al.*, 2005; Mai-Prochnow *et al.*, 2008).

O biofilme pode se formar tanto em tecidos vivos quanto em materiais inertes. Há estimativas de que 65% das infecções bacterianas são causadas por células organizadas sob a forma de biofilmes (Smith *et al.*, 2008). Assim, os biofilmes podem causar problemas significativos na prática médica, sendo relacionados a diversos tipos de infecções, como: infecções persistentes e recorrentes; relacionadas a dispositivos médicos invasivos; em superfícies do corpo (pele, mucosas, pulmão, bexiga, coração, etc.); e infecções crônicas (Bjarnsholt, 2013). Cabe ressaltar que essas infecções são propensas a responderem fracamente à terapia com antibióticos convencionais (Pramodhini *et al.*, 2012). Desse modo, é comum que diversas doenças bacterianas envolvam a formação de biofilme, tendo em vista as vantagens que esse mecanismo proporciona para a sobrevivência dos microrganismos no hospedeiro (Costerton, Stewart e Greenberg, 1999).

A produção de biofilme também desempenha um importante papel para o sucesso da colonização pelos SCN (Morales *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2011). Nesse contexto, *S. epidermidis* é reconhecido como a maior causa de infecções associadas a biofilme em humanos (Hogan *et al.*, 2015). A alta eficiência dos SCN em produzir biofilmes é um dos principais determinantes de virulência em infecções relacionadas a implantes. Qualquer dispositivo médico introduzido em um paciente como válvulas cardíacas, cateteres venosos, cateteres urinários, tubos endotraqueais, lentes de contato, dispositivos intrauterinos e implantes ortopédicos pode servir como superfície para colonização (Brooks e Jefferson, 2012; Bjarnsholt, 2013; Hogan *et al.*, 2015). No entanto, infecções associadas a biofilmes estafilocócicos também ocorrem com frequência em tecidos do hospedeiro. Os exemplos incluem periodontite, endocardite, otite média, artrite aguda, infecções oculares, prostatite bacteriana aguda e rinosinusite crônica (Bjarnsholt, 2013).

1.3.1 Formação do biofilme

As estruturas do biofilme são altamente organizadas e a comunicação química entre as células, ou *quorum sensing*, permite que as bactérias coordenem suas atividades e se agrupem em comunidades (Cafiso *et al.*, 2010). Dentro destas comunidades, elas são capazes de compartilhar nutrientes e são protegidas de fatores ambientais prejudiciais às células, como os antibióticos, a dissecação e o sistema imune do hospedeiro (Anderson *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2014).

A formação da estrutura do biofilme tem sido bastante estudada e um dos modelos propostos sugere que ocorra através de um processo ordenado, que pode ser dividido em três etapas: adesão e colonização da superfície; maturação, onde ocorre a adesão intercelular com a proliferação e acumulação de células em multicamadas; e desprendimento do biofilme com liberação das células (Otto, 2012) (**Figura 1**). A adesão inicial pode ocorrer em superfícies bióticas ou abióticas como o plástico de um dispositivo médico, sendo dependente das características físico-químicas do dispositivo e da parede celular bacteriana e das interações eletrostáticas e hidrofóbicas. O grau de hidrofobicidade da superfície da célula microbiana e o da superfície do biomaterial correspondente são geralmente considerados de grande importância para a primeira ligação (Legeay, Poncin-Epaillard e Arciola, 2006). Nesta primeira fase, há o envolvimento de moléculas bacterianas de superfície específicas como autolisinas, ácidos teicóicos e MSCRAMMs (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* - componentes da superfície microbiana que reagem com a matriz adesiva das células) (Otto, 2012).

Durante a maturação, há a formação de EPS e a proliferação das bactérias, formando agregados por ação da aderência intercelular. Nesta etapa, há a participação de diferentes macromoléculas específicas, como adesinas polissacarídicas e certas proteínas indutoras de agregação (Becker, Heilmann e Peters, 2014). Durante a maturação as bactérias emitem sinais químicos capazes de realizar a “intercomunicação” entre as células. Por fim, há o desprendimento e a dispersão das células do biofilme pré-existente. A importância da fase de dispersão reside na propagação da infecção da superfície de um dispositivo médico, por exemplo, para outros sítios corporais via circulação sanguínea e linfática (Otto, 2012).

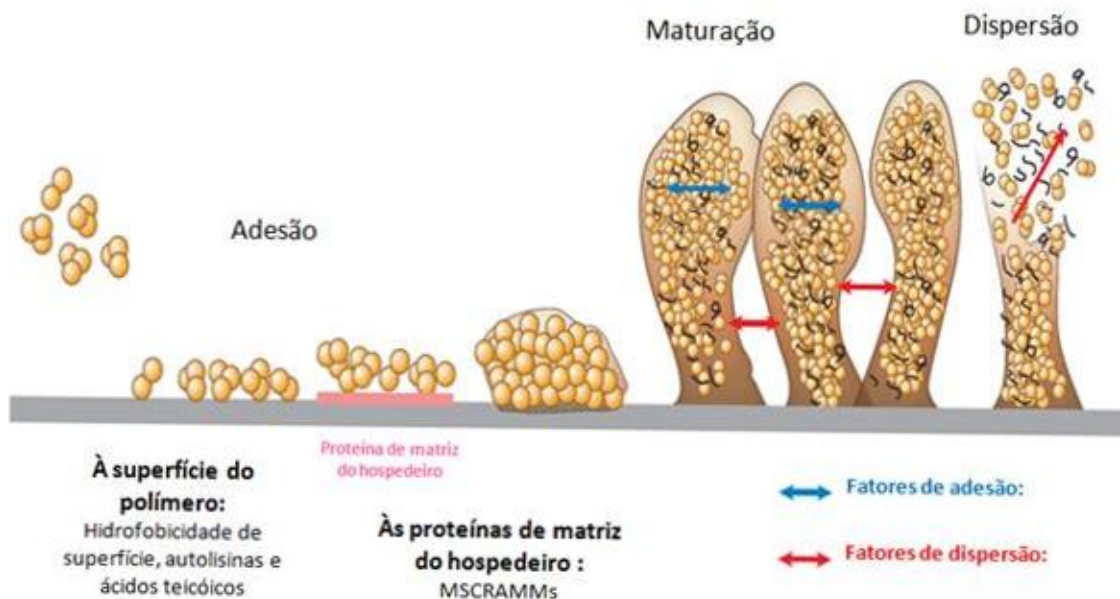


Figura 1: Fases de desenvolvimento do biofilme estafilocócico (adaptado de Otto, 2012).

1.3.2 Biofilme de *Staphylococcus* spp.

A base molecular e genética da formação do biofilme é multifatorial. Para as bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, o principal exopolissacarídeo associado ao biofilme e adesão intercelular é o PNAG (poli- β (1,6)-N-acetil-Dglicosamina), denominado PIA, (do inglês: *polysaccharide intercellular adhesion*) (Izano *et al.*, 2008) que, juntamente com os outros polímeros, como ácido teicóico e proteínas, formam a matriz extracelular do biofilme. A produção da PIA foi inicialmente descrita em *S. epidermidis* e posteriormente detectada em *S. aureus* (Rohde *et al.*, 2007). A biossíntese deste polissacarídeo é promovida pelos produtos do operon *icaADBC*. As proteínas IcaA e IcaD, codificadas pelos genes *icaA* e *icaD*, apresentam atividade de transferase (N-acetilglicosaminiltransferase), sendo responsáveis pela síntese de oligômeros de PNAG com menos de 20 resíduos; A proteína IcaC, codificada pelo gene *icaC*, é uma proteína de membrana responsável pelo transporte dos oligômeros sintetizados por IcaAD através da membrana celular. Além disso, IcaC está envolvida na formação de longos oligômeros de PIA/PNAG. A proteína IcaB, codificada pelo gene *icaB*, presente na superfície celular estafilocócica, é responsável pela reação final de deacetilação da molécula, conferindo assim carga positiva ao PIA (Cue, Lei e Lee, 2012). O caráter catiônico do PIA parece ser essencial para sua ligação à superfície bacteriana, carregada negativamente devido à

presença dos ácidos teicóicos (Vuong *et al.*, 2004; Sadovskaya *et al.*, 2005). Além dessas proteínas, o locus *ica* possui o regulador *icaR*, que é transcrito no sentido oposto, e modula diretamente a expressão do operon *icaADBC* (Cue, Lei e Lee, 2012). Embora os sinais de controle da produção de PIA/PNAG *in vivo* não sejam bem estabelecidos, sabe-se que diferentes condições ambientais afetam sua produção *in vitro*, como: anaerobiose, altas temperaturas, alta osmolaridade, glicose, etanol e outros antissépticos e concentrações subinibitórias de antimicrobianos (Nuryastuti *et al.*, 2011).

A matriz extracelular do biofilme também abriga outras proteínas que parecem estar envolvidas na formação dessa estrutura, uma delas é a proteína associada ao biofilme (Bap - *Biofilm-Associated Protein*), que encontra-se ancorada na parede celular de *Staphylococcus* (Cue, Lei e Lee, 2012; Cucarella *et al.*, 2001). Essa proteína é importante tanto para a aderência inicial quanto para a acumulação do biofilme. Estudos também constataram que quando o gene *bap* é expresso, ocorre a formação de biofilme mesmo na ausência do operon *icaADBC*. Em cepas de *S. epidermidis* de origem humana, foi encontrado um homólogo de *bap*, denominado *bhp*. Devido à grande similaridade nas sequências, foi sugerido que este gene estaria envolvido na produção de biofilme em cepas de *S. epidermidis*. O gene *bhp* codifica a proteína Bhp, de 284,4 kDa, que atua na formação e na acumulação do biofilme, na ausência do PIA, semelhante ao que ocorre com Bap em cepas isoladas de animais (Antunes *et al.*, 2011).

Como mencionado, a produção do biofilme é multifatorial e outras proteínas também estão envolvidas na formação dessa estrutura. Nesse caso, as proteínas adesivas presentes na superfície bacteriana (como as proteínas da família MSCRAMMs) parecem realizar um papel essencial (Kaplan *et al.*, 2012). Além disso, outras moléculas desempenham a mesma função independentemente do operon *ica*, como proteínas associadas à acumulação (Aap - *accumulation-associated protein*) (Rohde *et al.*, 2005; Tormo *et al.*, 2005; Conrady *et al.*, 2008), proteína de ligação à matriz extracelular (Embp - *extracellular matrix binding protein*) (Christner *et al.*, 2010), proteína A (Merino *et al.*, 2009), proteínas de ligação ao fibrinogênio (FnbpA e FnbpB - *fibrinogen-binding proteins*) (O'Neill *et al.*, 2008), proteína G de superfície de *S. aureus* (SasG - *S. aureus* surface protein G) (Geoghegan *et al.*, 2010), entre outras.

Além da presença de polissacarídeos e proteínas, biofilmes de *S. aureus* também podem apresentar uma matriz composta por e-DNA (DNA extracelular) cujas funções são

assegurar a estabilidade e a integridade da estrutura (López, Vlamakis e Kolter, 2010). Como a molécula de DNA apresenta carga negativa, ela tem capacidade de se ligar a outras moléculas, incluindo moléculas de PIA. Acredita-se que este e-DNA seja obtido a partir da lise celular com liberação do DNA genômico (Rice *et al.*, 2007).

1.4 Papel das concentrações subinibitorias de antimicrobianos nos mecanismos de virulência

A utilização de concentrações subinibitórias de antimicrobianos (sub-CMI) é um aspecto importante a ser considerado no tratamento das ITU. Uma vez que existem casos em que as concentrações antimicrobianas em um paciente podem estar presentes em níveis subinibitórios, é importante compreender as consequências para as cepas bacterianas que colonizam indivíduos sob tais circunstâncias (Erdeljan *et al.*, 2012). Primeiramente, embora a seleção de resistência aos antimicrobianos seja estudada principalmente em concentrações acima da CMI, é evidente que as estirpes resistentes são expostas e selecionadas por um amplo gradiente de concentrações, incluindo aqueles muito menores que a CMI. Assim, é provável que níveis sub-CMI de antimicrobianos tenham significativa influência sobre a evolução da resistência. No entanto, ainda não foram determinadas as condições específicas, nas quais os efeitos sub-CMI são mais importantes, e como as taxas e os mecanismos de seleção diferem daqueles encontrados durante a utilização de concentrações letais (maiores que a CMI) de antimicrobianos (Andersson e Hughes, 2014).

Cabe ainda ressaltar que, em determinados sítios do corpo, como o intestino e tecidos moles, as concentrações de antimicrobianos podem, no máximo, atingir níveis subinibitórios, expondo o agente patogênico e membros da microbiota a estas concentrações, e selecionando, entre esses, microrganismos resistentes (Andersson e Hughes, 2014). Essas cepas resistentes podem causar uma nova infecção no mesmo paciente. Essa consideração torna-se cada vez mais importante para a seleção de antimicrobianos, especialmente em infecções muito frequentes e com baixo potencial de complicações graves, como a cistite simples (Wagenlehner, Weidner e Naber, 2009).

Além da influência na seleção de resistência, as baixas doses de antimicrobianos podem alterar o comportamento celular em dois níveis diferentes: gerando variabilidade genética e fenotípica e atuando como moléculas de sinalização entre células de uma mesma

espécie ou de espécies diferentes. Análises transcricionais sugerem que níveis sub-CMI de antimicrobianos induzem a expressão diferenciada de 5 a 10% do genoma, modulando atividades de resposta ao estresse e sistemas específicos de sinalização (Davies, Spiegelman e Yim, 2006; Goh *et al.*, 2002; Hoffman *et al.*, 2005; Kelley, 2006). Tal sinalização possui diversas consequências funcionais, incluindo a modulação da expressão gênica, *quorum sensing*, virulência bacteriana e formação de biofilme (Andersson e Hughes, 2014).

De fato, a modulação da formação do biofilme por concentrações subinibitórias de antimicrobianos já foi observada em diversos patógenos, incluindo espécies do gênero *Staphylococcus*. Rachid e colaboradores (2000) evidenciaram que concentrações subinibitórias de tetraciclina e estreptogramina, aumentaram a formação de biofilme, assim como a expressão do gene *ica*, em cepas de *S. epidermidis*. No entanto, outros antimicrobianos, dentre os quais clorafenicol, clindamicina, gentamicina, ofloxacina e vancomicina, não tiveram efeitos sobre a expressão desse gene. De maneira semelhante, Wang e colaboradores (2010) constataram um aumento na formação de biofilme em cepas de *S. epidermidis icaADBC*-positivas ou negativas, quando expostas a concentrações subinibitórias dos macrolídeos eritromicina, azitromicina e claritromicina.

No entanto, poucos estudos avaliaram como o biofilme produzido por cepas de *S. saprophyticus* reagem às condições subinibitórias de antimicrobianos. Goneau e colaboradores (2015) evidenciaram que concentrações subinibitórias de ciprofloxacina, ampicilina e gentamicina resultaram no aumento da formação do biofilme pela cepa de *S. saprophyticus* ATCC 15305. Em outro estudo, Erdeljan e colaboradores (2012) demonstraram que a exposição a uma concentração sub-CMI de ciprofloxacina aumentou a adesão de *S. saprophyticus* em superfícies bióticas e abióticas, incluindo dispositivos urinários (*stent* ureteral) e em culturas de células de bexiga (células T24). Essas alterações fenotípicas podem aumentar a eficiência da colonização por *S. saprophyticus* no trato urinário e aumentar a capacidade desse microrganismo em causar ITU. Além disso, o aumento da adesão a um *stent* ureteral, inserido em um trato urinário colonizado por *S. saprophyticus*, pode promover a formação do biofilme e subsequente colonização do dispositivo.

A influência de concentrações subinibitórias em outros mecanismos de virulência também foi evidenciada no estudo de Goneau e colaboradores (2015). Foi observado que

os antimicrobianos testados aumentaram a colonização de *E. coli* e *S. saprophyticus* na bexiga e rins de camundongos. Além disso, camundongos tratados previamente com concentrações subinibitórias de ciprofloxacina, foram mais susceptíveis a infecções mais graves e recorrentes. Por fim, o tratamento com doses subinibitórias desse antimicrobiano, em camundongos cronicamente infectados, resultou em um aumento da infecção. Foi sugerido que parte dessas mudanças se deve à supressão da imunidade de mucosa, como demonstrado através da diminuição da secreção de mediadores pró-inflamatórios e na redução de células do sistema imune no trato urinário. Esses dados indicam que é fundamental considerar os impactos da utilização da terapia antimicrobiana com doses subinibitórias ao projetar estratégias de tratamento de ITUr, avaliando se as vantagens de tais tratamentos superam os riscos da seleção da resistência e do potencial aumento da virulência.

Por fim, outros estudos também evidenciaram a influência das concentrações subinibitórias na indução da resposta SOS (conjunto de genes co-regulados que são induzidos em resposta ao dano no DNA) que, em consequência, pode conduzir a alterações genéticas associadas com a mobilidade de elementos genéticos. Assim, em última instância, essas concentrações subinibitórias também estariam envolvidas no aumento da recombinação e da transferência horizontal de genes (Andersson e Hughes, 2014).

Justificativa

A espécie de interesse em nossos estudos, *Staphylococcus saprophyticus*, é o segundo organismo causador de uma das infecções que mais atingem a população humana, as infecções no trato urinário. Apesar da baixa taxa de resistência observada em cepas de *S. saprophyticus*, é fundamental a constante vigilância e o conhecimento atualizado dos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos. Além disso, a capacidade de espécies de SCN atuarem como reservatórios de genes de resistência, como o gene *mecA*, torna importante o monitoramento desses microrganismos. Uma vez que as ITU são tratadas empiricamente, essas informações permitirão uma terapia mais eficaz e um uso mais racional dos antimicrobianos.

Além disso, diversos estudos em diferentes microrganismos, incluindo uropatógenos e espécies de *Staphylococcus*, têm demonstrado a influência de concentrações subinibitórias de antimicrobianos sobre diversos mecanismos celulares, incluindo a formação de biofilme. No entanto, poucos trabalhos foram realizados em cepas clínicas de *S. saprophyticus* e ainda não é completamente elucidado se os benefícios do tratamento com concentrações subinibitórias sobrepõem-se aos prejuízos que estes podem acarretar. Assim, acreditamos que os resultados obtidos nesse estudo fornecem elementos para um melhor entendimento acerca das características das cepas dessa espécie e como essas se comportam frente as condições aqui propostas.

Objetivos

2.1 Objetivo geral:

O presente estudo tem como objetivo determinar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, verificar a presença do gene *mecA*, avaliar a formação de biofilme na presença e ausência de concentrações subinibitórias de ciprofloxacina, assim como analisar os genes envolvidos na formação de biofilme em cepas de *S. saprophyticus*.

2.2 Objetivos específicos e estratégia experimental:

- 1 Determinar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, através da técnica de difusão em disco;
- 2 Verificar, através da técnica de PCR, a presença do gene *mecA* nas cepas uropatogênicas de *S. saprophyticus*;
- 3 Caracterizar, através de PCR-multiplex, o tipo de SCC*mec* presente nas cepas *mecA* positivas;
- 4 Determinar a concentração mínima inibitória através da técnica de microdiluição em caldo;
- 5 Avaliar a formação de biofilme na presença e na ausência de concentrações subinibitória de ciprofloxacina;
- 6 Analisar a presença, através da técnica de PCR, dos genes *ica* e *bap*, envolvidos na formação de biofilme.

Material e Métodos

3.1 Cepas utilizadas

Foram utilizadas 47 cepas clínicas da espécie *S. saprophyticus*, pertencentes a coleção do nosso laboratório, isoladas de infecções urinárias de pacientes atendidos no Hospital Naval Marcílio Dias. As cepas isoladas foram previamente identificadas pelo sistema automatizado MicroScanWalkAway (DADE-BEHRING, USA) e tiveram a identificação confirmada através de PCR espécie-específico realizado em nosso laboratório (de Paiva-Santos *et al.*, 2016). As diferentes cepas de referência e os controles utilizados nesse estudo estão listadas na **tabela 1**:

Tabela 1: Cepas de referência e controles utilizados nesse estudo.

Espécie	Cepa	Característica	Referência
<i>S. aureus</i>	1290a	Amostra clínica; controle CMI	-
<i>S. aureus</i>	ATCC 29213	Amostra tipo; controle CMI	CLSI 2015
<i>S. aureus</i>	63a	Amostra clínica com SCCmec III	Vivoni <i>et al.</i> , 2006
<i>S. aureus</i>	V329	Amostra clínica; <i>bap</i> ⁺	CLSI 2015
<i>S. epidermidis</i>	35984	Amostra clínica, <i>icaA</i> ⁺	-
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 12228	Amostra tipo, <i>bap</i> ⁻ ; <i>icaA</i> ⁻	-
<i>S. haemolyticus</i>	MD2	Amostra clínica; <i>mecA</i> ⁺	-
<i>S. saprophyticus</i>	ATCC 15305	Amostra tipo	-

ATCC: American Type Culture Collection

3.2 Condições de cultivo e armazenamento das cepas

Cada cepa de *Staphylococcus saprophyticus* foi cultivada em BHI (*Brain Heart Infusion* – DIFCO) acrescido de 1,5% (p/v) de ágar a 37°C por 24h. Após o crescimento, as cepas foram estocadas em meio com 30 % de glicerol a uma temperatura de -20°C.

3.3 Análise da susceptibilidade aos antimicrobianos das cepas de *S. saprophyticus*

3.3.1 Teste de difusão a partir de disco

O perfil de resistência a antimicrobianos foi analisado através do teste de difusão em ágar frente aos seguintes antimicrobianos (SENSIFAR): ampicilina (10µg), cefoxitina (30µg), ciprofloxacina (5µg), clindamicina (2µg), cloranfenicol (30µg), eritromicina (15µg), gentamicina (10µg), penicilina G (10UI), rifampicina (5µg), sulfazotrim (25µg) e tetraciclina (30µg).

As cepas foram inicialmente inoculadas em placa de agar BHI por 18-24 horas a 37°C. O crescimento microbiano foi diluído em 3mL de salina estéril até atingir o grau de turvação 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente 10^8 UFC/mL). Feito isso, a suspensão bacteriana foi inoculada em placas de Mueller Hinton de forma confluyente com o auxílio de um *swab*. Então, os discos de antibióticos foram colocados sobre a placa semeada e a leitura dos halos de inibição foi feita após uma incubação de 18-24 horas a 37°C. A interpretação foi realizada de acordo com CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2015).

3.3.2 Determinação da concentração mínima inibitória de ciprofloxacina

A concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada através da microdiluição em caldo, conforme descrito pelo CLSI (2015). O antimicrobiano selecionado foi a ciprofloxacina (SIGMA-ALDRICH). As diluições do antimicrobiano foram feitas em caldo Müeller-Hinton (DIFCO) com concentrações entre 0,125 a 16 µg/mL. Dentro de cada poço da placa de microdiluição de 96 poços (TECHNO PLASTIC PRODUCTS AG) foram adicionados 200 µL do meio contendo o antimicrobiano diluído. Para o preparo do inóculo bacteriano foram utilizadas cepas isoladas, crescidas em ágar-BHI (DIFCO), após o crescimento a 37° C durante 18 h. Quantidade suficiente do crescimento bacteriano foi utilizado na preparação de uma suspensão correspondente a 0,5 da escala de McFarland e esta foi posteriormente diluída na proporção 1:10 em salina estéril [cloreto de sódio 0,85% (p/v) - MERCK]. Só então, 10 µL da suspensão bacteriana foram adicionados nos poços contendo os antibióticos. Em seguida, foi incubado a 37° C por 24 h. Após o tempo de incubação, a leitura foi realizada visualmente, onde a CMI correspondeu à primeira diluição na qual não foi observada turvação ou a formação de um “botão”. As cepas com *breakpoint* ≤ 1 foram consideradas sensíveis ao antimicrobiano.

3.4 Metodologia para a detecção do gene *mecA* nas cepas clínicas de *S. saprothyticus*

3.4.1 Extração do DNA total com tiocianato de guanidina

Foi utilizada a técnica descrita por Aires de Souza e colaboradores (1996). As cepas foram previamente inoculadas em tubos contendo caldo BHI a 37°C por 24h. A seguir, 1,5mL desse cultivo foram transferidos para um microtubo e a suspensão bacteriana foi centrifugada a 8000xg por 5 minutos tendo seu sobrenadante desprezado. As células foram lavadas com 1,5ml de TE (10mM de Tris, 1 mM EDTA, pH7,8) e suspensas em 100µl de solução de lise (1mL de TE 1X, 50mg de lisozima, 50µl de BRIJ a 0,5%) contendo 5µl de solução de RNase (10mg/mL) e 2µl de lisostafina (1mg/ml – SIGMA-ALDRICH). Em seguida, foram incubadas a 37°C por 1 hora em banho-maria.

Depois da incubação, foi adicionado 500µl de solução de tiocianato de guanidina (5M – PROMEGA). Os microtubos foram agitados manualmente e, posteriormente, incubados a temperatura ambiente por 7 minutos, sendo depois resfriadas no gelo por 10 minutos. A seguir foram adicionados 250µl de acetato de amônio (7,5M – REAGEN) e os microtubos foram invertidos várias vezes e incubados em gelo por 10 minutos. A essa solução foram adicionados 500µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 – MERCK) e homogeneizado até formar uma única fase. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados a 13000xg por 12 minutos e o sobrenadante de fase aquosa, cerca de 800µl, foi transferido para outro microtubo. Após a transferência, foram adicionados 0,54 volumes de isopropanol (MERCK) gelado para precipitar o DNA. A solução foi invertida gentilmente várias vezes até a visualização de um precipitado fibroso branco e, em seguida, foi feita uma centrifugação a 13000xg por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. O precipitado de DNA foi lavado com 500µl de etanol (70% - MERCK) para retirar possíveis sais e então, centrifugado a 13000xg por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento dissolvido em 50µl de água de vacina e estocado a -20 °C.

3.4.2 PCR para detecção do gene *mecA*

A detecção do gene *mecA* foi realizada para a cepa que apresentou resistência à cefoxitina (MD9) através do teste de difusão em disco. Para essa reação foram utilizados iniciadores capazes de amplificar um fragmento do gene *mecA* (154 pb). As reações de PCR foram feitas utilizando o termociclador T100TM *Thermal 33 Cyclor* - BIO-RAD. A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25µL, contendo aproximadamente 50ng de DNA, tampão 10x da enzima (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,4 - BIOTOOLS), 200 µM de cada dNTP (BIOTOOLS), 1,5mM de MgCl₂, 0,5U de *Taq* DNA-polimerase (BIOTOOLS) e 20pmol de cada um dos iniciadores MRS1 e MRS2 descritos por Del Vecchio e colaboradores (1995) (**tabela 2**). A reação foi submetida a uma etapa inicial de aquecimento a 94°C por 3 minutos, seguida por 30 ciclos de amplificação de 94°C por 1 minuto (desnaturação), 55°C por 1 minuto (anelamento) e 72°C por 1 minuto (extensão), e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Após o fim da reação de PCR, os produtos gerados foram estocados a -20°C e a análise da amplificação foi realizada através de eletroforese em gel de agarose. Foram utilizados como controles positivo e negativo da reação *S. haemolyticus* e *S. saprophyticus* ATCC 15305, respectivamente.

3.4.3 Eletroforese de DNA em gel de agarose

O gel de agarose 1,5% (p/v) foi preparado em tampão TBE 0,5X (Tris 89mM – PROMEGA; ácido bórico 89mM – PROMEGA; EDTA 2mM – REAGEN; pH 8,2). Aos produtos da PCR foram adicionados 1/5 do volume de tampão de amostra [sacarose 60% (p/v) - CAQ - CASA DA QUÍMICA IND E COM. LTDA; EDTA 10mM – REAGEN; azul de bromofenol 0,2% (p/v) - BIO-RAD], e estas foram submetidas à eletroforese em cuba horizontal (*Wide Mini-Sub Cell GT* – BIO-RAD) a 80V em tampão TBE 0,5X. No gel foi colocado o padrão de tamanho molecular 1kb *DNA Ladder* (INVITROGEN). Após o término da eletroforese, o gel foi corado com uma solução de brometo de etídio na concentração final de 0,5% µg/ml, durante 30 minutos. Posteriormente, o gel foi observado com auxílio de transiluminador de luz ultravioleta e as imagens documentadas pelo sistema de fotodocumentação *Doc-PrintII* (VILBER LOURMAT). As análises das imagens foram realizadas com o auxílio do software *Photo-Capt* (VILBER LOURMAT).

3.5 PCR multiplex para tipagem do SCCmec de *S. saprophyticus*

A determinação do tipo de SCCmec foi realizada conforme descrito por Milheiriço, Oliveira e De Lencastre (2007). Para as amostras que apresentarem amplificação para o gene *mecA* (item 3.4.2) foi realizado uma caracterização com objetivo de determinar o tipo de SCCmec que as amostras possuíam. Essa caracterização foi feita a partir da reação de PCR multiplex, a qual consiste na amplificação de fragmentos de regiões específicas de cada tipo de SCCmec. Na tabela 2 estão descritas as sequências dos oligonucleotídeos utilizados, o tamanho dos produtos gerados e a especificidade para cada tipo de SCCmec. Como controle interno da reação, foi utilizado o par de iniciadores MRS1 e MRS2, responsável pela amplificação do gene *mecA* (Del Vecchio *et al.*, 1995). A amplificação dos fragmentos foi realizada no termociclador T100TM *Thermal Cycler* (BIO-RAD). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50µL, contendo aproximadamente 30ng de DNA, tampão 10x da enzima (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,4 - BIOTOOLS), 200 µM de cada dNTP (BIOTOOLS), 3,0mM de MgCl₂, 1,5U de *Taq* DNA-polimerase (BIOTOOLS) e 20pmol dos oligonucleotídeos CIF2 F2, CIF2R2, MECI P2 e MECI P3, 25 pmoles dos oligonucleotídeos RIF5 F10, RIF5 R13, pUB110 R1 e pT181 R1, 40 pmoles dos oligonucleotídeos DCS F2, DCS R1, IS431 P4, MRS1 e MRS2 e 10 pmoles dos oligonucleotídeos KDP F1, KDP R1, RIF4 F3 e RIF4 R9 (**Tabela 2**). Como controle positivo da reação foi utilizada a cepa de *S. aureus* 63a e como controle negativo foi utilizado *S. saprophyticus* ATCC 15305.

A reação foi submetida a uma etapa inicial de aquecimento a 94°C por 4 minutos, seguida por 30 ciclos de amplificação de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 53°C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 1 minuto (extensão), e uma extensão final a 72°C por 4 minutos. Após o fim da reação de PCR, as amostras foram estocadas a -20°C e a análise da amplificação foi realizada através de eletroforese em gel de agarose (conforme descrito no item 3.4.3).

Tabela 2: Sequência, tamanho do *amplicon* e tipo do *SCCmec* detectado na reação de PCR-multiplex. Adaptado segundo Milheiriço, Oliveira e de Lencastre, 2007.

Oligonucleotídeos	Sequência (5' → 3')	Fragmento Amplificado (pb)	Especificidade (tipo de <i>Scmec</i>)
CIF2 F2	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG	495	I
CIF2 R2	ATTTACCACAAGGACTACCAGC		
KDP F1	AATCATCTGCCATTGGTGATGC	284	II
KDP R1	CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG		
MECI P2	ATCAAGACTTGCATTCAGGC	209	II, III
MECIP3	GCGGTTTCAATTCACTTGTC		
DCS F2	CATCCTATGATAGCTTGGTC	342	I, II, IV
DCS R1	CTAAATCATAGCCATGACCG		
RIF4F3	GTGATTGTTCGAGATATGTGG	243	III
RIF4R9	CGCTTTATCTGTATCTATCGC		
RIF5 F10	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG	414	III
RIF5 R13	GTCACAGTAATTCCATCAATGC		
IS431 P4	CAGGTCTCTTCAGATCTACG	381	IA
pUB110 R1	GAGCCATAAACACCAATAGCC		
IS431 P4	CAGGTCTCTTCAGATCTACG	303	IIIA
pT181 R1	GAAGAATGGGGAAAGCTTCAC		
MRS1	TAGAAATGACTGAACGTCCG	154	Controle interno da reação
MRS2	TTGCGATCAATGTTACCGTAG		

3.6 Análise da formação de biofilme na presença e ausência de concentrações subinibitória de antimicrobianos

Primeiramente, foi analisada a capacidade das cepas de formarem biofilme na ausência de antimicrobianos, como descrito por Stepanovic e colaboradores (2007) com

modificações. As cepas foram inoculadas em ágar BHI (KASVI) e incubadas a 37°C por 24h. A partir do inóculo foi feita uma diluição de 1:100 (v/v) em caldo BHI (BD) contendo glicose [1% (p/v) – SIGMA], que foi posteriormente distribuída em placas de microdiluição de poliestireno de 96 poços - KASVI. Posteriormente, foram utilizados 200 µL da cultura diluída em cada poço. Após a distribuição, a placa foi incubada a 37°C durante 24 horas. Ao término desta etapa, o meio de cultura presente nos poços foi removido e a placa lavada três vezes com solução PBS (fosfato de potássio monobásico 2 mM – MERCK; fosfato de sódio dibásico 20 mM – REAGEN; cloreto de sódio 140 mM – MERCK; cloreto de potássio 3 mM - MERCK). As possíveis células aderidas (biofilme) foram fixadas em estufa a uma temperatura de 60°C durante 1 hora. O biofilme foi corado com a utilização de 200 µL de solução de cristal violeta [0,1% (p/v) – PROQUIMIOS] em cada poço, sendo mantida em repouso a temperatura ambiente durante 15 minutos. A placa foi lavada com água corrente e secada em estufa a 60°C por aproximadamente 30 minutos. Posteriormente foram adicionados 200 µL de solução de etanol [99,5% (v/v) – MERCK] em cada poço da placa de microdiluição e a mesma foi mantida por 30 minutos a temperatura ambiente. A absorbância foi medida em leitor de ELISA (*Microplate Reader Model 680* - BIO-RAD, Berkeley, Califórnia) na faixa de 570 nm. Como controle negativo foi utilizado meio BHI (KASVI). Os experimentos foram realizados em triplicata para a validação dos resultados.

Foram utilizados os critérios descritos por Stepanovic e colaboradores (2007) para a classificação das cepas em forte produtora, produtora moderada, fraca produtora e não produtora de biofilme. A média da absorbância obtida para as amostras (MA) foi comparada com o valor de corte (VC), calculado da seguinte maneira: valores médios do controle negativo (CN) somados ao valor do desvio padrão (dp) multiplicado por 3, ou seja, $VC = \text{média (CN)} + 3 \times dp(\text{CN})$. Para o cálculo da média, foram desconsiderados os maiores e os menores valores que foram comparados e classificados de acordo com a seguinte regra apresentada na **Tabela 3**.

Tabela 3: Parâmetros para classificação das estirpes quanto à produção de biofilme.

$MA \leq VC$	Não produtora
$VC < MA \leq 2VC$	Produtora fraca
$2VC < MA \leq 4VC$	Produtora moderada

MA > 4VC	Forte produtora
MA: média da absorbância; VC: valor de corte.	

Em um segundo momento, para a análise da modulação antimicrobiana durante a formação do biofilme, os ensaios foram realizados após a adição de concentrações subinibitórias de ciprofloxacina (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 do CMI) ao meio BHI contendo glicose [1% (p/v)].

3.7 PCR para a detecção dos genes *bap* e *icaA*

Para essa reação foram utilizados iniciadores capazes de detectar um fragmento dos genes *bap* e *icaA*, apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4: Sequência e tamanho dos amplicons esperados na detecção dos genes *bap* e *icaA* por PCR

Oligonucleotídeo	Sequência (5' → 3')	Fragmento Amplificado (pb)	Referência
<i>bap2 F</i>	GAGCCAGATAAACAACAAGAAG	598	Potter <i>et al.</i> (2009)
<i>bap2 R</i>	CATGCTCAGCAATAATTGGATC		
<i>icaA F</i>	CGATGGGCTCAAGGTGG	287	
<i>icaA R</i>	TTCTTTTCGTAGCGACTGTC		

Para a detecção dos genes *bap* e *icaA*, as reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25µL, contendo aproximadamente 50ng de DNA, tampão 10x da enzima (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,4 - BIOTOOLS), 200 µM de cada dNTP (BIOTOOLS), 1,5mM de MgCl₂, 0,5U de *Taq* DNA-polimerase (BIOTOOLS) e 20pmol dos oligonucleotídeos *bap2 F* e *bap2 R* ou *icaA F* e *icaA R*. Cada reação foi submetida a uma etapa inicial de aquecimento a 95°C por 3 minutos, seguida por 30 ciclos de amplificação de 94°C por 1 minuto (desnaturação), 57°C por 1 minuto (anelamento) e 72°C por 1 minutos (extensão), e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Após o fim da reação de PCR, as amostras foram estocadas a -20°C e a análise da amplificação foi

realizada através de eletroforese em gel de agarose (conforme descrito no item 3.4.3). Como controles positivo e negativo para o gene *bap* foram utilizadas as cepas *S. aureus* V329 e *S. epidermidis* ATCC 12228, respectivamente. Os controles positivo e negativo da reação de PCR para o gene *ica* foram *S. epidermidis* ATCC 35984 e *S. epidermidis* ATCC 12228, respectivamente.

3.8 Análise estatística

Para a análise da modulação antimicrobiana da formação de biofilme, as diferentes concentrações de ciprofloxacina foram comparadas com o controle positivo (bactérias inoculadas em BHI na ausência do antimicrobiano). A análise estatística foi realizada através do teste t de *Student* bi-caudal com o programa Microsoft Excel (MICROSOFT CORP.), considerando como valores significativos aqueles em que $p < 0,05$. Gráficos foram gerados com o programa SigmaPlot v.11.0 (SYSTAT SOFTWARE INC.).

Resultados

4.1 Análise da susceptibilidade aos antimicrobianos das cepas de *S. saprophyticus*

O perfil de susceptibilidade das 47 cepas clínicas de *S. saprophyticus*, isoladas do Hospital Naval Marcílio Dias, foi analisado através do teste de difusão a partir de disco.

Os resultados obtidos revelaram uma alta taxa de sensibilidade, sendo 53% (n=24) sensíveis aos 11 antimicrobianos testados. Entretanto, foi detectada resistência a eritromicina (n=19), ampicilina (n=5), penicilina (n=4), tetraciclina (n=2), sulfazotrim (n=1) e cefoxitina (n=1). Os resultados estão apresentados na **tabela 5**.

Tabela 5: Perfil de resistência das cepas de *S. saprophyticus*

CEPAS	ANTIBIOGRAMA
MD1	STA
MD2	STA
MD3	STA
MD4	STA
MD5	Tet ^R Amp ^R
MD6	Eri ^R
MD7	Eri ^R
MD8	Eri ^R
MD9	Amp ^R Cfo ^R Pen ^R
MD10	STA
MD11	Eri ^R
MD13	STA
MD14	STA
MD15	Eri ^R
MD16	Eri ^R
MD17	STA
MD18	STA
MD19	Eri ^R
MD20	Eri ^R
MD21	STA
MD22	Eri ^R
MD24	STA
MD25	STA
MD26	Eri ^R
MD28	STA
MD29	STA
MD30	STA
MD31	STA
MD32	Amp ^R , Eri ^R
MD33	STA
MD34	STA
MD35	STA
MD36	STA
MD37	STA
MD38	STA
MD39	Pen ^R , Eri ^R , Amp ^R
MD40	Pen ^R , Eri ^R , Amp ^R
35S	Eri ^R
46S	Eri ^R
135S	Eri ^R
139S	Eri ^R
260S	STA
270S	Sut ^R
271S	Eri ^R
510S	Eri ^R
7108	Pen ^R
ATCC	STA

STA: Sensível a todos os antimicrobianos testados; ^R: resistente a; Amp: ampicilina; Cfo: cefoxitina; Eri: eritromicina; Pen: penicilina G; Tet: tetraciclina e Sut: sulfazotrim

4.2 Detecção do gene *mecA* nas cepas de *S. saprophyticus*

Para a cepa de *S. saprophyticus*, MD9, que apresentou resistência à cefoxitina, no teste de difusão a partir de disco, foi realizada a reação de PCR com o objetivo de avaliar a presença do gene *mecA*. Através de eletroforese, foi detectado para essa cepa à

amplificação do fragmento esperado de 154pb, correspondente à amplificação parcial do gene *mecA* (**Figura 2**).

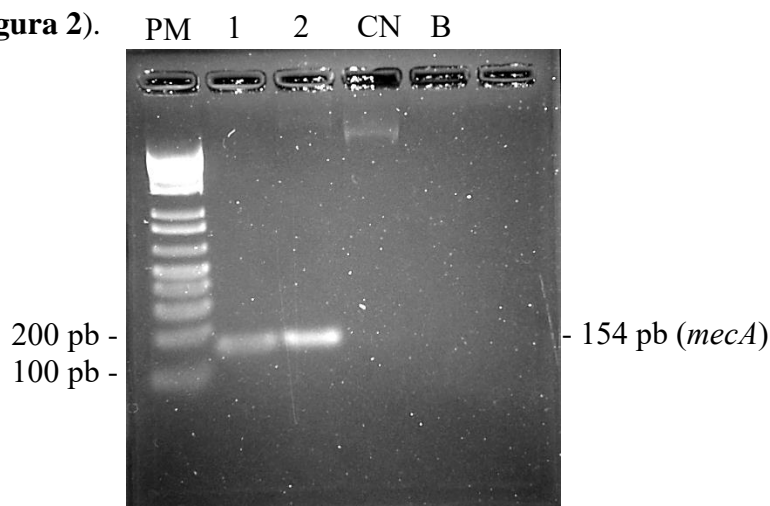


Figura 2: Detecção do gene *mecA* nas cepas clínica de *S. saprophyticus*. PM– Padrão de tamanho de DNA (“1Kb-DNA Plus Ladder”); 1 - *S. saprophyticus* MD9; 2 – Controle positivo da reação (*S. haemolyticus* MD2); CN – Controle negativo da reação (*S. saprophyticus* ATCC 15305); B – controle de contaminação da reação de PCR.

4.3 Caracterização do tipo de SCC*mec* nas cepas de *S. saprophyticus*

A tipagem do SCC*mec* para a cepa MD9, que apresentou o gene *mecA*, foi realizada através de PCR multiplex. Essa tipagem identificou segmentos gênicos compatíveis com o SCC*mec* do tipo IIIB (**Figura 3**). Esse tipo de SCC*mec* difere do tipo III, utilizado como controle da reação, pela ausência de segmentos gênicos específicos, representados pelos fragmentos de 243 pb e 414 pb.

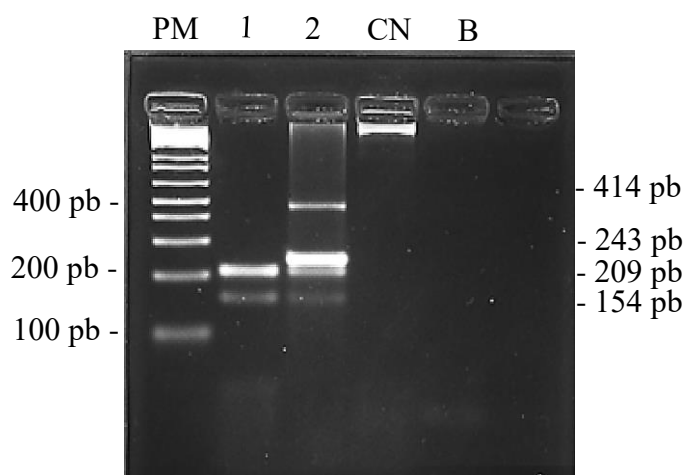


Figura 3: Detecção das sequências gênicas que codificam o tipo de SCCmec na cepa de *S. saprophyticus* MD9. PM – Padrão de tamanho de DNA (“1Kb-DNA Plus Ladder”); 1 - *S. saprophyticus* MD9; 2 - Amostra controle com SCCmec tipo III (*S. aureus* 63a); CN – controle negativo (*S. saprophyticus* ATCC 15305); B – controle de contaminação da reação de PCR.

4.4 Concentração mínima inibitória de ciprofloxacina das cepas de *S. saprophyticus*

As CMI para o antimicrobiano ciprofloxacina foram determinadas conforme descrito pelo CLSI (2015). Entre as 47 cepas testadas, todas foram consideradas sensíveis ao antimicrobiano (*breakpoint* ≤ 1), sendo 32 (68%) apresentando CMI de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ e 15 (32%) com CMI de 1 $\mu\text{g/ml}$ (**figura 4**).

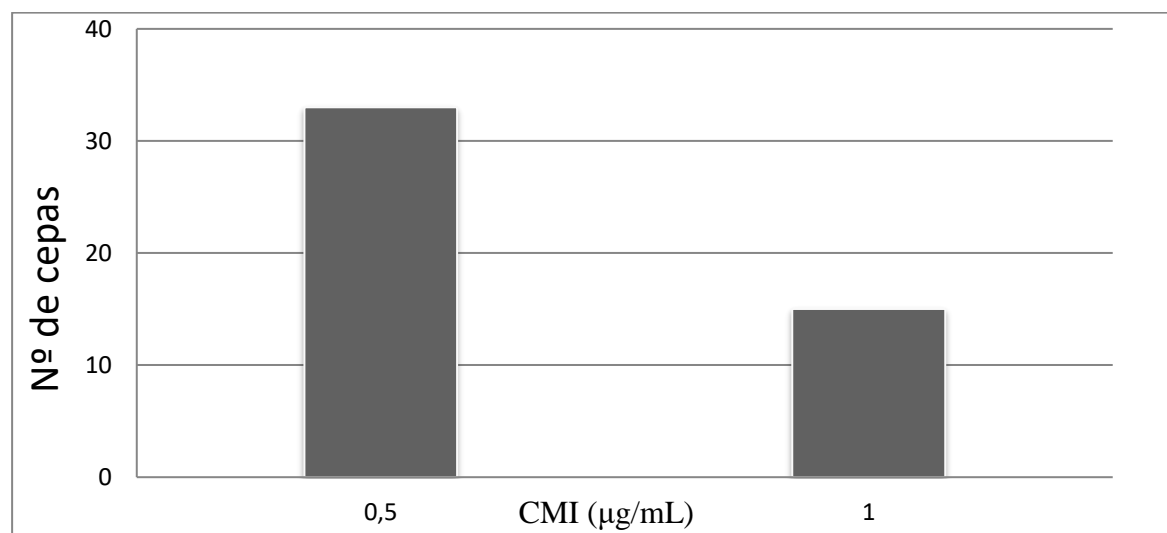


Figura 4: Representação da concentração mínima inibitória das 47 cepas testadas para o antimicrobiano ciprofloxacina.

4.5 Avaliação da produção de biofilme em placa de microdiluição de poliestireno

A produção de biofilme foi testada com meio BHI suplementado com 1% de glicose, sendo realizada em placas de microdiluição de poliestireno. Entre as 47 cepas de *S. saprophyticus* analisadas, todas apresentaram a capacidade de formar biofilme, sendo 15 (32%) consideradas fracas produtoras, 6 (13%) produtoras moderadas e 26 (55%) consideradas fortes produtoras de biofilme. Os resultados estão apresentados na **figura 5**.

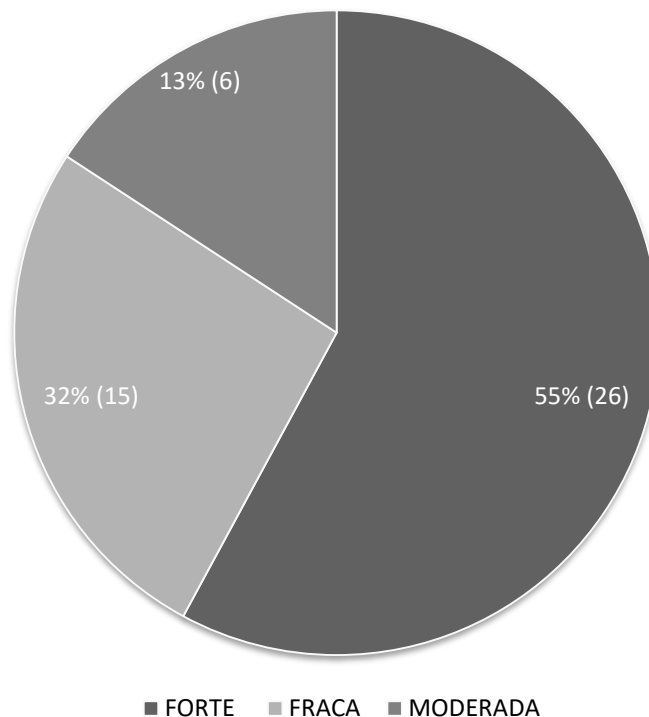
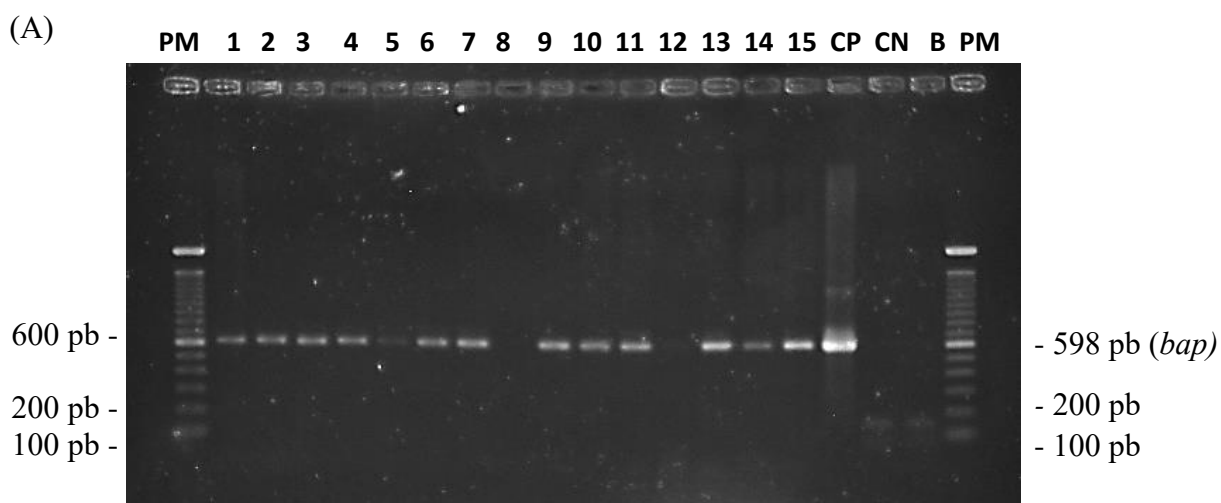


Figura 5: Classificação das cepas de *S. saprophyticus* quanto à produção de biofilme.

4.6 Detecção dos genes *bap* e *icaA* através da PCR

Através de PCR e posterior eletroforese foi detectada a presença do gene *bap*, **figura 6 (A)**, em 36 (76,5%) cepas de *S. saprophyticus*. Dentre essas cepas, 20 foram classificadas como fortes produtoras de biofilme, 4 como produtoras moderadas e 12 como fracas produtoras de biofilme. Só foi detectada a amplificação de um fragmento do gene *icaA* na cepa controle *S. epidermidis* 35984, **figura 6 (B)**. Todos os fragmentos amplificados apresentaram o tamanho esperado de 598 pb e 287 pb para os genes *bap* e *icaA*, respectivamente.



(B)

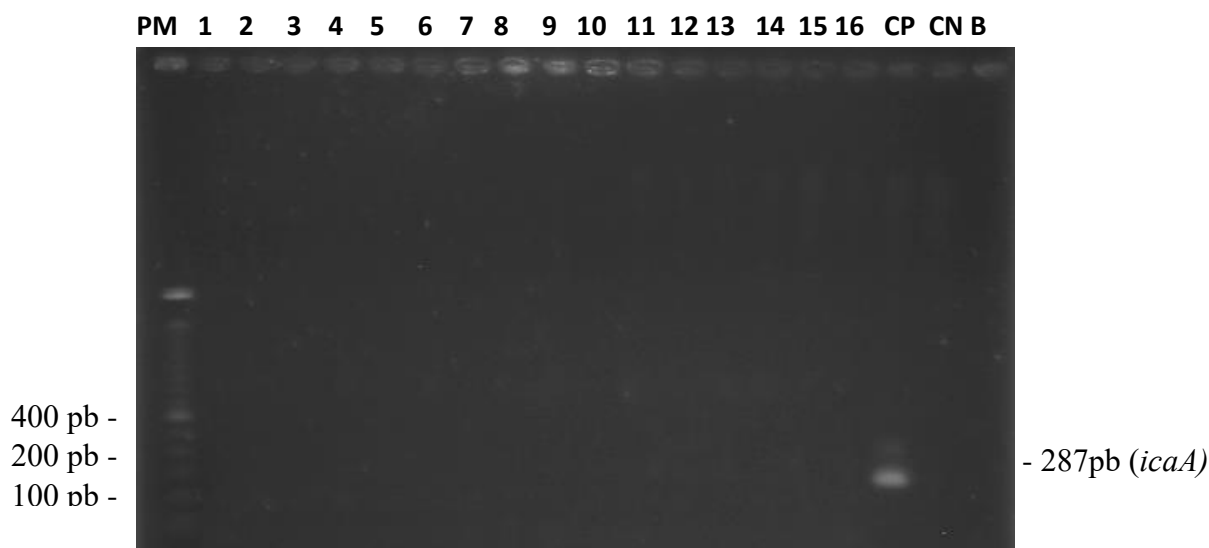
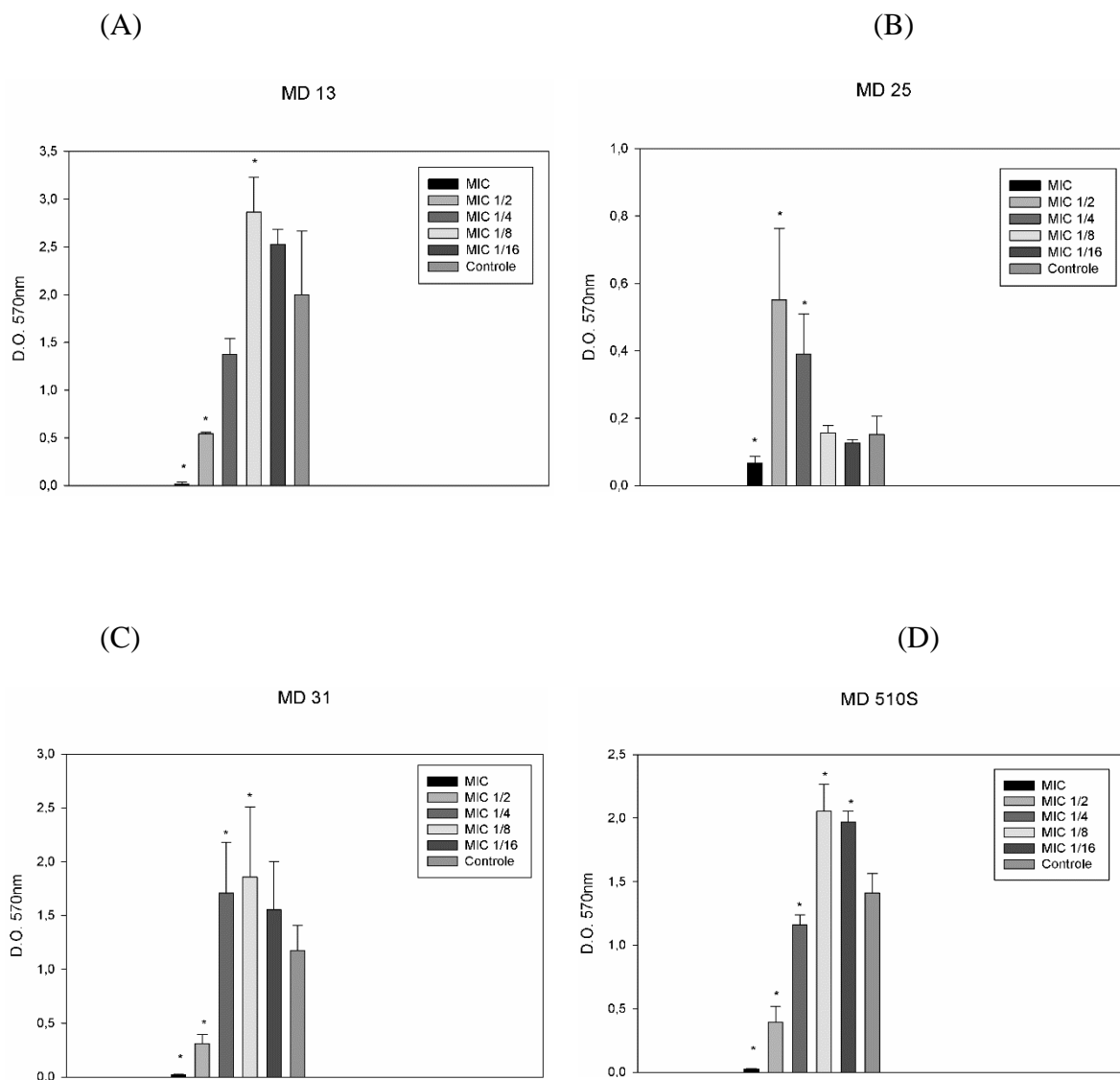


Figura 6: Detecção dos genes *bap* (A) e *icaA* (B) nas cepas de *S. saprophyticus*. PM: padrão de tamanho de DNA (*100-pb DNA Ladder* – Gibco/BioLabs); B – branco da reação de PCR. (A) CP- controle positivo (*S. aureus* V329); CN- controle negativo (*S. epidermidis* ATCC 12228). (B) CP- controle positivo (*S. epidermidis* ATCC 35984); CN- controle negativo (*S. epidermidis* ATCC 12228).

4.7 Análise da formação de biofilme em concentrações subinibitórias de ciprofloxacina

Para a análise da formação de biofilme na presença de concentrações subinibitórias de ciprofloxacina foram utilizadas 16 cepas de *S. saprophyticus*, selecionadas de acordo com a produção de biofilme (forte, fraca ou moderada) e a presença e ausência do gene *bap*. O antimicrobiano foi capaz de inibir a formação de biofilme na concentração CMI em todas as cepas testadas. Foi observado um comportamento cepa-dependente, onde algumas cepas (n=7) apresentaram aumento na formação de biofilme em diferentes concentrações subinibitórias do antimicrobiano. Na **figura 7** estão os gráficos representativos da modulação antimicrobiana em 6 cepas analisadas. As cepas MD13, MD25, MD31 e MD510S apresentaram um aumento na formação do biofilme, na presença

de determinadas concentrações subinibitórias, quando comparado ao meio sem o antimicrobiano (**figura 7: A, B, C, D**). As cepas MD 29 e MD 35S não apresentaram aumento estatisticamente significativo (considerando como valores significativos aqueles em que $p < 0,05$) em nenhuma das concentrações subinibitórias utilizadas (**figura 7: E e F**).



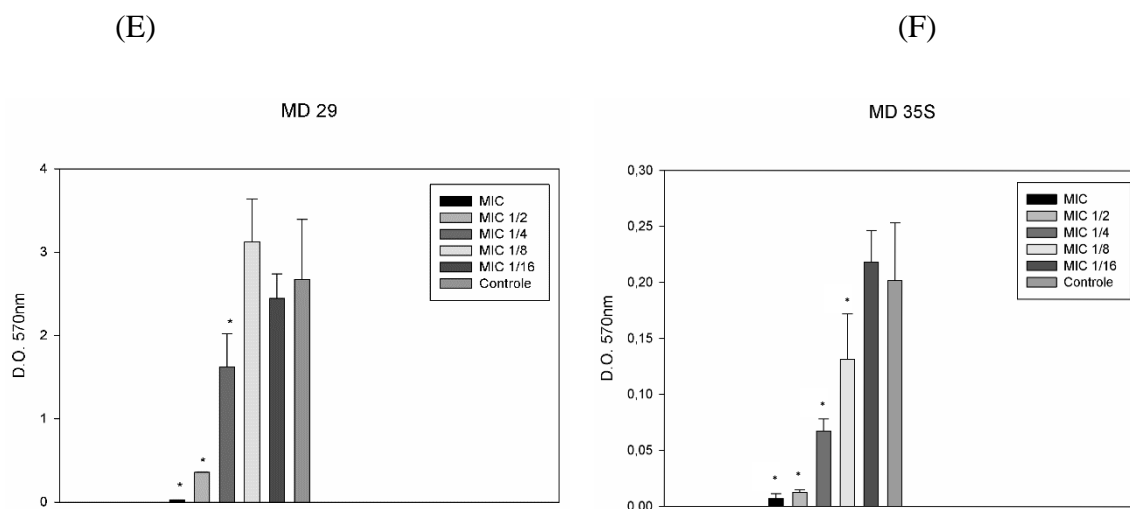


Figura 7: Formação de biofilme em capas de *S. saprophyticus* na presença de concentrações subinibitórias de ciprofloxacina. Cada barra indica os valores médios \pm DP. Controle: sem adição de antimicrobiano. * Indica diferenças significativas entre a concentração testada e o controle. (A) cepa MD 13, (B) cepa MD 25, (C) cepa MD 31, (D) cepa MD 510S, (E) cepa MD 29 e (F) cepa MD 35S. A análise estatística foi realizada através do teste t de *Student* bi-caudal com o programa Microsoft Excel (MICROSOFT CORP.), considerando como valores significativos aqueles em que $p < 0,05$. Gráficos foram gerados com o programa SigmaPlot v.11.0 (SYSTAT SOFTWARE INC.).

As cepas analisadas estão apresentadas na **tabela 6**, onde estão descritas a produção de biofilme, a presença ou ausência do gene *bap* e em qual concentração ocorreu a modulação antimicrobiana.

Tabela 6: Cepas utilizadas para a análise da formação de biofilme na presença de concentrações subinibitórias de ciprofloxacina.

Cepas	Produção de biofilme	Gene <i>bap</i>	Modulação antimicrobiana	
			Diminuição da formação de biofilme	Aumento da formação de biofilme
MD5	Forte	+	CMI/2, CMI/4	NS
MD8	Forte	-	NS	NS
MD13	Forte	-	CMI/2	CMI/8
MD16	Moderada	+	CMI/2	NS
MD18	Forte	-	CMI/2	CMI/8, CMI/16
MD21	Forte	-	CMI/2	NS
MD24	Forte	-	CMI/2	CMI/8, CMI/16
MD25	Fraca	+	NS	CMI/2, CMI/4
MD28	Forte	+	CMI/2	CMI/4, CMI/16
MD29	Forte	-	CMI/2, CMI/4	NS
MD31	Moderada	+	CMI/2	CMI/4, CMI/8
MD37	Moderada	-	CMI/2	NS
MD39	Forte	+	CMI/2	NS
MD35S	Fraca	+	CMI/2, CMI/4, CMI/8	NS
MD135S	Fraca	-	NS	NS
MD510S	Fraca	-	CMI/2, CMI/4	CMI/8, CMI/16

NS: Não significativo.

Discussão

Staphylococcus coagulase negativos (SCN) é um grupo de bactérias Gram-positivas que durante muito tempo não tiveram sua importância reconhecida, mas que atualmente são vistos como importantes patógenos oportunistas (Becker e Peters, 2014). Dentre esses microrganismos, *S. saprophyticus* se destaca por ser o segundo maior causador de infecções do trato urinário (ITU) não-complicadas em mulheres jovens. Tal fato pode ser confirmado no estudo de Eriksson e colaboradores (2012) que analisaram o perfil microbiológico de amostras de urina de cerca de 33 mil pacientes com infecção urinária na Suécia no ano de 2010. Nesse trabalho, aproximadamente 15% das cepas, isoladas de mulheres com idade entre 15-29 anos, foram identificadas como *S. saprophyticus*. Em um estudo mais recente realizado no Brasil foi observada, em um período de três anos, uma alta frequência de ITU em mulheres jovens causadas por *S. saprophyticus*. Ainda que a frequência de *Escherichia coli* fosse alta (52,8%), *S. saprophyticus* foi detectado em 24.5% das pacientes (Lo *et al.*, 2015).

Um aspecto importante se tratando de estudos com uropatógenos é referente à avaliação do perfil de resistência aos antimicrobianos nesses microrganismos. Embora geralmente auto-limitantes, o tratamento de infecções do trato urinário com antibióticos conduz a uma resolução mais rápida dos sintomas, porém também seleciona para uropatógenos resistentes e bactérias comensais e afeta negativamente a microbiota intestinal e vaginal (Foxman, 2010). A combinação da alta prevalência dessas infecções com o tratamento empírico utilizado no combate ao patógeno leva ao uso excessivo de antimicrobianos, cenário perfeito para a seleção de cepas resistentes. Essa resistência varia geograficamente, assim, a reavaliação periódica do padrão de sensibilidade aos antimicrobianos em locais específicos se torna essencial.

Poucos estudos da avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos foram realizados exclusivamente para amostras de *S. saprophyticus* e, na sua maioria, se dedicam ao estudo de SCN em geral. Nesse estudo avaliamos o perfil de susceptibilidade de 47 cepas clínicas de *S. saprophyticus*. Como já é descrito, as cepas dessa espécie apresentaram uma alta taxa de sensibilidade, com 53% sensíveis a todos os antimicrobianos utilizados. No entanto foi detectada resistência a penicilina (n=3), ampicilina (n=5), tetraciclina (n=2), sulfazotrim (n=1) e cefoxitina (n=1). Além disso, uma maior taxa de resistência foi

encontrada para eritromicina (n=19). De fato, Orden-Martínez e colaboradores (2008), em um estudo longitudinal, realizado durante 10 anos (1997-2006), apontaram uma elevada porcentagem de resistência a eritromicina (37,7%) e um significativo aumento durante a realização do trabalho. Nesse mesmo estudo, todas as cepas de *S. saprophyticus* analisadas foram sensíveis a vancomicina, rifampicina, gentamicina e amoxicilina-ácido clavulânico. Aproximadamente 1,5% foram resistentes a clindamicina e apenas 0,9% foram resistentes a fluorquinolonas. Além disso, 45% das cepas isoladas foram consideradas resistentes à oxacilina.

Em outro estudo, Cernohorská e colaboradores (2010), na República Checa, analisaram 87 cepas de *S. saprophyticus* isoladas a partir da urina de pacientes com cistite durante o período 2005-2009. Nenhuma das cepas de *S. saprophyticus* apresentou resistência à vancomicina, enquanto maiores taxas de resistência foram observadas para nitrofurantoína (2,3%), doxiciclina (10,3%), oxacilina (23,0%), amoxicilina/clavulanato (6,9%), cefoxitina (6,9%) e para sulfametoxazol/trimetoprim (1,1%). Por fim, nas cepas de *S. saprophyticus* presentes no trabalho de Eriksson e colaboradores (2012), citado acima, as taxas de resistência a ampicilina, cefadroxila e trimetoprim foram de 1,3%, 1,4% e 1,9%, respectivamente.

Em nosso trabalho, para a cepa de *S. saprophyticus* que apresentou resistência à cefoxitina, foi realizada a reação de PCR com o objetivo de avaliar a presença do gene *mecA*. De acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015), para a detecção da resistência mediada por *mecA*, é recomendado a realização de teste de disco-difusão com discos de 30 µg de cefoxitina como a melhor alternativa, em relação a utilização de discos de 1 µg de oxacilina. Muitos estudos foram realizados demonstrando que a avaliação da resistência à oxacilina poderia superestimar a presença do gene *mecA*. Para *S. saprophyticus*, Higashide e colaboradores (2006) e Antunes e colaboradores (2007) constataram esse fato através da avaliação de cepas clínicas que mostraram uma baixa correlação entre a resistência à oxacilina e a presença do gene. De fato, as 47 cepas analisadas nesse estudo apresentaram uma alta taxa de resistência à oxacilina (dados não mostrados). No entanto, somente na cepa que apresentou resistência a cefoxitina foi detectada a presença do gene *mecA*.

A análise da presença do gene *mecA* é importante em função do grande número de infecções causadas por cepas MRSA e da possibilidade de cepas de SCN funcionarem

como reservatórios de genes de resistência. Em relação aos outros membros do grupo dos SCN é observada uma menor taxa de cepas de *S. saprophyticus mecA*-positivas. Entre os casos relatados, podemos citar como exemplo ocorrências no Canadá (Hussain *et al*, 2000), nos EUA (Swenson e Tenover, 2005) e no Brasil (Antunes *et al*, 2007). No entanto, esses trabalhos foram realizados envolvendo membros do grupo de SCN e poucos trabalhos avaliaram a presença do gene *mecA* exclusivamente em cepas de *S. saprophyticus*. Fabre e colaboradores (2013), detectaram a presença do gene em duas das 91 cepas de *S. saprophyticus* analisadas. Recentemente, Małyszko e colaboradores (2014) relataram a presença de um novo alótipo do gene *mecC* (gene homólogo ao *mecA*), designado *mecC2*, em uma cepa de *S. saprophyticus* resistente a meticilina.

Poucos estudos também realizam a tipagem do SCC*mec* em cepas de *S. saprophyticus*. Higashide e colaboradores (2008), analisando oito cepas *mecA*-positivas, não foram capazes de atribuir os tipos de SCC*mec* utilizando as metodologias válidas no período do estudo. Soderquis e colaboradores (2009) realizaram o primeiro relatório de caracterização da resistência à meticilina em *S. saprophyticus* na Europa. Das oito cepas analisadas, cinco foram associadas ao SCC*mec* tipo III e três cepas foram consideradas não tipáveis. Para a cepa MD9, *mecA*-positiva, encontrada nesse estudo, a tipagem realizada identificou segmentos gênicos compatíveis com o SCC*mec* do tipo IIIB. Esse subtipo de SCC*mec* se difere do tipo III, pela ausência de segmentos gênicos que carregam o plasmídeo pT181 (responsável pela resistência a tetraciclina e mercúrio) e o transposon Tn554 (responsável pela resistência a macrolídeos e estreptograminas). O SCC*mec* do tipo IIIB pode ter surgido a partir das cepas de MRSA hospitalares que transportavam o SCC*mec* do tipo III e perderam os determinantes portadores de genes de resistência para macrolídeos e tetraciclina num ambiente isento de antibióticos ou vice-versa. (Oliveira e de Lencastre, 2002; Karahan *et al.*, 2010).

Além da resistência aos antimicrobianos, outro fator que contribui para o sucesso das infecções causadas pelos SCN está relacionado a formação de biofilme. O crescimento em biofilmes protege as células constituintes de agressões externas, dos mecanismos de defesa do hospedeiro, além de atuar como uma barreira de difusão de pequenas moléculas. Além disso, todos os materiais utilizados para a fabricação dos cateteres podem servir de substrato para a formação de biofilmes (Donlan, 2001; Saint e Chenoweth, 2003; Stickler e Morgan 2008). Assim, uma vez formado o biofilme no cateter, os microrganismos podem alcançar a bexiga em 1 a 3 dias (Donlan, 2001). Existem muitos estudos a respeito da

formação de biofilme em *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, porém os dados para outras espécies do grupo dos SCN são limitados (Tormo *et al.*, 2005; Simojoki *et al.*, 2012; Tremblay *et al.*, 2013).

Apesar da formação de biofilme ser um fator de virulência reconhecido nos SCN, os principais fatores de virulência de *S. saprophyticus* estão relacionados com a sua capacidade de adaptação ao ambiente do trato urinário e sua habilidade de aderir às células uroepiteliais. Apesar desse fato, todas as cepas analisadas neste estudo foram capazes de formar biofilme, sendo 55% fortes produtoras, 13% produtoras moderadas e 32% apresentando fraca produção de biofilme. Esses resultados diferem de outros estudos realizados para essa espécie. Allori e colaboradores (2006), com amostras hospitalares de *S. saprophyticus*, detectaram a formação de biofilme em apenas 29% das 51 cepas analisadas. Em outro estudo, realizado no Brasil por de Oliveira e colaboradores (2016), 65% das 20 cepas clínicas de *S. saprophyticus* estudadas foram produtoras de biofilme, sendo 12 consideradas fracas e apenas uma cepa apresentando forte formação de biofilme.

Um fator importante para a formação de biofilme em *Staphylococcus* é a presença do exopolissacarídeo PIA/PNAG, codificado pelo gene *icaADBC*. Nesse estudo foi analisada a presença do gene *icaA*, presente no operon *icaADBC*, nas 47 cepas de *S. saprophyticus*. Através da técnica de PCR só foi verificada a amplificação de um fragmento do gene *icaA* na cepa de *Staphylococcus epidermidis* 35984, utilizada como controle positivo da reação de PCR. Curiosamente, em nossos ensaios, não houve amplificação para a cepa de *S. saprophyticus* ATCC15305. No entanto, análises *in silico* demonstram a presença do gene nessa cepa e as sequências específicas para o anelamento dos iniciadores utilizados nesse estudo. Assim, algumas abordagens, como o desenho de novos iniciadores para outra região desse gene ou a utilização de outras técnicas, como *Dot blot*, podem ser empregadas visando a detecção do gene *icaA*.

Além do operon *icaADBC*, a proteína associada ao biofilme (Bap) codificada pelo gene *bap*, é capaz de induzir a formação de biofilme na ausência de PIA/PNAG. Nesse estudo foi analisada a presença do gene *bap* nas 47 cepas de *S. saprophyticus*. A análise de PCR revelou que 36 (68%) cepas apresentaram o gene *bap* e, dentre elas, estão presentes cepas classificadas como fortes (n=20), moderadas (n=4) e fracas produtoras de biofilme (n=12). Existem poucos estudos que analisaram a presença do gene *bap* em cepas clínicas de *Staphylococcus* spp. isoladas de humanos. Potter e colaboradores (2009) realizaram o

primeiro estudo analisando a presença do gene *bap* em cepas de *Staphylococcus* isoladas de IRAS. Foi observado que todas as 10 cepas testadas apresentaram o gene *bap*. Esses resultados mostram que, ao contrário do que era descrito em estudos anteriores, que mostravam que o gene *bap* era detectado exclusivamente em amostras animais (Cucarella *et al.*, 2001, Vautor *et al.*, 2008), este gene também pode ser encontrado em cepas de *Staphylococcus* isoladas de humanos. Em contraste, em estudo recente realizado por Yousefi e colaboradores (2016) no Irã, das 39 cepas de *Staphylococcus*, isoladas de infecção urinária, nenhuma apresentou o gene *bap*, apesar de metade das cepas serem fortes produtoras de biofilme. Esses dados corroboram o fato de que a formação de biofilme é multifatorial, com a participação diversas moléculas que são expressas em diferentes níveis, dependendo das condições apresentadas. Além disso, em condições *in vitro*, vários fatores podem influenciar a expressão gênica e/ou o desenvolvimento do biofilme (Brooks e Jefferson, 2012; Fitzpatrick, Humphreys e O'gara, 2005).

Um desses fatores que podem modular a formação do biofilme é a presença de concentrações subinibitórias de antimicrobianos, fato esse que já foi evidenciado para diferentes espécies do gênero *Staphylococcus*. Para *S. saprophyticus* apenas dois trabalhos analisaram como essa espécie se comporta frente a essas condições. O primeiro estudo, realizado por Erdeljan e colaboradores (2012), demonstrou que concentrações subinibitórias de ciprofloxacina aumentava a adesão bacteriana em lâminas de vidro, cateteres e células de bexiga. Apesar da produção de biofilme não ter sido avaliada, o aumento da adesão inicial pode favorecer a colonização e a formação de biofilme. Posteriormente, Goneau e colaboradores (2015) observaram que concentrações subinibitórias de ciprofloxacina, ampicilina e gentamicina resultaram no aumento da formação do biofilme em *S. saprophyticus*. No entanto, esse estudo apenas avaliou uma cepa de *S. saprophyticus* (ATCC 15305).

Em nosso estudo foram avaliadas 16 cepas de *S. saprophyticus* em relação a modulação antimicrobiana na presença de concentrações subinibitórias de ciprofloxacina. Foi observada uma relação cepa-dependente, onde em 7 cepas houve um aumento na produção de biofilme em determinadas concentrações do antimicrobiano. Para a cepa MD25, por exemplo, a concentração de CMI/2 já resultou em um aumento significativo na formação do biofilme. A cepa MD510S, por sua vez, apesar de ter apresentado menor produção de biofilme nas concentrações de CMI/2 e CMI/4, demonstrou um aumento significativo nas frações de CMI/8 e CMI/16. Cabe ressaltar que entre as cepas que

sofreram modulação haviam fortes, moderadas e fracas produtoras de biofilme, assim como cepas que possuíam ou não o gene *bap*, não sendo observada uma relação entre esses fatores.

A influência de concentrações subinibitórias possui grande relevância clínica, uma vez que as células bacterianas são expostas a essas concentrações no início e no final da antibioticoterapia, entre as doses ou no regime contínuo com baixas doses de antimicrobiano. Considerando-se que as ITUr são comumente tratadas com doses profiláticas de antimicrobianos em concentrações subinibitórias, estudos como o aqui apresentado são essenciais, uma vez que fornecem informações acerca da influência de um antimicrobiano específico em cepas clínicas de uropatógenos. Esse conhecimento é importante para a escolha da melhor terapia antimicrobiana a ser utilizada.

Futuramente, a análise da expressão de genes relacionados a formação do biofilme, como os genes *icaA* e *bap* e de MSCRAMMs associadas a adesão, assim como estudos de proteômicas na presença de concentrações subinibitórias de antimicrobianos, podem ajudar a esclarecer os processos bacterianos afetados nessas condições.

Conclusão

- ✓ As cepas analisadas apresentaram baixa resistência frente à maioria dos antimicrobianos testados, exceto à eritromicina.
- ✓ Dentre as cepas analisadas somente uma apresentou o gene *mecA* e esta exibiu segmentos gênicos compatíveis com o SCC*mec* do tipo IIIB.
- ✓ Todas as cepas de *S. saprophyticus* analisadas foram produtoras de biofilme.
- ✓ Foi observado um perfil cepa-dependente em relação a modulação antimicrobiana com concentrações subinibitórias de ciprofloxacina.
- ✓ A maioria das cepas (76,6%) apresenta o gene *bap* relacionado a formação de biofilme.

Referências Bibliográficas

- Abad, C.L., Safdar, N. (2009). **The role of lactobacillus probiotics in the treatment or prevention of urogenital infections--a systematic review.** J Chemother. 21, 243-252.
- Allori, M. C. G., Jure, M. Á., Romero, C. e de Castillo, M. E. C. (2006). **Antimicrobial resistance and production of biofilms in clinical isolates of coagulase-negative Staphylococcus strains.** Biological and Pharmaceutical Bulletin. 29, 1592-1596.
- Aminov, R.I. (2009). **The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature.** Environ. Microbiol. 11, 2970–2988.
- Anderson, M.J., Lin, Y.C., Gillman, A. N., Parks, P.J., Schlievert, P.M., e Peterson, M. L. (2012). **Alpha-toxin promotes Staphylococcus aureus mucosal biofilm formation.** The Staphylococci and staphylococcal pathogenesis, 95.
- Andersson, D.I. e Hughes, D. (2014). **Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics.** Nature Reviews Microbiology 12, 465–478.
- Andrews, J., Ashby, J., Jevons, G., Marshall, T., Lines, N. e Wise, R. (2000). **A comparison of antimicrobial resistance rates in Gram-positive pathogens isolated in the UK from October 1996 to January 1997 and October 1997 to January 1998.** J. Antimicrob. Chemother. 45, 285–293.
- Antunes, A.L.S., Bonfanti, J.W., Perez, L.R.R. e Pinto, C.C.F. (2011). **High vancomycin resistance among biofilms produced by Staphylococcus species isolated from central venous catheters.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 106, 3-5.
- Antunes, A.L.S., Secchi, C., Reiter, K. C., Perez, L.R.R., Freitas, A.L.P.D. e d'Azevedo, P.A. (2007). **Evaluation of oxacillin and cefoxitin disks for detection of resistance in coagulase negative staphylococci.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 102, 719–723.
- Archer, N. K., MAzaitis, M. J., Costerton, J. W., Leid, J. G., Powers, M. E. e Shirtliff, M. E. (2011). **Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation, and roles in human disease.** Virulence. 2, 445-459.
- August, S.L. e De Rosa M.J. (2012). **Evaluation of the prevalence of urinary tract infection in rural Panamanian women.** PLoS ONE. 7, e47752.
- Baharoglu, Z. e Mazel D. (2014). **SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions.** FEMS Microbiol Rev. 38, 1126-45.
- Balaban, N., Stoodley, P., Fux, C.A., Wilson, S., Costerton, J.W. e Dell'Acqua, G. (2005). **Prevention of staphylococcal biofilm-associated infections by the quorum sensing inhibitor RIP.** Clin Orthop Relat Res 437, 48-54.
- Bannerman, T.L. e Peacock, S. J. (2007). **Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase-positive cocci.** In: Manual of Clinical Microbiology. Murray, P. R.; Baron, E. J.; Jorgensen, J. H.; Landry, M. L. e Pfaller, M. A. (eds). 9th ed. ASM Press, Washington. 390-411
- Barber, A.E., Norton, J. P., Spivak, A.M. e Mulvey, M.A. (2013). **Urinary tract infections: current and emerging management strategies.** Clinical infectious diseases. 57, 719-724.
- Becker K e von Eiff C. (2011). **Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase-positive cocci.** In: Versalovic J, Carroll, K.C., Funke, G., Jorgensen, J.H., Landry, M.L. e Warnock D.W., editors. Manual of clinical microbiology. 10th ed. ASM Press. pp. 308-30.
- Becker, K., Heilmann C. e Peters G. (2014). **Coagulase-negative staphylococci.** Clin Microbiol Rev. 27, 870–926.
- Beetz R. (2006). **May we go on with antibacterial prophylaxis for urinary tract infections?** Pediatr Nephrol. 21, 5–13.
- Ben-Ami, R., Navon-Venezia, S., Schwartz, D. e Carmeli, Y. (2003) **Infection of a ventriculoatrial shunt with phenotypically variable Staphylococcus epidermidis masquerading as polymicrobial bacteremia due to various coagulase-negative staphylococci and Kocuria varians.** J Clin Microbiol. 41, 2444-7.
- Bennett, J.V. e Brachman, P.S. (1998). **Hospital infection.** In: Lippincott-Raven. Philadelphia, USA.

- Bisognano, C., Vaudaux P., Rohner P., Lew D.P. e Hooper, D.C. (2000). **Induction of fibronectin-binding proteins and increased adhesion of quinolone-resistant *Staphylococcus aureus* by subinhibitory levels of ciprofloxacin.** *Antimicrob Agents CH.* 44, 1428–1437.
- Bjarnsholt, T. (2013). **The role of bacterial biofilms in chronic infections.** *APMIS Suppl.* 136, 1–51.
- Bower, J.M., Eto, D.S. e Mulvey, M.A. (2005). **Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract.** *Traffic.* 6, 18–31.
- Boyce, J.M., Jackson, M.M., Pugliese, G., Batt, M.D., Fleming, D., Garner, J.S., Hartstein, A. I., Kauffman, C. A., Simmons, M., Weinstein, R. e Williams, C.O.B. (1994). **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): A briefing for acute care hospital and nursing facilities.** *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 15, 105-115.
- Brooks, J.L. e Jefferson, K. (2012). ***Staphylococcal* Biofilms.** *Quest for the Magic Bullet. Ad Appl Microbiol.* 81, 63-87.
- Caboclo R.M., Cavalcante F.S., Iorio N.L., Schuenck R.P., Olendzki A.N., Felix M.J., Chamon R.C., dos Santos K.R. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Rio de Janeiro hospitals: dissemination of the USA400/ST1 and USA800/ST5 SCCmec type IV and USA100/ST5 SCCmec type II lineages in a public institution and polyclonal presence in a private one.** *Am J Infect Control* 2013; 41(3):21-26.
- Cafiso, V., Bertuccio, T., Spina, D., Purrello, S. e Stefani, S. (2010). **Tigecycline inhibition of a mature biofilm in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*: comparison with other drugs.** *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 59, 466–469
- Cargill, J.S. e Upton, M. (2009). **Low concentrations of vancomycin stimulate biofilm formation in some clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*.** *J. Clin. Pathol.* 62, 1112–1116.
- Casey, A. L., Lambert, P. A. e Elliott, T. S. (2007). ***Staphylococci*.** *Int. J. Antimicrob. Agents,* 3, S23-S32.
- Cernohorská, L. e Votava, M. (2010). **Antibiotic resistance and biofilm formation in *Staphylococcus saprophyticus* strains isolated from urine.** *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie.* 59, 88-91.
- Chadwick, D. e Whelan, J., eds. (1992). **Secondary Metabolites: Their Function and Evolution,** CIBA Foundation Symposium 171 (Wiley, Chichester, U.K.).
- Chiang, Y.C., Lu, H.C., Li, S.C., Chang, Y.H. e Chen, H.Y. (2012). **Development of PCR Primers and a DNA Microarray for the Simultaneous Detection of Major *Staphylococcus* Species Using *groESL* Gene.** *Foodborne Pathog. Dis.* 9, 249-57.
- Christner, M., Kranke, G.C., Schommer, N.N., Wendt, U., Wegert, K., Pehle, P., Kroll, G., Schulze, C., Buck, F., Mack, D., Aepfelbacher, M. e Rohde, H. (2010). **The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin.** *Mol Microbiol.* 75, 187–207.
- CLSI. (2015). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement.** CLSI document M100-S23. Wayne, P. A. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Conrady, D.G., Brescia, C.C., Horii, K., Weiss, A.A., Hassett, D.J. e Herr, A.B. (2008). **A zinc-dependent adhesion module is responsible for intercellular adhesion in *staphylococcal* biofilms.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 105, 19456–61.
- Conway, P.H., Cnaan, A., Zaoutis, T., Henry, B.V., Grundmeier, R.W. e Keren, R. (2007). **Recurrent urinary tract infections in children: risk factors and association with prophylactic antimicrobials.** *JAMA.* 298, 179–186.
- Corse, J. e Williams, R.E. (1968). **Antibiotic resistance of coagulase-negative *staphylococci* and micrococci.** *J. Clin. Pathol.* 21, 722–728.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S. e Greenberg, E.P. (1999). **Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections.** *Science.* 284, 1318–22.
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I. e Penadés J.R. (2001). **Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation.** *J. Bacteriol.* 183, 2888-96.
- Cue, D, Lei, M.G. e Lee, C.Y. (2012). **Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in *staphylococci*.** *Front Cell Infect Microbiol.* 26, 38.

- Cuevas, O., Cercenado, E., Vindel, A., Guinea, J., Sanchez-Conde, M., Sanchez-Somolinos, M. e Bouza, E. (2004). **Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. In Spain: five nationwide prevalence studies, 1986 to 2002.** Antimicrob. Agents Chemother. 48, 4240–4245.
- Cunha, M., A., Assunção, G., L., M., Medeiros, I., M., e Freitas, M. R. (2016). **Antibiotic resistance patterns of urinary tract infections in a northeastern Brazilian capital.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 58.
- D'Addazio., L.B., Moraes S.R. (2015). **Microrganismos isolados de infecção do trato urinário da comunidade.** Rev Saúde. 6, 11–13.
- Davies, J., Spiegelman, G.B. e Yim, G. (2006). **The world of subinhibitory antibiotic concentrations.** Curr Opin Microbiol. 9, 445–453.
- de Oliveira, A., Cataneli Pereira, V., Pinheiro, L., Moraes Riboli, D. F., Benini Martins, K. e Ribeiro de Souza da Cunha, M. D. L. (2016). **Antimicrobial Resistance Profile of Planktonic and Biofilm Cells of *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci.** International Journal of Molecular Sciences, 17(9), 1423.
- de Paiva-Santos, W., Barros, E. M., de Sousa, V. S., Laport, M. S. e Giambiagi-deMarval, M. (2016). **Identification of coagulase-negative *Staphylococcus saprophyticus* by polymerase chain reaction based on the heat-shock repressor encoding *hrcA* gene.** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 86, 253-256.
- Del Vecchio, V. G., Petroziello, J. M., Gress, M. J., McCleskey, F. K., Melcher, G. P., Crouch, H. K. e Lupski, J. R. (1995). **Molecular Genotyping of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* via Fluorophore-Enhanced Repetitive-Sequence PCR.** J. Clin. Microbiol. 33, 2141-2144.
- Dielubanza, E.J. e Schaeffer, A. J. (2011). **Urinary tract infections in women.** Med Clin North Am. 95, 27–41.
- Donlan, R.M. (2001). **Biofilms and device-associated infections.** Emerg Infect Dis. 7, 1–4.
- Donders, G.G. (1999). **Microscopy of the bacterial flora on fresh vaginal smears.** Infect Dis Obstet Gynecol. 7,177-179.
- Drago L, De Vecchi E, Mombelli B, Nicola L, Valli M, Gismondo MR. (2001). **Activity of levofloxacin and ciprofloxacin against urinary pathogens.** J Antimicrob Chemother.48, 37–45.
- Drekonja, D.M. e Johnson, J.R. (2008). **Urinary tract infections.** Prim Care. 35, 345–67.
- Drisko, J.A., Giles, C.K., Bischoff, B.J. **Probiotics in health maintenance and disease prevention.** Altern Med Rev. 8, 143-155.
- Dulon, M., Haamann, F., Peters, C., Schablon, A. e Nienhaus, A. (2011). **MRSA prevalence in European healthcare settings: a review.** BMC Infect Dis. 11, 138.
- Dzidic, S., Suskovic, J. e Kos, B. (2008). **Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Biocheical and genetic aspects.** Food Technol Biotechnol. 46, 11-21.
- El Astal, Z. 2005. (2005). **Increasing Ciprofloxacin Resistance Among Prevalent Urinary Tract Bacterial Isolates in Gaza Strip, Palestine.** J. Biomed. Biotech. 3, 238-241.
- Elouennass, M., Sahnoun, I., Zrara, A., Bajjou, T. e Elhamzaoui, S. (2008). **Epidemiology and susceptibility profile of blood culture isolates in an intensive care unit (2002-2005).** Med. Mal. Infect. 38, 18-24.
- EPP, A., Larochele, A., Lovatsis, D. *et al.* (2010). **Recurrent urinary tract infection.** J Obstet Gynaecol Can. 32, 1082–1101.
- Erdeljan, P., MacDonald, K.W., Goneau, L.W., Bevan, T. e Carriveau, R. (2012) **Effects of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin on *Staphylococcus saprophyticus* adherence and virulence in urinary tract infections.** J Endourol 26, 32–37.
- Eriksson, A., Giske, C.G. e Ternhag, A. (2012). **The relative importance of *Staphylococcus saprophyticus* as a urinary tract pathogen: distribution of bacteria among urinary samples analysed during 1 year at a major Swedish laboratory.** APMIS, 121, 72–78.

- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2014). **Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2013**. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm.
- Fabre, R., Mérens, A., Tabone-Ledan, C., Epifanoff, G., Cavallo, J.D. e Ternois, I. (2013). ***Staphylococcus saprophyticus* isolated from urine culture in outpatients: epidemiology and antimicrobial susceptibility (Label Bio Elbeuf study-November 2007-July 2009)**. Pathologie-biologie, 61, 44-48.
- Faria, N. A., Oliveira, D. C., Westh, H., Monnet, D. L., Larsen, A. R., Skov, R. e De Lencastre, H. (2005). **Epidemiology of emerging methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Denmark: a nationwide study in a country with low prevalence of MRSA infection**. J. Clin. Microbiol. 43, 1839-1842.
- Farrell, D.J., Morrissey, I., De Rubeis, D., Robbins, M. e Felmingham, D. (2003). **A UK multicentre study of the antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens causing urinary tract infection**. Journal of Infection. 46, 94-100.
- Ferreira, R.B.R., Iorio, N.L.P., Malvar, K.L., Nunes, A.F., Fonseca, L.S., Bastos, C.C.R. e Santos, K.R.N. (2003). **Coagulase-negative staphylococci: comparison of phenotypic and genotypic oxacillin susceptibility testes and evaluation of the agar screening test by using different concentrations of oxacillin**. J. Clin. Microbiol. 41, 3609-3614.
- Fey, P.D. e Olson, M.E. (2010). **Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis***. Future Microbiol. 5, 917-933.
- Fihn, S.D. (2003). **Clinical practice: Acute uncomplicated urinary tract infection in women**. N Engl J Med. 349, 259-66.
- Fitzpatrick, F.; Humphreys, H. e O'gara, J. P. **The genetics of staphylococcal biofilm formation – will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection?** Clin. Microbiol. Infect. 11: 967-973, 2005.
- Flores-Mireles, A.L., Walker, J.N., Caparon, M. e Hultgren, S.J. (2015). **Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options**. Nature Reviews Microbiology. 13, 269-284.
- Foxman, B. (2010). **The epidemiology of urinary tract infection**. Nat Rev Urol. 7, 653-660.
- Foxman, B., Barlow, R., D'Arcy, H., Gillespie, B. e Sobel, J. D. (2000). **Urinary tract infection: self-reported Saint, S. Clinical and economic consequences of nosocomial catheter-related bacteriuria**. Am. J. Infect. Control. 28, 68–75.
- Franson, T.R., Sheeth, N.K., Rose, H.D. e Sohnle, P.G. (1984). **Scanning electron microscopy of bacteria adherent to intravascular catheters**. J. Clin. Microbiol. 20, 500-505.
- Fuller R. (1989). **Probiotics in man and animals**. J Appl Bacteriol.66, 365-378.
- Gatermann, S., Kreft, B., Marre, R. e Wanner, G. (1992). **Identification and characterization of a surface-associated protein (Ssp) of *Staphylococcus saprophyticus***. Infect Immun. 60, 1055-60.
- Geoghegan, J.A., Corrigan, R.M., Gruszka, D.T., Speziale, P., O'Gara, J.P., Potts, J.R. e Foster, T.J. (2010). **Role of surface protein SasG in biofilm formation by *Staphylococcus aureus***. J Bacteriol. 192, 5663-5673.
- Gesu, G.P. e Marchetti, F. (2007). **Increasing resistance according to patient's age and sex in *Escherichia coli* isolated from urine in Italy**. J Chemother. 19, 161-5.
- Goh, E.B., Yim G., Tsui W., McClure J., Surette M.G. e Davies J. (2002). **Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99, 17025–17030.
- Goh, E.B., Yim, G., Tsui, W., McClure, J., Surette, M.G. e Davies, J. (2002). **Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics**. Proc Natl Acad Sci U S A. 99, 17025–17030.
- Goldmann, D.A. e Pier G.B. (1993). **Pathogenesis of infections related to intravascular catheterization**. Clin Microbiol. 6, 176-92.

- Goneau, L.W., Hannan, T.J., MacPhee, R.A., Schwartz, D.J., Macklaim, J.M., Gloor, G.B., Razvi, H., Reid, G., Hultgren, S.J. e Burton J.P. (2015). **Subinhibitory antibiotic therapy alters recurrent urinary tract infection pathogenesis through modulation of bacterial virulence and host immunity.** *mBio.* 6, 356-15.
- Gullberg, E., Cao, S., Berg, O. G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D. e Andersson, D.I. (2011). **Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations.** *PLoS Pathog.* 7.
- Haaber, J., Cohn, M.T., Frees, D., Andersen, T.J. e Ingmer, H. (2012) **Planktonic aggregates of *Staphylococcus aureus* protect against common antibiotics.** *PloS One.* 7, 41075.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. e Stoodley, P. (2004). **Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases.** *Nat Rev Microbiol.* 2, 95–108.
- Hall-Stoodley, L. e Stoodley, P. (2005). **Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens.** *Trends Microbiol* 13, 7–10.
- Hall-Stoodley, L. e Stoodley P. (2009). **Evolving concepts in biofilm infections.** *Cell Microbiol.* 11, 1034–1043.
- Hannan, T.J., Totsika, M., Mansfield, K. J., Moore, K. H., Schembri, M. A. e Hultgren, S. J. (2012). **Host-pathogen checkpoints and population bottlenecks in persistent and intracellular uropathogenic *Escherichia coli* bladder infection.** *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 616–648.
- Hanson, L., VandeVusse, L., Jermé, M., Abad, C. L. e Safdar, N. (2016). **Probiotics for Treatment and Prevention of Urogenital Infections in Women: A Systematic Review.** *Journal of Midwifery & Women's Health.* 61,339-355.
- Heikens, E., Fler, A., Paauw, A., Florijn, A. e Fluit, A. C. (2005). **Comparison of Genotypic and Phenotypic Methods for Species-Level Identification of Clinical Isolates of Coagulase-Negative *Staphylococci*.** *J. Clin. Microbiol.,* 43, 2286-2290.
- Heilmann C, Hussain M, Peters G, Götz F. (1997). **Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface.** *Mol Microbiol.* 24, 1013-24.
- Hell, W., Meyer, H. G. e Gatermann, S. G. (1998). **Cloning of *aas*, a gene encoding a *Staphylococcus saprophyticus* surface protein with adhesive and autolytic properties.** *Mol. Microbiol.* 29, 871-881.
- Helmholtz, H.F. (1941). *Mayo Clin Proc* 16,145.
- Higashide, M., Kuroda, M., Ohkawa, S. e Ohta, T. (2006). **Evaluation of a cefoxitin disk diffusion test for the detection of *mecA*-positive methicillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus*.** *Int J Antimicrob Agents.* 27,500 504.
- Higashide, M., Kuroda, M., Omura, C.T.N., Kumano, M., Ohkawa, S., Ichimura, S. e Ohta, T. (2008). **Methicillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus* isolates carrying staphylococcal cassette chromosome *mec* have emerged in urogenital tract infections.** *Antimicrobial agents and chemotherapy,* 52(6), 2061-2068.
- Hillebrand, L., Harmanli, O.H., Whiteman, V., Khandelwal, M. (2002). **Urinary tract infections in pregnant women with bacterial vaginosis.** *Am J Obstet Gynecol.* 186, 916–917.
- Hiramatsu, K., Katayama, Y., Yuzawa, H. e Ito, T. (2002). **Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *International journal of medical microbiology.* 292, 67-74.
- Hirota, S., Sasaki, T., Kuwahara-Arai, K. e Hiramatsu, K. (2011). **Rapid and accurate identification of human-associated *staphylococci* by use of multiplex PCR.** *J. Clin. Microbiol.* 49, 3627-31.
- Hoberman, A., Greenfield, S.P., Mattoo, T.K., Keren, R., Mathews, R., Pohl, H.G., Kropp, B.P., Skoog, S.J., Nelson, C.P., Moxey-Mims, M., Chesney, R.W. e Carpenter, M.A. (2014). **Antimicrobial prophylaxis for children with vesicoureteral reflux.** *N Engl J Med.* 370, 2367–2376.
- Hoffman, L.R., D'Argenio, D.A., MacCoss, M.J., Zhang, Z., Jones, R.A., Miller, S.I. (2005). **Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation.** *Nature* 436, 1171–1175.
- Hogan S., Stevens, N. T., Humphreys H., O'Gara J. P. e O'Neill E. (2015) **Current and future approaches to the prevention and treatment of staphylococcal medical device-related infections.** *Curr. Pharm. Des* 21, 100–113.
- Hooton, T. M. (2012). **Uncomplicated urinary tract infection.** *New Engl. J. Med.* 366, 1028–1037.

- Horvath, D. J. Jr *et al.* (2011). **Morphological plasticity promotes resistance to phagocyte killing of uropathogenic *Escherichia coli*.** *Microbes Infect.* 13, 426–437.
- Houston P, Rowe SE, Pozzi C, Waters EM, O'Gara JP. (2011). **Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype.** *Infection and Immunity.* 79, 1153–65.
- Huebner, J. e Goldmann, D. A. (1999). **Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens.** *Annu Ver. Med.* 50, 223-36.
- Hussain, Z., Stoakes, L., Massey, V., Diagre, D., Fitzgerald, V., EL Sayed, S. e Lannigan, R. (2000). **Correlation of oxacillin MIC with *mecA* gene carriage in coagulase-negative staphylococci.** *J Clin Microbiol.* 38, 752–754.
- Ikaheimo, R., Siitonen, A., Heiskanen, T., Kärkkäinen, U., Kuosmanen, P., Lipponen, P., Mäkelä, P.H. (1996). **Recurrence of urinary tract infection in a primary care setting: analysis of a 1-year follow-up of 179 women.** *Clin Infect Dis.* 22, 91-9.
- International Working Group on the Classification of *Staphylococcal* Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). (2016). **Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements.** *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 4961–4967.
- Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K: (2001). **Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*.** *Antimicrob Agents Chemother,* 45, 1955–1963.
- Iwatsuki, K., Yamasaki, O., Morizane, S. e OONO, T. (2006). ***Staphylococcal* cutaneous infections: invasion, evasion and aggression.** *J. Dermatol. Sci.* 42, 203-214.
- Izano, E.A., Amarante, M.A., Kher, W.B., Kaplan, J.B. (2008). **Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms.** *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 470–476.
- J. Savage, Victoria *et al.* (2016). **Biological profiling of novel tricyclic inhibitors of bacterial DNA gyrase and topoisomerase IV.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 7, 1905-1913.
- Justice, S. S., Hunstad, D. A., Cegelski, L. e Hultgren, S. J. (2008). **Morphological plasticity as a bacterial survival strategy.** *Nature Rev. Microbiol.* 6, 162–168.
- Kaplan, J. B., Lovetri, K., Cardona, S. T., Madhyastha, S., Sadovskaya, I., JAbbouri, S. e Izano, E. A. (2012). **Recombinant human DNase I decreases biofilm and increases antimicrobial susceptibility in staphylococci.** *J. Antibiot.* 65, 73-77.
- Karlowsky, J. A, Jones, M. E., Thornsberry, C., Critchley, I., Kelly, L. J. e Sahm, D. F. (2001). **Prevalence of antimicrobial resistance among urinary tract pathogens isolated from female outpatients across the US in 1999.** *Int. J. Antimicrobial Agents.* 18, 121-127.
- Karahan, Z.C., Tekeli, A., Adaleti, R., Koyuncu, E., Dolapci, I. e Akan, O. (2008). **A Investigation of Panton-Valentine leukocidin genes and SCC*mec* types in clinical *Staphylococcus aureus* isolates from Turkey.** *Microb Drug Resist.* 14, 203–210.
- Kelley, W.L. (2006). **Lex marks the spot: the virulent side of SOS and a closer look at the LexA regulon.** *Mol Microbiol* 62, 1228–1238.
- Kim, J., Kim, C., Hacker, J., Ziebuhr, W., Lee, B. K., Cho, S. (2008). **Molecular characterization of regulatory genes associated with biofilm variation in a *Staphylococcus aureus* strain.** *J Microbiol Biotechnol.* 18, 28-34.
- King, N. P., Sakinç, T., Zakour, N.L.B., Totsika, M., Heras, B., Simerska, P., Shepherd, M., Gatermann, S. G., Beatson, S. A. e Schembri, M. A. (2012). **Characterisation of a cell wall-anchored protein of *Staphylococcus saprophyticus* associated with linoleic acid resistance.** *BMC Microbiol.* 12, 8.
- Kline, K.A., e Lewis, A.L. (2016). **Gram-Positive Uropathogens, Polymicrobial Urinary Tract Infection, and the Emerging Microbiota of the Urinary Tract.** *Microbiology spectrum.* 4,2.
- Kline, K.A., Ingersoll, M.A., Nielsen, H V., Sakinc, T., Henriques-Normark, B., Gatermann, S., Michael, G., Caparon, e Hultgren, S.J. (2010). **Characterization of a novel murine model of *Staphylococcus***

- saprophyticus* urinary tract infection reveals roles for Ssp and SdrI in virulence. Infection and immunity. 78, 1943-1951.
- Kloos, W. E. e Bannerman, T. L. (1999). *Staphylococcus and Micrococcus*. In: Manual of Clinical Microbiology. Edited by Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, F.C. e Tenover, R.H. ASM. , 264-282.
- Kloos, W. E. e Schleifer, K. H. (1986). **Genus IV. *Staphylococcus* Rosenbach 1884**. Bergey's Manual of Systemic Bacteriology, 2.
- Kohanski, M., DePristo, M., Collins, J. (2010). **Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis**. Mol Cell. 37, 311–320.
- Koksal, F., Yasar, H., Samasti, M., (2009). **Antibiotic resistance patterns of coagulase-negative *Staphylococcus* strains isolated from blood cultures of septicemic patients in Turkey**. Microbiol. ReS. 164, 404-10.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Tenover, J.C. (2008). **Diagnóstico microbiológico**. Texto e Atlas colorido. 6 a ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 551-579.
- Kresken, M., Hafner, D. (1999). **Drug resistance among clinical isolates of frequently encountered bacterial species in central Europe during 1975– 1995**. Infection 27(Suppl 2), S2–S8.
- Kuroda, M., Yamashita, A., Hirakawa, H., Kumano, M., Morikawa, K., Higashide, M., Maruyama, A., Inose, Y., Matoba, K., Toh, H., Kuhara, S., Hattori, M. e Ohta, T. (2005). **Whole genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection**. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 102, 13272-7.
- Lagos, J., Alarcón, P., Benadof, D., Ulloa, S., Fasce, R., Tognarelli, J., Aguayo, C., Araya, P., Parra, B., Olivares, B., Hormazábal, J.C. e Fernández J. (2015). **Novel nonsense mutation in the *kata* gene of a catalase-negative *Staphylococcus aureus* strain**. Medical Microbiology. 47, 177-180.
- Lasa, I. e Penadés, J. R. (2006). **Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation**. Research in microbiology, 157, 99-107.
- Latham, R.H., K. Running, e W.E. Stamm. (1983). **Urinary tract infections in young adult women caused by *Staphylococcus saprophyticus***. 250, 3063-3066.
- Lazar, V. e Chifiriuc, M.C. (2010). **Architecture and physiology of microbial biofilms**. Roum Arch Microbiol Immunol. 69, 95–107.
- Legeay, G., Poncin-Epaillard, F. e Arciola, C.R. (2006). **New surfaces with hydrophilic/hydrophobic characteristics in relation to (no)bioadhesion**. Int J Artif Organs. 29, 453-61.
- Li, H., Xu, L., Wang, J., Wen, Y., Vuong, C., Otto, M. e Gao, Q. (2005). **Conversion of *Staphylococcus epidermidis* strains from commensal to invasive by expression of the *ica* locus encoding production of biofilm exopolysaccharide**. Infect Immun 73,3188 –3191.
- Li, D., Renzoni, A., Estoppey, T., Bisognano, C., Francois, P., Kelley, W.L., Lew, D.P., Schrenzel, J. e Vaudaux, P. (2005). **Induction of fibronectin adhesins in quinolone-resistant *Staphylococcus aureus* by subinhibitory levels of ciprofloxacin or by sigma B transcription factor activity is mediated by two separate pathways**. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 916–924.
- Lim, Y. (2013). **Predictive genetic risk markers for strong biofilm-forming *Staphylococcus aureus*: *fnbB* gene and SCCmec type III**, Diagn Microbiol Infect Dis
- Lindsay, E.N. (2005). **Managing recurrent urinary tract infections in women**. Womens Health 1, 39–50.
- Liu, J., Chen, D., Peters, B.M., Li, L., Li, B., Xu, Z., e Shirliff, M. E. (2016). **Staphylococcal chromosomal cassettes *mec* (SCCmec): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. Microbial Pathogenesis. 101, 56-67.
- Lo, D. S., Shieh, H. H., Barreira, E. R., Ragazzi, S. L. B. e Gilio, A. E. (2015). **High Frequency of *Staphylococcus Saprophyticus* Urinary Tract Infections Among Female Adolescents**. The Pediatric infectious disease journal. 34, 1023-1025.
- Lohr, J.A, Nunley, D.H, Howards, S.S. e Ford, R.F. (1977). **Prevention of recurrent urinary tract infections in girls**. Pediatrics 59, 562-565.
- López, D., Vlamakis, H. e Kolter, R. (2010). **Biofilm**. Cold Spring Harb. Perspect Biol. 2, a000398.

- Lorian, V., Gemmell, C.G. (1991). **Effect of low antibiotic concentrations on bacteria: effects on ultra-structure, virulence, and susceptibility to immuno-defenses.** In *Antibiotics in Laboratory Medicine*, edn 3. Edited by Lorian V. Williams e Wilkins. 493-555.
- Lowy, F.D. (2001). **Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*.** *J Clin Invest.* 111, 1265-1273
- Lowy, F.D. (1998). ***Staphylococcus aureus* infections.** *N. Engl.J.Med.* 339, 520–532.
- LPSN. **List of prokaryotic names with standing in nomenclature – Genus *Staphylococcus*.** Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>, acessado em 05 de dezembro de 2016.
- Lowy, F.D. (2003). **Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*.** *J Clin Invest.* 111, 1265-1273
- Lyytikäinen, O., Vaara, M., Järviluoma, E., Rosenqvist, K., Tiittanen, L. e Valtonen, V. (1996). **Increased resistance among *Staphylococcus epidermidis* isolates in a large teaching hospital over a 12-year period.** *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. DiS.* 15,133–138.
- Ma, X.X., Wang, E.H., Liu, Y. e Luo, E.J. (2011). **Antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci (CoNS): emergence of teicoplanin-non-susceptible CoNS strains with inducible resistance to vancomycin.** *J Med Microbiol.* 60, 1661–1668.
- Mai-Prochnow, A., Lucas-Elio, P., Egan, S., Thomas, T., Webb, J.S., Sanchez-Amat, A. e Kjelleberg, S. (2008). **Hydrogen peroxide linked to lysine oxidase activity facilitates biofilm differentiation and dispersal in several Gram-negative bacteria.** *J. Bacteriol.* 190, 5493–5501.
- Małyżsko, I., Schwarz, S. e Hauschild, T. (2014). **Detection of a new *mecC* allotype, *mecC2*, in methicillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus*.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 43.
- Martineau, F., Picard, F.J., Christian Ménard, C., Roy, P.H., Ouellette, M. e Bergeron, M. G. (2000). **Development of a Rapid PCR Assay Specific for *Staphylococcus saprophyticus* and Application to Direct Detection from Urine Samples.** *J. Clin. Microbio.,* 38, 3280–3284.
- Martineau, F., Picard, F.J., Danbing, K.E., Paradis, S., Roy, P.H., Ouellette, M. e Bergeron, M. G. (2001). **Development of a PCR Assay for Identification of *Staphylococci* at Genus and Species Levels.** *J. Clin. Microbiol.* 39, 2541–2547.
- Martineau, F., Picard, F.J., Roy, P.H., Ouellette, M. e Bergeron, M.G. (1998). **Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*.** *J. Clin. Microbiol.,* 36, 618-23.
- Martineau, F., Picard, F. J., Roy, P. H., Ouellette, M. e Bergeron, M.G. (1996). **Species-specific and ubiquitous DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*.** *J. Clin. Microbiol.,* 34, 2888-93.
- Mason, W. J., Blevins, J. S., Beenken, K., Wibowo, N., Ojha, N. e Smeltzer, M.S. (2001). **Multiplex PCR protocol for the diagnosis of staphylococcal infection.** *J. Clin. Microbiol.* 39, 3328-3332.
- Mehnert-Kay, S.A. (2005). **Diagnosis and management of uncomplicated urinary tract infections.** *American Family Physician.* 72, 451-6.
- Merino, N., Toledo-Arana, A., Vergara-Irigaray, M., Valle, J., Solano, C. e Calvo, E. (2009). **Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*.** *J Bacteriol.* 191, 832–843.
- Milheiro, C., Oliveira, D.C. e de Lencastre, H. (2007). **Update do the multiplex PCR strategy for assignment for *mec* element in *Staphylococcus aureus*.** *Antimicrob Agents Chemother.* 51, 3374-77.
- Morales, M., Mendez-Alvarez, S., Martin-Lopes, J.V., Marreiro, C. e Freytes, C.O. (2004). **Biofilm: the microbial —bunker for intravascular catheter-related infection.** *Support Care Cancer.* 12, 701-07.
- Murakami, K., Minamide, W., Wada, K., Nakamura, E., Teraoka, H. e Watanabe, S. (1991). **Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction.** *J Clin Microbiol.,* 29, 2240– 2244.
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Kobayashi, G.S. e Pfaller, M.A. (2004). **Microbiologia Médica. 4^a ed.** Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 188.

- Naber, K.G., Cho, Y.H., Matsumoto, T. e Schaeffer, A.J. (2009). **Immunoactive prophylaxis of recurrent urinary tract infections: A meta-analysis.** *Int J Antimicrob Agents.* 33, 111–119.
- Nerurkar, Dr. Alka, Solanky, Dr. Priti, Naik e Dr. Shanta S. (2012). **Bacterial pathogens in urinary tract infection and antibiotic susceptibility pattern.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences.* 1-3.
- Nickel, J.C. (2005). **Practical management of recurrent urinary tract infections in premenopausal women.** *Rev Urol* 7,11–17.
- Nicolle, L., Anderson, P.A.M., Conly, J., Mainprize, T.C., Meuser, J., Nickel, J.C., Senikas, V.M. e Zhanel G.G. (2006). **Uncomplicated urinary tract infection in women.** *Can. Fam. Phys.* 52, 612–618.
- Nuryastuti, T., Krom, B.P., Aman, A.T., Busscher, H.J. e Van der Mei, H.C. (2011). **Ica-expression and gentamicin susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* biofilm on orthopedic implant biomaterials.** *J Biomed Mater Res Part A.* 96, 365–371.
- O'Neill, E., Pozzi, C., Houston, P., Humphreys, H., Robinson, D.A., Loughman, A., Foster, T.J. e O'Gara, J.P. (2008). **A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB.** *J. Bacteriol.* 190, 3835–3850.
- O'Gara, J.P., Humphreys, H. (2001). ***Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications.** *J Med Microbiol.* 50,582-587.
- Oliveira, C. F. D., Cavanagh, J. P., Fredheim, E. G. A., Reiter, K. C., Rieger, A., Klingenberg, C. e Sollid, J. E. (2016). **Coagulase-negative staphylococci in Southern Brazil: looking toward its high diversity.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 49, 292-299.
- Oliveira, D. C., e de Lencastre, H. (2002). **Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *Antimicrobial agents and chemotherapy,* 46, 2155-2161.
- Orden-Martínez, B., Martínez-Ruiz, R. e Millán-Pérez, R. (2008). **What are we learning about *Staphylococcus saprophyticus*?** *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 26, 495–9.
- Otto, M. (2008). ***Staphylococcal* biofilms.** *Curr. Top. Microbiol. Immunol.,* 322, 207-228.
- Otto, M. (2012). ***Staphylococcal* infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity.** *Ann Rev Med.* 64, 175-188.
- Piette, A. e Verschraegen, G. (2008). **Role of coagulase-negative *staphylococci* in human disease.** *Vet Microbiol.* 134, 45-54.
- Potter, A., Ceotto, H., Giambiagi-deMarval, M., dos Santos, K. R. N., Nes, I. F. e de Freire Bastos, M. D. C. (2009). **The gene *bap*, involved in biofilm production, is present in *Staphylococcus* spp. strains from nosocomial infections.** *The Journal of Microbiology,* 47(3), 319-326.
- Pramodhini, S., Niveditha, S., Umadevi, S., Kumar, S. e Stephen, S. (2012). **Antibiotic resistance pattern of biofilm-forming uropathogens isolated from catheterized patients in Pondicherry.** *AMJ.* 7, 344-348.
- Purevdorj-Gage, B., Costerton, W.J. e Stoodley, P. (2005). **Phenotypic differentiation and seeding dispersal in non-mucoid and mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms.** *Microbiology.* 151, 1569–1576.
- Qin, T., Kang, H.Q., Ma, P., Li P.P., Huang, L.Y. e Gu, B. (2015). **SOS response and its regulation on the fluoroquinolone resistance.** *Annals of Translational Medicine.* 22, 1-17.
- Rachid, S., Ohlsen, K., Witte, W., Hacker, J. e Ziebuhr, W. (2000). **Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesion expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*.** *Antimicrob. Agents CH.* 44, 3357-3363.
- Ramotar, K., Woods, W. e Toye, B. (2001). **Oxacillin susceptibility testing of *Staphylococcus saprophyticus* using disk diffusion, agar dilution, broth microdilution, and the Vitek GPS-105 card.** *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 40, 203-205.
- Raz, R., Colodner, R. e Kunin, C.M. (2005). **Who Are You — *Staphylococcus saprophyticus*?** *Clin. Infect. Dis.* 40, 896-898.
- Reis, A.C.C., Santos, S.R.D.S., Souza, S.C.D., Saldanha, M.G., Pitanga, T.N., e Oliveira, R. R. (2016). **Ciprofloxacin resistance pattern among bacteria isolated from patients with community-acquired urinary tract infection.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo,* 58.

- Reid G, Bruce AW. (2001). **Selection of lactobacillus strains for urogenital probiotic applications.** J Infect Dis. 183 Suppl 1, S77-S80.
- Reid, G., Dols, J., Miller, W. (2009). **Targeting the vaginal microbiota with probiotics as a means to counteract infections.** Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 12,583-587.
- Reis, A. C. C., Santos, S. R. D. S., Souza, S. C. D., Saldanha, M. G., Pitanga, T. N., e Oliveira, R. R. (2016). **Ciprofloxacin resistance pattern among bacteria isolated from patients with community-acquired urinary tract infection.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 58.
- Rice, K.C., Mann, E.E., Endres, J.L., Weiss, E.C., Cassat, J.E., Smeltzer, M.S. e Bayles, K.W. (2007). **The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*.** Proc. Natl. Acad. Sci. 104, 8113–8118.
- Rocha, J.L., Tuon, F.F., Johnson, J.R. (2012). **Sex, drugs, bugs, and age: rational selection of empirical therapy for outpatient urinary tract infection in an era of extensive antimicrobial resistance.** Braz J Infect Dis.16, 115-21.
- Rohde, H., Burandt, E.C., Siemssen, N., Frommelt, L., Burdelski, C., Wurster, S., Scherpe, S., Davies, A. P., Harris, L.G., Horstkotte, M.A., Knobloch, J.K., Ragunath, C., Kaplan, J.B. e Mack, D. (2007). **Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections.** Biomaterials. 28, 1711-1720.
- Ronald, A.R., Nicolle, L.E., Stamm, E., Krieger, J., Warren, J., Schaeffer, A., Naber, K.G., Hooton, T. M., Johnson, J., Chambers, S. e Andriole, V. (2001). **Urinary tract infection in adults: research priorities and strategies.** Int. J. Antimicrobial Agents. 17, 343-48.
- Rupp, M.E., Soper, D.E. e Archer, G.L. (1992). **Colonization of the female genital tract with *Staphylococcus saprophyticus*.** J Clin Microbiol. 30, 2975–2979.
- Saaddeh, S.A. e Mattoo, T.K. (2011). **Managing urinary tract infections.** Pediatr Nephrol. 26,1967- 76.
- Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Flahaut, S., Kogan, G. e Jabbouri, S. (2005). **Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A.** Infect. Immun. 73, 3007-3017.
- Saint S, Chenoweth CE. **Biofilms and catheter-associated urinary tract infections.** Infect Dis Clin North Am 2003;17:411–32.
- Sakinc, T., Kleine, B. e Gatermann S.G. (2007). **Biochemical characterization of the surface-associated lipase of *Staphylococcus saprophyticus*.** FEMS Microbiol. Lett. 274, 335–341.
- Sakınç, T., Kleine, B. e Gatermann, S.G. (2006). **SdrI, a serine-aspartate repeat protein identified in *Staphylococcus saprophyticus* strain 7108, is a collagen binding protein.** Infect Immun., 74, 4615-4623.
- Sakınç, T., Kleine, B., Michalski, N., Kaase, M. e Gatermann, S.G. (2009). **SdrI of *Staphylococcus saprophyticus* is a multifunctional protein: localization of the fibronectin-binding site.** FEMS Microbiol Lett. 301, 28-34.
- Sakinc, T., Woznowski, M., Ebsen, M. e Gatermann, S.G. (2005). **The surface-associated protein of *Staphylococcus saprophyticus* is a lipase.** Infect Immun., 73, 6419-28.
- Sambanthamoorthy, K., Schwartz, A., Nagarajan, V. e Elasri, M.O. (2008). **The role of *msa* in *Staphylococcus aureus* biofilm formation.** BMC Microbiol. 8, 221.
- Santana, T.C., Pereira, E.M., Monteiro, S.G., Carmo, M.S., Turri, R.J., Figueiredo, P.M. (2012). **Prevalência e resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos de primeira escolha nas infecções do trato urinário no município de São Luís-MA.** Rev Patol Trop.;41:409-18.
- Santos, A.L., Santos, D.O., Freitas, C.C., Ferreira, B.L., 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.
- Schaeffer, A.J., Rajan, N., Cao, Q., Anderson, B.E., Pruden, D.L., Sensibar, J. e Duncan, J.L. (2001). **Host pathogenesis in urinary tract infection** Int J Antimicrob Agents. 17, 245-51.
- Schlundt, J. (2001). **Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria.** Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria.

- Scholes, D., Hooton, T.M., Roberts, P.L., Stapleton, A.E., Gupta, K e Stamm, W.E. (2000). **Risk factors for recurrent UTI in young women.** J. Infect. Dis. 182, 1177-1182.
- Shao, H.F., Wang, W.P., Zhang, X.W., Li, Z.D. (2003). **Distribution and resistance trends of pathogens from urinary tract infections and impact on management.** Zhonghua Nan Ke Xue. 9, 690–692, 696.
- Sharami, S.H., Afrakhteh, M. e Shakiba, M. (2007). **Urinary tract infections in pregnant women with bacterial vaginosis.** J Obstet Gynaecol. 27, 252–254.
- Simojoki, H., Hyvönen, P., Ferrer, C. P., Taponen, S. e Pyörälä, S. (2012). **Is the biofilm formation and slime producing ability of coagulase-negative staphylococci associated with the persistence and severity of intramammary infection?** Veterinary microbiology, 158, 344-352.
- Smellie, J.M., Hodson, C.J., Edwards, D. e Normand, I.C.S. (1964). **Clinical and radiological features of urinary tract infection in childhood.** Br Med J. 2, 1222–1226.
- Smith, K., Perez, A., Ramage, G., Lappin, D., Gemmell, C. G. e Lang, S. (2008). **Biofilm formation by scottish clinical isolates of *Staphylococcus aureus*.** J Med Microbiol. 57, 1018-1023.
- Söderquist, B., e Berglund, C. (2009). **Methicillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus* in Sweden carries various types of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*).** Clinical Microbiology and Infection, 15, 1176-1178.
- Sonstein, S.A. e Burnham, J.C. (1993). **Effect of low concentrations of quinolone antibiotics on bacterial virulence mechanisms.** Diagnostic microbiology and infectious disease. 16, 277-289.
- Speziale, P., Pietrocola, G., Foster T. J. e Geoghegan J. A. (2014). **Protein-based biofilm matrices in *Staphylococci*.** Front Cell Infect Microbiol. 4, 171.
- Stamm, W.E. e Norrby, S.R. (2001). **Urinary tract infections: disease panorama and challenges.** J. Infect. DiS. 183 (Suppl. 1), S1–S4.
- Stapleton, A.E. (2014). **Urinary Tract Infection Pathogenesis: Host Factors.** Infect Dis Clin N Am., 28, 149–59.
- Stapleton, A.E., Au-Yeung, M., Hooton, T.M., Fredricks, D.N., Roberts, P.L., Czaja, C.A e Stamm, W.E. (2011). **Randomized, placebo-controlled phase 2 trial of a *Lactobacillus crispatus* probiotic given intravaginally for prevention of recurrent urinary tract infection.** Clinical infectious diseases. 52, 1212-1217.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola, V., Bonaventura, G., Djukic, S., Cirkovic, I. e Ruzicka, F. (2007). **Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci.** Apmis. 115, 891-899.
- Stickler, D. J. e Morgan, S. D. (2008). **Observations on the development of the crystalline bacterial biofilms that encrust and block Foley catheters.** Journal of Hospital Infection, 69(4), 350-360.
- Sumati, A.H. e Saritha, N.K. (2009). **Association of urinary tract infection in women with bacterial vaginosis.** J Glob Infect Dis. 1,151–152.
- Swenson, J.M. e Tenover, F.C. (2005). **Cefoxitin disk study group. Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp.** J Clin Microbiol., 43, 3818–3823.
- Sweson, J.M. e Tenover F.C. (2005). **Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp.** J Clin Microbiol. 43, 3818-23.
- Tandogdu, Z., Cek, M., Wagenlehner, F., Naber, K., Tenke, P. e van Ostrum, E. (2014). **Resistance patterns of nosocomial urinary tract infections in urology departments: 8-year results of the global prevalence of infections in urology study.** World J Urol. 32,791–801.
- Tang, K., e Zhang, X.H. (2014). **Quorum quenching agents: resources for antivirulence therapy.** Mar. Drugs. 12, 3245–3282.
- Thaker, M.N., Wang, W., Spanogiannopoulos, P., Waglechner, N., King, A.M., Medina, R., e Wright, G. D. (2013). **Identifying producers of antibacterial compounds by screening for antibiotic resistance.** Nat. Biotechnol. 31, 922–927.
- Tong, S.Y.C., Schaumburg, F., Ellington, M.J., Corander, J., Pichon, B., Leendertz, F., Bentley, S.D., Parkhill, J., Holt, D.C., Peters, G. e Giffard, P.M. (2015). **Novel *staphylococcal* species that form part of a *Staphylococcus aureus*-related complex: the non-pigmented *Staphylococcus argenteus* sp. nov. and the**

- non-human primate-associated *Staphylococcus schweitzeri* sp. nov.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65, 15-22.
- Tormo, M.A., Knecht, E., Gotz, F., Lasa, I. e Penadés, J.R. (2005). **Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: Evidence of horizontal gene transfer?** Microbiol. 151, 2465–2475.
- Tremblay, Y. D., Lamarche, D., Chever, P., Haine, D., Messier, S. e Jacques, M. (2013). **Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms.** Journal of dairy science, 96, 234-246.
- Vadyvaloo, V. e Otto, M. (2005) **Molecular genetics of *Staphylococcus epidermidis* on indwelling medical devices.** Int J Artf Organs. 28, 1069-78.
- Valiquette, L. (2001). **Urinary tract infections in women.** Can J Urol. 8, 6–12.
- Vautor, E., Abadie, G., Pont, A. e Thiery, R. (2008). **Evaluation of the presence of the bap gene in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from human and animals species.** Veterinary microbiology, 127(3), 407-411.
- Vivoni, A. M., Diep, B. A., de Gouveia Magalhães, A. C., Santos, K. R., Riley, L. W. e Sensabaugh G. F. (2006). **Clonal composition of *Staphylococcus aureus* isolates at a Brazilian university hospital: identification of international circulating lineages.** J. Clin. Microbiol. 44, 1686–1691.
- Vosti, K.L. (2007). **Aprospective, longitudinal study of the behavior of serologically classified isolates of *Escherichia coli* in women with recurrent urinary tract infections.** J Infect. 55, 8–18.
- Vuong, C., Kocianova, S., Yao, Y., Carmody, A.B. e Otto M. (2004). **Increased colonization of indwelling medical devices by quorum-sensing mutants of *Staphylococcus epidermidis* in vivo.** J Infect Dis 190 1498–1505.
- Wagenlehner, F.M., Weidner, W. e Naber, K.G. (2009). **An update on uncomplicated urinary tract infections in women.** Curr Opin Urol. 19, 368-374.
- Wang, H., Dzink-Fox, J.L., Chen, M. e Levy, S.B. (2001). **Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: role of *acrR* mutations.** Antimicrob Agents Chemother. 45,1515–21.
- Wang, Q., Sun, F.J., Liu, Y., Xiong, L.R., Xie, L. L., e Xia, P.Y. (2010). **Enhancement of biofilm formation by subinhibitory concentrations of macrolides in *icaADBC*-positive and-negative clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*.** Antimicrob Agents CH. 54, 2707-2711.
- Whiteside, S. A., Razvi, H., Dave, S., Reid, G. e Burton, J. P. (2015). **The microbiome of the urinary tract [mdash] a role beyond infection.** Nature Reviews Urology, 12, 81-90.
- York, M.K., Gibbs, L., Cheahab, F. e Brooks, G.F. (1996). **Comparison of PCR detection of *mecA* with standard susceptibility testing methods to determine methicillin resistance in coagulase-negative *Staphylococci*.** J. Clin. Microbiol. 34, 249-253.
- Yousefi, M., Pourmand, M. R., Fallah, F., Hashemi, A., Mashhadi, R. e Nazari-Alam, A. (2016). **Characterization of *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation in Urinary Tract Infection.** Iranian journal of public health, 45(4), 485.
- Zong, Z., Peng, C. e Lü X. (2011). **Diversity of SCC*mec* elements in methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococci* clinical isolates.** PLoS ONE. 6, 20191.