

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Isabella Monteiro Carvalho

**Comparação da virulência e potencial terapêutico da fagoterapia  
em cepas ambientais e clínicas de *Staphylococcus saprophyticus***

RIO DE JANEIRO  
2025



Isabella Monteiro Carvalho

## **Comparação da virulência e potencial terapêutico da fagoterapia em cepas ambientais e clínicas de *Staphylococcus saprophyticus***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências (Microbiologia).

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Marcia Giambiagi de Marval  
Coorientador: Dr. Ciro César Rossi

RIO DE JANEIRO

2025

**FICHA CATALOGRÁFICA****CIP - Catalogação na Publicação**

C331c Carvalho, Isabella Monteiro  
Comparação da virulência e potencial terapêutico da fagoterapia em cepas ambientais e clínicas de *Staphylococcus saprophyticus* / Isabella Monteiro Carvalho. -- Rio de Janeiro, 2025.  
89 f.

Orientadora: Marcia Giambiagi-deMarval.  
Coorientador: Ciro César Rossi.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), 2025.

1. *Staphylococcus saprophyticus*. 2. Baía de Guanabara. 3. Virulência. 4. Bacteriófagos. 5. *Tenebrio molitor*. I. Giambiagi-deMarval, Marcia, orient. II. Rossi, Ciro César, coorient. III. Título.



## UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Centro de Ciências da Saúde

Instituto de Microbiologia Paulo de Góes

Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia)

### ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS (MICROBIOLOGIA) PARA A CONCESSÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA)

REALIZADA EM: 15 de abril de 2025

CANDIDATO(A): Isabella Monteiro Carvalho

**BANCA EXAMINADORA:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lucia Martins Teixeira (Presidente)  
 Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Raiane Cardoso Chamon (Membro Externo)  
 Prof. Dr. André Luis Souza dos Santos (Titular Interno)  
 Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Eliane de Oliveira Ferreira (Titular/Revisor)

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** “Comparação da virulência e potencial terapêutico da fagoterapia em cepas ambientais e clínicas de *Staphylococcus saprophyticus*”.

**LOCAL:** Sala de Seminários do Departamento de Microbiologia Médica

**HORA DE INÍCIO:** 13:00 horas

Em sessão pública, após a exposição oral do conteúdo referente ao trabalho de dissertação de Mestrado, o(a) candidato(a) foi arguido pelos membros da Banca. Após deliberação, a banca avaliadora resolve:

aprovar.

aprovar, condicionado à(s) exigência(s) formulada(s) pela Banca\*\*\* (Resolução CEPG N° 1 de 01/12/2006, Artigo 57, Parágrafo 3º)

reprovar.

Na forma regulamentar, foi lavrada a presente Ata que é assinada pelos membros da Banca, orientador(es), candidato(a) e coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia).

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lúcia Martins Teixeira (Presidente da Banca)

Rio de Janeiro, 15 de abril de 2025.

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marcia Giambiagi de Marval (Orientadora)

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Raiane Cardoso Chamon (Titular externo)

Candidato(a): Isabella Monteiro Carvalho

Prof. Dr. André Luis Souza dos Santos (Titular interno)

Coordenadora do PPG-MICRO:  
 Prof.ª. Dra. Alessandra D'Almeida Filardy

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Eliane de Oliveira Ferreira (Titular/Revisor)

\*\*\* A(s) exigência(s) foi(foram) cumprida(s) e aprovada(s) pelo Presidente da Banca em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_.

\_\_\_\_\_ (assinatura do presidente).

## Agradecimentos

Agradeço, antes de tudo, a Deus, pela força, sabedoria e saúde física e mental que me permitiram superar os desafios desta jornada. Sem a Sua presença constante em minha vida, este sonho não teria se tornado realidade. Foi Ele quem me guiou e me presenteou com pessoas extraordinárias para me apoiar em cada etapa. Como nos ensina a Escritura: “*Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos*” (**Provérbios 16:3**).

À minha família, em especial à minha mãe, **Jamile**, ao meu pai, **Luiz**, à minha avó, **Marlene**, e ao meu avô, **Jamil** (*in memoriam*), minha eterna base e inspiração. Obrigada por sempre acreditarem em mim e por nunca pouparem esforços para me ajudar a alcançar meus objetivos. Aos meus irmãos, **Guilherme**, **Lucca** e **Benício**, meu mais profundo agradecimento. Esta conquista também é de vocês! Obrigada por estarem ao meu lado nos momentos mais difíceis, me apoiando e me incentivando a seguir em frente. Amo todos vocês!

A minha querida tia **Márcia**, por me receber com tanto amor e carinho no Rio de Janeiro, permitindo que eu pudesse vir e realizar este sonho. Seu apoio foi fundamental em minha trajetória.

Ao meu namorado e melhor amigo, **Luiz Eduardo**, meu profundo agradecimento. Obrigada por ser meu porto seguro, por cada palavra de incentivo, por me ajudar a não desistir dos meus sonhos e por tornar os momentos mais leves com suas risadas e companhia. Sua paciência, compreensão e apoio foram essenciais. Eu te amo muito! Agradeço também à sua família, que sempre me acolheu com carinho, como uma filha, oferecendo suporte em todos os momentos.

À minha melhor amiga **Aline**, que é como uma irmã para mim. Obrigada por estar sempre ao meu lado, mesmo à distância, me apoiando, enviando mensagens de força e intercedendo por mim. Você é um verdadeiro presente em minha vida. A todos os amigos que torceram, incentivaram e demonstraram preocupação ao longo desses anos de estudo, meu sincero agradecimento. Cada palavra de encorajamento foi valiosa e me ajudou a prosseguir com mais confiança.

Com muita admiração e carinho, agradeço à minha orientadora, **Prof. Dra. Marcia Giambiagi**, por sua incansável dedicação, paciência e apoio. Desde o momento em que cheguei ao IMPG, sua receptividade e disponibilidade foram essenciais para que eu me sentisse acolhida e confiante. Obrigada por estar sempre pronta a ouvir, oferecer conselhos valiosos e acreditar no meu potencial. Seu comprometimento, seus ensinamentos e sua presença constante foram determinantes para a conclusão deste trabalho. Foi um privilégio e um verdadeiro presente tê-la como orientadora, sempre tão amável e atenciosa. Agradeço pela amizade, pelo exemplo de dedicação e pelo entusiasmo com que conduz seu trabalho, características que me inspiram profundamente.

Ao meu querido coorientador, **Prof. Dr. Ciro Rossi**, minha mais sincera gratidão. Sua presença constante, mesmo à distância, foi essencial em cada etapa deste trabalho. Agradeço pelas ideias valiosas, pelos esclarecimentos de dúvidas e pelas sugestões que enriqueceram este projeto. Sua orientação foi fundamental para o meu crescimento acadêmico e pessoal. Sou especialmente grata pela amizade e parceria que construímos ao longo dessa jornada. A forma como você demonstra amor pelo que faz e seu jeito sempre solícito são, para mim, uma referência de dedicação e inspiração profissional.

À professora **Dra. Marinella Laport**, manifesto minha profunda gratidão pela receptividade e pela constante disponibilidade em abrir as portas de seu laboratório para a realização deste trabalho.

À professora **Dra. Kátia Regina Netto**, minha sincera gratidão por sua dedicação e apoio. Sempre atenciosa, sua contribuição foi muito além de disponibilizar o laboratório e fornecer amostras fundamentais ao trabalho, mas também incentivo, conselhos valiosos e momentos de leveza. Agradeço por todo o suporte, pelas caronas e pelo cuidado em garantir que tudo transcorresse da melhor forma. Seu apoio foi indispensável e sua presença, um verdadeiro presente.

À revisora, **Dra. Eliane Ferreira**, expresse minha gratidão por suas valiosas sugestões e considerações, que contribuíram significativamente para o enriquecimento desta dissertação. Agradeço também pelo seu carinho, cuidado e constante disposição em me orientar, sempre pronta a ajudar para o aprimoramento deste trabalho.

À minha colega e amiga **Bruna** do LIH, pela troca de conhecimentos científicos, pela amizade tão especial, pelas conversas durante nossas viagens diárias ao Fundão e por toda a parceria.

À **Ana Luísa**, aluna de doutorado, minha sincera gratidão pela paciência, amizade e constante disposição em me auxiliar. Às técnicas de laboratório **Geovana** e **Natallia**, e à IC **Raienne**, meu muito obrigada pelo suporte imprescindível na realização deste trabalho, pela amizade e pelos momentos de descontração que tornaram a rotina mais leve.

Aos demais amigos do **Laboratório de Microbiologia Molecular**, muito obrigada pelo companheirismo ao longo desses dois anos e pela troca constante de conhecimento. Vocês tornaram a tarefa de concluir o mestrado mais leve e prazerosa. Aos colegas dos laboratórios **BMM14** e **LIH**, agradeço por estarem sempre prontos a ajudar, seja compartilhando experiências ou auxiliando nos desafios diários.

Aos professores da banca examinadora **André Luis dos Santos**, **Raiane Chamon** e **Lucia Teixeira**, meu sincero agradecimento por terem aceitado o convite e pelas sugestões e críticas construtivas que enriqueceram este trabalho. Vocês são grandes exemplos científicos, e sou muito grata pela presença de vocês neste momento.

Ao prestigiado **Instituto de Microbiologia Paulo de Góes**, meu sincero agradecimento pela oportunidade e suporte concedidos ao longo desta jornada acadêmica. Agradeço também a todos os funcionários e colaboradores do Instituto, em especial ao **Fabinho** e à **Tati**, da equipe de limpeza, sempre tão simpáticos e solícitos, e à **Safira** e ao **Eduardo**, da Secretaria da Pós, pelo auxílio constante nesses dois anos.

Por fim, expresso minha gratidão às agências de fomento **CNPq**, **CAPES** e **FAPERJ**, que forneceram todas as condições financeiras para produção deste trabalho

A todos vocês, meu mais profundo e sincero obrigada!



**UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro**  
**Instituto de Microbiologia Paulo de Góes**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências**  
**(Microbiologia)**

**TERMO DE CESSÃO DE DIREITOS AUTORAIS**  
**(press release)**

Pelo presente instrumento jurídico particular, Isabella Monteiro Carvalho, portador(a) da Cédula de Identidade nº 26.492.413-5, CPF nº 140.342.627-96, na condição legal de autor(a)/detentor(a) dos direitos autorais sobre o resumo de divulgação científica (*press release*) relacionado à dissertação/tese intitulada Comparação da virulência e potencial terapêutico da fagoterapia em cepas ambientais e clínicas de *Staphylococcus saprophyticus*, decide pelo presente Termo de Cessão de Direitos Autorais, em ceder total e gratuitamente ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG) – Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) sediado na Av. Carlos chagas Filho 373, CCS – bloco I, CEP 21941-902, CNPJ nº 33.663.683/0001-16, os direitos patrimoniais e de autor referentes à obra criação supramencionada, em caráter permanente, irrevogável e **NÃO EXCLUSIVO**, todos os direitos patrimoniais **NÃO COMERCIAIS** de utilização da obra artística e/ou científica, inclusive os direitos de voz, imagem e conexos vinculados à OBRA, em qualquer idioma e em todos os países, de acordo com os Termos e Condições desta Cessão, restando claro que são devidos os respectivos créditos autorais em todas as utilizações da obra. A divulgação será realizada em diferentes plataformas (website, facebook, instagram) associadas ao IMPG e ao Programa de Pós- Graduação em Ciências (Microbiologia) do IMPG-UFRJ.

Rio de Janeiro, 13 de maio de 2025.

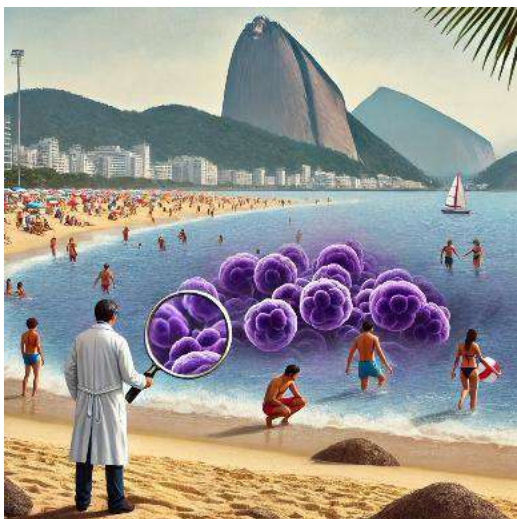
A handwritten signature in blue ink, consisting of a series of loops and flourishes, positioned above a horizontal line.

(Isabella Monteiro Carvalho)

## PRESS RELEASE

### Águas contaminadas podem abrigar bactérias perigosas para a saúde

Imagine um dia quente, perfeito para um mergulho refrescante. Mas e se a água onde você nada escondesse perigos invisíveis? Uma pesquisa realizada pelo Laboratório de Microbiologia Molecular da UFRJ revelou que as águas da Baía de Guanabara podem conter bactérias capazes de causar infecções, colocando em risco a saúde de quem frequenta a região. *Staphylococcus*



*saprophyticus*, que normalmente vive na pele e no trato urinário das pessoas sem causar problemas, é um bom exemplo. No entanto, em certas condições, essa bactéria pode se tornar agressiva e provocar infecções urinárias, principalmente em mulheres jovens. Nosso estudo comparou bactérias coletadas na Baía de Guanabara com aquelas encontradas em pacientes hospitalares e descobriu algo preocupante: as bactérias do meio ambiente eram tão perigosas quanto as que causam infecções nos hospitais. Isso

significa que entrar em contato com essa água contaminada pode ser um risco real. Outro alerta veio da interação das bactérias com antibióticos. O estudo mostrou que quando expostas a pequenas quantidades do medicamento ciprofloxacino, as bactérias criavam uma espécie de "escudo protetor", chamado de biofilme. Esse escudo torna os micro-organismos mais resistentes aos tratamentos, dificultando sua eliminação. Mas há esperança! Nossa pesquisa testou bacteriófagos, que são vírus naturais que atacam e destroem bactérias, sem afetar os seres humanos. Alguns desses vírus foram capazes de reduzir significativamente a capacidade da bactéria de formar biofilme, abrindo caminho para alternativas ao uso excessivo de antibióticos. Esses achados reforçam a importância de monitorar a qualidade da água, especialmente em locais onde há contato direto com o ambiente contaminado. Além disso, para tentar reverter esse cenário, medidas de saneamento vêm sendo implementadas na Baía de Guanabara, incluindo a ampliação da coleta e tratamento de esgoto, a remoção de resíduos sólidos e o controle do despejo irregular de poluentes. Apesar dos desafios, essas iniciativas são essenciais para reduzir a contaminação e melhorar a qualidade da água, tornando-a mais segura para a população. A poluição da Baía de Guanabara não é apenas um problema visual ou ambiental, ela pode trazer consequências sérias para a saúde da população. Cuidar da qualidade da água significa proteger a saúde de todos.

## RESUMO

*Staphylococcus saprophyticus* é uma bactéria gram-positiva, catalase-positiva e coagulase-negativa que compõe a microbiota da pele e do trato geniturinário humano. Sob certas condições, pode se tornar um patógeno oportunista causando infecções do trato urinário (ITU), especialmente em mulheres jovens e sexualmente ativas. Apesar de sua ampla distribuição ambiental, poucos estudos investigaram a presença de genes associados à virulência ou o potencial patogênico desse organismo em isolados aquáticos. A Baía de Guanabara, localizada no Rio de Janeiro, é um corpo d'água com elevados níveis de poluição, utilizado para atividades recreativas e pesca, o que aumenta ainda mais o risco de exposição a patógenos ambientais. Assim, investigar os mecanismos de virulência de isolados aquáticos de *S. saprophyticus* é essencial para identificar potenciais ameaças à saúde, especialmente em áreas de intensa interação humana com o ambiente. O presente estudo teve como objetivo comparar a virulência de cepas de *S. saprophyticus* isoladas da Baía de Guanabara e de pacientes hospitalares no Rio de Janeiro. Foram analisadas 40 cepas (20 isoladas da Baía de Guanabara e 20 de pacientes clínicos), avaliando-se a presença de genes de virulência (*aas*, *ssp*, *ureC*, *dsdA*, *uafA*, *sssF* e *sdrI*) por PCR, a capacidade de formação de biofilme, o impacto de concentrações subinibitórias (Sub-CIM) de ciprofloxacino, a patogenicidade em modelo *in vivo* em larvas de *Tenebrio molitor* e o potencial terapêutico dos bacteriófagos. Os resultados demonstraram ampla distribuição dos genes de virulência nas cepas de ambas as origens, exceto pelo gene *sdrI*, que não foi detectado em nenhuma delas. A capacidade de formar biofilme foi observada em 95% das cepas, com maior aderência entre os isolados clínicos. A exposição a Sub-CIM de ciprofloxacino induziu aumento na formação de biofilme em 50% das cepas, com efeitos cepa dependente. Os testes de virulência em *T. molitor* revelaram que cepas aquáticas e clínicas apresentaram perfis patogênicos semelhantes e, a análise das curvas de sobrevivência não identificou diferenças significativas entre os grupos. Em relação à fagoterapia, três fagos testados demonstraram atividade lítica contra 57% das cepas avaliadas, enquanto um deles, o fago CSF, reduziu a formação de biofilme em 92,5% dos isolados, incluindo cepas não suscetíveis à lise. Os resultados deste estudo indicam que as cepas aquáticas de *S. saprophyticus* possuem potencial patogênico semelhante ao das cepas clínicas, representando um risco à saúde pública em águas recreativas da Baía de Guanabara. Esses achados ressaltam a importância do monitoramento ambiental e de estratégias de controle. Além disso, a pesquisa reforça o potencial da fagoterapia como uma abordagem promissora para o tratamento de infecções bacterianas.

**Palavras-chave:** Baía de Guanabara; Bacteriófagos; *Staphylococcus saprophyticus*; *Tenebrio molitor*; Virulência.

## ABSTRACT

*Staphylococcus saprophyticus* is a gram-positive, catalase-positive and coagulase-negative bacterium that is part of the normal microbiota of the human skin and genitourinary tract. Under certain conditions, it can become an opportunistic pathogen, causing urinary tract infections (UTIs), particularly in young sexually active women. Despite its widespread environmental distribution, few studies have investigated the presence of virulence-associated genes or the pathogenic potential of this organism in environmental isolates. Guanabara Bay, located in Rio de Janeiro, is a highly polluted water body used for recreational activities and fishing, increasing the risk of exposure to environmental pathogens. Thus, investigating the virulence mechanisms of environmental isolates of *S. saprophyticus* is essential for identifying potential health threats, especially in areas of intense human-environment interaction. This study aimed to compare the virulence of *S. saprophyticus* strains isolated from Guanabara Bay and hospital patients in Rio de Janeiro, Brazil. A total of 40 strains (20 from Guanabara Bay and 20 from clinical patients) were analyzed, evaluating the presence of virulence genes (*aas*, *ssp*, *ureC*, *dsdA*, *uafA*, *sssF*, and *sdrI*) by PCR method, biofilm formation capacity, the impact of subinhibitory concentrations (sub-MIC) of ciprofloxacin, pathogenicity in an *in vivo* model using *Tenebrio molitor* larvae, and the therapeutic potential of bacteriophages. The results demonstrated a widespread distribution of virulence genes in strains from both sources, except for the *sdrI* gene, which was not detected in any of the isolates. Also, biofilm formation capacity was observed in 95% of the strains, with greater adherence among clinical isolates. Exposure to sub-MIC ciprofloxacin induced an increase in biofilm formation in 50% of the strains, with strain-dependent effects. Virulence tests in *T. molitor* revealed that aquatic and clinical strains exhibited similar pathogenic profiles, and survival curve analysis showed no significant differences between the groups. Regarding phage therapy, three tested bacteriophages exhibited lytic activity against 57% of the evaluated strains, while one, phage CSF, reduced biofilm formation in 92.5% of the isolates, including strains not susceptible to lysis. The findings of the current study indicate that environmental *S. saprophyticus* strains possess pathogenic potential comparable to that of clinical strains, representing a public health risk in the recreational waters of Guanabara Bay. These results emphasize the importance of environmental monitoring and control strategies. Additionally, the research highlights the potential of phage therapy as a promising approach for treating bacterial infections.

**Keywords:** Guanabara Bay; Bacteriophages; *Staphylococcus saprophyticus*; *Tenebrio molitor*; Virulence.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Representação esquemática dos genes de virulência analisados neste estudo.....	6
<b>Figura 2</b> - O ciclo de formação de um biofilme bacteriano.....	11
<b>Figura 3</b> - Diferentes estágios de desenvolvimento de <i>T. molitor</i> .....	15
<b>Figura 4</b> - Ciclos replicativos dos fagos.....	23
<b>Figura 5</b> - Mapa dos pontos de coleta na Baía de Guanabara.....	28
<b>Figura 6</b> - Modelo de infecção por <i>T. molitor</i> .....	37
<b>Figura 7</b> - Distribuição das 40 cepas de <i>Staphylococcus saprophyticus</i> analisadas quanto à capacidade de formação de biofilme.....	41
<b>Figura 8</b> - Distribuição dos valores de DO <sub>570nm</sub> associados ao biofilme formado.....	43
<b>Figura 9</b> - Distribuição das concentrações inibitórias mínimas (CIM) de ciprofloxacino determinadas em meio BHI para as cepas de <i>S. saprophyticus</i> analisadas.....	44
<b>Figura 10</b> - Distribuição das concentrações inibitórias mínimas (CIM) de ciprofloxacino determinadas em meio MH para as cepas de <i>S. saprophyticus</i> analisadas.....	44
<b>Figura 11</b> - Capacidade de indução da formação de biofilme na presença de Sub-CIM de ciprofloxacino.....	45
<b>Figura 12</b> - Redução da formação de biofilme por <i>S. saprophyticus</i> na presença de Sub-CIM de ciprofloxacino.....	46
<b>Figura 13</b> - Curvas de sobrevivência de larvas de <i>T. molitor</i> infectadas com diferentes cepas de <i>S. saprophyticus</i> .....	47
<b>Figura 14</b> - Espectro lítico dos fagos CSF e LGN sobre a cepa clínica RC181.....	49
<b>Figura 15</b> - Distribuição das cepas conforme a porcentagem de redução na formação de biofilme na presença do fago CSF.....	50
<b>Figura 16</b> - Panorama geral dos resultados encontrados.....	50

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> - Características gerais das 40 cepas ( <i>S. saprophyticus</i> ) analisadas.....	29
<b>Tabela 2</b> - Características gerais das amostras utilizadas como controles nos testes.....	30
<b>Tabela 3</b> - Genes de virulência analisados por PCR das cepas de <i>S. saprophyticus</i> neste estudo.....	31
<b>Tabela 4</b> - Iniciadores utilizados para detecção de genes de virulência.....	32
<b>Tabela 5</b> - Parâmetros para classificação das cepas de <i>S. saprophyticus</i> quanto à produção de biofilme.....	35
<b>Tabela 6</b> - Distribuição dos genes de virulência nas cepas de <i>S. saprophyticus</i> nos grupos aquático e clínico.....	40
<b>Tabela 7</b> - Classificação das cepas de <i>S. saprophyticus</i> quanto à capacidade de produção de biofilme.....	42
<b>Tabela 8</b> - Espectro lítico dos bacteriófagos nas cepas de <i>S. saprophyticus</i> aquáticas e clínicas.....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- Aap** - Proteína associada à acumulação (do inglês: accumulation-associated protein)
- Aas** - Autolisina/Adesina de *S. saprophyticus* (do inglês: Autolysin/adhesin of *S. saprophyticus*)
- AMPs** - Peptídeos Antimicrobianos (do inglês: Antimicrobial Peptides)
- ATCC** - Coleção Americana de Culturas Tipo (do inglês: American Type Culture Collection)
- Bap** - Proteína Associada ao Biofilme (do inglês: Biofilm-Associated Protein)
- BHI** - Infusão de coração e cérebro (do inglês: Brain Heart Infusion)
- BG** - Baía de Guanabara
- CLSI** - Manual clínico e laboratorial de testes padrões (do inglês: Clinical and Laboratory Standard Institute)
- CIM** - Concentração inibitória mínima
- CIP** - Ciprofloxacino
- DNA** - Ácido desoxirribonucléico (do inglês: deoxyribonucleic acid)
- DsdA** - D-serina-deaminase
- DO** - Densidade óptica
- e-DNA** - DNA extracelular
- EDTA** - Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês: Ethylenediamine tetraacetic acid)
- EPS** - Substâncias Poliméricas Extracelulares (do inglês: Extracellular Polymeric Substances)
- Embp** - Proteína de Ligação à Matriz Extracelular (do inglês: extracellular matrix binding protein)
- ITU** - Infecções do trato urinário
- IMPG** - Instituto de Microbiologia Paulo de Góes
- LPSN** - Lista de Nomes de Procariontes com Status na Nomenclatura (do inglês: List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature)
- LPXTG** - Motivo constituído de Leucina, Prolina, Treonina e Glicina (do inglês: Leucine-Proline-X-Threonine-Glycine motif)
- MALDI-TOF MS** - Espectrometria de Massas por Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz com Tempo de Voo (do inglês, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight mass spectrometry)
- MDR** - Resistência a Múltiplas Drogas (do inglês: Multidrug Resistance)
- MEC** - Moléculas da matriz extracelular
- MRSA** - *S. aureus* resistente à meticilina (do inglês: Methicilin-resistant *S. aureus*)
- MSCRAMM** - Componentes de superfície microbianas que reconhecem moléculas adesivas de matriz (do inglês: microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules)
- NaCl** - Cloreto de sódio
- NIH** - *National Institutes of Health*
- pb** - Pares de base
- PBS** - solução salina fosfatada tamponada (do inglês: phosphate buffered saline)
- PCR** - Reação em cadeia da polimerase (do inglês: polimerase chain reaction)
- PIA** - adesina intercelular polissacarídica (do inglês: Polysaccharide Intercellular Adhesin)
- RNA** - Ácido ribonucléico (do inglês: ribossomal ribonucleic acid)
- SCN** - *Staphylococcus* coagulase-negativos
- SCP** - *Staphylococcus* coagulase-positivos
- SdrI** - Proteína de Repetição Serina-Aspartato I (do inglês: Serina-Aspartate Repeat Protein I)
- Ssp** - Proteína Associada à Superfície de *S. saprophyticus* (do inglês: *S. saprophyticus* surface-associated protein)
- spp.** - plural de espécie
- SssF** - Proteína de Superfície F de *S. saprophyticus* (do inglês: *S. saprophyticus* surface protein F)

**Sub-CIM** - Concentração sub-inibitória (do inglês: Sub-Inhibitory Concentration)

**Taq** - *Thermus aquaticus*

**TBE** - Tris/Borato/EDTA.

**UafA** - Fator de uro-aderência A (do inglês: Uroadherence factor A)

**UafB** - Fator de uro-aderência B (do inglês: Uroadherence factor B)

**UFC** - Unidade formadora de colônia

**UFRJ** - Universidade Federal do Rio de Janeiro

**UFP** - Unidade Formadora de Placas

**UFV** - Universidade Federal de Viçosa

**UreC** - subunidade alfa da urease (do inglês: urease alpha subunit)

## SUMÁRIO

<b>PRESS RELEASE.....</b>	<b>v</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>x</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 Características do gênero <i>Staphylococcus</i> .....	1
1.2 <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos (SCN).....	2
1.2.1 <i>Staphylococcus saprophyticus</i> .....	3
1.3 Fatores de virulência de <i>Staphylococcus</i> spp.....	4
1.3.1 Genes de virulência de <i>S. saprophyticus</i> .....	5
1.3.2 Colonização e formação de biofilme em <i>Staphylococcus</i> spp.....	8
1.3.3 Concentrações subinibitórias de antimicrobianos na virulência microbiana	11
1.4 Modelo de infecção <i>in vivo</i> .....	13
1.4.1 Características gerais <i>Tenebrio molitor</i> .....	14
1.4.2 <i>Tenebrio molitor</i> como modelo de infecção.....	15
1.5 A Baía de Guanabara como fonte de bactérias patogênicas.....	17
1.6 Terapia fágica: avanços, aplicações e desafios no combate às infecções multirresistentes.....	21
1.6.1 Terapia fágica no combate a infecções bacterianas multirresistentes.....	21
1.6.2 Mecanismos de ação dos fagos.....	22
1.6.3 Fagoterapia no combate a biofilmes.....	24
1.6.4 Aplicações e vantagens da terapia com fagos.....	25
1.6.5 Desafios e limitações.....	25
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>26</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
3.1 Objetivo geral.....	27
3.2 Objetivos específicos.....	27
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
4.1 Cepas de <i>S. saprophyticus</i> utilizadas.....	28
4.2 Condições de cultivo e armazenamento.....	30

4.3 Obtenção de DNA.....	30
4.4 Detecção de genes de virulência nas cepas de <i>S. saprophyticus</i> .....	31
4.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	33
4.6 Análise da formação de biofilme.....	34
4.6.1 Formação de biofilme na presença de Sub-CIM de ciprofloxacino.....	35
4.7 Infecção <i>in vivo</i> em larvas de <i>t. molitor</i> .....	36
4.8 Espectro lítico dos bacteriófagos.....	37
4.8.1 Formação de biofilme na presença do bacteriófago CSF.....	38
4.9 Análises estatísticas.....	39
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
5.1 Detecção dos genes de virulência em <i>S. saprophyticus</i> .....	39
5.2 Avaliação da formação de biofilme.....	40
5.3 Influência de Sub-CIM de ciprofloxacino em cepas de <i>S. saprophyticus</i> .....	43
5.4 Avaliação da virulência de cepas de <i>S. saprophyticus</i> no modelo invertebrado <i>T. molitor</i> .....	46
5.5 Avaliação da capacidade lítica de bacteriófagos isolados de fonte aquática nas cepas de <i>S. saprophyticus</i> .....	48
5.5.1 Capacidade de inibição dos bacteriófagos na formação de biofilme nas cepas de <i>S. saprophyticus</i> .....	49
5.5.2 Panorama geral dos resultados encontrados.....	50
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>60</b>
<b>9. ANEXO I: Tabela suplementar.....</b>	<b>71</b>

## 1. Introdução

### 1.1 Características do gênero *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus* é composto por cocos Gram-positivos, agrupados em cachos e, é membro da família Staphylococcaceae. Atualmente, esse gênero apresenta mais de 60 espécies, conforme a classificação mais recente da *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (LPSN, 2024). São imóveis, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, resistentes à 0,04 U de bacitracina, halotolerantes (toleram até 10 % de NaCl), possuem baixo conteúdo G+C no genoma e são produtores da enzima catalase, responsável pela degradação do peróxido de hidrogênio (Rossi *et al.*, 2024; Djawadi *et al.*, 2023; Parte *et al.*, 2020; Bessa *et al.*, 2016).

*Staphylococcus* são classificados em dois grupos com base na produção da coagulase, uma proteína secretada que induz a conversão de fibrinogênio em fibrina, promovendo a formação de coágulos. *Staphylococcus* coagulase-positivos (SCP), possuem a capacidade de coagular o plasma sanguíneo, com *S. aureus* sendo a espécie mais conhecida e estudada e *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN), que não exibem essa habilidade (Jiménez-Velásquez *et al.*, 2024; Herman *et al.*, 2018). A coagulase é um importante fator de virulência, visto que induz a coagulação da fibrina ao redor da bactéria, conferindo-lhe proteção contra a resposta imunológica do hospedeiro e favorecendo a persistência da infecção (González-Martín *et al.*, 2020).

As espécies do gênero *Staphylococcus* se distinguem por apresentar características bioquímicas diferentes, incluindo produção de catalase, oxidação e fermentação de glicose, bem como, fermentação de açúcares como maltose, D-manitol, lactose, sacarose e ribose. Além disso, a resistência a antimicrobianos, como à novobiocina e polimixina B, distinguem as espécies dentro desse gênero (Bannerman e Peacock, 2006).

*Staphylococcus* são microrganismos ubíquos, encontrados na pele, mucosas no corpo humano e diversas superfícies ambientais. Em geral, são membros da microbiota natural, considerados comensais, coexistindo sem causar danos. No entanto, muitas espécies têm a capacidade de se tornarem patógenos oportunistas em condições favoráveis. Sua capacidade de colonização e infecção é especialmente relevante em indivíduos imunocomprometidos ou portadores de dispositivos médicos implantáveis (Crossman *et al.*, 2024; Byrd, Belkaid e Segre, 2018).

Os *Staphylococcus*, incluindo *Staphylococcus aureus* e SCN, são patógenos humanos responsáveis por infecções comunitárias e hospitalares, como infecções de sítios cirúrgicos e bacteremias associadas a dispositivos médicos (Herman *et al.*, 2018; Becker *et al.*, 2014). *S. aureus* é conhecido por sua alta virulência e resistência antimicrobiana e está associado a infecções comunitárias e hospitalares, enquanto os SCN, como *S. epidermidis*, são frequentemente associados a infecções nosocomiais (Michalik *et al.*, 2020; Natsis & Cohen, 2018).

A capacidade de adquirir resistência aos antimicrobianos em ambos os grupos limita as opções terapêuticas, aumentando a morbidade e mortalidade dos pacientes (Serra *et al.* 2023; Morgenstern *et al.*, 2016). A espécie mais amplamente estudada, *S. aureus*, coloniza preferencialmente regiões como nariz, garganta, axilas e virilha em indivíduos saudáveis, com taxas de colonização que variam conforme fatores geográficos, faixa etária e outros elementos de risco (Zajmi *et al.*, 2022; Becker *et al.*, 2017).

## **1.2 *Staphylococcus coagulase-negativos* (SCN)**

Dentro do gênero *Staphylococcus*, a maioria das espécies pertence ao grupo dos SCN. São bactérias comensais que normalmente residem na pele, narinas, canais auditivos e membranas mucosas de humanos e animais, contribuindo para a homeostase e integridade epitelial (Gautam *et al.*, 2017; Piette e Verschraegen, 2009). No entanto, apesar de sua presença na microbiota da pele saudável e mucosa, os SCN emergiram como patógenos relevantes em infecções nosocomiais (Michalik *et al.*, 2020; Gautam *et al.*, 2017).

O crescente impacto clínico dessas bactérias está associado à imunossupressão do hospedeiro, ruptura da barreira epitelial e mucosa, e ao uso prolongado ou permanente de dispositivos médicos, fatores que favorecem sua colonização e reforçam sua relevância na prática médica atual (França *et al.*, 2021; Heilmann *et al.*, 2019).

Dentre as espécies de SCN, algumas apresentam maior relevância clínica em infecções humanas, incluindo *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. warneri* e *S. capitis* (Gautam *et al.*, 2017; Becker *et al.*, 2014). *S. epidermidis* é o principal agente de infecções relacionadas a dispositivos médicos, devido à sua capacidade de formar biofilme e colonizar implantes como cateteres e próteses (Becker *et al.*, 2014; Christensen e Brüggemann, 2014; Upadhyayula *et al.*, 2012). Já *S. saprophyticus* é frequentemente isolado do trato gastrointestinal e geniturinário, especialmente em indivíduos jovens, estando associado a infecções do trato urinário (Becker *et al.*, 2014).

Os SCN apresentam uma tendência maior de resistência a antimicrobianos em comparação com *S. aureus*, desenvolvendo frequentemente multirresistência. A resistência à meticilina, geralmente adquirida por transferência horizontal de genes, é comum, assim como a menor suscetibilidade aos glicopeptídeos (Becker *et al.*, 2014; Taponen e Pyörälä, 2009). O principal mecanismo envolve a produção de  $\beta$ -lactamase, conferindo resistência aos beta-lactâmicos. Cepas resistentes à meticilina (MRS) frequentemente apresentam resistência cruzada a aminoglicosídeos e macrolídeos (Soumya *et al.*, 2017; Taponen e Pyörälä, 2009).

O uso indiscriminado de antibióticos intensifica a pressão seletiva, favorecendo a disseminação de cepas multirresistentes e limitando as opções terapêuticas (Leite de Pinho *et al.*, 2024). A ausência de alternativas eficazes e a inexistência de vacinas agravam o impacto dos SCN como patógenos relevantes (Heilmann *et al.*, 2019). Além disso, apresentam elevado grau de complexidade terapêutica, uma vez que a formação de biofilmes em dispositivos médicos compromete a erradicação bacteriana, favorecendo a ocorrência de complicações graves, como sepse, endocardite e infecções secundárias por disseminação hematogênica (Rossi *et al.*, 2020; Oliveira *et al.*, 2018).

### 1.2.1 *Staphylococcus saprophyticus*

Dentre as espécies de *Staphylococcus*, *S. saprophyticus* destaca-se como a única tipicamente uropatogênica, sendo um patógeno oportunista, resistente à novobiocina, e o segundo agente mais frequente de infecções do trato urinário (ITUs) inferior não complicada em mulheres jovens sexualmente ativas. No entanto, sua relevância clínica estende-se a indivíduos de todas as faixas etárias (Djawadi *et al.*, 2023; Lindsay, 2019; de Paiva-Santos *et al.*, 2018; Becker *et al.*, 2014).

A colonização do reto e do trato urogenital por *S. saprophyticus*, emerge como uma causa frequente de ITU, associada a complicações como pielonefrite aguda, nefrolitíase, e, em pacientes do sexo masculino, uretrite, epididimite e prostatite (Djawadi *et al.*, 2023; Lindsay, 2019). A capacidade de *S. saprophyticus* em colonizar o reto e o trato urogenital está relacionada à codificação de proteínas de adesão às células uroteliais e à produção de urease, uma enzima que contribui para sua virulência. Essas características são essenciais para compreender a patogenicidade e a prevalência dessa bactéria em infecções do trato urinário (Argemi *et al.*, 2019; Lindsay, 2019).

Além disso, *S. saprophyticus* foi identificado como parte da microbiota gastrointestinal de bovinos e suínos, sendo um contaminante comum de alimentos associados a esses animais,

como carne suína e bovina crua, leite e produtos de queijo (Lawal *et al.* 2021; Santos de Sousa *et al.*, 2017). Este microrganismo também é encontrado no meio ambiente, especialmente em ambientes marinhos, tanto em águas contaminadas quanto em áreas recreativas (de Paiva-Santos *et al.*, 2018).

### 1.3 Fatores de virulência de *Staphylococcus* spp.

A virulência de *Staphylococcus* é multifatorial e envolve aspectos clínicos, moleculares e genômicos. Clinicamente, refere-se à capacidade de uma espécie ou cepa clonal de provocar manifestações específicas, frequentemente associadas à produção de fatores de virulência, muitas vezes uma proteína (Argemi *et al.*, 2019). Durante a infecção, as bactérias regulam a expressão de um conjunto de moléculas essenciais à patogenicidade, denominadas fatores de virulência (Suleiman 2024). Essa regulação, geralmente específica de cada espécie, é essencial para a sobrevivência do patógeno e para o sucesso na invasão do hospedeiro. Diante disso, os patógenos desenvolveram sistemas regulatórios avançados para ajustar a expressão dos genes de virulência às flutuações nas condições ambientais durante o curso da infecção (Jenul *et al.*, 2019).

O início da patogênese das infecções estafilocócicas muitas vezes se inicia com a adesão de microrganismos aos tecidos hospedeiros, considerado um passo essencial (Berry *et al.*, 2022). A quebra da barreira cutânea desempenha um papel crítico nesse processo, transformando as espécies de SCN em patógenos, convertendo fatores originalmente relacionados ao ciclo de vida bacteriano na pele em fatores de virulência que resultam em manifestações patológicas (Harris-Tryon & Grice, 2022; Argemi *et al.*, 2019). Esse processo é essencial para que o microrganismo cause infecções e se estabeleça no hospedeiro.

O avanço nas tecnologias de sequenciamento do genoma proporcionou a descoberta de um amplo conjunto de genes potencialmente relacionados à patogenicidade dos *Staphylococcus* (Lin *et al.*, 2021). A análise de sequências genômicas completas de SCN é crucial para a compreensão mais aprofundada de sua patogenicidade e a identificação de potenciais fatores de virulência. No que diz respeito a esses fatores, os SCN apresentam um extenso repertório de genes relacionados à adesão, a produção de biofilme e hemolisinas, exoenzimas e superantígenos. A maioria compartilha sistemas regulatórios semelhantes ao *S. aureus*, como o sistema *agr*, cujos homólogos foram identificados em várias espécies de SCN (Argemi *et al.*, 2019). Esses fatores contribuem para a evasão eficaz das defesas fagocíticas do hospedeiro, facilitam a aderência às células epiteliais, promovem a colonização nos tecidos e garantem a

persistência extracelular. Essas estratégias são fundamentais para o seu sucesso na instalação e manutenção nos tecidos do hospedeiro (Marques *et al.*, 2013).

Em *Staphylococcus* spp., a ligação das proteínas da matriz extracelular (MEC) é frequentemente mediada por receptores de superfície conhecidas como MSCRAMMs (do inglês, *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*). Essas MSCRAMMs são reconhecidas como componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas na matriz extracelular (MEC) e interagem com diversas proteínas, tais como fibrinogênio, colágeno, fibronectina, vitronectina e elastina, promovendo adesão firme às células epiteliais e endoteliais (Argemi *et al.*, 2019; Sakinc *et al.*, 2006). Essa forte interação facilita a formação de biofilmes, tornando as infecções mais persistentes e resistentes ao sistema imunológico e a agentes antimicrobianos (Foster 2019).

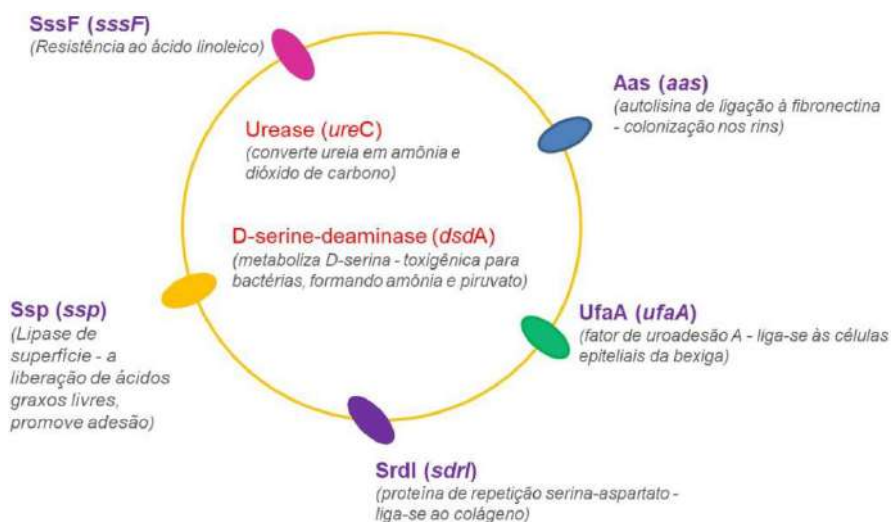
Embora *S. aureus* seja amplamente reconhecido por sua elevada virulência, infecções nosocomiais causadas por SCN, tradicionalmente considerados comensais, têm motivado uma reavaliação de seu potencial patogênico. Apesar de apresentarem um perfil de virulência inferior ao de *S. aureus*, a crescente incidência de infecções associadas a SCN, especialmente em ambientes hospitalares, despertou o interesse por investigações moleculares e genômicas que buscam compreender seus fatores de virulência e mecanismos de adaptação ao hospedeiro (Rafiee e Ghaemi, 2023; Argemi *et al.*, 2019; Parlet *et al.* 2019).

### 1.3.1 Genes de virulência de *S. saprophyticus*

A adesão e a persistência no trato urinário são fatores cruciais relacionados à patogenicidade de *S. saprophyticus*. No entanto, ainda há lacunas significativas nos estudos de virulência baseados no sequenciamento do genoma completo, o que limita o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos. Além da adesão, a enzima urease exerce um papel fundamental no crescimento bacteriano e na capacidade invasiva, favorecendo a sobrevivência e a adaptação dessas bactérias na bexiga (Argemi *et al.*, 2019; Kuroda *et al.*, 2005).

As proteínas de superfície facilitam a adesão bacteriana às superfícies das células hospedeiras. Em *S. saprophyticus*, seis proteínas de superfície já foram descritas como fatores de virulência. Entre elas, destacam-se a proteína associada à superfície (Ssp) e a autolisina (Aas), uma proteína multifuncional sem *motif* LPXTG, ambas ligadas de forma não covalente à superfície. Além disso, quatro proteínas ancoradas de forma covalente à parede celular, através do *motif* LPXTG, também já foram descritas: o fator de uro-adesão A (UafA), a proteína de reprodução serina-aspartato (SdrI), o fator de uro-adesão B (UafB) e a proteína de superfície

F (SssF). Juntamente com essas proteínas, as atividades da urease (UreC) e da D-serina desaminase (DsdA) são fundamentais para a colonização e patogenicidade de *S. saprophyticus* (Figura 1) (de Paiva-Santos *et al.*, 2018; King *et al.*, 2012; Sakinc *et al.*, 2006).



**Figura 1** - Representação esquemática dos genes de virulência analisados neste estudo. Na superfície celular, destacam-se cinco proteínas de adesão (SssF, Ssp, Aas, UfaA e SdrI). No interior da célula bacteriana, localizam-se duas enzimas (UreC e DsdA).

A proteína Ssp, inicialmente descrita na cepa de *S. saprophyticus* 7108, foi a primeira proteína de superfície descrita nesta espécie e, é um importante fator de virulência presente na maioria dos isolados clínicos (Sakinc *et al.*, 2006). Com atividade lipolítica, está associada a infecções localizadas, como abscessos e furúnculos. Ensaio *in vitro* demonstraram sua expressão durante infecções em modelos murinos de abscesso (Sakinc *et al.*, 2005). Apesar de sua relevância na patogenicidade, o mecanismo exato pelo qual a Ssp contribui para o desenvolvimento da infecção *in vivo*, ainda não está completamente elucidado, exigindo estudos complementares (Rafiee e Ghaemi, 2023).

A proteína de superfície SdrI (Serine-aspartate repeat I), rica em serina-aspartato, foi a segunda proteína covalentemente ligada à superfície descrita em *S. saprophyticus*. Identificada na cepa 7108 por Sakinc *et al.* (2006), é ancorada à superfície pelo *motif* LPXTG e demonstra afinidade tanto pelo colágeno tipo I quanto pela fibronectina, sendo esta última uma característica única entre as proteínas Sdr. Embora presente em poucas cepas, a SdrI está associada à hidrofobicidade da superfície bacteriana, promovendo a adesão ao epitélio do hospedeiro. Em modelos murinos de infecção do trato urinário (ITU), essa proteína mostrou-se

relevante para a persistência da infecção, embora não seja essencial para a colonização inicial (Govindarajan e Kandaswamy, 2022; Paharik e Horswill, 2016; Sakinc *et al.*, 2006).

As autolisinas bacterianas são proteínas associadas à parede celular fundamentais para a catalização de reações no peptidoglicano durante a divisão celular. Em *S. saprophyticus*, a autolisina Aas, conservada em todos os isolados, destaca-se como uma proteína multifuncional, com atividades adesivas e autolíticas. Além disso, essa proteína apresenta afinidade pela fibronectina e eritrócitos de ovelha, promovendo a hemaglutinação (Lindsay, 2019). Estudos *in vitro* demonstraram sua ligação com os ureteres humanos, enquanto modelos experimentais *in vivo* confirmaram sua capacidade de colonizar rins de ratos (Govindarajan e Kandaswamy, 2022).

Estudos genômicos comparativos conduzidos por Kuroda *et al.* (2005) identificaram a proteína UafA em *S. saprophyticus*, ligada covalentemente à parede celular. Conhecida como fator de uro-adesão A, atua como hemaglutinina e facilita a adesão às células uroepiteliais (Argemi *et al.*, 2019). Essa foi a primeira proteína em *S. saprophyticus* classificada como MSCRAMM, destacando seu papel essencial na adesão ao trato urinário, um ambiente desafiador devido ao fluxo urinário (Rafiee e Ghaemi, 2023). Até o momento, quatro proteínas covalentemente ligadas à parede celular foram descritas em *S. saprophyticus*: SdrI, UafA e UafB e SssF (de Paiva-Santos *et al.*, 2018).

O fator de uroadesão UafB, descrito por King *et al.* (2011), também é expresso por *S. saprophyticus*. Codificada por um gene plasmidial, a glicoproteína UafB é rica em serina e modula a hidrofobicidade da superfície celular. Além disso, a UafB atua na ligação de fibronectina, fibrinogênio humano e de células epiteliais da bexiga (Govindarajan e Kandaswamy, 2022; King *et al.*, 2012).

Posteriormente, King *et al.* (2012) identificaram a proteína de superfície F (SssF) em *S. saprophyticus* ATCC 15305, codificada pelo plasmídeo pSSP1. Conservada entre diversas cepas, a SssF está associada à resistência ao ácido linoleico, presente em regiões do trato gastrointestinal humano, como o períneo. Embora não esteja diretamente relacionado à uropatogênese, a SssF parece ser crucial para a sobrevivência de *S. saprophyticus* em nichos periuretrais ricos em ácidos graxos poli-insaturados, como o ácido linoleico. Essa proteína é prevalente em cepas clínicas e representa a sexta proteína de superfície descrita para a espécie (Rafiee e Ghaemi, 2023).

No ambiente da bexiga, a sobrevivência de *S. saprophyticus* depende, além das proteínas de superfície, de duas enzimas citoplasmáticas: a urease (UreC) e a D-serina desaminase (DsdA) (King *et al.*, 2012). A D-serina é comumente encontrada em concentrações elevadas na urina humana, sendo tóxica para a maioria das bactérias que colonizam o trato urinário. No entanto, bactérias uropatogênicas, como *S. saprophyticus* e *E. coli* produzem a enzima DsdA, que conferem resistência e capacidade de utilização deste aminoácido como fonte de nutrientes, conferindo-lhes uma vantagem adaptativa no ambiente urinário (Rafiee *et al.*, 2023; Haugen *et al.*, 2007).

Além dessa adaptação, *S. saprophyticus* se beneficia da produção abundante de urease, uma enzima que converte a ureia em dióxido de carbono e amônia. Esse processo eleva o pH do trato urinário, contribuindo para a formação de cálculos e a persistência da infecção (Djawadi *et al.*, 2023; Rafiee e Ghaemi, 2023; Sakinc *et al.*, 2005). O aumento do pH compromete as defesas naturais do hospedeiro e favorece a adesão bacteriana ao epitélio uroepitelial. Além disso, a amônia gerada pode reduzir a eficácia de antibióticos e de outros tratamentos, agravando o quadro infeccioso (Jordan & Nicolle, 2014; Cunha, 2016).

Pesquisas utilizando modelos de ITU em ratos ressaltaram o papel da urease como um fator de virulência. A inibição química da urease mostrou-se eficaz em evitar as alterações no pH induzidas pelo crescimento do *S. saprophyticus* em meio de urina artificial, embora sua eficácia *in vivo* ainda necessite de estudos complementares (Loes *et al.*, 2014). Portanto, a produção de urease por *S. saprophyticus* é crucial para uma colonização eficiente tanto da bexiga quanto dos rins (Govindarajan e Kandaswamy, 2022).

### **1.3.2 Colonização e formação de biofilme em *Staphylococcus* spp.**

Biofilme é uma comunidade microbiana multicelular aderida a uma superfície e incorporada numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares (Figura 2) (Magana *et al.*, 2018; Paharik e Horswill, 2016). Os biofilmes podem se formar em uma ampla gama de ambientes, desde superfícies abióticas de dispositivos médicos, até superfícies bióticas, como tecidos biológicos, desempenhando papéis importantes na patogenicidade de infecções (Heilmann *et al.*, 2019).

Os SCN, apesar de integrarem a microbiota cutânea, podem causar infecções oportunistas, sobretudo em pacientes imunocomprometidos ou com dispositivos médicos implantados, como cateteres intravasculares (Giormezis *et al.*, 2014). A capacidade dessas bactérias de aderir e formar biofilme em diversas superfícies, incluindo tecidos do hospedeiro e dispositivos

médicos, é fundamental para o desenvolvimento dessas infecções. A quebra da barreira cutânea e a inserção de dispositivos médicos, oferecem aos SCN oportunidades para acessar e colonizar os tecidos do hospedeiro, formando biofilmes nas superfícies desses dispositivos. Os biofilmes proporcionam vantagens adaptativas ao proteger os microrganismos da resposta imunológica do hospedeiro e da ação dos antibióticos, dificultando a erradicação das infecções (Heilmann *et al.*, 2019; Paharik e Horswill, 2016).

As infecções por biofilme representam um desafio clínico significativo devido à sua alta resistência aos tratamentos antimicrobianos e à sua ocorrência em regiões do corpo de difícil acesso para tratamento. Segundo o *National Institutes of Health* (NIH), até 80% das infecções humanas estão associadas a biofilme. Essas infecções são, portanto, um fardo significativo para o sistema de saúde atual. Assim, o estado do biofilme *in vivo* é uma área de pesquisa de grande importância, dada a sua prevalência e complexidade (Paharik e Horswill, 2016).

Os *S. aureus* e SCN, estão entre os principais agentes causadores de infecções associadas a biofilmes. Nos Estados Unidos da América, *S. aureus* é a causa mais comum de infecções adquiridas em hospitais, enquanto os SCN ocupam o terceiro lugar, principalmente em infecções associadas a dispositivos médicos e feridas cirúrgicas. A formação de biofilme *in vivo* pelos *Staphylococcus* confere alta resistência aos antibióticos, contribuindo para doenças como osteomielite, endocardite e colonização de dispositivos médicos (Grassia *et al.*, 2024; Paharik e Horswill, 2016).

SCN demonstram uma notável capacidade de colonizar dispositivos médicos, o que favorece a formação de biofilmes, facilitando sua adesão e colonização. Esse processo impulsiona sua capacidade de causar infecções no hospedeiro, destacando sua relevância como agentes patogênicos. A habilidade de formar biofilmes é considerada o principal fator de virulência dos SCN, como *S. saprophyticus* (Rafiee e Ghaemi, 2023; Heilmann *et al.*, 2019; Soumya *et al.*, 2017).

Essa capacidade de adesão das bactérias a diversos biomateriais é influenciada pelas propriedades de superfície das bactérias e dos substratos. Essa interação é mediada por forças físico-químicas, como interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals e carga elétrica. Os SCN utilizam diferentes componentes de superfície para essa ligação, incluindo adesinas covalentemente ligadas ao peptidoglicano (proteínas CWA), proteínas associadas à superfície por mecanismos diversos e moléculas de superfície não proteicas, como ácidos teicóicos. Esses

fatores contribuem para a capacidade dos SCN de aderir e formar biofilmes (Becker *et al.*, 2014).

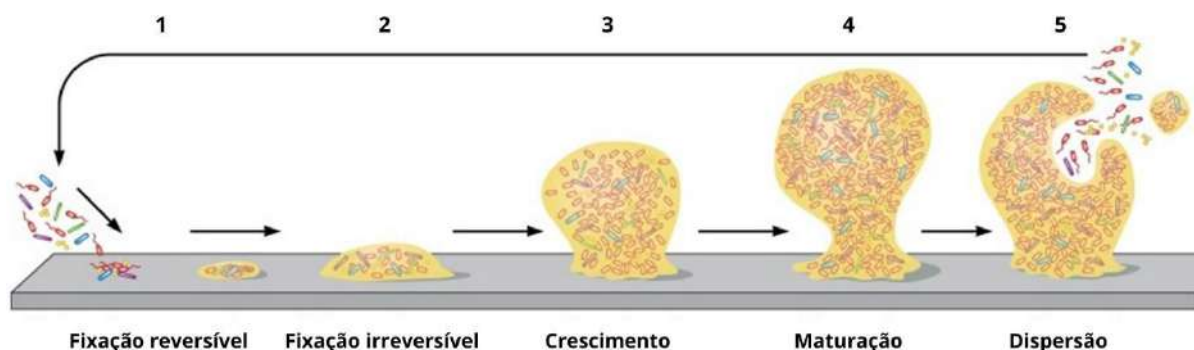
A formação de biofilme pode ocorrer em quatro etapas: fixação, acumulação, maturação e desprendimento. Na etapa inicial, as bactérias aderem a superfícies biótica ou abiótica, processo mediado por adesinas ancoradas na parede celular, como Bhp, AtlE e Fbe e MSCRAMMs. Esses componentes facilitam tanto a fixação inicial quanto a adesão intercelular. Enquanto *S. aureus* possui mais de 20 genes de adesinas em seu genoma, os SCN apresentam um número significativamente menor. A adesão e o acúmulo do biofilme envolvem uma combinação de proteínas da parede celular covalentes ou não e fatores não proteicos (Paharik e Horswill, 2016; Giormezis *et al.*, 2014).

Na etapa de acumulação, as bactérias se multiplicam e formam agregados em múltiplas camadas, processo que requer adesão intercelular. Esse estágio envolve a produção de adesina intercelular polissacarídica (PIA), codificada pelo *operon icaADBC*, que interage com o ácido teicóico na superfície bacteriana. Além do PIA, proteínas de superfície como Aap e Embp também contribuem para o acúmulo do biofilme em SCN. A proteína associada à acumulação (Aap), pertencente à família de proteínas semelhantes a Bap, e promove o acúmulo mesmo na ausência de PIA, após a remoção de seu domínio N-terminal. Enquanto a proteína de ligação à matriz extracelular (Embp) facilita a adesão bacteriana à fibronectina e no acúmulo de biofilme. O domínio N-terminal de Aap também está associado à adesão a superfícies abióticas e corneócitos, destacando sua relevância na colonização cutânea (Heilmann *et al.*, 2019; Soumya *et al.*, 2017; Giormezis *et al.*, 2014).

Na fase de maturação, o biofilme adquire uma estrutura espessa e organizada, com a formação de canais que facilitam a distribuição de oxigênio e nutrientes às células bacterianas nas camadas mais profundas. Por fim, ocorre a dispersão de células ou aglomerados, que podem migrar pela corrente sanguínea e iniciar a colonização e formação de um novo biofilme em outro local. Esse processo de dispersão é mediado por enzimas degradadoras da matriz extracelular, produzidas pelas próprias bactérias ou presentes no ambiente circundante (Magana *et al.*, 2018; Soumya *et al.*, 2017; Becker *et al.*, 2014).

A estrutura do biofilme contém ainda DNA extracelular (eDNA), proveniente tanto da lise bacteriana quanto da possível morte de células de neutrófilos do hospedeiro, e é suscetível à degradação por DNases. Além disso, adesinas proteicas são encontradas na estrutura do

biofilme estafilocócico, podendo estar ligadas diretamente às bactérias no biofilme ou dispersas na sua matriz (Paharik e Horswill, 2016).



**Figura 2** - O ciclo de formação de um biofilme bacteriano. A formação de biofilmes ocorre em cinco estágios progressivos: **(1)** Fixação reversível – as células planctônicas se fixam ao substrato por meio do polo celular ou flagelo. **(2)** Fixação irreversível – as células permanecem aderidas, com redução na reversão dos flagelos e aumento na produção de componentes da matriz do biofilme, resultando em maior tolerância a medicamentos. **(3)** Crescimento e formação de microcolônias – as células formam aglomerados e se embutem na matriz extracelular. **(4)** Maturação – as células amadurecem em microcolônias. **(5)** Dispersão – desprendimento de células superficiais da matriz do biofilme formado. **Fonte:** Adaptado de Magana *et al.*, 2018, artigo de acesso aberto disponível em: <https://doi.org/10.1128/cm.00084-16>

### 1.3.3 Concentrações subinibitórias de antimicrobianos na virulência microbiana

Os antibióticos desempenham um papel crucial no tratamento de infecções bacterianas, sendo a concentração inibitória mínima (CIM) o parâmetro mais utilizado para avaliar a eficácia dos medicamentos. A CIM é definida como a menor concentração de antibiótico necessária para inibir o crescimento bacteriano, e sua determinação é fundamental para o estabelecimento de tratamentos antimicrobianos eficazes (Berryhill *et al.*, 2023; Gao *et al.*, 2022). No entanto, o uso de antibióticos, frequentemente baseado em abordagens empíricas, têm exacerbado o surgimento de cepas bacterianas resistentes (Delik *et al.*, 2024).

A resistência é agravada pela exposição de bactérias a concentrações subinibitórias de antibióticos (Sub-CIMs). Embora não sejam letais, essas concentrações influenciam diversos processos fisiológicos bacterianos, como a formação de biofilmes, alterações morfológicas, modificações na superfície celular, impacto na motilidade, produção de enzimas e toxinas, além de modificações na adesão bacteriana às células hospedeiras (Delik *et al.*, 2024; Andersson & Hughes, 2014). Mesmo quando administrados adequadamente, fatores individuais como metabolismo e distribuição tecidual podem gerar concentrações subinibitórias *in vivo*,

promovendo virulência bacteriana e dificultando o controle eficaz das infecções (Elawady *et al.*, 2024; Stevens *et al.*, 2007).

A administração empírica de antibióticos, prática comum em infecções graves antes da obtenção de antibiogramas, pode resultar no uso de fármacos inadequados e na exposição bacteriana a concentrações subinibitórias (Sub-CIMs), favorecendo a expressão de fatores de virulência e agravando os desfechos clínicos. Estudos evidenciam que *S. aureus*, por exemplo, apresenta aumento de virulência quando exposto a tais condições (Gao *et al.*, 2022; Shang *et al.*, 2019). Além disso, Sub-CIMs podem modular a expressão gênica e favorecer a transferência horizontal de genes, contribuindo para a resistência antimicrobiana (Shenkutie *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2019; Navidifar *et al.*, 2019).

O uso extensivo de antibióticos na medicina, pecuária e agricultura tem levado à liberação de resíduos antimicrobianos no ambiente, expondo bactérias a Sub-CIMs em solos e águas residuais. Essa pressão seletiva promove adaptações que favorecem a emergência de cepas resistentes, representando um desafio crescente para a saúde pública global, com impactos significativos na morbidade e mortalidade (Delik *et al.*, 2024; Wistrand-Yuen *et al.*, 2018).

A formação de biofilme é um fator de virulência crucial para a sobrevivência de *S. aureus* e outros patógenos em ambientes hostis. Sub-CIMs de antimicrobianos podem modular essa formação, impactando diretamente a patogênese e o desfecho clínico das infecções. Apesar de terapias antimicrobianas intensivas reduzirem a progressão dessas infecções, a erradicação completa do biofilme é desafiadora devido à sua matriz protetora e à persistência bacteriana. (Hathroubi *et al.*, 2017; Elawady *et al.*, 2024). Além disso, gradientes de concentração no interior dos biofilmes também favorecem a exposição a Sub-CIMs, contribuindo para o desenvolvimento de resistência (Andersson & Hughes, 2014; Hengzhuang *et al.*, 2011).

Estudos demonstram que Sub-CIMs de imipenem e ciprofloxacino aumentaram a formação de biofilme em até 80% dos isolados de *S. aureus* (Elawady *et al.*, 2024). De forma semelhante, Park *et al.* (2024) observaram que Sub-CIMs de nafcilina, vancomicina, ciprofloxacino e rifampicina induziram biofilmes em até 83% dos 107 isolados clínicos de MRSA, com variações dependentes do antibiótico e da concentração utilizada. Esses achados reforçam o papel das Sub-CIMs na virulência bacteriana e a necessidade de estratégias terapêuticas que considerem seus efeitos (Andersson & Hughes, 2014).

O estudo de Gao e colaboradores (2022) demonstrou que antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e as tetraciclina, em concentrações subinibitórias, podem induzir fatores de virulência em *S. aureus*, agravando infecções tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Esses antibióticos aumentaram a expressão de genes de virulência, produção de toxinas e sobrevivência intracelular, além de piorarem os desfechos clínicos em modelos animais, evidenciando um impacto negativo no controle da infecção.

Em relação a *S. saprophyticus*, os estudos sobre os efeitos de Sub-CIMs na modulação de fatores de virulência ainda são limitados. Erdeljan *et al.* (2012) observaram que a exposição à Sub-CIM de ciprofloxacino aumentou a adesão da cepa *S. saprophyticus* ATCC 15305 a superfícies bióticas e abióticas, incluindo dispositivos urinários como *stents* ureterais. Posteriormente, Goneau *et al.* (2015) demonstraram que a exposição da mesma cepa a Sub-CIM de ciprofloxacino, ampicilina e gentamicina intensificou a formação de biofilmes.

Essas alterações fenotípicas podem favorecer a colonização do trato urinário por *S. saprophyticus*, aumentando sua capacidade de causar ITU. Além disso, a maior adesão aos *stents* ureterais pode facilitar a formação de biofilmes nesses dispositivos, contribuindo para sua colonização persistente (Erdeljan *et al.*, 2012). Por fim, é crucial realizar estudos adicionais que abrangem um número mais amplo de cepas de *S. saprophyticus*, além de explorar outros fatores de virulência que possam ser modulados por Sub-CIM de antimicrobianos.

#### **1.4 Modelo de infecção *in vivo***

Modelos animais vertebrados são comumente utilizados em estudos de patogenicidade microbiana, desenvolvimento de vacinas, testes farmacológicos, e avaliação de eficácia e segurança de antibióticos, tanto na medicina humana, quanto na veterinária. No entanto, devido a considerações éticas, custos elevados e protocolos demorados associados à utilização de mamíferos, há uma crescente busca de estratégias alternativas que incluem o uso de invertebrados como modelos animais. Essa abordagem revela-se vantajosa em cenários que demandam a análise de um grande número de animais (Andrade-Oliveira *et al.*, 2023; de Souza *et al.*, 2018).

O princípio dos 3Rs (Refinamento, Redução e Substituição), proposto por Russell e Burch em 1959, fundamenta o uso de insetos como modelos de infecção. A substituição (do inglês, *Replacement*) visa substituir vertebrados por invertebrados sempre que possível, enquanto o refinamento busca minimizar o sofrimento animal e a redução propõe diminuir o número de animais utilizados (Russell e Burch, 1959). Diversos modelos alternativos foram

desenvolvidos, incluindo *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Bombyx mori*, peixe-zebra (*Danio rerio*) e larvas de *Galleria mellonella* e *Tenebrio molitor* (Brai *et al.* 2023; Fusco-Almeida *et al.* 2023; Ten *et al.* 2023). Estudos como o de Mares *et al.* (2023) utilizaram *G. mellonella* para investigar alterações histopatológicas e imunológicas em resposta a infecções por *S. haemolyticus*. O modelo demonstrou morte larval consistente em 24 horas nas doses mais altas, validando sua aplicabilidade para estudos de resposta imune inata.

Embora amplamente utilizadas, as larvas de *G. mellonella* exigem condições laboratoriais mais rigorosas para cultivo e apresentam menor disponibilidade comercial em alguns países. No Brasil, *T. molitor* é facilmente acessível por meio de diversos fornecedores e sua manutenção não requer instalações especializadas, favorecendo seu uso em estudos experimentais. Além disso, essas larvas apresentam um tamanho maior em comparação com as de *G. mellonella*, o que permite a administração de doses bacterianas mais substanciais (Lozoya-Pérez *et al.*, 2021; Pereira e Rossi, 2020; Pereira *et al.*, 2020; de Souza *et al.*, 2018).

#### **1.4.1 Características gerais *Tenebrio molitor***

A larva da farinha amarela, conhecida cientificamente como *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758), é uma espécie pertencente à ordem Coleoptera e à família Tenebrionidae. Sua ampla distribuição abrange todo o mundo, embora suas preferências climáticas estejam voltadas para regiões temperadas do hemisfério norte, apresentando uma faixa ótima de crescimento entre 22 e 28° C. Assim como *G. mellonella*, *T. molitor* pode ser mantido em temperaturas entre 25 °C e 37 °C, o que amplia sua aplicabilidade como modelo experimental em condições semelhantes às do hospedeiro humano. Essa capacidade torna-a não apenas um organismo versátil, mas também um modelo de estudo adequado para compreender as interações patógeno-hospedeiro (Fusco-Almeida *et al.* 2023; de Souza *et al.*, 2018; Souza *et al.* 2015).

Este inseto passa por uma metamorfose completa, composta por quatro estágios em seu ciclo de vida: a fase embrionária, caracterizada pelos ovos; a fase larval; a fase de pupa; e, por fim, a fase adulta (Figura 3). As fêmeas de *T. molitor* depositam em torno de 500 ovos por vez, e esses ovos eclodem entre 3 e 9 dias. A fase larval tem uma durabilidade de 1 a 8 meses, apresentando uma coloração amarelada a marrom claro. O tamanho médio da larva é geralmente cerca 2,0 a 3,5 cm ou mais, enquanto o dos adultos atinge aproximadamente 1 cm (Fusco-Almeida *et al.* 2023; Petronio Petronio *et al.*, 2022; de Souza *et al.*, 2018).



**Figura 3** - Diferentes estágios de desenvolvimento de *T. molitor* (da esquerda para a direita): ovos, fase larval, pupa e adulta. **Fonte:** Adaptado de Andrade-Oliveira *et al.*, 2023, artigo de acesso aberto disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106304>

*T. molitor* é uma espécie onívora, capaz de consumir vegetais e animais, sendo frequentemente alimentada com farelo ou farinha de cereais em cultivos comerciais para garantir seu desenvolvimento saudável (Petronio Petronio *et al.*, 2022). Além disso, as larvas da farinha destacam-se por seu valor nutricional como fonte proteica para alimentação animal e humana, além da capacidade de degradar resíduos plásticos, contribuindo para práticas ambientalmente sustentáveis. Esse conjunto de características torna as larvas de *T. molitor* uma opção versátil e benéfica em diversas aplicações (Vignerón *et al.*, 2019; de Souza *et al.*, 2018; Souza *et al.* 2015).

No Brasil, as larvas de *T. molitor* estão disponíveis em lojas especializadas, sendo amplamente empregadas em atividades pesqueiras e como fonte alimentar para animais domésticos, como aves e répteis. A disponibilidade das larvas é favorecida pelo baixo custo associado e, à não exigência de instalações especializadas para a manutenção, diferentemente dos modelos de mamíferos. A capacidade de produção em larga escala é impulsionada por seu curto ciclo de desenvolvimento, além de sua facilidade de cultivo e manutenção. Essas características tornam as larvas de *T. molitor* uma opção acessível e prática para diversas finalidades, contribuindo para sua popularidade e ampla utilização no contexto brasileiro (Andrade-Oliveira *et al.*, 2023; de Souza *et al.*, 2018).

#### **1.4.2 *Tenebrio molitor* como modelo de infecção**

As larvas de *T. molitor* atingem cerca de 20 mm no último ínstar, estágio final do desenvolvimento larval antes da metamorfose, facilitando sua manipulação, injeção de inóculos e coleta de amostras para análises posteriores (Andrade-Oliveira *et al.*, 2023). Seu porte permite

a administração precisa de inóculos diretamente na hemocele larval. Além disso, o curto ciclo de vida, associado à facilidade e ao baixo custo de manutenção, torna *T. molitor* um modelo experimental viável para experimentos em larga escala em um período relativamente breve, representando uma alternativa prática e econômica aos modelos tradicionais de mamíferos (Petronio Petronio *et al.*, 2022; Jacobsen, 2014).

O estudo de Andrade-Oliveira *et al.* (2023) estabeleceu as larvas de *T. molitor* como um modelo *in vivo* confiável para avaliar a virulência de *Staphylococcus* spp. e a transferência horizontal de genes, incluindo a investigação da transferência de plasmídeos. Da mesma forma, o trabalho de Souza *et al.* (2015) demonstrou a eficácia do modelo em infecções fúngicas, como *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, observando diferenças nas características de virulência, como a formação de hifas e cápsulas de melanina.

Além disso, seu sistema imunológico apresenta semelhanças funcionais e estruturais com o sistema imunológico inato de mamíferos. Os patógenos são reconhecidos por receptores específicos, podendo ser fagocitados pelos hemócitos dos insetos, que desempenham um papel funcional análogo aos neutrófilos. De maneira similar aos neutrófilos, os hemócitos utilizam espécies reativas de oxigênio e enzimas líticas para eliminar microrganismos invasores. Essas características fazem das larvas de *T. molitor* um modelo valioso para investigações relacionadas à resposta imunológica e interações patógeno-hospedeiro (Jacobsen, 2014).

Apesar da ausência de imunidade adaptativa, esses insetos apresentam um sistema imunológico inato complexo, envolvendo elementos celulares e humorais, tornando-os uma escolha ideal para modelar infecções persistentes (Petronio Petronio *et al.*, 2022; Jacobsen, 2014). Embora não possuam os efetores imunológicos responsáveis pela resposta adaptativa dos vertebrados, o sistema imunológico do *T. molitor* é capaz de realizar modulação funcional, apresentando semelhanças com a resposta imune adaptativa observada nos vertebrados (Vigneron *et al.*, 2019).

Desse modo, similar a outros insetos, o *T. molitor* apresenta um conjunto de mecanismos comportamentais, físicos e fisiológicos que visam prevenir invasões exógenas ou mitigar as consequências de infecções bem-sucedidas. A eficácia dessas linhas de defesa pode variar independentemente ou agir sinergicamente, dependendo de fatores ambientais bióticos e abióticos, como temperatura, alimentação, densidade populacional e interações individuais passadas com patógenos e parasitas (Vigneron *et al.*, 2019; Tsai *et al.*, 2016;).

O estudo de Berryhill *et al.* (2024), utilizando *G. mellonella*, revelou que altas cargas bacterianas comprometem o sistema imunológico inato, resultando em maior mortalidade. Os tratamentos com medicamentos bacteriostáticos e bacteriófagos mostraram-se tão eficazes quanto antibióticos bactericidas no controle da infecção, evidenciando a relevância dos modelos invertebrados na pesquisa de infecções e terapias antimicrobianas.

Dessa forma, as larvas de *T. molitor* têm sido adaptadas com êxito como um modelo para investigar a sinalização do sistema imunológico inato, abrangendo respostas humorais e celulares. A resposta humoral compreende a produção de melanina e peptídeos antimicrobianos (AMPs) com atividades bactericidas e antifúngicas. Por outro lado, as respostas celulares são coordenadas por diversas células, conhecidas coletivamente como hemócitos, que executam fagocitose, encapsulamento e nodulação. Estudos anteriores evidenciaram a produção de AMPs em *T. molitor* em resposta à infecção por bactérias Gram-positivas, incluindo *S. aureus*, e outros fatores associados à resposta imune (Andrade-Oliveira *et al.*, 2023; Fusco-Almeida *et al.* 2023).

Assim como descrito em *G. mellonella*, a melanização desempenha um papel fundamental na defesa de *T. molitor* contra patógenos microbianos. Sua ocorrência e velocidade variam dependendo da virulência do patógeno e da quantidade do inóculo. Tipicamente, inicia-se com o surgimento de manchas pretas na superfície da cutícula larval, podendo progredir para uma melanização completa à medida que a infecção avança, muitas vezes correlacionada com a morte larval subsequente. Durante a melanização, os patógenos são isolados por encapsulamento, e a camada melanizada dos hemócitos induz a morte dos microrganismos por falta de oxigênio ou pela liberação de compostos, como espécies reativas de oxigênio, produzidos pela atividade da fenoloxidase (Pereira *et al.*, 2020; de Souza *et al.*, 2018; Tsai *et al.*, 2016).

Assim, dependendo dos objetivos experimentais, *T. molitor*, assim como outros invertebrados, pode substituir modelos vertebrados mais complexos. Em situações nas quais a ausência de resposta imune adaptativa limita sua aplicabilidade, o modelo pode atuar como uma ponte entre estudos *in vitro* e *in vivo* em vertebrados, como evidenciado anteriormente em *G. mellonella* por Pereira *et al.* (2020).

### **1.5 A Baía de Guanabara como fonte de bactérias patogênicas**

A Baía de Guanabara, localizada no estado do Rio de Janeiro, é a segunda maior baía do Brasil, cobrindo uma área de aproximadamente 384 km<sup>2</sup>. Este sistema estuarino tropical urbano é marcado por 22 ilhas (a maior delas é a Ilha do Governador, com 40,8 km<sup>2</sup>) e 44 praias

frequentadas por moradores e turistas ao longo do ano, além de ser um importante ponto de pesca e habitat de diversas espécies marinhas (Canellas *et al.*, 2021; Gonçalves *et al.*, 2019; Fistarol *et al.*, 2015). Aproximadamente 13 milhões de indivíduos residem nas proximidades da Baía de Guanabara, sendo que cerca de 4 milhões residem em comunidades informais com infraestrutura urbana e sanitária precária (Costa *et al.*, 2023; Freire *et al.*, 2023; Canellas *et al.*, 2021). Assim, a baía desempenha um papel crucial na qualidade de vida dessas comunidades.

A bacia hidrográfica da Baía de Guanabara abrange uma extensão de 4.081 km<sup>2</sup> e abastece parcial ou totalmente 16 municípios, incluindo Belford Roxo, Cachoeira de Macacu, Duque de Caxias, Guapimirim, Itaboraí, Magé, Mesquita, Nilópolis, Niterói, Nova Iguaçu, Petrópolis, Rio Bonito, Rio de Janeiro, São Gonçalo, São João de Meriti e Tanguá. Esta bacia hidrográfica recebe o fluxo de água de 50 rios e córregos, desempenhando um papel crucial como recurso hídrico para toda a região (Fistarol *et al.*, 2015).

Desde a colonização europeia, a Baía de Guanabara tem sido alvo de atividades humanas intensas, como exploração madeireira, mineração e desenvolvimento industrial, resultando em décadas de degradação ambiental. A falta de tratamento de esgoto e controle do impacto ambiental intensificou o acúmulo de resíduos e poluentes, comprometendo a qualidade de vida local e promovendo a disseminação de bactérias patogênicas, o que representa riscos à saúde pública (Freire *et al.*, 2023; Sklar *et al.*, 2023; Cordeiro *et al.*, 2021; Gonçalves *et al.*, 2019). Estima-se que cerca de 18 m<sup>3</sup>/s de efluentes não tratados sejam despejados diariamente na baía, comprometendo sua qualidade e afetando a balneabilidade das praias locais (Carvalho Aguiar *et al.*, 2018; Fistarol *et al.*, 2015).

A área costeira adjacente à Baía de Guanabara é reconhecida como uma das mais industrializadas do Brasil, abrigando milhares de indústrias, portos, aeroportos e terminais petrolíferos (Freire *et al.*, 2023; Seixas *et al.*, 2021; Kjerfve *et al.*, 1997). Essa intensa atividade industrial, aliada ao descarte inadequado de esgoto, contribui para a poluição crônica observada na baía, comprometendo a preservação do ecossistema e a qualidade da água (Freire *et al.*, 2023; Cordeiro *et al.*, 2021).

A qualidade da água na Baía de Guanabara é afetada por fatores como hidrologia complexa, poluição sazonal, especialmente durante os períodos chuvosos e despejo direto de efluentes urbanos e industriais, além do assoreamento e eutrofização causados por matéria orgânica,

nutrientes e metais pesados (Hwang, 2020; de Carvalho Aguiar *et al.*, 2018; Kjerfve *et al.*, 1997). O aumento populacional e o desenvolvimento industrial, aliados à falta de tratamento de esgoto, gestão inadequada de resíduos e fiscalização insuficiente, intensificam a degradação ambiental da baía (Costa *et al.*, 2023; Drabinski *et al.*, 2023; Freire *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2019).

A Baía de Guanabara tem uma renovação rápida da água, levando cerca de 11,4 dias para renovar metade de seu volume. No entanto, nas áreas internas da Baía de Guanabara, onde há uma alta carga de esgoto urbano, a renovação da água é mais lenta, resultando no acúmulo de contaminantes, especialmente na região norte e noroeste. Em contraste, nas regiões mais próximas à entrada da baía, a diluição das marés proporciona uma melhor qualidade da água (Bernardes Filho *et al.*, 2019; Fistarol *et al.*, 2015). Apesar disso, mesmo com a entrada de água do Oceano Atlântico e de rios e córregos, as áreas internas da baía são impróprias para banho. Apesar dos riscos associados à poluição, atividades como navegação, pesca e natação ainda são comuns na região (Canellas *et al.*, 2021).

De acordo com o Painel de Saneamento da Região Metropolitana do Rio de Janeiro, 36,3% da população não é contemplada com coleta de esgoto apropriada. O monitoramento da região evidencia a gravidade desse cenário, com mais de 4.300 hospitalizações e 40 óbitos registrados em 2022 devido a doenças de veiculação hídrica (Instituto Trata Brasil, 2022). A exposição direta às águas da Baía de Guanabara, seja por atividades recreativas como natação e pesca, aumenta o risco de desenvolver doenças gastrointestinais e outras infecções. No entanto, ainda há lacunas no conhecimento sobre os impactos específicos na saúde humana da exposição às águas da baía (Canellas *et al.*, 2021).

Apesar dos crescentes níveis de poluição, a atividade pesqueira continua sendo uma fonte importante de sustento para as comunidades locais, representando aproximadamente um terço da pesca total no estado do Rio de Janeiro. As atividades pesqueiras incluem pesca artesanal e comercial, bem como a coleta de mariscos e caranguejos (Bernardes Filho *et al.*, 2019; Abreu *et al.*, 2016). Carvalho *et al.* (2016) identificaram altos níveis das espécies *E. coli* e *Vibrio* em caranguejos de manguezais da Baía de Guanabara, associando a contaminação e a resistência antimicrobiana à poluição e à urbanização, evidenciando importantes riscos à saúde pública.

Estudos recentes destacam a presença crescente de microrganismos patogênicos na Baía de Guanabara, possivelmente devido ao impacto humano sobre o ambiente marinho. Canellas *et al.* (2021) identificaram *Aeromonas* spp. e *Vibrio* spp. como potenciais patógenos humanos,

com genes de resistência a beta-lactâmicos em isolados multirresistentes, reforçando a necessidade de monitoramento nesse estuário altamente poluído. A falta de tratamento adequado do esgoto despejado na região eleva os riscos à saúde pública, pois os efluentes domésticos carregam microrganismos potencialmente patogênicos, bactérias resistentes a antimicrobianos e resíduos de fármacos, favorecendo o surgimento de microrganismos adaptados e aumentando o risco de doenças para humanos e animais marinhos (Coutinho *et al.*, 2019; Fistarol *et al.*, 2015; Baquero *et al.*, 2008).

Dentre os microrganismos potencialmente patogênicos identificados na Baía de Guanabara destacam-se espécies de *Vibrio*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Clostridium* e *Bacillus*, representando riscos significativos ao ecossistema e à saúde humana (Silva *et al.*, 2019; Coutinho *et al.*, 2014; Vieira *et al.*, 2008). A contaminação microbiana, proveniente de resíduos domésticos e hospitalares não tratados, evidencia a urgência de tratamento adequado de esgotos para prevenir a disseminação desses microrganismos. Compreender a diversidade microbiana na Baía de Guanabara e os impactos antrópicos sobre esses organismos é essencial para avaliar os riscos à população, destacando a importância do tratamento adequado de esgotos para preservar a saúde pública (Coutinho *et al.*, 2019; Fistarol *et al.*, 2015).

Nos últimos anos, esforços significativos têm sido realizados para despoluir a Baía de Guanabara, um dos ecossistemas mais impactados pela poluição no Brasil. Desde a concessão da CEDAE em 2021, investimentos em saneamento básico têm promovido melhorias substanciais, incluindo obras que evitam o despejo diário de milhões de litros de esgoto na baía (G1, 2024). A concessionária Águas do Rio recuperou sistemas de esgotamento sanitário, impedindo que 82 milhões de litros de esgoto sejam lançados no ecossistema, e a meta é alcançar o tratamento universal até 2033, com coleta e tratamento de 1,3 bilhão de litros de resíduos por dia (Veja Rio, 2024). Dados do Instituto Estadual do Ambiente (Inea) indicam uma melhoria contínua da qualidade da água desde 2020, resultado direto dessas intervenções estruturais e do reforço das políticas ambientais voltadas para a recuperação do ecossistema da baía (G1, 2024).

Apesar dos avanços, a necessidade de monitoramento constante se mantém essencial, especialmente com o uso crescente da baía para atividades recreativas e esportivas. Com a progressiva melhoria da qualidade da água, a população tem frequentado com mais regularidade as praias da região, reforçando a necessidade de controle contínuo da poluição e manutenção

dos investimentos em saneamento (Veja Rio, 2024; Fistarol *et al.*, 2015). Medidas como a implantação de novas estações de tratamento, fiscalização rigorosa e conscientização ambiental são fundamentais para consolidar a recuperação da baía e garantir sua sustentabilidade para o lazer, a biodiversidade e a economia local (G1, 2024; Veja Rio, 2024).

## **1.6 Terapia fágica: avanços, aplicações e desafios no combate às infecções multirresistentes**

### **1.6.1 Terapia fágica no combate a infecções bacterianas multirresistentes**

Os bacteriófagos, ou fagos, são vírus que infectam especificamente bactérias, descobertos independentemente por Frederick Twort (1915) e Félix d'Hérelle (1917). Embora inicialmente considerados promissores no combate a infecções bacterianas, seu uso declinou após a introdução dos antibióticos na década de 1940, exceto em países do antigo bloco soviético, onde a terapia fágica permaneceu integrada aos sistemas de saúde (Chanishvili *et al.*, 2012; Abedon *et al.*, 2011; D'Herelle, 2007). Nos últimos anos, o aumento das infecções causadas por bactérias multirresistentes (MDR) e a desaceleração na descoberta de novos antibióticos reacenderam o interesse pela terapia fágica (Olawade *et al.*, 2024; Piedra *et al.*, 2024; Barbu *et al.*, 2016; Jin *et al.*, 2012).

A fagoterapia consiste no uso de fagos para tratar infecções bacterianas, aproveitando sua especificidade para atacar apenas as bactérias-alvo, levando frequentemente à lise celular. Essa especificidade preserva a microbiota benéfica e minimiza o risco de disbiose (Olawade *et al.*, 2024; Mitropoulou *et al.*, 2022). Além disso, os fagos se autoamplificam no local da infecção, prolongando o efeito terapêutico e reduzindo a necessidade de múltiplas administrações (Piedra *et al.*, 2024; Carascal *et al.*, 2022).

Os fagos estão entre os organismos biológicos mais abundantes na Terra, com cerca de  $10^{31}$  partículas virais distribuídas em ambientes diversos, como solo, água do mar, esgoto e fezes. Essa abundância facilita a descoberta de novos fagos com potencial terapêutico (Olawade *et al.*, 2024; Piedra *et al.*, 2024; Tamma *et al.*, 2022). O interesse pela terapia fágica tem crescido frente à ameaça crescente das infecções por bactérias multirresistentes (MDR), destacando-se como alternativa ou complemento ao tratamento antibiótico tradicional (Chegini *et al.*, 2021). Estudos destacam seu potencial no combate a patógenos do grupo ESKAPE, como *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e enterobactérias produtoras de  $\beta$ -lactamase de espectro estendido (ESBL) (Shamsuzzaman *et al.*,

2024; El-Telbany *et al.*, 2023; Kebriaei *et al.*, 2023; Tamma *et al.*, 2022; Grygorcewicz *et al.*, 2021).

Pesquisas têm destacado a eficácia dos bacteriófagos em diversas aplicações terapêuticas e, evidências demonstram seu potencial na eliminação de cepas de MRSA, tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo*. Uma pesquisa conduzida por Kebriaei *et al.* (2023) demonstrou que um coquetel de fagos foi capaz de reduzir significativamente a colonização por MRSA em um modelo murino de infecção em feridas. De modo semelhante, Lebeaux *et al.* (2021) mostrou que a terapia fágica, em combinação com antibióticos, foi eficaz na redução da colonização pulmonar por *Achromobacter xylosoxidans* multirresistente em um paciente transplantado de pulmão com fibrose cística, resultando em melhora clínica sustentada e amostras negativas por mais de dois anos após o tratamento.

Além disso, a combinação de fagos com antibióticos tem demonstrado efeitos sinérgicos no combate a infecções causadas por patógenos multirresistentes. Racenis *et al.* (2023) evidenciaram que essa abordagem foi eficaz no tratamento de infecções pulmonares provocadas por *P. aeruginosa* multirresistente, resultando em uma redução substancial na carga bacteriana e em melhorias significativas nos desfechos clínicos.

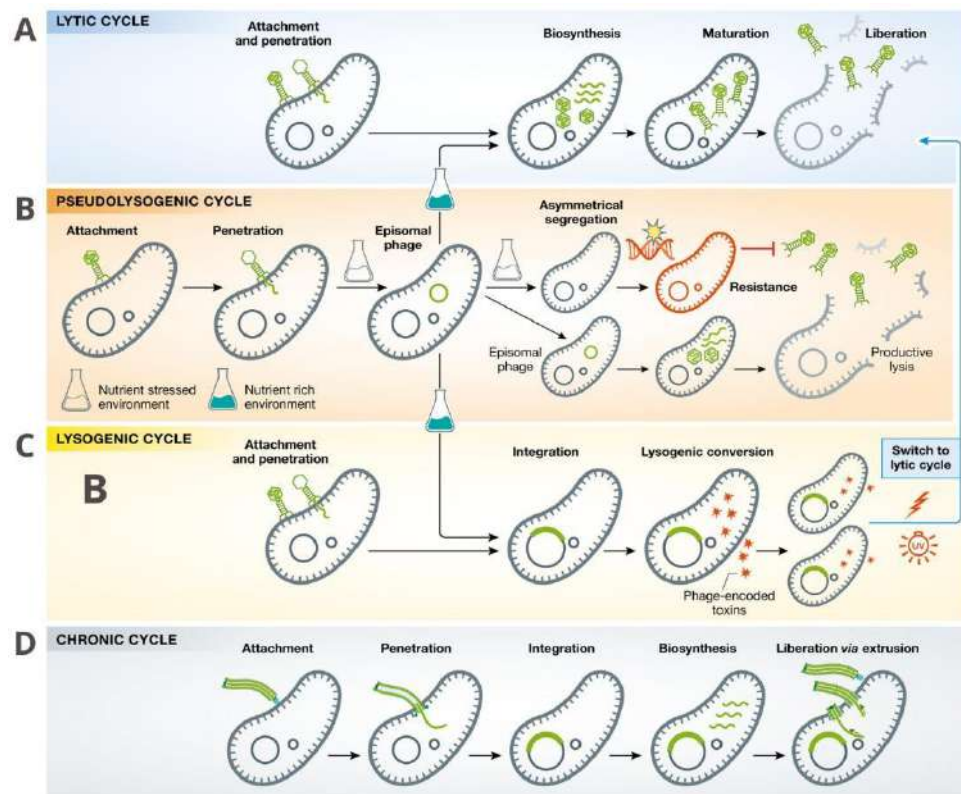
A terapia com fagos, tradicionalmente associada ao combate de bactérias extracelulares, expandiu seu escopo para incluir patógenos que também podem assumir formas de vida intracelulares, como *Mycobacterium tuberculosis* e *Salmonella* spp.. Esses microrganismos representam um desafio terapêutico devido à capacidade de sobreviver e proliferar dentro de células hospedeiras, onde a eficácia dos antibióticos convencionais é limitada pela barreira celular. No entanto, avanços na engenharia de fagos e no desenvolvimento de sistemas inovadores de administração têm ampliado significativamente seu uso no combate a infecções intracelulares (Dedrick *et al.*, 2019; Kropinski *et al.*, 2007).

### **1.6.2 Mecanismos de ação dos fagos**

Os bacteriófagos podem ser classificados conforme os seguintes ciclos de vida: lítico, lisogênico, pseudolisogênico e infecção crônica (Figura 4). No ciclo lítico, o fago infecta a bactéria, utiliza sua maquinaria celular para se replicar e, ao final, provoca a lise da célula hospedeira, liberando novas partículas virais. Esse ciclo é de particular interesse terapêutico devido à destruição direta das bactérias (Piedra *et al.*, 2024; Venturini *et al.*, 2022; Dedrick *et al.*, 2019). No ciclo lisogênico, o genoma viral integra-se ao DNA bacteriano, permanecendo

dormente como um profago até que condições ambientais induzam sua reativação para o ciclo lítico. Embora o ciclo lisogênico não resulte em destruição imediata, ele pode contribuir para a transferência horizontal de genes, incluindo aqueles relacionados à resistência a antibióticos, representando um desafio adicional para o controle de infecções (Olawade *et al.*, 2024; Zhang *et al.*, 2024; Nasr-Eldin *et al.*, 2023; Mitropoulou *et al.*, 2022).

Na pseudolisogenia, o fago permanece inativo dentro da bactéria sem integração cromossômica, podendo entrar nos ciclos lítico ou lisogênico quando as condições forem favoráveis. Já na infecção crônica, típica de fagos filamentosos (*Inoviridae*), ocorre a produção contínua de vírions sem lise da célula hospedeira (Venturini *et al.*, 2022).



**Figura 4** - Ciclos replicativos dos fagos. **(A)** Ciclo lítico – Após a infecção, o fago utiliza a maquinaria celular da bactéria para replicar seu genoma e montar novos vírions. A lise da célula hospedeira libera as partículas virais, permitindo a reinfecção de novas bactérias. **(B)** Ciclo pseudolisogênico – O genoma do fago permanece em estado episomal, sem integração ao cromossomo bacteriano. Durante a divisão celular, podem segregar-se assimetricamente, e uma fração pode entrar no ciclo lítico, favorecendo a seleção de subpopulações bacterianas resistentes. **(C)** Ciclo lisogênico – O material genético do fago integra-se ao cromossomo bacteriano, replicando-se passivamente com o hospedeiro na forma de profago. A transição para o ciclo lítico ocorre em resposta a estímulos ambientais específicos. **(D)** Infecção crônica – Característico de fagos filamentosos (*Inoviridae*), nos quais há produção contínua de vírions liberados por extrusão, sem lise ou morte da célula hospedeira. **Fonte:** Adaptado de Venturini *et al.*, 2022, artigo de acesso aberto disponível em: <https://doi.org/10.15252/emmm.202012435>

O ciclo de vida dos fagos envolve cinco etapas principais: adsorção, injeção do material genético, replicação, montagem de partículas virais e lise da célula hospedeira. A adsorção é altamente específica e ocorre por meio da interação entre proteínas de ligação ao receptor dos fagos e receptores bacterianos, como lipopolissacarídeos, proteínas e carboidratos na superfície celular (Piedra *et al.*, 2024; Dowah & Clokie, 2018). Após a injeção do material genético, os fagos sequestram a maquinaria metabólica bacteriana para produzir novas partículas virais, na maioria das vezes culminando na lise da célula e na liberação de novos fagos (Carascal *et al.*, 2022).

Enzimas fágicas, como endolisinas e despolimerases, têm sido amplamente estudadas por sua capacidade de degradar paredes celulares bacterianas, mesmo em biofilmes densos, destacando-se como potenciais agentes terapêuticos (Cui *et al.*, 2024). Um estudo conduzido por Yang *et al.* avaliou um fago específico para *Enterococcus faecalis* e sua endolisina, demonstrando atividade significativa contra biofilmes de *E. faecalis* isolados de infecções do trato urinário. Ambos reduziram substancialmente a densidade dos biofilmes, evidenciando seu potencial como ferramentas de biocontrole na eliminação dessas estruturas.

De forma semelhante, Grygorcewicz e colaboradores (2021) avaliaram um coquetel de fagos com alta atividade lítica (56%–84%) contra *A. baumannii* multirresistente. O tratamento reduziu significativamente a biomassa de biofilmes em urina humana. Além disso, a combinação dos fagos com os antibióticos trimetoprima/sulfametoxazol e ciprofloxacino potencializou os resultados, alcançando reduções de 94,3% e 93,3% na biomassa do biofilme, respectivamente.

### 1.6.3 Fagoterapia no combate a biofilmes

Os biofilmes são estruturas complexas que protegem bactérias contra terapias convencionais e representam um desafio significativo no tratamento de infecções. Fagos têm se mostrado promissores nesse contexto, especialmente pela produção de enzimas como despolimerases, que degradam componentes da matriz (EPS), facilitando a penetração e a ruptura da estrutura do biofilme (Cui *et al.*, 2024; Chegini *et al.*, 2021). Um estudo de Melo *et al.* (2019) avaliou a eficácia de fagos específicos contra enterococos em um modelo *in vitro* de feridas com biofilmes, demonstrando que os fagos conseguem atingir e eliminar tanto células bacterianas ativas quanto dormentes dentro dessas estruturas. De forma semelhante, Ribeiro *et al.* (2023) evidenciaram que coquetéis de fagos podem efetivamente combater sorovares de

*Salmonella* formadores de biofilmes, devido à ação de enzimas como despolimerases, que degradam a matriz extracelular e expõem as bactérias protegidas.

#### **1.6.4 Aplicações e vantagens da terapia com fagos**

A versatilidade dos fagos vai além da terapia antimicrobiana. Na biotecnologia, eles têm sido utilizados como plataformas para o desenvolvimento de vacinas, terapia do câncer e sistemas de entrega de genes. A tecnologia de exibição de fagos, que permite a apresentação de peptídeos ou proteínas na superfície viral, revolucionou o design de vacinas (Cui *et al.*, 2023; González-Mora *et al.*, 2020; Zhai *et al.*, 2019). Fagos modificados têm sido utilizados para criar imunógenos contra *Clostridioides difficile*, agente causador da colite pseudomembranosa, com resultados promissores em modelos pré-clínicos (Raeisi *et al.*, 2023).

Além de sua versatilidade biotecnológica, os fagos possuem vantagens terapêuticas notáveis, destacando-se pela alta segurança e especificidade, sem afetar células eucarióticas, o que os torna adequados para pacientes imunocomprometidos ou com infecções multirresistentes. Além disso, têm baixo impacto ambiental por serem organismos naturais, contrastando com os antibióticos, cuja produção gera subprodutos químicos com efeitos ambientais negativos (Cui *et al.*, 2024; Carascal *et al.*, 2022; Law & Aslam, 2020; Dedrick *et al.*, 2019).

#### **1.6.5 Desafios e limitações**

Apesar do potencial promissor, a terapia com fagos ainda enfrenta desafios importantes, como a estabilidade durante armazenamento, a resposta imunológica do hospedeiro e a possibilidade de resistência bacteriana, frequentemente associada a mutações nos receptores bacterianos ou à ativação de sistemas como o CRISPR-Cas. No entanto, avanços na engenharia genética e no uso de coquetéis de fagos têm demonstrado eficácia em superar essas limitações (Cocorullo *et al.*, 2024; Carascal *et al.*, 2022; Verbeken *et al.*, 2007). Com o progresso contínuo da pesquisa e inovação, a terapia fágica tem o potencial de se consolidar como uma abordagem essencial na medicina moderna, proporcionando soluções eficazes contra infecções resistentes e ampliando as opções terapêuticas disponíveis.

## 2 JUSTIFICATIVA

*Staphylococcus saprophyticus* é um patógeno oportunista amplamente disseminado no meio ambiente e presente na microbiota de humanos e animais. Sua relevância clínica é bem reconhecida, especialmente por sua associação com ITU em mulheres. No entanto, a compreensão de sua ecologia e evolução ainda é limitada, uma vez que poucos estudos investigam isolados aquáticos dessa espécie. Essa lacuna é particularmente evidente em locais como a Baía de Guanabara, um ambiente impactado pela poluição, mas amplamente utilizado para recreação e pesca. A presença de *S. saprophyticus* nesse ecossistema levanta preocupações sobre possíveis vias de disseminação, fontes de contaminação e fatores ambientais que possam influenciar sua patogenicidade. Além disso, a capacidade de *S. saprophyticus* formar biofilmes representa um desafio significativo para o tratamento de ITUs, especialmente diante da exposição a antimicrobianos em concentrações subinibitórias, que podem modular suas propriedades de adesão e virulência. Embora esse fenômeno tenha sido descrito para outros uropatógenos, sua relevância específica para *S. saprophyticus* ainda carece de investigação. A necessidade de aprofundar o conhecimento sobre os determinantes de virulência dessa espécie também se estende à avaliação de modelos experimentais que permitam a comparação entre isolados aquáticos e clínicos. Modelos alternativos, como o de *Tenebrio molitor*, oferecem uma abordagem acessível e eticamente viável para estudos de patogenicidade, possibilitando uma melhor compreensão do potencial infeccioso de linhagens aquáticas. Por fim, diante do aumento da resistência antimicrobiana, estratégias alternativas de controle, como o uso de bacteriófagos, se destacam como uma abordagem promissora. Esses vírus bactericidas são amplamente encontrados na natureza e representam uma possível ferramenta terapêutica para infecções por *S. saprophyticus*. Assim, investigações sobre sua eficácia dos fagos contra essa espécie podem contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, ampliando as opções disponíveis para o manejo de ITUs e outras infecções associadas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Realizar uma análise comparativa fenotípica e genotípica da virulência de cepas de *Staphylococcus saprophyticus* aquáticas, isoladas da Baía de Guanabara, com cepas clínicas, investigando o impacto das variações ambientais na virulência e o potencial terapêutico dos bacteriófagos contra estas bactérias.

#### 3.2 Objetivos específicos

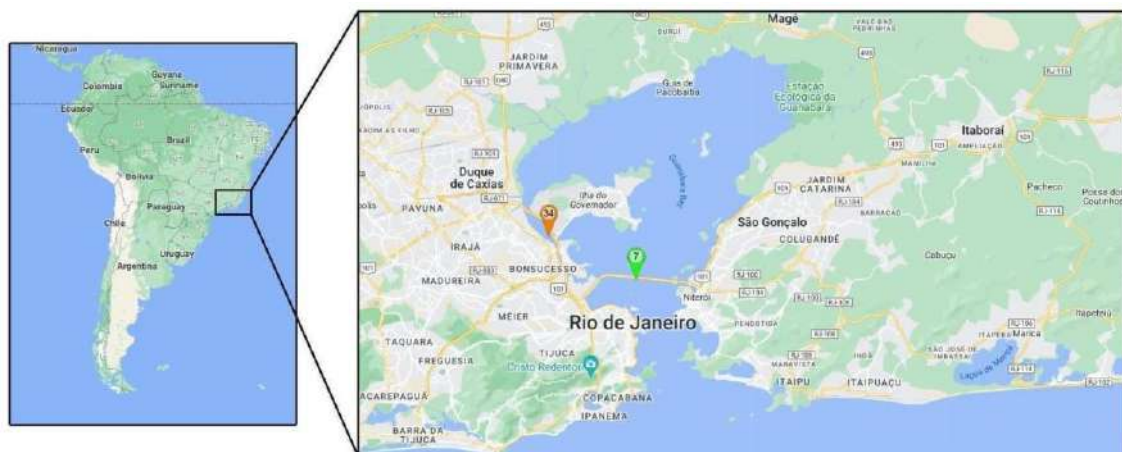
- Avaliar, a presença dos genes de virulência que codificam as proteínas de superfície UafA, Aas, Ssp, SdrI e SssF, bem como as enzimas DsdA e UreC;
- Analisar a capacidade de formação de biofilme de cepas de *S. saprophyticus*;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de ciprofloxacino para cepas de *S. saprophyticus*;
- Avaliar a formação de biofilme na presença de concentrações Sub-CIM de ciprofloxacino;
- Avaliar *in vivo* a virulência de cepas de *S. saprophyticus* utilizando o modelo invertebrado de *Tenebrio molitor*;
- Avaliar a capacidade lítica de uma coleção de sete bacteriófagos isolados de ambiente aquáticos nos Estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro;
- Avaliar a influência do bacteriófago lítico CSF na formação de biofilme.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Cepas de *S. saprophyticus* utilizadas

Neste estudo, foram analisadas 40 cepas de *S. saprophyticus*, sendo 20 provenientes de ambiente aquático e 20 de fonte clínica (Tabela 1). As cepas aquáticas foram coletadas previamente em dois locais distintos (Figura 5) e em diferentes níveis de profundidade na Baía de Guanabara, no Rio de Janeiro, Brasil, durante o ano de 2019, em colaboração com o Prof. Rodolfo Paranhos do Instituto de Biologia (UFRJ) e fazem parte da coleção do Laboratório de Microbiologia Molecular (IMPG – UFRJ).

O primeiro local de coleta está situado distante da costa, apresentando menor exposição a atividades humanas e, conseqüentemente, melhor qualidade da água. Em contraste, o segundo ponto localiza-se próximo à região costeira, caracterizando-se por níveis mais elevados de poluição. A distância entre esses dois pontos é aproximadamente 10 km (Vilar *et al.*, 2025).



**Figura 5** - Mapa dos pontos de coleta na Baía de Guanabara, situada no Rio de Janeiro, Brasil. O ponto 7 (22°52'12''S; 43°09'46''W), que apresenta a melhor qualidade de água, está representado em verde, enquanto o ponto 34 (22°50'09''S; 43°14'56''W), que apresenta os maiores índices de poluição, está destacado em laranja. **Fonte:** Adaptado de Vilar *et al.*, 2025, artigo de acesso aberto disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2025.102326>

Estudos prévios realizados por Vilar *et al.* (2025) caracterizaram as amostras coletadas nesses locais, destacando *S. saprophyticus* como a espécie mais prevalente, com frequência de 30,3%, especialmente no ponto costeiro. A maioria dos isolados de *S. saprophyticus* foi obtida de águas profundas, evidenciando significativa diversidade genética, com 10 genótipos distintos identificados entre as 20 linhagens analisadas.

As cepas clínicas de *S. saprophyticus* foram coletadas previamente de diferentes pacientes atendidos em hospitais localizados no Estado do Rio de Janeiro e fazem parte da coleção do

Laboratório de Infecção Hospitalar (LIH). As cepas foram isoladas de infecções urinárias, dermatite atópica e colonização durante o ano de 2018-2019.

Todas as cepas utilizadas nesse estudo tiveram a identificação confirmada em estudos prévios por meio de MALDI-TOF e PCR espécie-específico do gene *hrcA* (de Paiva-Santos *et al.*, 2018).

**Tabela 1** - Características gerais das 40 cepas (aquáticas e clínicas) de *S. saprophyticus* analisadas neste estudo.

Origem	Amostra	Fonte de isolamento	Ano de isolamento
BG	BG21 BG22 BG32 BG35	Ponto 7 (superfície)	2019
BG	BG23 BG24 BG25 BG26 BG27 BG28 BG29 BG30 BG31 BG33 BG36 BG37 BG38 BG39 BG40 BG41	Ponto 34 (profundo)	2019
IPPMG	60ad 75c 87c 94c 106c 143c 174c 224c	Colonização	2019
	110ad 228ad 521ad 601ad 744ad 759ad 794ad	Dermatite Atópica	2018
HUAP	RC41 RC78a	Infecção Urinária	2019

	RC141 RC181 RC299		
--	-------------------------	--	--

BG – Baía de Guanabara; HUAP - Hospital Universitário Antônio Pedro; IPPMG - Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira;

Além disso, foram incluídas três amostras utilizadas como controles nos testes realizados, conforme listado na Tabela 2.

**Tabela 2** - Características gerais das amostras utilizadas como controles nos testes realizados neste estudo.

Número da cepa	Descrição	Espécies	Referência
7108	Cepa clínica positiva para todos os genes de virulência investigados	<i>S. saprophyticus</i>	Gatermann <i>et al</i> , 1988
ATCC 35984	Cepa forte produtora de biofilme	<i>S. epidermidis</i>	Christensen <i>et al</i> , 1985
ATCC 29213	Cepa padrão para análise do teste de microdiluição em caldo	<i>S. aureus</i>	CLSI, 2023

## 4.2 Condições de cultivo e armazenamento

As cepas de *S. saprophyticus* foram cultivadas em meio *Brain Heart Infusion* (BHI - Becton Dickinson, EUA) acrescido de 1,5% de ágar (p/v) e incubadas a 37°C por 24 horas. Após o crescimento, as cepas foram estocadas em meio BHI caldo acrescido de 30% (v/v) de glicerol e mantidas a uma temperatura de -20°C.

## 4.3 Obtenção de DNA

A obtenção do DNA foi conduzida utilizando Chelex-100 (Bio-Rad), com adição de Proteinase K (Sigma-Aldrich), conforme descrito por Ahmad *et al.* (2025), com adaptações. As cepas bacterianas foram cultivadas em BHI ágar (BD®) e incubadas em estufa (ELETROlab®) a 37°C por 24 horas. Duas a três colônias bacterianas foram suspensas em microtubos contendo 200 µL de solução Chelex a 5% (m/v) em água ultrapura e 2 µL de proteinase K (Sigma-Aldrich) (20 mg/mL), seguidas de incubação em banho-maria (FANEM®) a 56°C por 1 hora. A solução foi homogeneizada brevemente com o auxílio de um *vórtex* (CRV-45X - CAPP®) e, em seguida, incubada a 100°C por 10 minutos em banho seco (BOEKEL Scientific®).

Posteriormente, os tubos foram novamente agitados no *vórtex* e centrifugados (5424-R - Eppendorf®) a 12.000g por 3 minutos. O sobrenadante, contendo o DNA, foi retirado e transferido para um novo microtubo, sendo quantificado por equipamento *Nanodrop lite spectrophotometer* (Thermo Scientific®) e armazenado a -20°C, até o momento de utilização.

#### 4.4 Detecção de genes de virulência nas cepas de *S. saprophyticus*

A presença dos genes de virulência *aas*, *uafA*, *ssp*, *sdrI*, *ureC*, *dsdA* e *sssF* em cepas de *S. saprophyticus* foi investigada por PCR (Tabela 3) utilizando *primers* específicos (IDT®). Os *primers* mencionados por Paiva-Santos *et al.* (2018) foram utilizados para amplificação dos genes *uafA*, *sdrI*, *sssF* e *ureC*. Os *primers* referentes à amplificação dos genes *aas*, *ssp* e *dsdA* foram os descritos por Korte-Berwanger *et al.* (2013). Os iniciadores utilizados neste trabalho estão apresentados na tabela 4. Conforme descrito por Sakinc *et al.* (2006), a cepa selvagem de *S. saprophyticus* 7108, foi utilizada como controle positivo devido à sua codificação de todos os genes de virulência investigados neste estudo.

**Tabela 3** - Genes de virulência analisados por PCR das cepas de *S. saprophyticus* neste estudo.

Gene	Função	Referência
<i>ssp</i>	Proteína associada à superfície	Korte-Berwanger <i>et al.</i> (2013)
<i>sdrI</i>	Proteína de repetição de serina-aspartato	Sakinc <i>et al.</i> (2006)
<i>aas</i>	Autolisina	Korte-Berwanger <i>et al.</i> (2013)
<i>uafA</i>	Fator de uro-aderência A	Kuroda <i>et al.</i> (2005)
<i>ureC</i>	Urease	Gatermann <i>et al.</i> (1989)
<i>dsdA</i>	D-serina-deaminase	Korte-Berwanger <i>et al.</i> (2013)
<i>sssF</i>	Proteína de superfície	King <i>et al.</i> (2012)

As reações de PCR foram realizadas individualmente contendo um par de iniciador, em um volume final de 12,5 µL, contendo aproximadamente 25 ng de DNA como molde, 6,25 µL de GoTaq G2 Green Master Mix (Promega), 20 pM/µL de cada iniciador (Tabela 4), e 4,25 µL de água. A amplificação foi realizada em um termociclador Classic GM-02 (Heal Force).

Os fragmentos-alvo de cada gene foram amplificados após a desnaturação do DNA a 95°C por 5 min. Em seguida, foram realizados 30 ciclos de amplificação específicos para cada gene.

Ciclo 1 (*ssp/sdrI*): 95°C por 30 segundos (desnaturação), 60°C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 30 segundos (extensão). Ciclo 2 (*uafA/aas/sssF/ureC*): 95°C por 45 segundos (desnaturação), 55°C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 30 segundos (extensão). Ciclo 3 (*dsdA*): 95°C por 30 segundos (desnaturação), 58°C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 30 segundos (extensão). Após os ciclos de amplificação, houve uma etapa final de extensão a 72°C por 5 min (Termociclador Classic GM-02 - Heal Force).

**Tabela 4** - Iniciadores utilizados para detecção de genes de virulência entre as cepas de *S. saprophyticus* neste trabalho.

Gene	Sequência (5' → 3')	Amplicon (pb)	T de anelamento (°C)	Referência
<i>ssp</i>	F-TGGTGCTGCACATGCAGAAAG R-ACGGACAGTTTGTCTCCCATAC	129	60	Korte-Berwanger <i>et al.</i> (2013)
<i>sdrI</i>	F-CAACGTGCAACAACAGATGAC R-TATTTGATGGCGACGGAGTG	111	60	de Paiva-Santos <i>et al.</i> (2018)
<i>aas</i>	F-GCCGACTACGCAGCAACTAAC R-CCATGAGGGTCAGAGTGGTCAG	136	55	Korte-Berwanger <i>et al.</i> (2013)
<i>uafA</i>	F-GTAGATGACTCCGTGGTTGAAG R-AGCGATTGTTCTCCATTAGC	125	55	de Paiva-Santos <i>et al.</i> (2018)
<i>ureC</i>	F-CCATGTGTAATGGCTGGGTT R-GCAAGTTTGCTCACCGTATGA	122	55	de Paiva-Santos <i>et al.</i> (2018)
<i>dsdA</i>	F-TTACTGAACCAACACATGCCCC R-ATTTGCCCGACTAAGCGAGATG	147	58	Korte-Berwanger <i>et al.</i> (2013)

<i>sssF</i>	F-GGTACCAAAGTCTATTTGACG	118	55	de Paiva- Santos <i>et al.</i> (2018)
	R-AGCTACCCGAGGAATCACC			

---

Pb - pares de bases; F - *forward*; R - *reverse*.

Após a reação de PCR, os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Promega®) a uma concentração de 1,2% (m/v), preparado em tampão Tris-Borato EDTA (TBE) 0,5x pH 8. Para a eletroforese foi realizada em tampão TBE 0,5x a uma tensão de 80V, por aproximadamente 30 minutos. Como comparação, o padrão de tamanho molecular de 100pb (Thermo Scientific) foi utilizado. Posteriormente, o gel foi corado por imersão em uma solução de brometo de etídio a 0,5 µg/mL (Sigma-Aldrich) por 30 minutos. Em seguida, as bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta em um transiluminador L-Pix touch (Loccus®).

#### 4.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) do antimicrobiano ciprofloxacino (Sigma-Aldrich) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, conforme as diretrizes estabelecidas pelo CLSI (2024). Inicialmente, uma solução estoque do antimicrobiano foi preparada (40 µg/mL) e armazenada a -20 °C. As diluições do antimicrobiano foram realizadas em caldo Müeller-Hinton *cation-adjusted* (Sigma-Aldrich) com concentrações variando entre 0,03 µg/mL e 2 µg/mL. Ao final do procedimento, cada fileira horizontal da placa de 96 poços com fundo côncavo, (Techno Plastic Products AG) apresentou concentrações decrescentes do antimicrobiano, enquanto a última fileira vertical foi utilizada como controle, contendo apenas caldo BHI e o inóculo, sem o antimicrobiano. Para fins de comparação, a CIM também foi determinada em meio BHI (HiMedia®), mantendo as condições utilizadas nos ensaios de formação de biofilme. O crescimento obtido em BHI ágar (Sigma-Aldrich) após incubação a 37 °C por 24 horas foi suspenso em solução salina estéril 0,9 % [cloreto de sódio (m/v) - Merck] até atingir um padrão de turvação equivalente à escala do tubo 0,5 da escala de McFarland (~1,5 x 10<sup>8</sup> UFC/mL). Em seguida, o inóculo foi diluído 1:10 (v/v) em salina estéril e desta solução, foram transferidos 5 µL para cada poço da coluna horizontal da placa. As placas foram incubadas a 35 °C por um período de 16 a 20 horas.

A CIM foi definida como a menor concentração de antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano visível. A leitura foi realizada visualmente, conforme os critérios do

CLSI (2024), considerando como CIM o menor valor em que não houve formação de "botão" ou turvação no meio de cultura. De acordo com o CLSI (2024), a classificação de sensível, intermediário e resistente à ciprofloxacino é definida por valores de CIM de  $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ ,  $2 \mu\text{g/mL}$  e  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente. A amostra de *S. aureus* ATCC 29213 foi utilizada como controle do teste.

#### 4.6 Análise da formação de biofilme

A avaliação da formação de biofilme por cepas de *S. saprophyticus* foi realizada em microplacas de poliestireno de 96 poços com fundo chato (K12-096 – Kasvi), utilizando o método de cristal violeta conforme descrito por Stepanovic *et al.* (2007) com adaptações. Inicialmente, as cepas foram previamente cultivadas em BHI ágar (BD®) por 24 horas a 37 °C. Posteriormente, algumas colônias de cada cepa foram suspensas em solução salina estéril, ajustando a turvação da suspensão bacteriana para o tubo 0,5 da escala McFarland ( $\sim 1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Em seguida, os poços da placa foram preenchidos com 20  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana em 180  $\mu\text{L}$  BHI (HiMedia®). Para fins de controle, a cepa da espécie *S. epidermidis* (ATCC 35984) foi utilizada como controle positivo, enquanto o controle negativo consistiu em poços contendo apenas caldo BHI (HiMedia®). Posteriormente, a placa foi incubada em estufa por 48 horas a 37 °C. Após esta etapa foi realizada a leitura visual para confirmar o crescimento das cepas e verificar ausência de contaminação nos controles negativos. Em seguida, os meios de cultura foram removidos dos poços, e a placa passou por três lavagens com 200  $\mu\text{L}$  de solução PBS (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*) (Laborclin®), com o objetivo de remover as células planctônicas não aderidas. A placa foi fixada na estufa por 1 hora a 60 °C, e as células aderidas foram coradas com 200  $\mu\text{L}$  de uma solução de cristal violeta a 0,1% (p/v) (Sigma-Aldrich) por 15 minutos, à temperatura ambiente. Após esse período, o corante foi removido, e a placa passou por um novo ciclo de lavagem. Após a lavagem e secagem da placa, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de solução de etanol 95% (v/v) em cada poço, mantendo-a por 30 minutos à temperatura ambiente. A absorbância foi medida utilizando um leitor de ELISA (LMR-96-4 - Loccus®) na faixa de 570 nm. Os experimentos foram realizados em quadruplicatas técnicas e biológicas e, os resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

Seguindo a metodologia descrita por Stepanovic e colaboradores (2007), as cepas foram categorizadas em produtoras fortes, moderadas, fracas e não produtoras de biofilme, com base na média das densidades ópticas (DO). Essa classificação foi determinada comparando-se a média da absorbância das amostras subtraídas do valor médio do controle negativo (MA) com

o valor de corte (VC), calculado da seguinte forma: somou-se a média do controle negativo (CN) com três vezes o desvio padrão (dp), obtendo-se assim o VC, ou seja,  $VC = \text{média (CN)} + 3 \times dp \text{ (CN)}$ . Para calcular a média, os valores discrepantes foram desconsiderados.

As amostras foram categorizadas da seguinte forma: fortes produtoras (média de absorvância superior a quatro vezes o valor de corte), moderadas (média de absorvância entre duas e quatro vezes o valor de corte), fracas (média de absorvância entre uma e duas vezes o valor de corte) e não produtoras (média de absorvância igual ou inferior ao valor de corte). Parâmetros ilustrados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Parâmetros para classificação das cepas de *S. saprophyticus* 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 absorvância; VC: valor de corte.

Adicionalmente, foi realizado um cálculo individual para cada placa, seguido de uma análise estatística dos valores absolutos das médias da densidade óptica (DO) obtidas nos quatro experimentos distintos. Esse procedimento visou minimizar a variação nos resultados, possibilitando uma comparação mais precisa entre as cepas de origem aquática e clínica. O teste estatístico aplicado permitiu avaliar as diferenças na densidade óptica entre esses dois grupos analisados.

#### 4.6.1 Formação de biofilme na presença de Sub-CIM de ciprofloxacino

As análises das Sub-CIMs na formação de biofilmes foram realizadas em seis cepas aquáticas e seis clínicas de *Staphylococcus saprophyticus*. Para isso, as cepas foram inicialmente cultivadas em BHI ágar (BD®) por 24 horas a 37 °C. Após o período de crescimento, colônias isoladas de cada cepa foram suspensas em solução salina estéril, e a

suspensão bacteriana foi ajustada para o tubo 0,5 da escala de McFarland ( $\sim 1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Em seguida, 180  $\mu$ L de BHI (HiMedia®), contendo diluições seriadas de ciprofloxacino variando de CIM a CIM/16, foram distribuídos em cada poço da placa de microdiluição, aos quais foram adicionados 20  $\mu$ L da suspensão bacteriana. Como controle de crescimento, utilizaram-se poços contendo BHI inoculado sem o antimicrobiano, enquanto o controle negativo consistiu em poços com apenas caldo BHI (HiMedia®). As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas, e a leitura dos resultados foi realizada conforme os critérios descritos anteriormente no tópico 4.6, referente à formação de biofilme.

#### 4.7 Infecção *in vivo* em larvas de *T. molitor*

As larvas de *T. molitor* foram adquiridas de um produtor local e mantidas em laboratório a 4°C em recipientes plásticos opacos, ao abrigo da luz, com mistura comercial de sementes e grão, por um período de até 2 semanas. Conforme protocolo estabelecido por Andrade e colaboradores (2023), as larvas foram infectadas com as 20 cepas aquáticas e 20 cepas clínicas de *S. saprophyticus*, e os experimentos foram conduzidos em grupos de 15 larvas cada, em triplicatas biológicas. As larvas foram selecionadas por sua coloração clara e uniforme, pesando entre 70 e 100 mg e medindo aproximadamente 2 cm (Figura 5).

A infecção foi realizada na hemocele das larvas por meio de injeção na porção ventral do segundo esternito visível (Figura 6). As cepas de *S. saprophyticus* foram previamente cultivadas em 1 mL de caldo BHI por 24 horas, centrifugadas e ressuspensas em solução salina estéril 0,9% (m/v). Cada larva foi inoculada com 10  $\mu$ L de uma suspensão de *S. saprophyticus* em salina estéril, com diluições seriadas de  $10^0$  a  $10^{-7}$ , utilizando seringa de insulina. Em paralelo, 10  $\mu$ L de cada diluição foram semeados em placas de BHI para confirmação da concentração inicial de células. Embora tenham sido testadas concentrações de até  $10^7$  UFC/mL, a análise dos resultados foi padronizada para  $10^6$  UFC/mL, titulação atingida por todas as cepas. O grupo controle recebeu uma injeção de 10  $\mu$ L de NaCl 0,9% (m/v). As larvas foram posteriormente separadas em placas de Petri e incubadas a 37°C por 72 horas para permitir o crescimento bacteriano. As larvas foram monitoradas diariamente quanto à atividade e sobrevivência, considerando-se as larvas mortas quando se encontravam imóveis, não respondiam ao toque ou apresentavam melanização.



**Figura 6** - Modelo de infecção por *T. molitor*. **(A)** Foram selecionadas larvas de aproximadamente 2 cm, com coloração clara e uniforme, sem manchas escuras. **(B)** A inoculação foi realizada na porção ventral, com a injeção do inóculo na hemocele, no segundo esternito visível. **(C)** As setas brancas indicam as larvas mortas, que apresentam a melanização característica.

#### 4.8 Espectro lítico dos bacteriófagos

Os bacteriófagos utilizados neste estudo foram previamente isolados a partir de cepas aquáticas, incluindo esgotos, água marinha e rejeitos de fazendas, e integram as coleções do Laboratório de Microbiologia Molecular (IMPG – UFRJ) e do Laboratório de Biotecnologia Molecular (UFV).

Os fagos isolados, provenientes do estado de Minas Gerais, foram denominados CSF, LGN, GLS e SS8, e aqueles provenientes do estado do Rio de Janeiro, TJK, LUF e LUG. Para propagação e preservação, os fagos foram cultivados em suas hospedeiras originais e armazenados em tubo falcon contendo tampão SM (composto por 0,1 M de NaCl, 0,2 M de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1 M de Tris-HCl, pH 7,5, e 0,1% de gelatina), sob refrigeração a 4°C. As concentrações obtidas variaram de  $10^8$  a  $10^{12}$  UFP/mL, garantindo a viabilidade para os ensaios subsequentes.

A atividade lítica dos fagos foi avaliada frente às 40 cepas de *S. saprophyticus* analisadas neste estudo. Para isso, as cepas bacterianas e os fagos isolados foram submetidos a testes de suscetibilidade para determinar a capacidade lítica dos fagos. Inicialmente, 10µL de cada cepa foram inoculados em 10 mL de meio BHI líquido e incubados sob agitação a 37 °C por 24 horas. No dia seguinte, as bactérias cultivadas foram adicionadas em 3mL de meio semissólido, que foi então vertido em placas de BHI. Após a solidificação do meio, 3µL de cada fago foram pipetados sobre as placas, que foram incubadas a 37 °C por 24 horas. As zonas de lise foram avaliadas no dia seguinte, observando-se a presença ou a ausência de lise nas placas.

#### **4.8.1 Formação de biofilme na presença do bacteriófago CSF**

Para analisar a formação de biofilme na presença de bacteriófago, o fago CSF foi selecionado por apresentar a maior atividade lítica nos testes iniciais, sendo considerado o mais promissor para avaliar sua eficácia na redução de biofilmes formados pelas 40 cepas de *S. saprophyticus* analisadas neste estudo. A metodologia adotada foi baseada no protocolo descrito por Stepanovic, detalhado no item 4.6. Inicialmente, as cepas foram cultivadas em ágar BHI (BD®) por 24 horas a 37 °C. Após o crescimento, as colônias isoladas de cada cepa foram suspensas em solução salina estéril, e a suspensão bacteriana foi ajustada para o tubo 0,5 da escala de McFarland. Em seguida, 2 µL desta suspensão bacteriana foram adicionados a cada poço de placas de microdiluição contendo 100 µL de BHI líquido e 100 µL do fago CSF. Como controle positivo de crescimento, foram utilizados poços contendo a cepa BG21, enquanto o controle negativo consistiu em poços contendo apenas BHI líquido. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas. Após o período de incubação, os biofilmes foram avaliados de acordo com os critérios estabelecidos no item 4.6. Em seguida, os dados obtidos foram analisados utilizando o software Excel para calcular o percentual de redução do biofilme em formação. Essa análise permitiu quantificar a eficácia do bacteriófago CSF na redução da formação de biofilmes pelas cepas de *S. saprophyticus* estudadas.

#### 4.9 Análises estatísticas

As análises estatísticas e a plotagem dos gráficos foram conduzidas utilizando o programa GraphPad Prism 8 (Graph-Pad, La Jolla, CA, EUA). Os registros de mortalidade foram representados através de curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier e submetidos à análise pelo teste Log-rank. A significância estatística foi estabelecida em  $p < 0,05$  para o teste Log-rank. O teste estatístico log-rank foi realizado por meio do software SigmaPlot para comparar os dois grupos (aquáticos e clínicos), a fim de aprofundar a avaliação da patogenicidade entre as cepas de ambas as origens. Os resultados não revelaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados ( $p < 0,05$ ). Os valores médios obtidos nos testes de formação de biofilme, realizados na presença e ausência de concentrações Sub-CIM de ciprofloxacino, foram comparados utilizando o teste de Análise de Variância (ANOVA). As comparações aos pares foram realizadas pelo teste de Tukey, considerando  $p < 0,05$  como estatisticamente significativo. A formação de biofilme na presença de fago foi comparada com aquela observada na ausência de fago por meio do teste t de Student.

### 5 Resultados

#### 5.1 Detecção dos genes de virulência em *S. saprophyticus*

Foram analisadas todas as 40 cepas de *S. saprophyticus*, aquáticas e clínicas, para detectar a presença de genes de virulência que codificam as proteínas de superfície UafA, Aas, Ssp, SdrI e SssF, além das enzimas DsdA e UreC. Como controle positivo, utilizamos a cepa ATCC 7108. Os resultados evidenciaram uma alta prevalência dos genes de virulência nas cepas avaliadas. Os genes *aas*, *ssp*, *ureC* e *dsdA* foram detectados em 100% (n=40) das cepas, enquanto *uafA* (fator de adesão) e *sssF* (proteína de superfície celular) foram encontrados em 97% (n=39) e 82% (n=33) das cepas, respectivamente. Apenas uma cepa de origem ambiental não apresentou o gene *uafA*, enquanto três cepas aquáticas e quatro clínicas não possuíam o gene *sssF*. Por outro lado, o gene *sdrI*, também associado a uma proteína de superfície, não foi identificado em nenhuma das cepas testadas (Tabela 6).

**Tabela 6** - Distribuição dos genes de virulência nas cepas de *S. saprophyticus* nos grupos aquático e clínico.

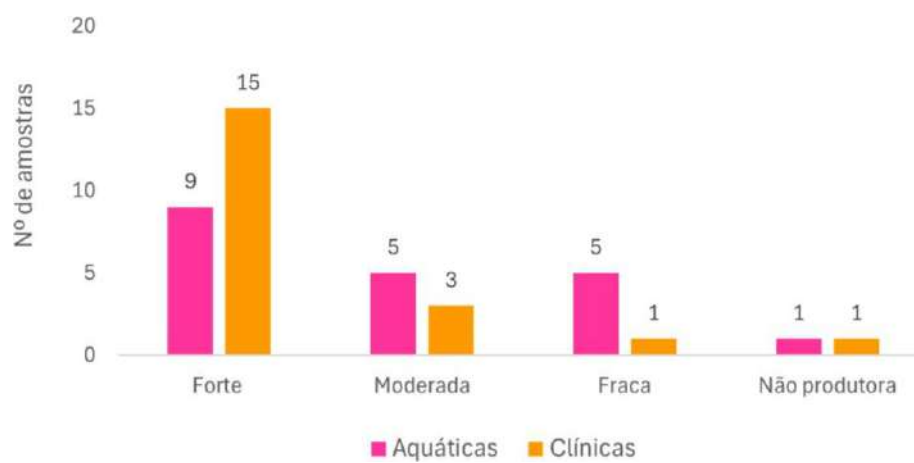
	<i>uafA</i>	<i>aas</i>	<i>sssF</i>	<i>ssp</i>	<i>sdrI</i>	<i>dsdA</i>	<i>ureC</i>
<b>ATCC 7108*</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>Cepas clínicas (n=20)</b>	100%	100%	80%	100%	0%	100%	100%
<b>Cepas aquáticas (n=20)</b>	95%	100%	85%	100%	0%	100%	100%

\*Cepa utilizada como controle para a análise de todos os genes neste estudo.

## 5.2 Avaliação da formação de biofilme

A formação de biofilme foi analisada nas 40 cepas de *S. saprophyticus*. Observou-se que um maior número de cepas de origem clínica demonstrou maior tendência à formação de biofilmes mais fortemente aderidos, quando comparadas às cepas de origem aquática, de acordo com os critérios de classificação estabelecidos por Stepanovic *et al.* (2007). Contudo, ao analisar a média da densidade óptica (DO), não foi identificada uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Considerando ambos os grupos, 95% das cepas foram identificadas como produtoras de biofilme (n=38). Analisando o grupo cepas aquáticas, 45% (n=9) foram classificadas como fortes produtoras, 25% (n=5) como moderadas, 25% (n=5) como fracas e, 5% (n=1) não formaram biofilme. Já nas cepas clínicas, 75% (n=15) foram classificadas como fortes produtoras, 15% (n=3) como moderadas, 5% (n=1) como fracas e 5% (n=1) não formaram biofilme. A distribuição das cepas em relação à classificação da formação de biofilme nos grupos analisados está ilustrada na Figura 7, e os resultados detalhados da classificação para cada cepa podem ser consultados na Tabela 7.

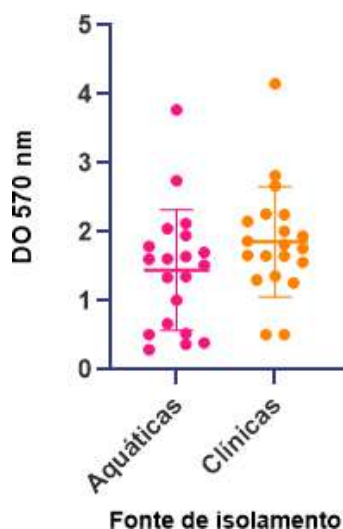


**Figura 7** - Distribuição das 40 cepas de *Staphylococcus saprophyticus* analisadas quanto à capacidade de formação de biofilme.

**Tabela 7** - Classificação das cepas de *S. saprophyticus* quanto à capacidade de produção de biofilme entre as cepas analisadas no estudo.

Cepas Aquáticas		Cepas Clínicas	
Produção de biofilme	Cepas	Produção de biofilme	Cepas
FORTE	BG21	FORTE	RC41
	BG22		RC78a
	BG23		RC141
	BG24		RC181
	BG33		RC299
	BG36		60ad
	BG37		75c
	BG40		87c
	BG41		94c
MODERADA	BG25	MODERADA	106c
	BG28		110ad
	BG31		224c
	BG32		228ad
	BG39		744ad
FRACA	BG26	FRACA	759ad
	BG27		521ad
	BG29		601ad
	BG30		794ad
NÃO PRODUTORA	BG35	NÃO PRODUTORA	143c
			174c

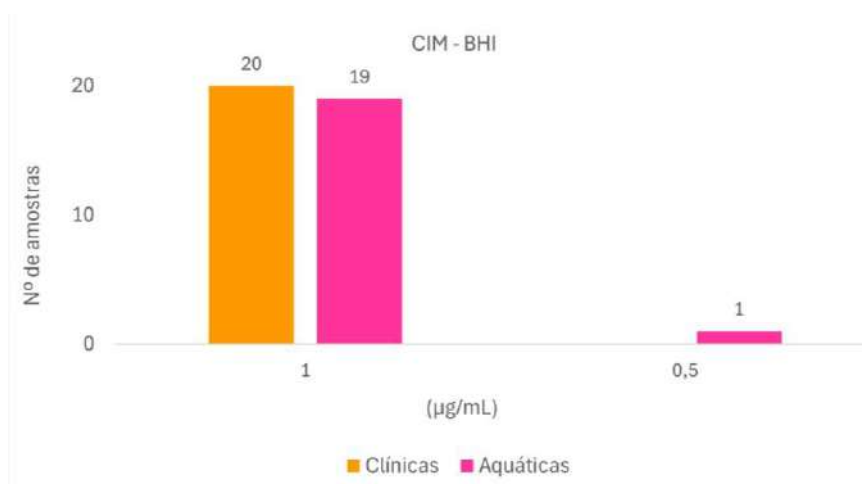
A Figura 8 ilustra a distribuição dos valores da  $DO_{570nm}$  associados à formação de biofilme em placas de poliestireno das 40 cepas analisadas neste estudo. Embora algumas cepas apresentem valores extremos divergentes, a maioria das cepas aquáticas e clínicas apresentaram biofilmes com turbidez medida similar, não havendo diferença significativa entre as médias de cada grupo (ANOVA;  $p < 0,05$ ).



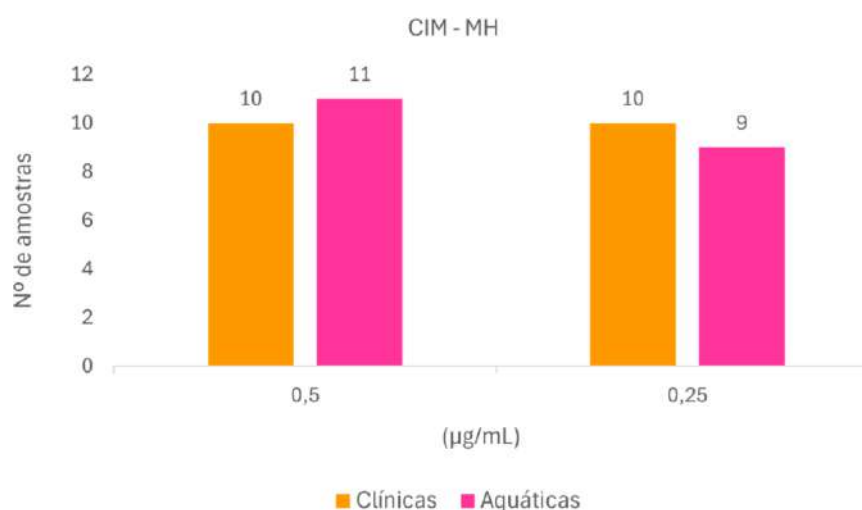
**Figura 8** - Distribuição dos valores de  $DO_{570nm}$  associados ao biofilme formado em placa de 96 poços entre as 20 cepas de *S. saprophyticus* aquáticas e as 20 de origem clínica. A diferença não foi significativa ( $p$ -valor < 0,05).

### 5.3 Influência de concentrações subinibitórias de ciprofloxacino em cepas de *S. saprophyticus*

Todas as 40 cepas analisadas apresentaram sensibilidade ao antimicrobiano ciprofloxacino, considerando os critérios estabelecidos pelo CLSI (2023), que considera resistência quando a CIM é superior ou igual a 1  $\mu\text{g/mL}$  em meio Müller-Hinton (MH). Para garantir a padronização do meio de cultivo na análise do biofilme, os resultados foram obtidos utilizando o meio BHI em vez de MH. Entre as cepas testadas no meio BHI, uma apresentou CIM de 0,5  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto as demais 39 cepas exibiram CIM de 1  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 9). No meio MH, 21 cepas apresentaram CIM de 0,5  $\mu\text{g/mL}$  e as 19 restantes demonstraram CIM de 0,25  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 10). Observou-se que os valores de CIM determinados no meio BHI, utilizado nos ensaios de formação de biofilme, diferiram em uma a duas diluições daqueles obtidos pelo método clássico de microdiluição em caldo com meio Müller-Hinton.



**Figura 9** - Distribuição das concentrações inibitórias mínimas (CIM) de ciprofloxacino determinadas em meio BHI para as cepas de *S. saprophyticus* analisadas.

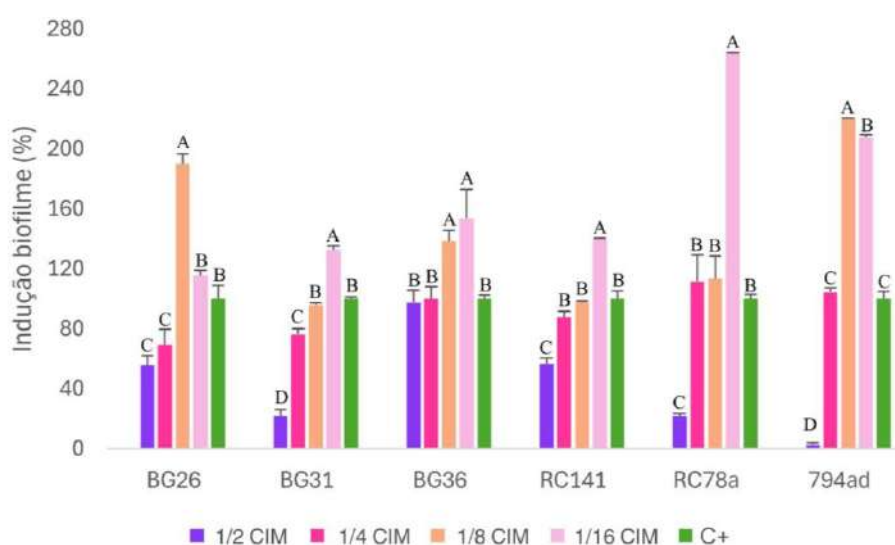


**Figura 10** - Distribuição das concentrações inibitórias mínimas (CIM) de ciprofloxacino determinadas em meio Müller-Hinton (MH) para as cepas de *S. saprophyticus* analisadas.

### 1.1.1. Avaliação da formação de biofilme na presença de Sub-CIM de ciprofloxacino

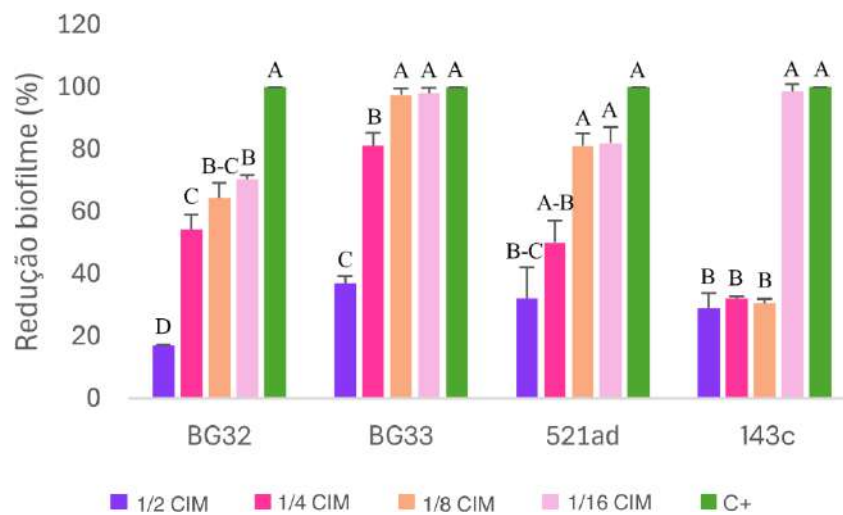
Posteriormente, foram selecionadas seis cepas de origem aquática e seis clínicas para avaliar a formação de biofilme na presença de concentrações Sub-CIM de ciprofloxacino. Em cada grupo, as cepas foram selecionadas de acordo com a capacidade de formação de biofilme, sendo duas fortes, duas moderadas, uma fraca e uma não produtora. Os experimentos foram realizados em duplicatas técnicas e biológicas. Na presença do antimicrobiano ciprofloxacino, observou-se uma variação significativa no comportamento das cepas quanto à formação de biofilme, dependendo da Sub-CIM utilizada.

Em seis cepas, houve um aumento na indução de biofilme nas concentrações entre  $\frac{1}{4}$  e  $\frac{1}{16}$  da CIM, com duas delas apresentando um aumento de até 100% na formação de biofilme (Figura 11). Entre essas cepas, três foram previamente classificadas como fortes produtoras de biofilme, duas como moderadas e uma como fraca. Notavelmente, a cepa BG26, inicialmente classificada como fraca produtora de biofilme, exibiu um aumento expressivo de até 89% na formação de biofilme quando exposta à  $\frac{1}{8}$  da Sub-CIM.



**Figura 11** - Capacidade de indução da formação de biofilme por *S. saprophyticus* na presença de Sub-CIM de ciprofloxacino. Barras identificadas pela mesma letra para uma única cepa são consideradas estatisticamente equivalentes. CIM - Concentração Inibitória Mínima; C+ - Controle positivo na ausência de antimicrobiano. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas técnicas e duplicatas biológicas, e os valores médios obtidos para cada cepa foram comparados por ANOVA, seguido do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ); (%) - indução da produção de biofilme.

Por outro lado, quatro outras cepas exibiram uma redução na formação de biofilme quando expostas às concentrações subinibitórias testadas (Figura 12). Por fim, as duas cepas não formadoras de biofilme (BG35 e 174c) não apresentaram nenhuma alteração significativa na formação de biofilme, independentemente da exposição às Sub-CIM.



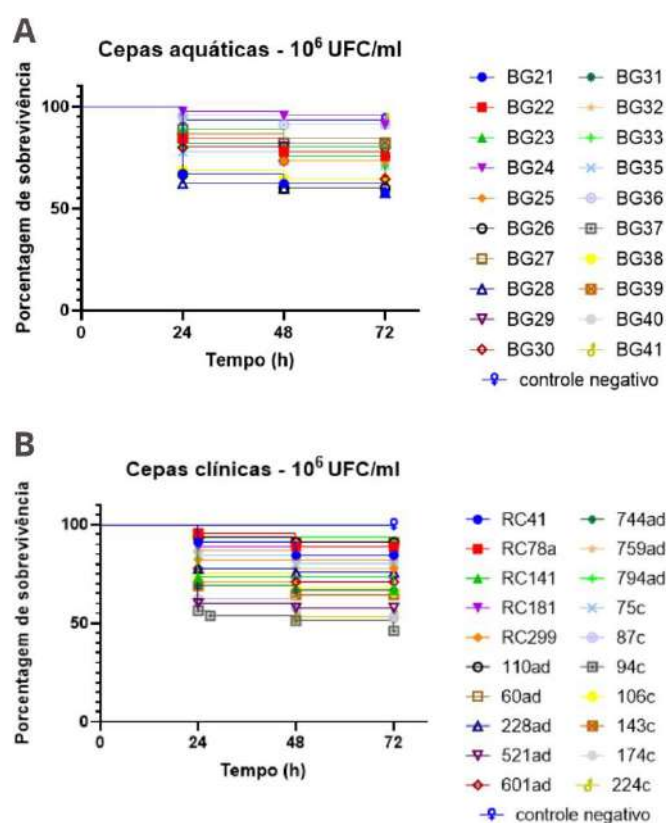
**Figura 12** - Redução da formação de biofilme por *S. saprophyticus* na presença de Sub-CIM de ciprofloxacino. Barras identificadas pela mesma letra para uma única cepa são consideradas estatisticamente equivalentes. CIM - Concentração Inibitória Mínima; C+ - Controle positivo; os experimentos foram realizados em duplicatas técnicas e duplicatas biológicas, e os valores médios obtidos para cada cepa foram comparados por ANOVA, seguido do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 5.4 Avaliação da virulência de cepas de *S. saprophyticus* no modelo invertebrado

##### *Tenebrio molitor*

Com o objetivo de avaliar a virulência das 20 cepas clínicas e 20 cepas aquáticas de *S. saprophyticus*, foram realizados testes utilizando larvas do invertebrado *Tenebrio molitor*. As cepas apresentaram diferentes taxas de crescimento, resultando em variações nas densidades ópticas (DO). Os testes de virulência realizados nas larvas de *T. molitor* revelaram um perfil de patogenicidade semelhante entre as cepas de *S. saprophyticus* de origem aquática e clínica, conforme indicado pelas curvas de sobrevivência (Figura 13). Esses resultados sugerem que não há diferença significativa na capacidade patogênica das cepas de ambas as origens no modelo experimental. As cepas aquáticas BG21, BG26, BG28 e BG32 destacaram-se por apresentarem as maiores taxas de mortalidade entre as cepas analisadas. De forma semelhante, as cepas clínicas 87, 94, 224 e 521 também exibiram elevados índices de mortalidade.

Entre as oito cepas mais letais, quatro eram de origem aquática. Notavelmente, uma dessas cepas, classificada como fraca produtora de biofilme e sem o gene *sssF*, apresentou um aumento de até 89% na formação de biofilme na presença de Sub-CIM. Esses achados indicam a relevância do modelo de *T. molitor* para investigar a virulência e as características fenotípicas de *S. saprophyticus* isolados de diferentes fontes. Foi realizado o teste estatístico *log-rank* para comparar os dois grupos (aquáticos e clínicos), e os resultados não indicaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados ( $p < 0,05$ ).



**Figura 13** - Curvas de sobrevivência de larvas de *Tenébrio molitor* infectadas com diferentes cepas de *S. saprophyticus* de origem aquática (A) e clínica (B) utilizando a concentração  $10^6$  UFC/ml.

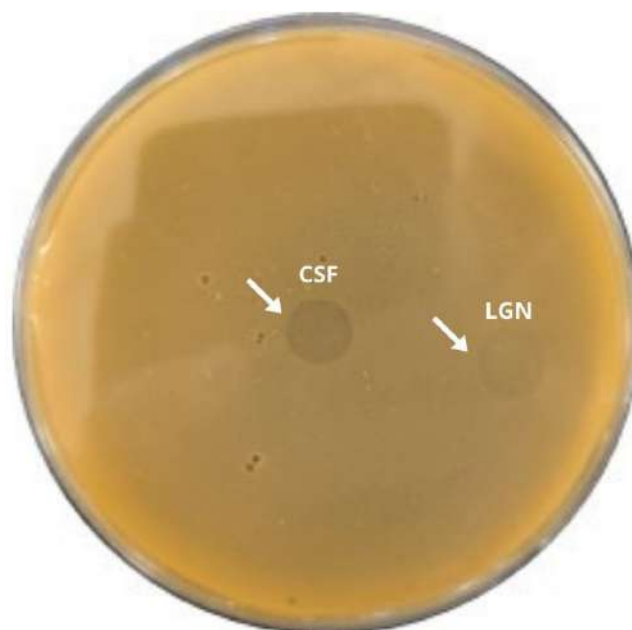
### 5.5 Avaliação da capacidade lítica de bacteriófagos isolados de fonte aquática nas cepas de *S. saprophyticus*

A capacidade lítica dos bacteriófagos foi avaliada por meio do teste de espectro lítico (Tabela 8), revelando diferenças na eficiência de lise entre os fagos e os grupos de cepas analisados. Nas cepas de origem aquática, o bacteriófago CSF apresentou maior atividade, com lise de 50% das amostras (n=10), seguido pelo fago LGN, que lisou 25% (n=5), enquanto o fago TJK exibiu atividade lítica em apenas 5% das cepas (n=1). Por outro lado, nas cepas clínicas, o fago CSF manteve o maior espectro de atividade, lisando 65% das amostras (n=13), seguido pelo fago LGN, com 30% de eficiência (n=6) (Figura 14).

Observou-se que os bacteriófagos apresentaram capacidade lítica distinta entre as cepas analisadas. O fago CSF demonstrou a maior eficácia em ambos os grupos, enquanto os fagos LGN e TJK apresentaram atividade sobre um número menor de cepas.

**Tabela 8** – Espectro lítico dos bacteriófagos nas cepas de *S. saprophyticus* aquáticas e clínicas.

	CSF	LGN	GLS	SS8	TJK	LUG	LUF
<b>Cepas clínicas (n=20)</b>	13 (65%)	6 (30%)	0	0	0	0	0
<b>Cepas aquáticas (n=20)</b>	10 (50%)	5 (25%)	0	0	1 (5%)	0	0
<b>Ambos os grupos (n=40)</b>	23 (57%)	11 (27%)	0	0	1 (2%)	0	0

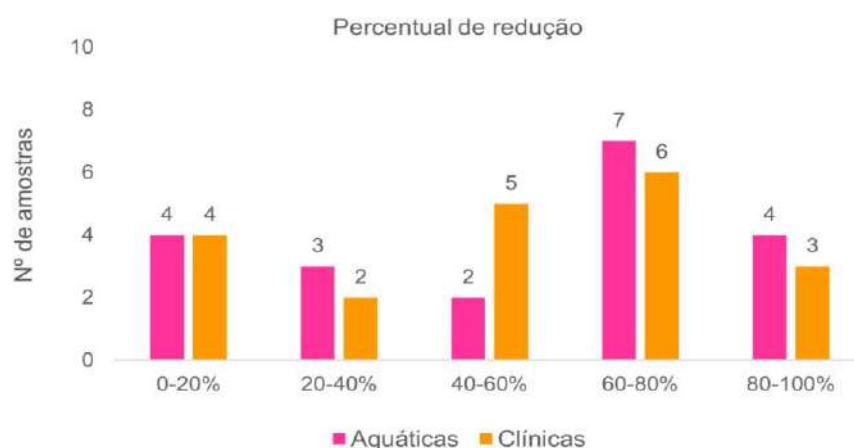


**Figura 14** - Espectro lítico dos fagos CSF e LGN sobre a cepa clínica RC181 de *S. saprophyticus*.

### 5.5.1 Capacidade de inibição dos bacteriófagos na formação de biofilme nas cepas de *S. saprophyticus*

A metodologia previamente descrita para o teste de formação de biofilme foi utilizada para avaliar a capacidade do bacteriófago CSF na redução do biofilme em formação. Os resultados indicaram que, mesmo em cepas onde o bacteriófago não apresentou atividade lítica, houve uma redução significativa na formação do biofilme. Entre as cepas de origem aquática, 95% (n=19) exibiram redução, enquanto nas cepas clínicas a eficácia foi de 90% (n=18). Uma cepa de origem aquática e uma clínica não apresentaram capacidade de formar biofilme e, conseqüentemente, não demonstraram redução na formação do biofilme nos ensaios realizados. Os valores detalhados estão disponíveis na Tabela Suplementar (Anexo 1).

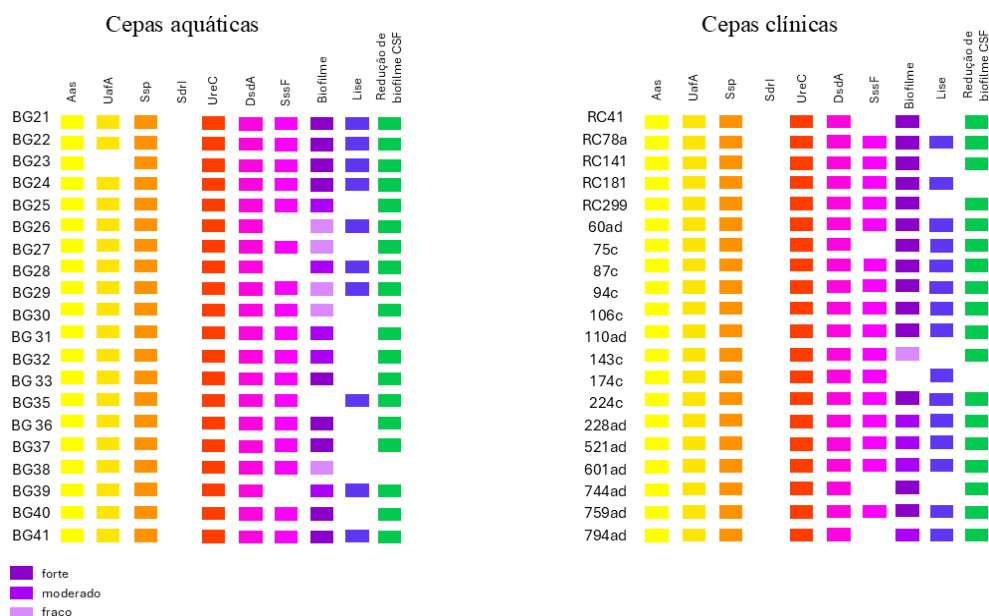
Os valores de redução do biofilme em formação atingiram 91% (Figura 15), evidenciando a capacidade do fago em interferir na formação do biofilme e destacando seu potencial como uma abordagem promissora para o controle de formação dessa estrutura. Esses resultados destacam o fago CSF como um agente antimicrobiano promissor, capaz de exercer atividade lítica e modular a formação de biofilmes, com aplicação relevante no controle de infecções em contextos clínicos e ambientais.



**Figura 15** - Distribuição das cepas conforme a porcentagem de redução na formação de biofilme na presença do fago CSF. Uma cepa aquática e uma clínica não foram formadoras de biofilme, logo, não tiveram uma redução.

### 5.5.2 Panorama geral dos resultados encontrados

Por fim, a Figura 16 apresenta uma síntese geral dos principais resultados obtidos neste estudo, reunindo os dados referentes às 40 cepas de *S. saprophyticus* analisadas. A figura contempla informações sobre a prevalência dos genes de virulência, a produção de biofilme, a atividade lítica dos bacteriófagos e a capacidade do fago CSF em reduzir a formação de biofilme.



**Figura 16** - Panorama geral dos resultados obtidos no estudo, incluindo a avaliação da prevalência dos genes de virulência, a capacidade de formação de biofilme, a análise da atividade lítica de uma coleção de sete bacteriófagos e a avaliação do potencial do bacteriófago CSF na redução da formação de biofilme.

## 6 Discussão

*S. saprophyticus* é um patógeno oportunista presente no meio ambiente e na microbiota de humanos e animais, com relevância clínica reconhecida por sua associação a ITU (Paiva-Santos *et al.* 2018). No entanto, sua ecologia e evolução permanecem pouco compreendidas, devido à escassez de estudos sobre isolados aquáticos. Essa lacuna é notável em locais como a Baía de Guanabara, um ambiente impactado pela poluição, mas amplamente utilizada para recreação e pesca (Fistarol *et al.* 2015). A presença de *S. saprophyticus* em águas recreativas do Rio de Janeiro levanta preocupações quanto à sua origem, disseminação e risco à saúde pública. Dado que as origens das infecções humanas por esse patógeno ainda não são totalmente compreendidas, torna-se essencial investigar suas características e potencial uropatogênico em cepas de diferentes fontes. Ao contrário de outros uropatógenos, como *E. coli* uropatogênica (UPEC), os mecanismos moleculares de colonização do trato urinário por *S. saprophyticus* permanecem pouco elucidados.

A escassez de estudos sobre isolados aquáticos de *S. saprophyticus* destaca a necessidade de investigações mais aprofundadas. Portanto, neste estudo, foi realizada uma análise comparativa da virulência de cepas aquáticas e clínicas, em níveis fenotípico e genotípico, com o objetivo de investigar o impacto das variações ambientais e o potencial terapêutico dos bacteriófagos contra estas bactérias. As análises realizadas em isolados provenientes da Baía de Guanabara oferecem uma contribuição significativa para a compreensão dos riscos e da patogenicidade desse microrganismo.

Os resultados deste estudo revelaram que todas as cepas analisadas possuíam genes que codificam a autolisina Aas, a lipase Ssp, a D-serina deaminase (DsdA) e a urease (UreC). Esses achados se alinham aos relatados por Paiva-Santos *et al.* (2018), que observaram uma prevalência de 100% desses genes em cepas de origem humana, aquática e alimentar. De forma semelhante, Kleine *et al.* (2010) registraram 100% de prevalência do gene *aas* em seus isolados, além de relatar a presença do gene *ssp* em 86% dos isolados humanos e 100% dos isolados de origem animal, sugerindo diferenças na distribuição desses genes entre diferentes fontes. Da mesma forma, Rafiee *et al.* (2023) observaram altas prevalências, com 91% para o gene *aas* e 80% para o gene *ssp* em isolados clínicos.

Resultados semelhantes aos nossos foram reportados por Sakinc *et al.* (2010), que observaram 100% de prevalência do gene *dsdA*. No entanto, Alao *et al.* (2020) detectaram esse gene em apenas 7% dos seus isolados. O gene *dsdA*, também presente em UPEC, é fundamental

para a sobrevivência em ambientes com alta concentração de D-serina, como o trato urinário, onde essa substância é tóxica para bactérias desprovidas da enzima deaminase (Rafiee *et al.* 2023). A urease, fator importante de virulência em *S. saprophyticus*, é essencial para a colonização da bexiga e rins, induzindo inflamação e disseminação em modelos experimentais de ITU (Gatermann *et al.* 1989). Em humanos, essa enzima está associada à formação de cálculos urinários (Fowler, 1985). A presença desses genes em cepas aquáticas e clínicas, reforça a hipótese de que *S. saprophyticus* de diferentes fontes possuem os pré-requisitos para colonização do trato urinário.

Com relação a autolisina Aas, esta apresenta propriedades de hemaglutinação e adesão, contribuindo para a colonização renal em modelos experimentais (Meyer *et al.* 1996). Mortimer *et al.* (2017), por meio de sequenciamento e análise genômica comparativa, identificaram uma mutação vantajosa nesse gene. Segundo os autores, essa alteração genética favorece a sobrevivência de *S. saprophyticus* no trato urinário humano, aprimorando sua capacidade de colonização e persistência durante o processo infeccioso.

O fator de adesão UafA, essencial para a ligação inicial às células epiteliais da bexiga, foi detectado em 39 das 40 cepas analisadas neste estudo. Estudos prévios, como os de Kleine *et al.* (2010) e Paiva-Santos *et al.* (2018), relataram uma prevalência de 100% desse gene em todas as amostras analisadas, enquanto Rafiee *et al.* (2023) encontrou uma prevalência de 88%. A proteína SssF foi identificada em 33 cepas, com três isolados aquáticos e quatro clínicos não apresentando esse gene. Resultados semelhantes foram reportados por King *et al.* (2012), que observaram prevalências entre 84% e 90% em estudos realizados na Austrália, Estados Unidos e Alemanha. A proteína de superfície SssF de *S. saprophyticus*, codificada por plasmídeos nas cepas ATCC 15305 e MS1146, está ligada à resistência ao ácido linoleico, um componente antimicrobiano do sistema imune inato presente na pele humana. Essa resistência é essencial para a sobrevivência do patógeno em nichos biológicos como o períneo e o tecido periuretral, antes da colonização uretral (King *et al.* 2012).

Por fim, o gene *sdrI*, que codifica uma proteína de repetição serina-aspartato, não foi identificado nos isolados analisados neste estudo, corroborando os achados de Rafiee *et al.* (2023), Alao *et al.* (2020) e Paiva-Santos *et al.* (2018). Por outro lado, Kleine *et al.* (2010) relatou a presença desse gene em 10,2% das cepas clínicas humanas, mas não em isolados de origem animal. De forma semelhante, Al-Waeely *et al.* (2016) observaram a proteína SdrI em apenas uma minoria de cepas de *S. saprophyticus*. O estudo de Kleine *et al.* (2010) sugere que

o SdrI desempenha um papel crucial na persistência bacteriana no trato urinário durante a infecção por *S. saprophyticus*, embora não seja essencial para a colonização inicial.

Os achados evidenciam a ampla dispersão dos principais genes de virulência em cepas de *S. saprophyticus* provenientes tanto de ambientes clínicos quanto aquáticos. Essa distribuição reforça o potencial patogênico das cepas presentes em águas recreativas, o que representa um risco à saúde pública. Além disso, a detecção desses genes em isolados aquáticos sugere possível contaminação das águas da Baía de Guanabara por cepas de origem humana, destacando a importância de medidas preventivas e monitoramento constante da qualidade ambiental.

A produção de biofilme é um dos principais fatores de virulência dos SCN, associando-se frequentemente a infecções relacionadas a implantes médicos. Esse mecanismo facilita a evasão do sistema imunológico e reduz a suscetibilidade aos antimicrobianos, favorecendo a persistência dessas infecções (Sousa *et al.*, 2017; Otto, 2018). Sabendo da relevância deste fator de virulência, analisamos a capacidade de formação de biofilme das quarenta cepas de *S. saprophyticus* analisadas anteriormente. De acordo com os resultados deste estudo, um número significativo de isolados de *S. saprophyticus* 95% apresentaram a capacidade de formar biofilme, com apenas uma cepa em cada grupo (clínico e aquático) não demonstrando essa característica. Entre as cepas aquáticas, 45%, 25% e 25% foram classificadas como produtoras de biofilme forte, fraco e moderado, respectivamente. Nas cepas clínicas, as classificações foram de 75%, 15% e 5%, respectivamente. A formação de biofilme em *S. saprophyticus* apresenta variações entre diferentes estudos.

Lawal *et al.* (2021) relataram que 91% dos isolados clínicos e alimentares eram formadores de biofilme, resultado semelhante ao descrito por Rafiee *et al.* (2023), que identificaram a mesma proporção em isolados clínicos. Em contrapartida, Martins *et al.* (2019) e Hashemzade *et al.* (2021) registraram taxas mais baixas, de 70% e 63%, respectivamente. Em contraste com nossos achados, Hashemzade *et al.* (2021) relataram que 53% dos isolados não formaram biofilme detectável, uma porcentagem muito superior aos 5% observados em nosso estudo. Essa diferença pode estar relacionada a fatores geográficos ou a variações na resistência a antimicrobianos.

A elevada taxa de formação de biofilme sugere que esse mecanismo constitui um importante modo de sobrevivência de *S. saprophyticus*, sendo fundamental para sua colonização e adaptação a diferentes ambientes. Esse processo desempenha um papel crucial na persistência

e na patogenicidade bacteriana (Jeong *et al.* 2016). Nossos resultados evidenciam a importância do biofilme em *S. saprophyticus*, destacando sua prevalência em cepas de diferentes origens. Contudo, há uma significativa carência de estudos sobre a formação de biofilme em isolados aquáticos, o que restringe uma compreensão mais abrangente desse fenômeno em variados contextos ecológicos. Em relação a formação de biofilme induzida por antimicrobianos, tal fenômeno tem sido relatada em diversas espécies bacterianas, com diferentes classes modulando esse fenômeno por mecanismos ainda não totalmente elucidados.

As principais hipóteses sugerem que células mortas e seus produtos podem favorecer a formação do biofilme ou que concentrações subinibitórias de antimicrobianos atuem como moléculas sinalizadoras (Ranieri *et al.*, 2018; Elawady *et al.*, 2024; Park *et al.*, 2024). Considerando que essas concentrações podem estar presentes em diversas condições *in vivo* e influenciar fatores de virulência, é fundamental compreender a resposta de *S. saprophyticus* a essas situações. Devido ao seu amplo uso nos setores humano e animal, com impacto clínico e ambiental, o ciprofloxacino foi escolhido para as análises deste estudo. Todas as 40 cepas de *S. saprophyticus* testadas demonstraram sensibilidade ao antimicrobiano, com valores de CIM de 0,5 ou 1,0 µg/mL. Esses resultados estão em concordância com a literatura, onde Potter *et al.* (2024) e Chua *et al.* (2023) também reportaram 100% de suscetibilidade à ciprofloxacino em 277 e 302 isolados, respectivamente.

No entanto, estudos realizados em diferentes regiões revelam variações nos padrões de suscetibilidade. Jhora *et al.* (2011) relataram que, apesar de todas as cepas analisadas apresentarem sensibilidade ao imipenem, a taxa de suscetibilidade à ciprofloxacino foi de 68,96%. Em contraste, Reis *et al.* (2016) constataram baixa resistência à ciprofloxacino em *S. saprophyticus* no nordeste do Brasil, especialmente em comparação com *E. coli* e *K. pneumoniae*. Embora os guias clínicos mais recentes não recomendem as fluoroquinolonas como agentes de primeira escolha no tratamento de ITUs, esses antimicrobianos continuam sendo amplamente prescritos (Pietrucha-Dilanchian & Hooton, 2016).

A exposição a Sub-CIM de antibióticos exerce forte pressão seletiva sobre patógenos, promovendo mecanismos adaptativos como a modulação da expressão gênica e mutações. Esse fenômeno pode favorecer a formação de biofilmes, comprometendo a eficácia do tratamento e prolongando a infecção. Essas concentrações subinibitórias, presentes em diversas condições *in vivo*, afetam fatores de virulência bacteriana ao modular a patogenicidade e a persistência dos microrganismos (Rafaque *et al.*, 2020; Elawady *et al.*, 2024). Estudos sugerem que o efeito

dessas concentrações sobre a formação de biofilme pode ser estimulante ou inibitório, dependendo do isolado bacteriano e da classe do antimicrobiano envolvido (Elawady *et al.*, 2024).

Neste trabalho, avaliamos o impacto de Sub-CIM de ciprofloxacino na formação de biofilme em 12 cepas de *S. saprophyticus* (seis isolados clínicos e seis aquáticos). A exposição ao antimicrobiano resultou em aumento da formação de biofilme em 50% das cepas, com elevações de até 100%. Dentre essas, três cepas são fortes produtoras, duas moderadas e uma fraca. Curiosamente, uma cepa aquática, classificada como fraca produtora e desprovida do gene *sssF*, demonstrou um aumento de até 89% na formação de biofilme. De forma semelhante, outro isolado produtor moderado, também sem o gene *sssF*, exibiu um aumento de 100% após exposição ao antimicrobiano em condições Sub-CIM. Vale destacar que essas respostas foram dose-dependente.

Esses resultados evidenciam que Sub-CIM de ciprofloxacino podem modular a estrutura e a heterogeneidade do biofilme de *S. saprophyticus*, possivelmente através de mecanismos que envolvem alterações na adesão e na produção da matriz extracelular. Tais achados são consistentes com estudos prévios que associam Sub-CIM de ciprofloxacino à indução de biofilme em diferentes bactérias. Elawady *et al.* (2024) relataram que 80% dos isolados de *S. aureus* exibiram aumento na formação de biofilme em presença de Sub-CIM de ciprofloxacino, enquanto Park *et al.* (2024) observaram que 83,2% das cepas de MRSA apresentaram resultados semelhantes. De forma convergente, Rafaque *et al.* (2020) também identificaram indução de biofilme em cinco das seis cepas de UPEC analisadas, evidenciando o papel modulador dessas concentrações sobre diferentes espécies bacterianas.

Por outro lado, quatro cepas de *S. saprophyticus* apresentaram redução na formação de biofilme em resposta às concentrações subinibitórias de ciprofloxacino, em um efeito dependente da dose. Esse resultado corrobora com os achados de Erdal *et al.* (2020), que demonstraram diminuição significativa na formação de biofilme em *P. aeruginosa* com maior efeito na concentração de MIC/2. De forma semelhante, Elhosseini *et al.* (2024) relataram redução de até 70,9% na formação de biofilme em *P. mirabilis* sob exposição a sub-MICs de ciprofloxacino, além de alterações nos fatores de virulência e na morfologia bacteriana.

Esses achados ressaltam a importância da escolha criteriosa de antimicrobianos, considerando as concentrações atingidas durante o tratamento. A modulação da formação de

biofilme por concentrações subinibitórias de ciprofloxacino reforça a necessidade de estratégias terapêuticas que minimizem a persistência bacteriana e a resistência, especialmente em infecções causadas por *S. saprophyticus*.

Para avaliar se o potencial patogênico das cepas clínicas e aquáticas, indicado pela abundância de genes de virulência e pela capacidade de formação de biofilme, se refletia em um modelo *in vivo*, realizamos testes de infecção em *T. molitor*. Este modelo é amplamente reconhecido por sua aplicabilidade em estudos de virulência de microrganismos (Lozoya-Pérez *et al.*, 2021; Chau *et al.*, 2022). Este modelo apresenta respostas imunológicas inatas semelhantes às de vertebrados, além de vantagens experimentais, como homogeneidade das condições, baixos custos de manutenção e manejo simplificado. Essas características permitem o uso de amostras maiores e análises estatísticas mais robustas em comparação aos modelos baseados em mamíferos, que enfrentam restrições éticas, custos elevados e necessidade de infraestrutura especializada (Andrade-Oliveira *et al.* 2023). Foram avaliadas 40 cepas de *S. saprophyticus* previamente analisadas, buscando identificar diferenças no potencial de virulência entre os isolados clínicos e aquáticos.

Os testes de virulência em *T. molitor* revelaram perfis patogênicos semelhantes entre as cepas de *S. saprophyticus* de origem aquática e clínica, conforme indicado pelas curvas de sobrevivência. A mortalidade larval foi dependente da dose, aumentando com o inóculo bacteriano. A análise estatística identificou uma ausência de diferenças significativas na patogenicidade entre os grupos, sugerindo um potencial virulento equivalente das cepas aquáticas e clínicas. Este é o primeiro estudo a comparar a virulência de isolados de *S. saprophyticus* de diferentes ambientes utilizando *T. molitor* como modelo experimental.

Diversos estudos demonstram a eficácia das larvas de *T. molitor* como modelo *in vivo* para avaliar a virulência microbiana. Esse modelo permitiu diferenciar a patogenicidade de diferentes espécies de *Candida*, *Sporothrix* e *Staphylococcus*, mostrando que a mortalidade larval é dependente da dose e da cepa testada. Andrade-Oliveira *et al.* (2023) foi o único estudo que analisou a virulência de *S. saprophyticus* nesse modelo, destacando a alta mortalidade causada por *S. nepalensis* em doses baixas. Além disso, as larvas mostraram grande potencial para estudos de transferência de plasmídeos, com uma taxa de transferência de até 100 vezes superior à observada em ensaios *in vitro*.

Em estudos com infecções fúngicas, as larvas de *T. molitor* demonstraram sua capacidade de avaliar a virulência de diferentes espécies, como *Sporothrix spp.*, *Candida auris* e *C. tropicalis*, com mortalidade larval dependente da dose e da cepa infectante (Lozoya-Pérez *et al.*, 2021; Ramos *et al.*, 2024; Rodrigues *et al.*, 2025). Rodrigues *et al.* (2025) demonstraram que *C. auris* causou 100% de mortalidade em 24 horas. Da mesma forma, Ramos *et al.* (2024) observaram que os isolados de *C. tropicalis* apresentaram variações nas taxas de mortalidade, de 30% a 93,3% após sete dias, com alguns isolados matando todas as larvas em 24 e 48 horas. Isolados de *C. utilis* e *C. parapsilosis* tiveram mortalidades semelhantes, matando cerca de 86,7% e 73,3% das larvas, respectivamente. Todos os isolados foram obtidos de águas costeiras recreativas do Rio de Janeiro. Os resultados indicam que o modelo de *T. molitor* é eficaz para avaliar a virulência microbiana, oferecendo uma alternativa econômica e valiosa para investigações preliminares. Contudo, os achados observados nesse sistema específico podem não se refletir da mesma forma em outros modelos, reforçando a necessidade de mais estudos para confirmar e expandir a aplicação desse modelo em pesquisas de virulência e transferência genética.

O aumento das taxas de resistência antimicrobiana, impulsionado pelo uso indiscriminado de antibióticos em tratamentos empíricos, têm impulsionado a busca por alternativas terapêuticas. Nesse contexto, a fagoterapia vem ganhando destaque por utilizar bacteriófagos para eliminar bactérias de forma específica e eficaz (Kapoor *et al.*, 2024). Diversos ensaios clínicos e estudos de caso recentes têm demonstrado a eficiência dessa abordagem no combate a infecções bacterianas, especialmente aquelas causadas por patógenos multirresistentes (Olawade *et al.*, 2024). Em nossa investigação, três fagos demonstraram atividade lítica contra 57% das 40 cepas de *S. saprophyticus* avaliadas. A especificidade lítica distinta entre as cepas evidencia o potencial desses bacteriófagos para uso em coquetéis terapêuticos, direcionados ao controle de infecções por cepas resistentes. Resultados semelhantes foram observados em outros estudos. Zhang *et al.* (2024) relataram que um fago apresentou ampla gama de hospedeiros ao lisar efetivamente *V. parahaemolyticus* e outras espécies de *Vibrio*. Fei *et al.* (2023) também demonstraram alta eficácia de um fago contra *P. aeruginosa*, com uma taxa de lise de 78,38% em 37 cepas, incluindo cepas resistentes a múltiplos medicamentos.

Estudos adicionais reforçam a versatilidade da fagoterapia. Seo *et al.* (2018) demonstraram que um coquetel de bacteriófagos apresentou 100% de atividade lítica contra

cepas de referência de *Salmonella* e 92,5% contra isolados de campo. De forma semelhante, Naser *et al.* (2017) mostraram que um coquetel fágico foi eficaz na redução de formas planctônicas e biofilmes de *V. cholerae* toxigênico, indicando o potencial desses agentes em aplicações de biocontrole.

A crescente resistência bacteriana, especialmente em infecções crônicas associadas a biofilmes em dispositivos médicos, representa um desafio crítico à saúde pública. Biofilmes bacterianos são altamente tolerantes a antibióticos e à resposta imunológica do hospedeiro, dificultando sua erradicação e prolongando os quadros infecciosos. Nesse cenário, a terapia fágica surge como uma alternativa promissora, demonstrando eficácia contra patógenos multirresistentes em diferentes estudos (Mayorga-Ramos *et al.*, 2024). Diferentes abordagens, como a combinação de bacteriófagos e antibióticos, o uso de coquetéis de fagos e a aplicação de enzimas fágicas, têm revelado resultados positivos no combate a essas infecções complexas (Morrisette *et al.*, 2020; Abdelrahman *et al.*, 2021). Em nossa pesquisa, observamos que o fago CSF reduziu a formação de biofilme em 92,5% das 40 cepas de *S. saprophyticus* analisadas. Curiosamente, mesmo em cepas onde não houve atividade lítica, os biofilmes apresentaram redução. Nas cepas aquáticas, as reduções chegaram a 91%, enquanto nas clínicas, atingiram até 88%, demonstrando um efeito semelhante em ambos os grupos. Esses resultados reforçam o potencial de aplicação dos bacteriófagos no controle de biofilmes, mesmo em situações de ausência de lise bacteriana.

Estudos prévios corroboram esses achados. Coulter *et al.* (2014) demonstraram que a combinação de fago T4 e antibióticos reduziu significativamente o biofilme de *E. coli* resistentes tanto a antibióticos quanto a fagos. De forma semelhante, Khalifa *et al.* (2018) relataram que um coquetel de fagos foi capaz de eliminar biofilmes de *E. faecalis* resistentes à vancomicina, evidenciando a eficácia dessa abordagem em cepas multirresistentes. Alinhado aos nossos achados, Pérez *et al.* (2024) observaram que um colifago não apenas reduziu biofilmes estabelecidos de *P. aeruginosa*, mas também foi eficaz contra biofilmes de cepas não hospedeiras, reforçando o potencial dos fagos como agentes terapêuticos de amplo espectro.

Além das evidências experimentais, a eficácia clínica da terapia fágica foi confirmada em ensaios clínicos. Jault *et al.* (2019), em um estudo controlado randomizado na Bélgica, avaliaram o uso de fagos no tratamento de otite crônica causada por *P. aeruginosa*. Os resultados mostraram uma redução significativa na carga bacteriana e melhora clínica em pacientes tratados com fagos, em comparação àqueles que receberam terapia convencional.

Esses achados demonstram o grande potencial da fagoterapia no controle de infecções associadas a biofilmes e resistência antimicrobiana, tanto em contextos experimentais quanto clínicos. A especificidade dos fagos e a combinação com estratégias como coquetéis fágicos, que ampliam o espectro de ação e reduzem o risco de resistência, destacam essa abordagem como uma alternativa eficaz e promissora frente aos desafios impostos pela resistência bacteriana.

Os resultados deste estudo indicam que as cepas aquáticas de *S. saprophyticus* isoladas na Baía de Guanabara apresentam potencial patogênico semelhante ao das cepas clínicas, conforme evidenciado pelos testes realizados. Esses achados sugerem uma possível contaminação das águas recreativas por cepas de origem humana. Tais resultados ressaltam a importância do monitoramento contínuo dessas áreas, considerando o risco potencial à saúde pública, especialmente no que diz respeito a infecções causadas por patógenos oportunistas.

## **7 Conclusão**

Os resultados deste estudo demonstram que as cepas de *S. saprophyticus* isoladas da Baía de Guanabara apresentam um perfil de virulência semelhante ao das cepas clínicas, sugerindo que águas recreativas podem atuar como reservatórios de patógenos oportunistas. Além disso, a ampla presença de genes de virulência e a elevada capacidade de formação de biofilme reforçam a necessidade de monitoramento contínuo desses ambientes. A exposição a concentrações subinibitórias de ciprofloxacino modulou a formação de biofilme de maneira cepa-dependente, indicando que o uso inadequado deste antibiótico pode influenciar na virulência bacteriana e na persistência de infecções. A fagoterapia mostrou-se uma alternativa promissora para o controle de *S. saprophyticus*, com destaque para o fago CSF, que reduziu significativamente a formação de biofilme mesmo em cepas onde não apresentou atividade lítica. Esse achado evidencia o potencial dos bacteriófagos como agentes antimicrobianos tanto em ambientes clínicos quanto ambientais. Como perspectiva, futuras pesquisas devem explorar a aplicabilidade dos fagos em modelos *in vivo* e avaliar estratégias combinadas, como o uso de coquetéis fágicos e antibióticos, para potencializar a eficácia no controle de infecções associadas a biofilmes.

## 8 Referências bibliográficas

- Abdelrahman, F., Easwaran, M., Daramola, O. I., Ragab, S., Lynch, S., Oduselu, T. J., & El-Shibiny, A. (2021). Phage-encoded endolysins. *Antibiotics*, *10*(2), 124.
- Abedon, S. T., Kuhl, S. J., Blasdel, B. G., & Kutter, E. M. (2011). Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*, *1*(2), 66–85.
- Abreu, I. M., Cordeiro, R. C., Soares-Gomes, A., Abessa, D. M. S., Maranhão, L. A., & Santelli, R. E. (2016). Ecological risk evaluation of sediment metals in a tropical eutrophic bay, Guanabara Bay, Southeast Atlantic. *Marine Pollution Bulletin*, *109*(1), 435–445.
- Ahmad, F., Martuchelle, S. S., Andrade-Oliveira, A. L., Lanes Viana, V. E., Sousa, M. A. S. M., da Silveira, F. S., Nogueira-Diaz, M. A., Pereira, M. F., Giambiagi-deMarval, M., & Rossi, C. C. (2025). From Farm to Community: Dispersal of Potentially Pathogenic *Staphylococcus* and *Mammaliococcus* Species and Antimicrobial Resistance Across Shared Environments. *Current microbiology*, *82*(3), 104.
- Alao, F. O., Smith, S. I., Omonigbehin, E. A., & Adeleye, I. A. (2020). Prevalência de genes de virulência em *Staphylococcus saprophyticus* isolado de mulheres com infecções do trato urinário no estado de Lagos. *Scientific African*, *10*, e00626.
- Al-Waeely, F. A., Al-Khafaji, J. K., & Al-Saadi, Z. H. (2015). Characterization of virulence factors of *Staphylococcus saprophyticus* isolated from women with cystitis.
- Andersson, D., & Hughes, D. (2014). Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews Microbiology*, *12*, 465–478.
- Andrade-Oliveira, A. L., Lacerda-Rodrigues, G., Pereira, M. F., Bahia, A. C., de Alcântara Machado, E., Rossi, C. C., & Giambiagi-de Marval, M. (2023). *Tenebrio molitor* as a model system to study *Staphylococcus spp.* virulence and horizontal gene transfer. *Microbial Pathogenesis*, *183*, 106304.
- Argemi, X., Hansmann, Y., Prola, K., & Prévost, G. (2019). Coagulase-negative *Staphylococci* pathogenomics. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(5), 1215.
- Arismendi, E., Molina, R., Aldama, M., et al. (2019). Resistance to ciprofloxacin in urinary infections in patients hospitalized in the internal medicine service. *Journal of Microbiology Experiment*, *7*(2), 129–131.
- Arumugam, S. N., Manohar, P., Sukumaran, S., Sadagopan, S., Loh, B., Leptihn, S., & Nachimuthu, R. (2022). Antibacterial efficacy of lytic phages against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections in bacteremia mice models. *BioMed Central Microbiology*, *22*(1), 187.
- Bannerman, T. L., & Peacock, S. J. (2006). *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci. *Manual of Clinical Microbiology: Volume 1* (9<sup>a</sup> ed.), 390–411.
- Becker, K., Heilmann, C., & Peters, G. (2014). Coagulase-negative *Staphylococci*. *Clinical Microbiology Reviews*, *27*(4), 870–926.
- Becker, K., Schaumburg, F., Fegeler, C., Friedrich, A. W., & Kock, R. (2017). Prevalence of multiresistant microorganisms (PMMS). *International Journal of Medical Microbiology*, *307*, 21–27.
- Bernardes Filho, F., Alves, A. D. O., Towersey, L., Hay, R., Montag, A., Coutinho, A. L., ... & Frade, M. A. (2019). The skin health of fishermen in Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *International Journal of Dermatology*, *58*(4), 483–490.
- Berry, K. A., Verhoef, M. T., Leonard, A. C., & Cox, G. (2022). *Staphylococcus aureus* adhesion to the host. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1515*(1), 75–96.
- Berryhill, B. A., Gil-Gil, T., Manuel, J. A., Smith, A. P., Margollis, E., Baquero, F., & Levin, B. R. (2023). What's the matter with MICs: Bacterial nutrition, limiting resources, and antibiotic pharmacodynamics. *Microbiology Spectrum*, *11*, e04091.

- Berryhill, B. A., Gil-Gil, T., Witzany, C., Goldberg, D. A., Vega, N. M., Regoes, R. R., & Levin, B. R. (2024). The dynamics of *Staphylococcal* infection and their treatment with antibiotics and bacteriophage in the *Galleria mellonella* model system. *bioRxiv*.
- Bessa, R. G., Quinto, V. P., Machado, D. C., Lipnharski, C., Weber, M. B., Bonamigo, R. R., & D'Azevedo, P. A. (2016). *Staphylococcus aureus* resistance to topical antimicrobials in atopic dermatitis. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, *91*, 604-610.
- Byrd, A. L., Belkaid, Y., & Segre, J. A. (2018). The human skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, *16*(3), 143–155.
- Canellas, A. L., Lopes, I. R., Mello, M. P., Paranhos, R., de Oliveira, B. F., & Laport, M. S. (2021). *Vibrio* species in an urban tropical estuary: Antimicrobial susceptibility, interaction with environmental parameters, and possible public health outcomes. *Microorganisms*, *9*(5), 1007.
- Canteri de Souza, P., Custódio Caloni, C., Wilson, D., & Sergio Almeida, R. (2018). An invertebrate host to study fungal infections, mycotoxins and antifungal drugs: *Tenebrio molitor*. *Journal of Fungi*, *4*(4), 125.
- Carascal, M. B., dela Cruz-Papa, D. M., Remenyi, R., Cruz, M. C. B., & Destura, R. V. (2022). Phage revolution against multidrug-resistant clinical pathogens in Southeast Asia. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 820572.
- Carvalho, M. C. N., Jayme, M. M., Arenazio, G. S., Araújo, F. V., Leite, S. G. F., & Del Aguila, E. M. (2016). Microbiological quality assessment by PCR and its antibiotic susceptibility in mangrove crabs (*Ucides cordatus*) from Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *International Journal of Microbiology*, *2016*(1), 7825031.
- Chanishvili, N. (2012). Phage therapy—history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches. *Advances in Virus Research*, *83*, 3–40.
- Chau, N. N. (2022). The virulence and reproduction of six entomopathogenic nematode strains of species *Steinernema longicaudum* to mealworm *Tenebrio molitor* in the laboratory conditions. *Vietnam Journal of Biotechnology*, *20*(1), 25-34.
- Chegini, Z., Khoshbayan, A., Vesal, S., et al. (2021). Bacteriophage therapy for inhibition of multidrug-resistant uropathogenic bacteria: A narrative review. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, *20*, 30.
- Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M., & Beachey, E. H. (1985). Adherence of coagulase-negative *Staphylococci* to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of *Staphylococci* to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, *22*(6), 996–1006.
- Christensen, G. J., & Brüggemann, H. (2014). Bacterial skin commensals and their role as host guardians. *Beneficial Microbes*, *5*, 201-215.
- Cordeiro, R. C., Monteiro, F. F., Santelli, R. E., Moreira, L. S., Figueiredo, A. G., Bidone, E. D., ... & Meniconi, M. F. G. (2021). Environmental and anthropic variabilities at Guanabara Bay (Brazil): A comparative perspective of metal depositions in different time scales during the last 5,500 years. *Chemosphere*, *267*, 128895.
- Costa, W. F., Paranhos, R., Mello, M. P., Picão, R. C., & Laport, M. S. (2023). Occurrence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases-producing *Escherichia coli* isolates over gradient pollution in an urban tropical estuary. *Environmental Microbiology*, *25*(10), 2041–2048.
- Coulter, L. B., McLean, R. J., Rohde, R. E., & Aron, G. M. (2014). Effect of bacteriophage infection in combination with tobramycin on the emergence of resistance in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Viruses*, *6*(10), 3778-3786.
- Crossman, L., Sims, L., Dean, R., et al. (2024). Sticking together: The independent evolution of biofilm formation in different *Staphylococcus* species occurred multiple times via different pathways. *BioMed Central Genomics*, *25*, 812.
- Cui, L., Veeranarayanan, S., Thitianapakorn, K., & Wannigama, D. L. (2023). Bacteriophage bioengineering: A transformative approach for targeted drug discovery and beyond. *Pathogens*, *12*(9), 1179.

Cui, L., Watanabe, S., Miyanaga, K., Kiga, K., Sasahara, T., Aiba, Y., ... & Wannigama, D. L. (2024). A comprehensive review on phage therapy and phage-based drug development. *Antibiotics*, *13*(9), 870.

Cunha, B. A. (2016). An infectious disease and pharmacokinetic perspective on oral antibiotic treatment of uncomplicated urinary tract infections due to multidrug-resistant Gram-negative uropathogens: The importance of urinary antibiotic concentrations and urinary pH. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *35*, 521-526.

Dawoud, A. M., Saied, S. A., Malek, M. M., & Sabal, M. S. (2024). Impact of sub-inhibitory antibiotic concentrations on biofilm formation among nosocomial isolates of *Enterococcus* species. *Microbes and Infectious Diseases*, *5*(2), 663-675.

de Carvalho Aguiar, V. M., Abuchacra, P. F. F., Neto, J. A. B., & de Oliveira, A. S. (2018). Environmental assessment concerning trace metals and ecological risks at Guanabara Bay, RJ, Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, *190*, 1-17.

de Paiva-Santos, W., de Sousa, V. S., & Giambiagi-deMarval, M. (2018). Occurrence of virulence-associated genes among *Staphylococcus saprophyticus* isolated from different sources. *Microbial Pathogenesis*, *119*, 9-11.

de Pinho, L. L., de Lima Oliveira, K. N., dos Santos, T. A. S., Lima, S. B., Rabelo, A. M. F., Rabelo, M. W. F., ... & de Melo Nunes, R. (2024). Uso indiscriminado de antibióticos e o risco de resistência bacteriana: revisão de literatura. *Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences*, *6*(1), 438-452.

de Souza, P. C., Morey, A. T., Castanheira, G. M., Bocate, K. P., Panagio, L. A., Ito, F. A., ... & Almeida, R. S. (2015). *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. *Journal of Microbiological Methods*, *118*, 182-186.

Dedrick, R. M., Guerrero-Bustamante, C. A., Garlena, R. A., et al. (2019). Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nature Medicine*, *25*, 730-733.

Delik, E., Eroğlu, B., & Tefon-Öztürk, B. E. (2024). Evaluation of the in vitro effects of concentrations of antibiotics on three *Enterobacteriaceae* isolates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *40*(2), 73.

Stevens, D. L., Ma, Y., Salmi, D. B., McIndoo, E., Wallace, R. J., & Bryant, A. E. (2007). Impact of antibiotics on expression of virulence-associated exotoxin genes in methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Infectious Diseases*, *195*(2), 202-211.

D'Herelle, F. (2007). On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: Brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux (1917). *Research in Microbiology*, *158*(7), 553-554.

Djawadi, B., Heidari, N., & Mohseni, M. (2023). *UTI Caused by Staphylococcus saprophyticus*. *IntechOpen*.

Jenul, C., & Horswill, A. R. (2019). Regulação da virulência de *Staphylococcus aureus*. *Microbiology Spectrum*, *7*(2), 10-1128.

Harris-Tryon, T. A., & Grice, E. A. (2022). Microbiota and maintenance of skin barrier function. *Science*, *376*, 940-945.

dos Santos Rodrigues, M. I., da Cruz, G. H. R., Lucini, F., de Almeida, A. M., Pereira, F. F., Ramalho, R. T., ... & Rossato, L. (2025). *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host for the study of pathogenicity in *Candida auris*. *Microbial Pathogenesis*, *198*, 107115.

Drabinski, T. L., de Carvalho, D. G., Gaylarde, C. C., Lourenço, M. F., Machado, W. T., da Fonseca, E. M., ... & Baptista Neto, J. A. (2023, February). Microplastics in freshwater river in Rio de Janeiro and its role as a source of microplastic pollution in Guanabara Bay, SE Brazil. *Micro*, *3*(1), 208-223.

Duarte, A. C., Fernández, L., Jurado, A., Campelo, A. B., Shen, Y., Rodríguez, A., & García, P. (2024). Synergistic removal of *Staphylococcus aureus* biofilms by using a combination of phage *Kayvirus rodi* with the exopolysaccharide depolymerase Dpo7. *Frontiers in Microbiology*, *15*, 1438022.

- Elawady, R., Aboulela, A. G., Gaballah, A., et al. (2024). Antimicrobial sub-MIC induces *Staphylococcus aureus* biofilm formation without affecting the bacterial count. *BioMed Central Infectious Diseases*, 24, 1065.
- Elhosseini, M. A., El-Banna, T. E., Sonbol, F. I., et al. (2024). Potential antivirulence activity of sub-inhibitory concentrations of ciprofloxacin against *Proteus mirabilis* isolates: An in-vitro and in-vivo study. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 23, 48.
- El-Telbany, M., Lin, C. Y., Abdelaziz, M. N., et al. (2023). Potential application of phage vB\_EfKS5 to control *Enterococcus faecalis* and its biofilm in food. *Applied Microbiology and Biotechnology Express*, 13, 130.
- Erdal, B., Yalınay, M., & Elmas, Ç. (2021). Piperasilin/Tazobaktam ve Siprofloksasin Sub-minimal İnhibitör Konsantrasyonlarında *Pseudomonas aeruginosa* Biyofilm Oluşumunun ve Quorum Sensing Genlerinin Araştırılması. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 55(4), 517-529.
- Erdeljan, P., MacDonald, K. W., Goneau, L. W., Bevan, T., Carriveau, R., Razvi, H., & Cadieux, P. A. (2012). Third Prize: Effects of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin on *Staphylococcus saprophyticus* adherence and virulence in urinary tract infections. *Journal of Endourology*, 26, 32-37.
- Fei, B., Li, D., Liu, X., You, X., Guo, M., Ren, Y., ... & Li, Y. (2023). Characterization and genomic analysis of a broad-spectrum lytic phage HZ2201 and its antibiofilm efficacy against *Pseudomonas aeruginosa*. *Virus Research*, 335, 199184.
- Fistarol, G. O., Coutinho, F. H., Moreira, A. P. B., Venas, T., Cánovas, A., de Paula Jr, S. E., ... & Thompson, F. L. (2015). Environmental and sanitary conditions of Guanabara Bay, Rio de Janeiro. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1232.
- Foster, T. J. (2009). Colonization and infection of the human host by *Staphylococci*: Adhesion, survival and immune evasion. *Veterinary Dermatology*, 20(5-6), 456-470.
- Foster, T. J. (2019). The MSCRAMM family of cell-wall-anchored surface proteins of gram-positive cocci. *Trends in microbiology*, 27(11), 927-941.
- Fowler Jr, J. E. (1985). *Staphylococcus saprophyticus* como causa de cálculo urinário infectado. *Annals of Internal Medicine*, 102(3), 342-343.
- França, A., Gaio, V., Lopes, N., & Melo, L. D. R. (2021). Virulence factors in coagulase-negative *Staphylococci*. *Pathogens*, 10, 170.
- Freire, M. M., Gomez, C., Moreira, J. C., & Linde Arias, A. R. (2023). Multibiomarker approach in fish to assess a heavily polluted Brazilian estuary, Guanabara Bay. *Environmental Monitoring and Assessment*, 195(1), 187.
- Fusco-Almeida, A. M., de Matos Silva, S., Dos Santos, K. S., de Lima Gualque, M. W., Vaso, C. O., Carvalho, A. R., ... & Mendes-Giannini, M. J. S. (2023). Alternative non-mammalian animal and cellular methods for the study of host–fungal interactions. *Journal of Fungi*, 9(9), 943.
- G1. (2024). Prometida para as Olimpíadas do Rio, despoluição da Baía de Guanabara começa a avançar 8 anos após os Jogos. *Globo*. Disponível em: <https://g1.globo.com/mundo/olimpiadas/paris-2024/noticia/2024/07/28/prometida-para-as-olimpiadas-do-rio-despoluicao-da-baia-de-guanabara-comeca-a-avancar-8-anos-apos-os-jogos.ghtml>. Acesso em: 12/02/2025.
- Gao, P., Wei, Y., Wan, R. E., Wong, K. W., Iu, H. T. V., Tai, S. S. C., Li, Y., Yam, H. C. B., Halebeedu Prakash, P., Chen, J. H. K., Ho, P. L., Yuen, K. Y., Davies, J., & Kao, R. Y. T. (2022). Subinhibitory concentrations of antibiotics exacerbate *Staphylococcal* infection by inducing bacterial virulence. *Microbiology Spectrum*, 10(4), e0064022.
- Gatermann, S., John, J., & Marre, R. (1989). Urease de *Staphylococcus saprophyticus*: Caracterização e contribuição para a uropatogenicidade em infecção desobstruída do trato urinário de ratos. *Infection and Immunity*, 57(1), 110-116.
- Gautam, V., Sethuraman, N., Kaur, R., Sachdev, S., Marwaha, N., & Ray, P. (2017). Changing epidemiology of coagulase-negative *Staphylococci* in normal flora of skin. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 35, 277-278.

Giormezis, N., Kolonitsiou, F., Foka, A., Drougka, E., Liakopoulos, A., Makri, A., ... & Spiliopoulou, I. (2014). Coagulase-negative *Staphylococcal* bloodstream and prosthetic-device-associated infections: The role of biofilm formation and distribution of adhesin and toxin genes. *Journal of Medical Microbiology*, 63(11), 1500-1508.

Goel, N., Hashmi, Z., Khan, N., Ahmad, R., & Khan, W. H. (2023). Recent strategies to combat multidrug resistance. In *Non-traditional Approaches to Combat Antimicrobial Drug Resistance* (pp. 1-27). Singapore: Springer Nature Singapore.

Gonçalves, V. D., Meirelles-Pereira, F., Cataldo, M., Fonseca, B. D. O., Nogueira, B. A., Olivella, J. G. B., ... & Pereira, J. A. A. (2019). Detection of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* isolated from river waters flowing to the Guanabara Bay and from clinical samples of hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Biomedica*, 39, 135-149.

Goneau, L. W., Hannan, T. J., MacPhee, R. A., Schwartz, D. J., Macklaim, J. M., Gloor, G. B., & Burton, J. P. (2015). Subinhibitory antibiotic therapy alters recurrent urinary tract infection pathogenesis through modulation of bacterial virulence and host immunity. *mBio*, 6, e00356-15.

González-Martín, M., Corbera, J. A., Suárez-Bonnet, A., & Tejedor-Junco, M. T. (2020). Virulence factors in coagulase-positive *Staphylococci* of veterinary interest other than *Staphylococcus aureus*. *The Veterinary Quarterly*, 40(1), 118-131.

González-Mora, A., Hernández-Pérez, J., Iqbal, H. M. N., Rito-Palomares, M., & Benavides, J. (2020). Bacteriophage-based vaccines: A potent approach for antigen delivery. *Vaccines*, 8(3), 504.

Grassia, G., Bagnarino, J., Siciliano, M., Barbarini, D., Corbella, M., Cambieri, P., Baldanti, F., & Monzillo, V. (2024). Phenotypic and genotypic assays to evaluate coagulase-negative *Staphylococci* biofilm production in bloodstream infections. *Microorganisms*, 12(1), 126.

Grygorcewicz, B., Wojciuk, B., Roszak, M., Łubowska, N., Błażejczak, P., Jursa-Kulesza, J., ... & Dołęgowska, B. (2021). Environmental phage-based cocktail and antibiotic combination effects on *Acinetobacter baumannii* biofilm in a human urine model. *Microbial Drug Resistance*, 27(1), 25-35.

Hashemzadeh, M., Dezfuli, A. A. Z., Nashibi, R., Jahangirimehr, F., & Akbarian, Z. A. (2021). Study of biofilm formation, structure and antibiotic resistance in *Staphylococcus saprophyticus* strains causing urinary tract infection in women in Ahvaz, Iran. *New Microbes and New Infections*, 39, 100831.

Hathroubi, S., Mekni, M. A., Domenico, P., Nguyen, D., & Jacques, M. (2017). Biofilms: Microbial shelters against antibiotics. *Microbial Drug Resistance*, 23(2), 147-156.

Haugen, B. J., Pellett, S., Redford, P., Hamilton, H. L., Roesch, P. L., & Welch, R. A. (2007). In vivo gene expression analysis identifies genes required for enhanced colonization of the mouse urinary tract by uropathogenic *Escherichia coli* strain CFT073 *dsdA*. *Infection and Immunity*, 75.

Hengzhuang, W., Wu, H., Ciofu, O., Song, Z., & Høiby, N. (2011). Pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and imipenem on mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(9), 4469-4474.

Herman-Bausier, P., Labate, C., Towell, A. M., Derclaye, S., Geoghegan, J. A., & Dufrêne, Y. F. (2018). *Staphylococcus aureus* clumping factor A is a force-sensitive molecular switch that activates bacterial adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115, 5564-5569.

Hwang, S.-J. (2020). Eutrofização e o risco ecológico à saúde. *Revista Internacional de Pesquisa Ambiental e Saúde Pública*, 17(17), 6332.

Instituto Trata Brasil. (2022). *Painel Saneamento Brasil*. Disponível em: <https://www.painelsaneamento.org.br/localidade/index?id=331>. Acesso em: 30/01/2025.

Jacobsen, I. D. (2014). *Galleria mellonella* as a model host to study virulence of *Candida*. *Virulence*, 5(2), 237-239.

Jault, P., Leclerc, T., Jennes, S., Pirnay, J. P., Que, Y. A., Resch, G., ... & Gabard, J. (2019). Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa*

- (PhagoBurn): A randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. *The Lancet Infectious Diseases*, 19(1), 35-45.
- Jeong, D. W., Lee, B., Her, J. Y., Lee, K. G., & Lee, J. H. (2016). Safety and technological characterization of coagulase-negative *Staphylococci* isolates from traditional Korean fermented soybean foods for starter development. *International Journal of Food Microbiology*, 236, 9–16.
- Jiménez-Velásquez, S., Pacheco-Montealegre, M. E., Torres-Higuera, L., et al. (2024). Genus-targeted markers for the taxonomic identification and monitoring of coagulase-positive and coagulase-negative *Staphylococcus* species. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40, 333.
- Jin, J., Li, Z. J., Wang, S. W., et al. (2012). Isolation and characterization of ZZ1, a novel lytic phage that infects *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *BioMed Central Microbiology*, 12, 156.
- Jordan, R. P., & Nicolle, L. E. (2014). Preventing infection associated with urethral catheter biofilms. In *Biofilms in Infection Prevention and Control* (pp. 287-309). Academic Press.
- Kapoor, A., Mudaliar, S. B., Bhat, V. G., Chakraborty, I., Prasad, A. S. B., & Mazumder, N. (2024). Phage therapy: A novel approach against multidrug-resistant pathogens. *3 Biotech*, 14(10), 256.
- Kebriaei, R., Lehman, S. M., Shah, R. M., Stamper, K. C., Kunz Coyne, A. J., Holger, D., ... & Rybak, M. J. (2023). Optimization of phage-antibiotic combinations against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Microbiology Spectrum*, 11(3), e04918-22.
- Khalifa, L., Gelman, D., Shlezinger, M., Dessal, A. L., Copenhagen-Glazer, S., Beyth, N., & Hazan, R. (2018). Defeating antibiotic-and phage-resistant *Enterococcus faecalis* using a phage cocktail in vitro and in a clot model. *Frontiers in Microbiology*, 9, 326.
- King, N. P., Sakinç, T., Ben Zakour, N. L., Totsika, M., Heras, B., Simerska, P., ... & Schembri, M. A. (2012). Characterisation of a cell wall-anchored protein of *Staphylococcus saprophyticus* associated with linoleic acid resistance. *BioMed Central Microbiology*, 12(1), 1-12.
- Kjerfve, B., Ribeiro, C. H., Dias, G. T., Filippo, A. M., & Quaresma, V. D. S. (1997). Oceanographic characteristics of an impacted coastal bay: Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brazil. *Continental Shelf Research*, 17(13), 1609-1643.
- Kleine, B., Gatermann, S., & Sakinc, T. (2010). Genotypic and phenotypic variation among *Staphylococcus saprophyticus* from human and animal isolates. *BioMed Central Research Notes*, 3, 1-5.
- Kong, K. F., Vuong, C., & Otto, M. (2006). *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *International Journal of Medical Microbiology*, 296(2-3), 133-139.
- Korte-Berwanger, M., Sakinc, T., Kline, K., Nielsen, H. V., Hultgren, S., & Gatermann, S. G. (2013). Significance of the D-serine-deaminase and D-serine metabolism of *Staphylococcus saprophyticus* for virulence. *Infection and Immunity*, 81(12), 4525-4533.
- Kropinski, A. M., Sulakvelidze, A., Konczyk, P., & Poppe, C. (2007). *Salmonella* phages and prophages—genomics and practical aspects. In *Salmonella: Methods and Protocols* (pp. 133-175). Humana Press.
- Kuroda, M., Yamashita, A., Hirakawa, H., Kumano, M., Morikawa, K., Higashide, M., ... & Ohta, T. (2005). Whole genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(37), 13272-13277.
- Law, N., & Aslam, S. (2020). Phage therapy: Primer and role in the treatment of MDROs. *Current Infectious Disease Reports*, 22, 1-13.
- Lawal, O. U., Fraqueza, M. J., Bouchami, O., Worning, P., Bartels, M. D., Gonçalves, M. L., ... & Miragaia, M. (2021). Foodborne origin and local and global spread of *Staphylococcus saprophyticus* causing human urinary tract infections. *Emerging Infectious Diseases*, 27(3), 880.
- Lebeaux, D., Merabishvili, M., Caudron, E., Lannoy, D., Van Simaey, L., Duyvejonck, H., Guillemain, R., Thumerelle, C., Podglajen, I., Compain, F., Kassis, N., Mainardi, J. L., Wittmann, J., Rohde, C., Pirnay, J. P.,

- Dufour, N., Vermeulen, S., Gansemans, Y., Van Nieuwerburgh, F., & Vaneechoutte, M. (2021). A case of phage therapy against pandrug-resistant *Achromobacter xylosoxidans* in a 12-year-old lung-transplanted cystic fibrosis patient. *Viruses*, *13*(1), 60.
- Lin, S., Sun, B., Shi, X., Xu, Y., Gu, Y., Gu, X., ... & Zheng, M. (2021). Comparative genomic and pan-genomic characterization of *Staphylococcus epidermidis* from different sources unveils the molecular basis and potential biomarkers of pathogenic strains. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 770191.
- Lindsay, J. A. (2019). *Staphylococci*: Evolving genomes. *Microbiology Spectrum*, *7*(6), 7-6.
- Liu, G., Olsen, J. E., & Thomsen, L. E. (2019). Identification of genes essential for antibiotic-induced up-regulation of plasmid-transfer genes in cephalosporin-resistant *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 2203.
- Loera Piedra, A. A., Becerra Mejía, I. L., Luna Galicia, B., Martínez Díaz, S. F., Luna Herrera, J., & Aguilera Arreola, M. G. (2024). Exploring local reservoirs for bacteriophages with therapeutic potential against ESKAPE pathogens. *Microbiology Research*, *15*(3), 1459-1470.
- Loes, A. N., Ruyle, L., Arvizu, M., Gresko, K. E., Wilson, A. L., & Deutch, C. E. (2014). Inhibition of urease activity in the urinary tract pathogen *Staphylococcus saprophyticus*. *Letters in Applied Microbiology*, *58*(1), 31-41.
- Lozoya-Pérez, N. E., García-Carnero, L. C., Martínez-Álvarez, J. A., Martínez-Duncker, I., & Mora-Montes, H. M. (2021). *Tenebrio molitor* as an alternative model to analyze the *Sporothrix* species virulence. *Infection and Drug Resistance*, *14*, 2059–2072.
- LPSN. (2024). List of prokaryotic names with standing in nomenclature – Genus *Staphylococcus*. Disponível em: <http://www.bacterio.net/staphylococcus.html>. Acesso em: 19/03/2024.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, B. H., & Stahl, D. A. (2016). *Microbiologia de Brock* (14ª ed.). *Artmed*.
- Magana, M., Sereti, C., Ioannidis, A., Mitchell, C. A., Ball, A. R., Magiorkinis, E., Chatzipanagiotou, S., Hamblin, M. R., Hadjifrangiskou, M., & Tegos, G. P. (2018). Options and limitations in clinical investigation of bacterial biofilms. *Clinical Microbiology Reviews*, *31*(3), e00084-16.
- Mares, C. A., McGehee, R., & Smyth, D. (2023). An invertebrate model using *Galleria mellonella* to study the innate immune response to *Staphylococcus haemolyticus*. *The Journal of Immunology*, *210*(1\_Supplement), 71-17.
- Marques, V. F., Souza, M., de Mendonça, E. C., Alencar, T. A. D., Pribul, B. R., Coelho, S. D. M. D. O., ... & Reinoso, E. B. (2013). Análise fenotípica e genotípica da virulência de *Staphylococcus* spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, *33*, 161-170.
- Martins, K. B., Ferreira, A. M., Pereira, V. C., Pinheiro, L., Oliveira, A. D., & Cunha, M. D. L. R. D. S. D. (2019). In vitro effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus saprophyticus* isolated from patients with urinary tract infections. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 40.
- Mayorga-Ramos, A., Carrera-Pacheco, S. E., Barba-Ostria, C., & Guamán, L. P. (2024). Bacteriophage-mediated approaches for biofilm control. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *14*, 1428637.
- Melo, L. D., Ferreira, R., Costa, A. R., Oliveira, H., & Azeredo, J. (2019). Efficacy and safety assessment of two enterococci phages in an in vitro biofilm wound model. *Scientific Reports*, *9*(1), 6643.
- Meyer, H. G., Wengler-Becker, U., & Gatermann, S. G. (1996). The hemagglutinin of *Staphylococcus saprophyticus* is a major adhesin for uroepithelial cells. *Infection and Immunity*, *64*(9), 3893-3896.
- Michalik, M., Samet, A., Podbielska-Kubera, A., Savini, V., Międzobrodzki, J., & Kosecka-Strojek, M. (2020). Coagulase-negative staphylococci (CoNS) as a significant etiological factor of laryngological infections: A review. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, *19*, 1-10.

- Mitropoulou, G., Koutsokera, A., Csajka, C., Blanchon, S., Sauty, A., Brunet, J. F., von Garnier, C., Resch, G., & Guery, B. (2022). Phage therapy for pulmonary infections: Lessons from clinical experiences and key considerations. *European Respiratory Review*, *31*(166), 220121.
- Morgenstern, M., Erichsen, C., Hackl, S., Mily, J., Militz, M., Friederichs, J., Hungerer, S., Bühren, V., Moriarty, T. F., Post, V., Richards, R. G., & Kates, S. L. (2016). Antibiotic resistance of commensal *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci in an international cohort of surgeons: A prospective point-prevalence study. *PLoS One*, *11*, e0148437.
- Morrisette, T., Kebriaei, R., Lev, K. L., Morales, S., & Rybak, M. J. (2020). Bacteriophage therapeutics: A primer for clinicians on phage-antibiotic combinations. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, *40*(2), 153-168.
- Naser, I. B., Hoque, M. M., Abdullah, A., Bari, S. N., Ghosh, A. N., & Faruque, S. M. (2017). Environmental bacteriophages active on biofilms and planktonic forms of toxigenic *Vibrio cholerae*: Potential relevance in cholera epidemiology. *PLoS One*, *12*(7), e0180838.
- Nasr-Eldin, M. A., Gamal, E., Hazza, M., & Abo-Elmaaty, S. A. (2023). Isolation, characterization, and application of lytic bacteriophages for controlling *Enterobacter cloacae* complex (ECC) in pasteurized milk and yogurt. *Folia Microbiologica*, *68*(6), 911-924.
- Natsis, N. E., & Cohen, P. R. (2018). Coagulase-negative *Staphylococcus* skin and soft tissue infections. *American Journal of Clinical Dermatology*, *19*, 671-677.
- Navidifar, T., Amin, M., & Rashno, M. (2019). Effects of sub-inhibitory concentrations of meropenem and tigecycline on the expression of genes regulating pili, efflux pumps and virulence factors involved in biofilm formation by *Acinetobacter baumannii*. *Infection and Drug Resistance*, *12*, 1099-1111.
- Olawade, D. B., Fapohunda, O., Egbon, E., Ebiesuwa, O. A., Usman, S. O., Faronbi, A. O., & Fidelis, S. C. (2024). Phage therapy: A targeted approach to overcoming antibiotic resistance. *Microbial Pathogenesis*, *107088*.
- Oliveira, W. F., Silva, P. M. S., Silva, R. C. S., Silva, G. M. M., Machado, G., Coelho, L. C. B. B., & Correia, M. T. S. (2018). *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* infections on implants. *Journal of Hospital Infection*, *98*, 111-117.
- Organização Mundial da Saúde – OMS. (2017). *Antimicrobianos de importância crítica para a medicina humana* (5ª ed.). Genebra: OMS.
- Otto, M. (2018). Staphylococcal biofilms. *Microbiology Spectrum*, *6*(1), 1-17.
- Paharik, A. E., & Horswill, A. R. (2016). The *Staphylococcal* biofilm: Adhesins, regulation, and host response. In *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens* (pp. 529-566). American Society for Microbiology Press.
- Park, K. H., Kim, D., Jung, M., Kim, D. Y., Lee, Y. M., Lee, M. S., ... & Cho, O. H. (2024). Effects of sub-inhibitory concentrations of nafcillin, vancomycin, ciprofloxacin, and rifampin on biofilm formation of clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiology Spectrum*, *12*, e03412-23.
- Parlet, C. P., Brown, M. M., & Horswill, A. R. (2019). Commensal staphylococci influence *Staphylococcus aureus* skin colonization and disease. *Trends in Microbiology*, *27*, 497-507.
- Parte, A. C., Carbasse, J. S., Meier-Kolthoff, J. P., Reimer, L. C., & Göker, M. (2020). List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *70*(11), 5607-5612.
- Pereira, M. F., & Rossi, C. C. (2020). Overview of rearing and testing conditions and a guide for optimizing *Galleria mellonella* breeding and use in the laboratory for scientific purposes. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, *128*(12), 607-620.
- Pereira, M. F., Rossi, C. C., da Silva, G. C., Rosa, J. N., & Bazzolli, D. M. S. (2020). *Galleria mellonella* as an infection model: An in-depth look at why it works and practical considerations for successful application. *Pathogens and Disease*, *78*(8), ftaa056.

- Pérez, L. M., Havryliuk, O., Infante, N., Muniesa, M., Morató, J., Mariychuk, R., & Tzanov, T. (2024). Biofilm prevention and removal in non-target *Pseudomonas* strain by Siphovirus-like coliphage. *Biomedicines*, *12*(10), 2291.
- Petronio Petronio, G., Pietrangelo, L., Cutuli, M. A., Magnifico, I., Venditti, N., Guarnieri, A., & Di Marco, R. (2022). Emerging evidence on *Tenebrio molitor* immunity: A focus on gene expression involved in microbial infection for host-pathogen interaction studies. *Microorganisms*, *10*(10), 1983.
- Pietrucha-Dilanchian, P., & Hooton, T. M. (2016). Diagnosis, treatment, and prevention of urinary tract infection. *Microbiology Spectrum*, *4*(6), 10.1128/microbiolspec.UTI-0021-2015.
- Piette, A., & Verschraegen, G. (2009). Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. *Veterinary Microbiology*, *134*(1-2), 45-54.
- Racenis, K., Lacis, J., Rezevska, D., Mukane, L., Vilde, A., Putnins, I., ... & Kroica, J. (2023). Successful bacteriophage-antibiotic combination therapy against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* left ventricular assist device driveline infection. *Viruses*, *15*(5), 1210.
- Racisi, H., Azimirad, M., Asadzadeh Aghdaei, H., Zarnani, A. H., Abdolizadeh, J., Yadegar, A., & Zali, M. R. (2023). Development and characterization of phage display-derived anti-toxin antibodies neutralizing TcdA and TcdB of *Clostridioides difficile*. *Microbiology Spectrum*, *11*(5), e05310-22.
- Rafaque, Z., Abid, N., Liaqat, N., Afridi, P., Siddique, S., Masood, S., ... & Dasti, J. I. (2020). In-vitro investigation of antibiotics efficacy against uropathogenic *Escherichia coli* biofilms and antibiotic-induced biofilm formation at sub-minimum inhibitory concentration of ciprofloxacin. *Infection and Drug Resistance*, *13*, 2801-2810.
- Rafiee, M., & Ghaemi, E. A. (2023). Detection of virulence genes among *Staphylococcus saprophyticus* isolated from women with urinary tract infections: First report from Iran. *BioMed Central Research Notes*, *16*(1), 206.
- Ramos, L. S., Fernandes, M. F., Santos, H. L., Picão, R. C., Branquinha, M. H., & Santos, A. L. (2024). *Candida* spp. isolated from recreational coastal waters of Rio de Janeiro—Brazil: Focus on antifungal resistance and virulence attributes. *Science of The Total Environment*, *947*, 174662.
- Ranieri, M. R., Whitchurch, C. B., & Burrows, L. L. (2018). Mechanisms of biofilm stimulation by subinhibitory concentrations of antimicrobials. *Current Opinion in Microbiology*, *45*, 164-169.
- Jhora, S. T., & Paul, S. (2011). Urinary tract infections caused by *Staphylococcus saprophyticus* and their antimicrobial sensitivity pattern in young adult women. *Bangladesh Journal of Medical Microbiology*, *5*(1), 21-25.
- Potter, R. F., Marino, J., Muenks, C. E., Lammers, M., Wallace, M. A., Bard, J. D., ... & Burnham, C. A. D. (2024). Detection of *mecA*-mediated methicillin resistance and evaluation of disk-diffusion antimicrobial susceptibility characteristics of *Staphylococcus saprophyticus* isolates from geographically diverse locations. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *110*(4), 116538.
- Reis, A. C. C., Santos, S. R. D. S., Souza, S. C. D., Saldanha, M. G., Pitanga, T. N., & 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*, e31.
- Rossi, C. C., Ahmad, F., & Giambiagi-deMarval, M. (2024). *Staphylococcus haemolyticus*: An updated review on nosocomial infections, antimicrobial resistance, virulence, genetic traits, and strategies for combating this emerging opportunistic pathogen. *Microbiological Research*, *127*, 652.
- Rossi, C. C., Pereira, M. F., & Giambiagi-Demarval, M. (2020). Underrated *Staphylococcus* species and their role in antimicrobial resistance spreading. *Genetics and Molecular Biology*, *43*(1), 1–10.
- Russell, W. M. S., & Burch, R. L. (1959). *The principles of humane experimental technique*. Methuen.
- Sakinc, T., Kleine, B., & Gatermann, S. G. (2006). *SdrI*, a serine-aspartate repeat protein identified in *Staphylococcus saprophyticus* strain 7108, is a collagen-binding protein. *Infection and Immunity*, *74*(8), 4615-4623.

- Sakinç, T., Michalski, N., Kleine, B., & Gatermann, S. G. (2009). The uropathogenic species *Staphylococcus saprophyticus* tolerates a high concentration of D-serine. *FEMS Microbiology Letters*, 299(1), 60-64.
- Sakinc, T., Woznowski, M., Ebsen, M., & Gatermann, S. G. (2005). The surface-associated protein of *Staphylococcus saprophyticus* is a lipase. *Infection and Immunity*, 73(10), 6419-6428.
- Santos, A. L. D., Santos, D. O., Freitas, C. C. D., Ferreira, B. L. A., Afonso, I. F., Rodrigues, C. R., & Castro, H. C. (2007). *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 43, 413-423.
- Seixas, L. B., Conte-Junior, C. A., & Dos Santos, A. F. G. N. (2021). How much fluctuating asymmetry in fish is affected by mercury concentration in the Guanabara Bay, Brazil? *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 11183-11194.
- Seo, B. J., Song, E. T., Lee, K., Kim, J. W., Jeong, C. G., Moon, S. H., ... & Kim, W. I. (2018). Evaluation of the broad-spectrum lytic capability of bacteriophage cocktails against various *Salmonella* serovars and their effects on weaned pigs infected with *Salmonella Typhimurium*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 80(6), 851-860.
- Serra, N., Di Carlo, P., Andriolo, M., Mazzola, G., Diprima, E., Rea, T., ... & Cascio, A. (2023). *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococci* from bloodstream infections: Frequency of occurrence and antimicrobial resistance, 2018–2021. *Life*, 13(6), 1356.
- Shamsuzzaman, M., Kim, S., & Kim, J. (2024). Role of phage-antibiotic combinations in reducing ESBL-producing and carbapenem-resistant *Escherichia coli*. *bioRxiv*.
- Shang, W., Rao, Y., Zheng, Y., Yang, Y., Hu, Q., Hu, Z., ... & Rao, X. (2019).  $\beta$ -Lactam antibiotics enhance the pathogenicity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via *SarA*-controlled lipoprotein-like cluster expression. *MBio*, 10(3), 10-1128.
- Shenkutic, A. M., Zhang, J., Yao, M., Asrat, D., Chow, F. W. N., & Leung, P. H. M. (2022). Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of imipenem and colistin on expression of biofilm-specific antibiotic resistance and virulence genes in *Acinetobacter baumannii* sequence type 1894. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20), 12705.
- Silva, M. M., Maldonado, G. C., Castro, R. O., de Sá Felizardo, J., Cardoso, R. P., Dos Anjos, R. M., & de Araújo, F. V. (2019). Dispersal of potentially pathogenic bacteria by plastic debris in Guanabara Bay, RJ, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 141, 561-568.
- Sklar, R., Chabrelie, A. E., Carreira, R. S., Gurian, P. L., & Mitchell, J. (2023). Health risks to communities and athletes associated with swimming, wading, and sailing in water bodies of Brazil's Guanabara Bay Basin. *Water*, 15(14), 2509.
- Soumya, K. R., Philip, S., Sugathan, S., Mathew, J., & Radhakrishnan, E. K. (2017). Virulence factors associated with coagulase-negative *Staphylococci* isolated from human infections. *3 Biotech*, 7(2), 140.
- Sousa, Á. F. L. D., Marques, D. M., Monteiro, R. M., Queiroz, A. A. F. L., Andrade, D., & Watanabe, E. (2017). Prevenção da formação de biofilmes em marcapassos artificiais: É viável? *Acta Paulista de Enfermagem*, 30(6), 644-650.
- Sousa, V. S. D., da-Silva, A. P. D. S., Sorenson, L., Paschoal, R. P., Rabello, R. F., Campana, E. H., ... & Moreira, B. M. (2017). *Staphylococcus saprophyticus* recovered from humans, food, and recreational waters in Rio de Janeiro, Brazil. *International Journal of Microbiology*, 2017(1), 4287547.
- Suleiman, R. Z. (2024). A comparative approach to understanding bacterial pathogenicity: The role of enzymatic and hemolytic virulence factors. *Journal of Medical Genetics and Clinical Biology*, 1(6), 150-161.
- Taponen, S., & Pyörälä, S. (2009). Coagulase-negative *Staphylococci* as cause of bovine mastitis—Not so different from *Staphylococcus aureus*? *Veterinary Microbiology*, 134(1-2), 29-36.
- Ten, K. E., Muzahid, N. H., Rahman, S., & Tan, H. S. (2023). Use of the waxworm *Galleria mellonella* larvae as an infection model to study *Acinetobacter baumannii*. *PLOS One*, 18(4), e0283960.

Barbu, E. M., Cady, K. C., & Hubby, B. (2016). Phage therapy in the era of synthetic biology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(10), a023879.

Tran, M., Viera, A. J. H., Tran, P. Q., & Mo, C. (2024). Bacteriophage infection drives loss of  $\beta$ -lactam resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *bioRxiv*.

Tsai, C. J. Y., Loh, J. M. S., & Proft, T. (2016). *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*, 7(3), 214-229.

Twort, F. W. (1915). An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *The Lancet*, 186, 1241–1243.

Upadhyayula, S., Kambalapalli, M., & Asmar, B. I. (2012). *Staphylococcus epidermidis* urinary tract infection in an infant. *Case Reports in Infectious Diseases*, 2012, 983153.

Veja Rio. (2024). Despoluição da Baía de Guanabara avança após 8 anos. *Veja Rio*. Disponível em: [https://vejario.abril.com.br/cidade/despoluicao-baia-de-guanabara-avanca-apos-8-anos#google\\_vignette](https://vejario.abril.com.br/cidade/despoluicao-baia-de-guanabara-avanca-apos-8-anos#google_vignette). Acesso em: 12/02/2025.

Venturini, C., Petrovic Fabijan, A., Fajardo Lubian, A., Barbirz, S., & Iredell, J. (2022). Biological foundations of successful bacteriophage therapy. *EMBO Molecular Medicine*, 14(7), e12435.

Verbeken, G., De Vos, D., Vaneechoutte, M., Merabishvili, M., Zizi, M., & Pirnay, J. P. (2007). European regulatory conundrum of phage therapy. *Future Microbiology*, 2(5), 485-491.

Vigneron, A., Jehan, C., Rigaud, T., & Moret, Y. (2019). Immune defenses of a beneficial pest: the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Frontiers in Physiology*, 10, 138.

Vilar, L. C., Rego, A. C. S., Miguel, M. A. L., da Rocha Paranhos, R. P., Laport, M. S., Rossi, C. C., & Giambiagi-deMarval, M. (2025). *Staphylococcus* spp. and methicillin-resistance gene *mecA* dispersion in seawater: a case study of Guanabara Bay's recreational and touristic waters. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 102326.

Wistrand-Yuen, E., Knopp, M., Hjort, K., Koskiniemi, S., Berg, O. G., & Andersson, D. I. (2018). Evolution of high-level resistance during low-level antibiotic exposure. *Nature Communications*, 9(1), 1599.

Zajmi, A., Shiranee, F., Tang, S. G. H., Alhoot, M. A., & Karim, S. A. (2022). Multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* as coloniser in healthy individuals. In *Staphylococcal Infections - Recent Advances and Perspectives*. IntechOpen.

Zhai, L., Yadav, R., Kunda, N. K., Anderson, D., Bruckner, E., Miller, E. K., Basu, R., Muttill, P., & Tumban, E. (2019). Oral immunization with bacteriophage MS2-L2 VLPs protects against oral and genital infection with multiple HPV types associated with head & neck cancers and cervical cancer. *Antiviral Research*, 166, 56–65.

Zhang, Y., Mao, M., Zhang, R., Liao, Y. T., & Wu, V. C. (2024). DeepPL: A deep-learning-based tool for the prediction of bacteriophage lifecycle. *PLOS Computational Biology*, 20(10), e1012525.

**Anexo I: Tabela suplementar****Tabela Suplementar - Percentual de redução do biofilme na presença do fago CSF**

<b>CEPAS AQUÁTICAS</b>	<b>Redução de biofilme em %</b>	<b>CEPAS CLÍNICAS</b>	<b>Redução de biofilme em %</b>
BG21	85,28	RC41	33,97
BG22	91,08	RC78a	61,35
BG23	78,89	RC141	7,104
BG24	71,52	RC181	-13,25
BG25	52,67	RC299	35,56
BG26	73,62	60ad	55,32
BG27	38,55	75C	1,14
BG28	88,91	87C	79,11
BG29	10,72	94C	62,47
BG30	71,33	106C	52,3
BG31	66,89	110ad	70,92
BG32	64,66	143c	53,84
BG33	90,3	174c	-15,15
BG35	35,19	224c	82,17
BG36	60,21	228ad	88,68
BG37	11,26	521ad	54,45
BG38	-19,09	601ad	68,96
BG39	9,43	744ad	54,44
BG40	66,98	759ad	64,86

BG41

34,22

794ad

84,64

---