

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

Trabalho de Conclusão de Curso

Formação de Biofilme por *Staphylococcus pseudintermedius*: uma revisão

Elaborado por: Bruna Correa Lopes
Graduanda em Medicina Veterinária

Porto Alegre

2018/1

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

Trabalho de Conclusão de Curso

Formação de Biofilme por *Staphylococcus pseudintermedius*: uma revisão

Autor: Bruna Correa Lopes

Trabalho apresentado à Faculdade de
Veterinária como requisito parcial para a
obtenção da graduação em Medicina Veterinária

Orientadora: Professora Franciele Maboni Siqueira

PORTO ALEGRE

2018/1

Dedico esse trabalho a todos que tiverem interesse no assunto e queiram, de qualquer maneira, tornar o conhecimento uma ferramenta essencial e livre ao acesso de todos.

Dedico também àqueles que me deram apoio durante meu período de formação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de alguma maneira, somaram para a minha formação.

Agradeço à minha mãe, meus avós e familiares mais próximos. Agradeço a minha eterna amizade com a Ândrea S. Dutra. E agradeço às pessoas que conheci durante minha formação que marcaram minha trajetória.

Agradeço a Professora Franciele Maboni por ter aceitado ser minha orientadora neste trabalho.

Agradeço especialmente ao Professor Marcos Gomes por ter me proporcionado a oportunidade de fazer estágio em seu laboratório. Agradeço também a Professora Mary Jane por ser sempre tão acolhedora e gentil.

Agradeço ao Professor David Driemeier, Professor Saulo Pavarini e Professora Luciana pela confiança dada a mim – o que me fez crescer como profissional e como pessoa. Agradeço a oportunidade em trabalhar com um setor referência dentro da Faculdade de Veterinária da UFRGS.

Agradeço também ao grande amigo e orientador que encontrei durante minha formação, Gustavo Snel. Agradeço a Rachel Pilla, apesar de pouco período de convivência, é uma pessoa a qual tenho grande admiração.

Agradeço a qualquer pessoa que eu eventualmente tenha esquecido neste momento.

Formação de Biofilme por *Staphylococcus pseudintermedius*: uma revisão

RESUMO

Staphylococcus pseudintermedius é um patógeno importante na clínica de pequenos animais estando associado principalmente à piodermatites e otites externas em cães, sendo que cepas de *S. pseudintermedius* resistentes à meticilina (MRSP) são as causas mais comuns de infecção de sítio cirúrgico em instalações veterinárias. *S. pseudintermedius* é considerado um patógeno oportunista, constituindo a microbiota cutânea normal de cães e gatos – representando cerca de 90% dos *Staphylococcus* isolados de cães. Semelhante a outras espécies do gênero, é provável que a produção de biofilme seja um fator de virulência crítico para o estabelecimento e manutenção das infecções. Infecções associadas a biofilmes se caracterizam por massas de células bacterianas envoltas por matriz extracelular e aderidas as superfícies do hospedeiro, dificultando o acesso de antimicrobianos e desinfetantes, assim como, a ação do sistema imune. A produção de biofilme por *S. pseudintermedius* pode estar relacionada à fisiopatologia da doença e colonização do *Staphylococcus* a feridas, podendo facilitar o desenvolvimento de determinadas doenças. A elaboração de uma revisão bibliográfica sobre o tema “Formação de Biofilme por *Staphylococcus pseudintermedius*” tem como objetivo unir todas as informações existentes até o momento sobre o assunto e suas peculiaridades quando comparados a outras espécies do gênero. Com o intuito de incentivar pesquisas e tornar mais acessíveis informações da área, esta revisão será uma importante ferramenta de consulta bibliográfica. Por fim, pretende-se salientar a importância da produção de biofilme por *S. pseudintermedius* e sua íntima relação a diversas doenças que ocorrem nos animais domésticos.

Palavras-chave: *Staphylococcus pseudintermedius*, biofilme, resistência, MRSP.

ABSTRACT

Staphylococcus pseudintermedius is an important pathogen for small animal practice and is mainly associated with pyodermatitis and external otitis of canines, and strains methicillin-resistant *S. pseudintermedius* (MRSP) are the most common causes of surgical site infection in veterinary facilities. *S. pseudintermedius* is considered an opportunistic pathogen, constituting the normal cutaneous microbiota from dogs and cats – representing about 90% of *Staphylococcus* isolated from dogs. Similar to other species of the genus, biofilm production is likely to be a critical virulence factor for establishment and maintenance of infections. Infections associated with biofilm are characterized by masses of bacterial cells surrounded by extracellular matrix and adhered to the surfaces of the host, making it difficult to access antimicrobials and disinfectants, as well as the action of the immune system. Biofilm production by *S. pseudintermedius* may be related to the pathophysiology of the disease and colonization of *Staphylococcus aureus*, which may facilitate the disease development. The elaboration of a bibliographical review on the theme "Biofilm Formation of *Staphylococcus pseudintermedius*" aims to analyze all existing information on the subject and its peculiarities when compared to other species of the genus. In order to encourage research and make information more accessible in the area, this review will be an important tool for bibliographic consultation. Finally, we intend to emphasize the importance of biofilm production by *S. pseudintermedius* and its relationship to several dogs and cats diseases.

Key words: *Staphylococcus pseudintermedius*, biofilm, resistance, MRSP.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 8 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 9 |
| 2.1. Gênero <i>Staphylococcus</i> | 9 |
| 2.2. Taxonomia da espécie <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> | 10 |
| 2.3. Infecções causadas pela espécie <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> | 10 |
| 2.4. <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> resistente à meticilina | 12 |
| 2.5. Cães carreadores | 13 |
| 2.6. Formação de biofilme em <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> | 14 |
| 2.6.a. Avaliação de imagens obtidas de biofilmes formados por <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> | 20 |
| 2.7. Suscetibilidade do biofilme formado por <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> | 23 |
| 3. CONCLUSÃO | 28 |
| 4. REFERÊNCIAS | 29 |

1. INTRODUÇÃO

Em algumas espécies do gênero *Staphylococcus*, a formação de biofilme é conhecida como um importante fator de virulência envolvido em diversas doenças, no entanto, há poucas informações acerca da formação de biofilme por *Staphylococcus pseudintermedius* (SINGH *et al.*, 2013).

Infecções associadas a biofilmes se caracterizam por massas de células bacterianas envoltas por matriz extracelular e aderidas as superfícies do hospedeiro, dificultando o acesso de antimicrobianos e desinfetantes, assim como, a ação do sistema imune. Quando há o desenvolvimento de infecções associadas a biofilme, concentrações de antimicrobianos normalmente utilizadas no tratamento não conseguem eliminar o biofilme, o que provocará a reincidência da doença.

Além do tratamento de infecções associadas a biofilme ser de extrema dificuldade, o surgimento de cepas bacterianas multirresistentes fez com que a preocupação do risco zoonótico do MRSP (*Meticillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius*) aumentasse.

Enquanto o problema de resistência a antimicrobianos aumenta, a introdução de novos produtos antibacterianos reduz drasticamente. Sendo necessárias medidas mais eficazes para prevenção e controle de infecções causadas por *S. pseudintermedius*. O desenvolvimento de tais medidas requer compreensão aprofundada da ecologia e epidemiologia deste micro-organismo, bem como o conhecimento de fatores do hospedeiro envolvidos na patogênese de infecções causadas por *S. pseudintermedius* (BANNOEHR e GUARDABASSI, 2012).

S. pseudintermedius, com menor frequência, causa infecções em humanos. Quando ocorre, comumente é após contato direto de feridas com um animal portador. Recentemente, cepas MRSP emergiram como um patógeno importante em animais de companhia. Devido a opções terapêuticas limitadas para animais e homens, o aumento da incidência dessas infecções é considerado um problema alarmante. Sendo considerado um assunto de importância em saúde pública para veterinários e tutores (BARDIAU *et al.*, 2013).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Gênero *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus* é caracterizado por se apresentar como cocos gram positivos, com diâmetro de 0,8 a 1 µm, podendo estar em pares, tétrades, agrupados irregularmente ou em forma de “cachos de uva”. As colônias são normalmente brancas com bordas regulares. Não são móveis, não esporulam e a maior parte das espécies são anaeróbias facultativas, com metabolismo fermentativo. *Staphylococcus* apresenta reação positiva para o teste da catalase e negativa para o teste da oxidase. O crescimento ocorre em meios nutrientes com ou sem sangue, não ocorrendo em Ágar MacConkey. Alguns exemplares podem apresentar produção de cápsula (MARKEY *et al.*, 2013).

Atualmente, cerca de 52 espécies compõem o gênero *Staphylococcus* (<http://www.bacterio.net/staphylococcus.html>), a maioria é encontrada em animais, porém poucas são patogênicas. Infecções causadas por *Staphylococcus* são frequentemente agudas e piogênicas. As duas principais espécies patogênicas do gênero *Staphylococcus*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus pseudintermedius* são positivos quando submetidos ao teste da coagulase. *Staphylococcus* coagulase negativa (CoNS) podem colonizar ambientes abióticos e bióticos – ocorrendo como comensais no último exemplo. As espécies de *Staphylococcus* são consideradas um componente importante da microbiota de animais e humanos e, ocasionalmente, podem causar infecções oportunistas (MARKEY *et al.*, 2013).

Como *S. pseudintermedius* pode ser confundido com *S. aureus* ou identificado erroneamente como *S. intermedius* por sistemas de identificação bioquímica usados rotineiramente, os laboratórios de microbiologia clínica devem incluir métodos de identificação genotípica e vários testes bioquímicos para diferenciar *S. pseudintermedius*. Por exemplo, *S. pseudintermedius* não possui pigmento e a presença de fator de aglutinação – *clumping factor* – é variável, e exibe fermentação de manitol fraca e retardada; com reação positiva para o teste pirrolidonilarilamidase e *o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG: β-galactosidase). Quanto à diferenciação de *S. intermedius*, o *S. pseudintermedius* possui resultado negativo quando submetido ao teste de hidrólise da arginina e resultado positivo quando submetido ao teste de produção de ácido a partir dos carboidratos D-gentiobiose e D-manitol (CHUANG *et al.*, 2010).

2.2. Taxonomia da espécie *Staphylococcus pseudintermedius*

A espécie *S. pseudintermedius* foi recentemente reconhecida – início do século 21 (DEVRIESE *et al.*, 2005), anteriormente, estes isolados eram nomeados como *S. intermedius*. A primeira descrição de *S. intermedius* foi realizada por Hajek (1976), baseando-se em isolados de pombos, cães, visons e cavalos. Por 30 anos, o *S. intermedius* foi considerado o agente comumente isolado de afecções de pele e tecidos moles em cães. No entanto, grandes diferenças quanto a características genotípicas e fenotípicas foram observadas, sugerindo que mais de uma espécie existia.

Devriese *et al.* (2005) demonstraram que isolados classificados fenotipicamente como *S. intermedius*, deveriam ser classificados como *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* e *Staphylococcus delphini*, e pertenciam ao denominado Grupo *Staphylococcus intermedius* (SIG, do inglês *Staphylococcus intermedius Group*). *S. delphini* foi isolado pela primeira vez de lesões de pele purulentas de golfinhos em 1988 e após o primeiro isolamento, raramente foi relatado (VARALDO *et al.*, 1988). A cepa de *S. intermedius* de referência é originária de um pombo, e representa um grupo distinto e que não é representativa da maioria dos isolados comumente identificados como *S. intermedius* no passado (SASAKI *et al.*, 2007). Desde a reclassificação dessas espécies, foi proposto que todos os isolados de cães, pertencentes ao SIG, devem ser denominados de *S. pseudintermedius*, a menos que seja provado que não pertencem a essa espécie (DEVRIESE *et al.*, 2009).

2.3. Infecções causadas pela espécie *Staphylococcus pseudintermedius*

S. pseudintermedius é um componente comensal da microbiota da pele e das membranas mucosas de cães e gatos, sendo o agente mais comumente isolado de amostras clínicas provindas desses animais. Dentre as afecções clínicas que se destacam, estão as piodermatites, otites (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012), e infecções de caráter oportunista ou infecções adquiridas em ambientes hospitalares (GRONTHAL *et al.*, 2014; HAENNI *et al.*, 2013). E atualmente, com o surgimento de cepas resistentes, denominadas de *S. pseudintermedius* resistentes à meticilina (MRSP), há um aumento significativo na dificuldade do tratamento de afecções causadas por esta espécie (WEESE, 2010).

S. pseudintermedius está relacionado a infecções de ferida cirúrgica em cães (SSI, *Surgical Site Infection*), sendo o MRSP o agente mais comumente causador de SSI em alguns ambientes veterinários. A SSI é um risco inerente de qualquer procedimento cirúrgico

e é reportado como complicação em 0,8% a 18,1% dos procedimentos, dependendo da classificação da ferida cirúrgica (SINGH, 2013).

S. pseudintermedius carregado em cães é mais frequente e geneticamente heterogêneo comparado com o *S. aureus* carregado pelo homem. Aparentemente essas espécies de *Staphylococcus* evoluíram separadamente através de adaptação em seus respectivos hospedeiros naturais e diferem em relação a vários aspectos relativos à ecologia, estrutura e evolução da resistência aos antibióticos (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012).

Semelhante a outras espécies do gênero, o *S. pseudintermedius* é capaz de sintetizar uma série de fatores de virulência e mecanismos de invasão tecidual. E estão incluídos fatores de adesão à célula hospedeira (*clumping factor* e biofilme), toxinas, fatores de modulação do sistema imune (hemolisinas, leucotoxinas, toxinas exfoliativas e enterotoxinas). Além de outros fatores de virulência também estarem presentes na espécie, como: coagulase, DNase, proteína A e lipases (GARBACZ *et al.*, 2013).

Em contraste com o descrito por Devriese *et al.* (2005), Garbacz *et al.* (2013) revelaram que 20 % dos isolados eram positivos quando submetidos ao teste *clumping factor*, podendo ser um importante fator de virulência associado a patogenicidade da espécie.

Segundo estudo realizado por Garbacz *et al.* (2013), onde foram analisados os potenciais mecanismos envolvidos com a patogenicidade de *S. pseudintermedius*, observou-se que em isolados de cães que apresentavam alguma alteração clínica, a Proteína A era sintetizada mais frequentemente quando comparada a isolados de cães saudáveis. Além de todos os isolados serem positivos para os genes *siet* e *lukS/F* – genes codificadores da toxina exfoliativa e leucotoxina, respectivamente. Os genes *sea*, *seb*, *sed*, *see* e *tst* não foram detectados em cães saudáveis e cães que apresentavam afecção clínica. O gene *sec* foi detectado em um isolado (1,4 %) obtido de cães saudáveis e dois isolados (1,6%) obtidos de cães com alguma afecção clínica.

Em concordância com os dados anteriormente citados, em estudo realizado por Diribe *et al.* (2015), dos 13 exemplares de MRSP, todos eram positivos para a presença do gene *lukS* e *lukF* e negativos para o gene PVL. E 12 dos isolados eram positivos para a presença do gene *siet*. E dentre os 13 isolados MSSP, todos apresentavam os genes *lukS*, *lukF* e *siet*, porém não possuíam o gene PVL.

A real influência da presença do gene *siet* sobre a patogenicidade de *S. pseudintermedius* ainda não é clara. (GARBACZ *et al.*, 2013). Em um recente estudo realizado por Bannoehr e Guardabassi (2012), a injeção da toxina exfoliativa recombinante de

S. pseudintermedius em três cães não foi capaz de causar nenhuma alteração clínica ou histopatológica evidente.

2.4. *Staphylococcus pseudintermedius* Resistente à Meticilina

Staphylococcus pseudintermedius é um importante patógeno oportunista de animais de companhia, especialmente em cães. A partir de 2006, ocorreu um aumento significativo da ocorrência de *S. pseudintermedius* resistente à meticilina, principalmente devido à disseminação clonal.

Semelhante ao que ocorre em *S.aureus* resistente à meticilina (MRSA), a resistência do MRSP à meticilina é mediada pelo gene *mecA* que codifica a produção de uma proteína de ligação à penicilina modificada (PBP). Normalmente, antibióticos betalactâmicos se ligam à PBP do *S. pseudintermedius* para prevenira síntese da membrana celular pela bactéria. A PBP modificada da MRSP tem uma baixa afinidade para betalactâmicos e, portanto, a síntese da membrana celular não é impedida por estes antimicrobianos. O gene *mecA* é localizado no cromossomo de *S. pseudintermedius* em uma estrutura genética denominada "cassete cromossômico estafilocócico" (SCCmec). O elemento SCCmec pode ser transferido entre diferentes espécies de *Staphylococcus*.

Mutações associadas à resistência podem surgir espontaneamente ou certos organismos podem as derivar de ácido desoxirribonucleico (DNA) encontrado em locais diversos. Muitos organismos se tornaram resistentes devido à sua capacidade de absorver o DNA do ambiente circundante e o incorporar ao seu genoma (DICICCO *et al.*, 2014).

Segundo estudo realizado por Singh *et al.* (2013), cerca de 93% dos isolados de *S. pseudintermedius* pertenciam a dois grupos – segundo a classificação realizada através da tipificação da unidade direta de repetição –, um denominado de dt9a (48%) e outro denominado de dt11a (45%) – sequência tipo (ST) 71 e 68, respectivamente. Conforme estudo realizado por Perreten *et al.* (2010), esses dois clones independentes, pertencentes ao ST71 e ao ST68, estão distribuídos pela Europa e América do Norte, respectivamente – confirmando os dados encontrados pelo estudo de Singh *et al.* (2013), realizado no Canadá.

Embora exista grande variabilidade clonal entre os estafilococos, ainda não é compreendido por que alguns clones de *Staphylococcus* apresentam maior disseminação ou por que algumas espécies são mais prevalentes que outras (GUADARRAMA *et al.*, 2017).

Em estudo realizado por Osland *et al.* (2012) com objetivo de avaliar a diversidade clonal e padrão de resistência de cepas MRSP obtidas na Noruega, foi possível observar que

todos os isolados foram classificados como resistentes aos betalactâmicos (cefalotina, penicilina e oxacilina) baseados na presença do gene *mecA*. Nesse trabalho também foi verificado o padrão de resistência para outros antimicrobianos, com os seguintes resultados: 86,9% dos isolados eram resistentes a canamicina; 82,6% dos isolados eram resistentes a clindamicina, eritromicina e trimetoprim; 52,1% dos isolados eram resistentes a tetraciclina; 34,8% dos isolados eram resistentes ao ácido fusídico; 30,4% dos isolados eram resistentes a gentamicina; 21,7% dos isolados eram resistentes a cloranfenicol; e 17,4% dos isolados eram resistentes a ciprofloxacina.

Em estudo realizado no Japão por Bardiau *et al.* (2013), observou-se que dentre os 27 isolados – classificados com MRSP – a maioria das cepas pertenciam as cepas tipos ST71 e ST26. Sendo a linhagem ST26 uma possível cepa emergente da região. E, 78 % dos isolados MRSP apresentavam resultado resistente ou intermediário a 12 ou mais de cinco antimicrobianos comumente utilizados em medicina veterinária.

A partir dos perfis de sensibilidade das cepas MRSP foi possível observar que todos os isolados eram resistentes a pelo menos cinco dos antimicrobianos testados (gentamicina, canamicina, espectinomicina, eritromicina e sulfazotrim). Todos os isolados, exceto um, eram resistentes à penicilina, clindamicina e ciprofloxacina. Em contraste, mais de 40 % dos isolados eram sensíveis a cefoperazona, cefalexina e ceftiofur. E um isolado era resistente a todos os antimicrobianos testados (BARDIAU *et al.*, 2013).

2.5. Cães carreadores de *Staphylococcus pseudintermedius*

Em cães saudáveis, *S. pseudintermedius* faz parte da microbiota cutânea, colonizando a pele, folículos pilosos e, em particular, regiões mucocutâneas, como nariz, boca e ânus (DEVRIESE e PELSMAECKER, 1987). *S. pseudintermedius* constitui cerca de 90% dos *Staphylococcus* isolados de cães portadores saudáveis e de cães com doença de pele (FAZAKERLEY *et al.*, 2009).

Em contraste à obtenção de *S. aureus* em humanos, onde os swabs nasais são rotineiramente usados para fins de identificação do agente, caninos portadores de *S. pseudintermedius* podem ser identificados de forma mais confiável por esfregaço, tanto da mucosa oral quanto do períneo (BANNOEHR e GUARDABASSI, 2012). A figura 1 ilustra o sítios de detecção de *S. pseudintermedius*, com suas respectivas porcentagens.

Através de estudo realizado por Garbacz *et al.* (2013) onde foram analisados os potenciais mecanismos envolvidos com a patogenicidade de *S. pseudintermedius*, foi

observado que em ambos os isolados de cães com alterações clínicas e isolados de cães saudáveis foram capazes de sintetizar: hemolisina, *clumping factor*, coagulase, DNase, proteína A e lipase. Sendo preocupantes potenciais fatores de virulência associados ao *S. pseudintermedius* carregados por cães.

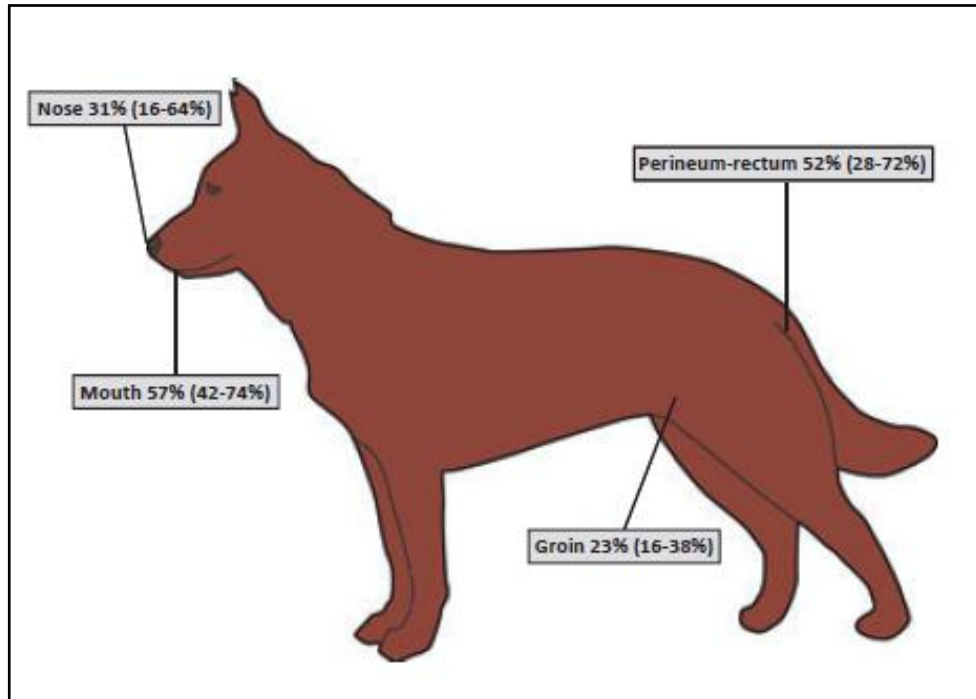


Figura 1. Locais onde *Staphylococcus pseudintermedius* é comumente encontrado em caninos. Adaptado de BANNOEHR e GUARDABASSI (2012).

2.6. Formação de Biofilme em *Staphylococcus pseudintermedius*

Em ambientes naturais ou em determinados hospedeiros, as bactérias podem estar presentes de duas formas: célula planctônica (célula livre) ou em biofilme. Um biofilme bacteriano é uma comunidade sésil e complexa de bactérias inseridas em uma matriz de carboidratos, proteínas e ácido desoxirribonucleico, compostos formadores da substância polimérica extracelular (EPS). Dentro de um biofilme, as bactérias alteram acentuadamente o metabolismo, melhoram a comunicação, através de sinalização por *quorum sensing*, e são capazes de escapar da resposta imune e dos efeitos dos antimicrobianos através de seu metabolismo isolado, juntamente com a proteção física e química da matriz do biofilme (COSTERTON, 2007).

Uma vez que há a adesão inicial a uma superfície (biótica ou abiótica), ocorre a secreção de EPS. Nos estafilococos, este componente da matriz extracelular, também denominado polissacarídeo de adesão intercelular (PIA), é codificado, em parte, pelo operon *ica* (CRAMTON *et al.*, 1999).

Quando a terapia antimicrobiana acaba ou é interrompida, o biofilme age como uma fonte reservatória do agente, contribuindo para o estado recorrente de algumas afecções (STEWART e CONSTERTON, 2001). E através do destacamento de células aderidas ao biofilme ocorre a disseminação de determinado agente, podendo acarretar na disseminação ou permanência da doença (OTTO, 2013).

A formação de biofilme atualmente é reconhecida como um importante fator de virulência do gênero *Staphylococcus*. A formação de biofilme é variável entre diferentes espécies bacterianas, sendo a habilidade de formação de biofilme pelo *S. pseudintermedius* não caracterizada totalmente (OTTO, 2013). A formação de biofilme em estafilococos é multifatorial, e a capacidade de formar um biofilme torna as cepas mais hábeis para sobreviver em ambientes normalmente hostis (GÖTZ, 2002).

Existem diversas hipóteses que explicam o motivo pelo qual os biofilmes bacterianos são tão resistentes à terapia antimicrobiana, e porque podem coexistir em um mesmo ambiente. Dentre elas estão: a matriz extracelular que impede a penetração de antimicrobianos no biofilme; muitas células dentro do biofilme não são metabolicamente ativas e são, portanto, resistentes a muitas terapias antimicrobianas; biofilmes são ativamente resistentes através da aquisição de genes de resistência e/ou expressão de bombas de efluxo; e biofilmes contêm uma subpopulação de células que não são suscetíveis a antimicrobianos (por exemplo, *resisters*) (FUENTE-NUNEZ *et al.*, 2013). Como resultado, a concentração inibitória mínima (MIC) de bactérias presentes em biofilme pode ser dez a 1.000 vezes maior do que em suas células planctônicas, o que frequentemente representa uma dose que seria letal ao hospedeiro (WALKER *et al.*, 2016).

Genes que codificam a resistência aos antimicrobianos e a formação de biofilme são caracterizados como genes acessórios, e essas características não são necessariamente estáveis nos genomas bacterianos (OSLAND *et al.*, 2012). Em *Staphylococcus epidermidis*, foi demonstrado que a expressão conjunta dos genes *icaA* e *icaD* acarreta em um aumento na atividade da PIA. No entanto, a formação de biofilme independente da expressão do *ica* tem sido relatada em *Staphylococcus* e o papel do operon *ica* na habilidade de formação de biofilme de *S. pseudintermedius* ainda é desconhecido.

Apesar de não ser esclarecido o envolvimento de genes no aumento da formação de biofilme produzido por *S. pseudintermedius*, foi observado por qRT-PCR que a expressão do gene *icaA* é significativamente maior em biofilme comparado com as fases de crescimento logarítmicas e estacionárias da bactéria (CRAWFORD *et al.*, 2014).

Em relação à presença dos genes relacionados à secreção de PIA, estudos demonstraram que o gene *icaA* foi detectado em 77,9% dos isolados (MRSP e *S. pseudintermedius* sensíveis à meticilina – MSSP). E apesar dos genes *icaA* e *icaD* estarem associados a produção de PIA, nenhuma associação entre a presença do *icaA* e valor de densidade óptica (OD) 570; *icaA* e diferentes intensidades de produção de biofilme; e entre *icaA* e cepas MRSP ou MSSP foram observadas (SINGH *et al.*, 2013; HAN *et al.*, 2015).

Semelhante ao gene *icaA*, o gene *icaD* foi detectado em 75,7% dos isolados (MRSP e MSSP). E nenhuma associação entre a presença do *icaD* e valor de OD570; *icaD* e diferentes intensidades de produção de biofilme; e entre *icaD* e cepas MRSP ou MSSP foram observadas (SINGH *et al.*, 2013).

Proietti *et al.* (2015) encontraram dados semelhantes aos encontrados por Singh *et al.* (2013), sendo os genes *icaA* e *icaD* detectados em 91,6% das amostras.

Quando a produção de biofilme por *S. pseudintermedius* é avaliada, é possível observar que *S. pseudintermedius* tem grande capacidade de formação de biofilme em métodos *in vitro* (SINGH *et al.*, 2015; HAN *et al.*, 2015; GARBACZ *et al.*, 2013). Em estudo realizado por Bardiau *et al.* (2013), avaliou-se a formação de biofilme de 27 cepas de MRSP e foi possível observar que 92,6% das cepas apresentavam forte produção de biofilme e os demais isolados apresentaram moderada e fraca produção de biofilme. Além de 96% dos isolados possuírem o gene *siet*, que é um importante fator de virulência, que associado à formação de biofilme, pode estar auxiliando na disseminação e persistência do *S. pseudintermedius*.

Segundo estudo realizado por Singh *et al.* (2013), 96% dos *S. pseudintermedius* isolados foram classificados como moderados e fortes produtores de biofilme. Sendo que não houve diferença significativa entre a formação de biofilme entre MRSP e MSSP testados (SINGH *et al.*, 2015; DIRIBE *et al.*, 2015; HAN *et al.*, 2015; STEFANETTI *et al.*, 2017).

Ainda, cerca de 93% dos isolados pertenciam a dois grupos, um denominado de dt9a (48%) e outro denominado de dt11a (45%) – sequência tipo 71 e 68, respectivamente. Não houve diferença significativa quanto à formação de biofilme desses dois grupos. E a produção de biofilme não foi significativamente diferente entre *S. pseudintermedius* isolados de cães carreadores e animais com afecções clínicas (SINGH *et al.*, 2013; GARBACZ *et al.*, 2013).

Um dado relevante observado por Garbacz *et al.* (2013), é que todas as cepas isoladas de cães com conjuntivite produziram significativamente mais biofilme quando comparadas a outras manifestações clínicas. De acordo com Prado *et al.* (2005) e Vargas *et al.* (2009) o Grupo *Staphylococcus intermedius* compõem as espécies do gênero *Staphylococcus* mais frequentemente isoladas da conjuntiva de cães clinicamente saudáveis e cães que possuem o quadro de ceratite ulcerativa. Podendo, portanto, a capacidade de formação de biofilme estar intimamente relacionada ao carreamento do *S. pseudintermedius* na conjuntiva, bem como o aparecimento de determinadas afecções oculares.

Apesar da emergência recente e do aumento da ocorrência do MRSP ST71 na Europa, em estudo realizado por Diribe *et al.* (2015) demonstrou, que além da resistência a muitos antimicrobianos, não foi observado diferença significativa quando comparada a formação de biofilme, suscetibilidade a biocidas e carreamento de fatores de virulência. Sugerindo que fatores determinantes que promovem o desenvolvimento de SSI não estão restritos a apenas um clone, mas a toda a espécie *S. pseudintermedius*.

Já, em estudo realizado por Osland *et al.* (2012), as cepas de MRSP pertencentes ao ST71 produziram quantidades maiores de biofilme e demonstraram diferença estatística significativa quanto a habilidade em formar biofilme quando comparado a outros isolados de MRSP. Enquanto isolados pertencentes a ST106 demonstraram uma produção de biofilme moderada comparada com os demais MRSP isolados no estudo.

Guadarrama *et al.* (2017) realizaram um estudo comparando três diferentes espécies de *Staphylococcus* Coagulase Positiva (CoPS): *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. pseudintermedius*. As amostras foram obtidas a partir de coletas realizadas no Hospital Veterinário Escola, localizado na Cidade do México. Segundo dados coletados, as cepas de *S. pseudintermedius* foram as únicas resistentes à meticilina – enquanto a maioria dos isolados eram resistentes a múltiplos grupos antimicrobianos, e tinham capacidade significativamente maior de formar biofilme.

Os *S. pseudintermedius* isolados foram agrupados, segundo metodologia Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PGFE), em sete padrões diferentes, sem mostrar dispersão clonal entre animais ou isolados ambientais. Este estudo sugere que tanto animais, quanto o ar são fontes ambientais potenciais do *S. pseudintermedius* multirresistente, que sobrevive em diferentes ambientes através da formação de biofilme e resistência a múltiplos fármacos. Características que podem ser transmitidas horizontalmente para outras bactérias e exacerbar o problema da resistência à antibióticos em humanos (GUADARRAMA *et al.*, 2017).

Através da comparação realizada por Guadarrama *et al.* (2017), as linhagens de *S. pseudintermedius* formaram maior quantidade de biofilme e apresentaram diferença estatística significativa nas habilidades de formação de biofilme em comparação com as demais CoPS (*S. intermedius* e *S. aureus*). E não houve diferença estatística significativa quanto à capacidade de formação de biofilme entre os isolados de *S. intermedius* e *S. aureus*.

Uma das grandes preocupações do método atualmente empregado para a avaliação da produção de biofilme é a padronização do inóculo inicial. Em análise comparativa da produção de biofilme a partir de três inóculos iniciais diferentes: 10^5 , 10^6 e 10^7 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/ml), a máxima produção de biofilme foi observada em inóculo inicial de 10^7 , no entanto não foi possível observar diferença estatística significativa na produção de biofilme entre os três inóculos iniciais (POMPILIO *et al.*, 2015).

Crawford *et al.* (2016) realizaram um estudo importante comparando a expressão de inúmeros genes por duas cepas de *S. pseudintermedius* resistentes à meticilina, A42 (ST68) e A54 (ST71), em diferentes materiais. Quanto aos genes envolvidos na produção de matriz extracelular (*icaA*, *icaC*, e *icaD*), em ambas as cepas bacterianas, a expressão de genes responsáveis pela produção de matriz extracelular foi aumentada em biofilmes produzidos em superfície de vidro e acrílico.

Quanto aos genes de moléculas específicas de adesão (*spsE*, *ebpS* e *atl*), embora houvesse diferenças significativas na expressão de moléculas de adesão específicas entre superfícies, não houve diferenças consistentes identificadas na expressão de todos os três Componentes da Superfície Microbiana que Reconhecem Moléculas Adesivas da Matriz (MSCRAMM) entre superfícies para as duas estirpes bacterianas (CRAWFORD *et al.*, 2016).

Quanto aos genes envolvidos no *quorum sensing* (*agrA* e *agrB*), a expressão dos genes foram significativamente diferente entre as fases de crescimento (CRAWFORD *et al.*, 2016).

A partir dos dados coletados por Crawford *et al.* (2016) foi possível concluir que existem diferenças significativas entre quase todas as superfícies testadas sendo necessário estudos futuros para o esclarecimento dos mecanismos que estão envolvidos na expressão desses diferentes genes no *S. pseudintermedius*.

Em estudo realizado por Proietti *et al.* (2015) comparando três diferentes métodos para avaliação da formação de biofilme por *S. pseudintermedius*, verificou-se que 93,3% dos isolados produziam biofilme através dos métodos de aderência em tubo (MAT) e da placa de microtitulação (MTP) e 86,6% dos isolados foram considerados produtores de biofilme através do método de cultivo em ágar vermelho congo (CRA).

A concordância entre o teste de aderência em tubo e o método da placa de microtitulação e entre o teste do ágar vermelho congo e o teste de aderência em tubo com dados categóricos foi razoável, enquanto moderada entre o CRA e o MTP. (PROIETTI *et al.*, 2015).

Em um trabalho semelhante ao desenvolvido por Proietti *et al.* (2015), Lopes (2016) comparou a formação de biofilme de *S. pseudintermedius* através de três métodos: método da placa de microtitulação, cultivo em ágar vermelho congo e cultivo em caldo vermelho congo (CRB) (Figura 2). A partir do experimento foi possível observar que no MTP, em acordo com o esquema de classificação proposto por Stepanovic *et al.* (2007), 95,45% dos isolados foram classificados como fortes produtores de biofilme, 3,03% como intermediários e 1,52% como fracos produtores. Utilizando o método de formação de biofilme em placa de microtitulação, todos os isolados foram classificados como produtores de biofilme. Através do método CRA, 78,79% dos isolados foram classificados como produtores de biofilme e 21,2% como não produtores. E usando o método do CRB, 93,94% dos isolados foram classificados como produtores e 6,06% como não produtores (LOPES, 2016). Finalmente, houve concordância entre os métodos CRA e CRB, baixa concordância entre os métodos MTP e CRA, e entre MTP e CRB concordância moderada (LOPES, 2016).

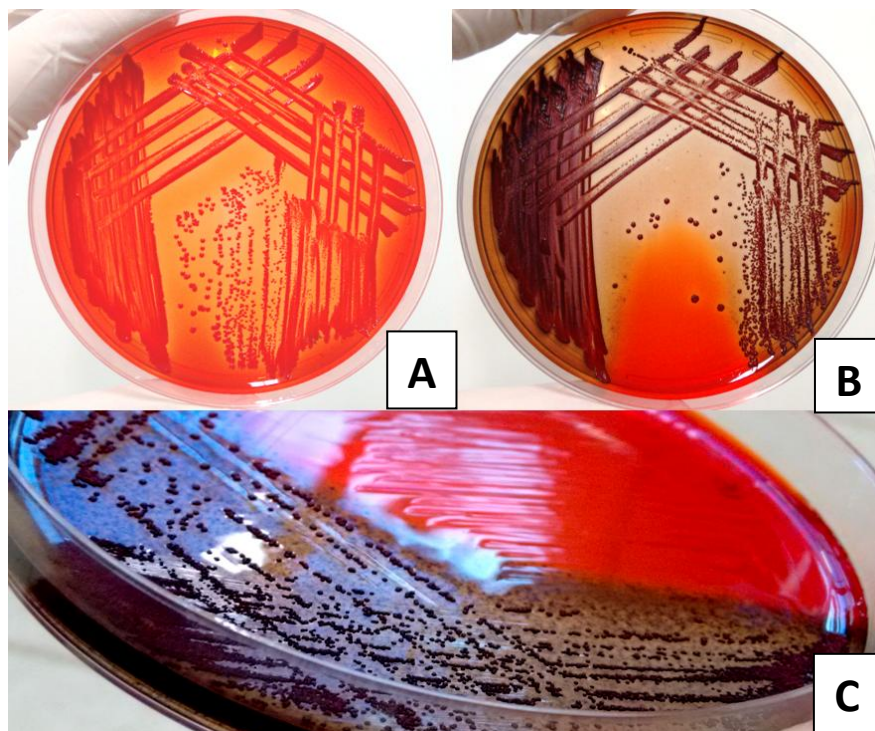


Figura 2. *Staphylococcus pseudintermedius* em ágar vermelho congo. A: isolado de *S. pseudintermedius* não produtora de biofilme. B: isolado de *S. pseudintermedius* produtora de

biofilme. C: detalhe de amostra de *S. pseudintermedius* produtora de biofilme. Adaptado de LOPES (2016).

2.6.a. Avaliação de imagens obtidas de biofilmes formados por *Staphylococcus pseudintermedius*

Através da visualização por microscopia eletrônica de varredura (MEV), é possível observar que o *S. pseudintermedius* é capaz de formar estruturas de biofilme a partir de quatro horas de incubação. Foi possível observar células aderidas à superfície de aço inoxidável de parafusos ósseos, bem como a visualização de quantidades variáveis de substância polimérica extracelular (Figura 3) (DICICCO *et al.*, 2012).

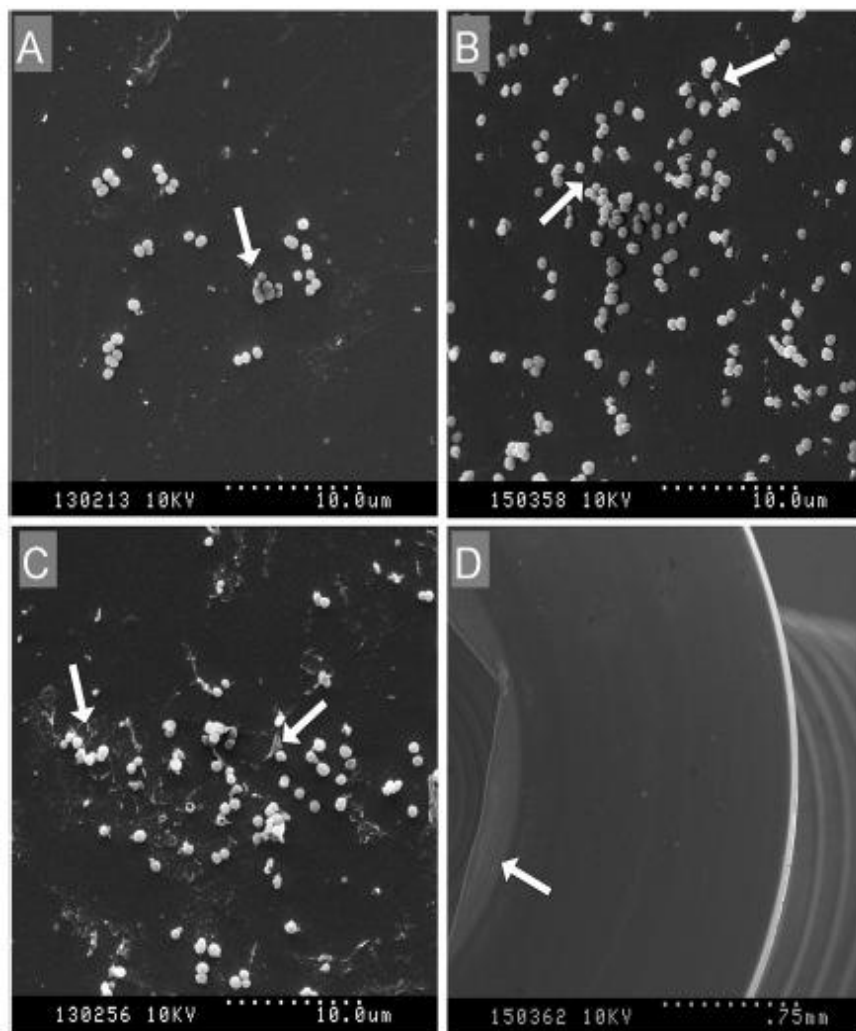


Figura 3. Imagens obtidas a partir de microscopia eletrônica de varredura de biofilme formado por *Staphylococcus pseudintermedius* em parafusos ortopédicos tratados com claritromicina.

A: produção de biofilme após quatro horas de incubação. B: aumento de EPS e mudanças morfológicas do biofilme após incubação de 12 horas. C: formação de biofilme após 24 horas. D: crescimento do biofilme concentrado em específicas áreas do parafuso. Adaptado de DICICCO *et al.* (2012).

Em estudo realizado por Pompilio *et al.* (2015), avaliou-se a produção de biofilme sob condições dinâmicas e estáticas através da visualização com microscopia eletrônica de varredura (MEV). Sob incubação estática, *S. pseudintermedius* é capaz de formar um biofilme denso com arquitetura *cogumelo-like* (semelhante a um cogumelo) consistindo de agregados e microcolônias que cobrem quase completamente a superfície de poliestireno (Figura 4). O biofilme formado na câmara da célula de fluxo, sob condições dinâmicas, mostrou-se significativamente mais complexo, em termos de espessura e celularidade, comparado ao biofilme formado sob incubação estática (espessura média, 25,4 e 14,2 μm , respectivamente) (POMPILIO *et al.*, 2015).

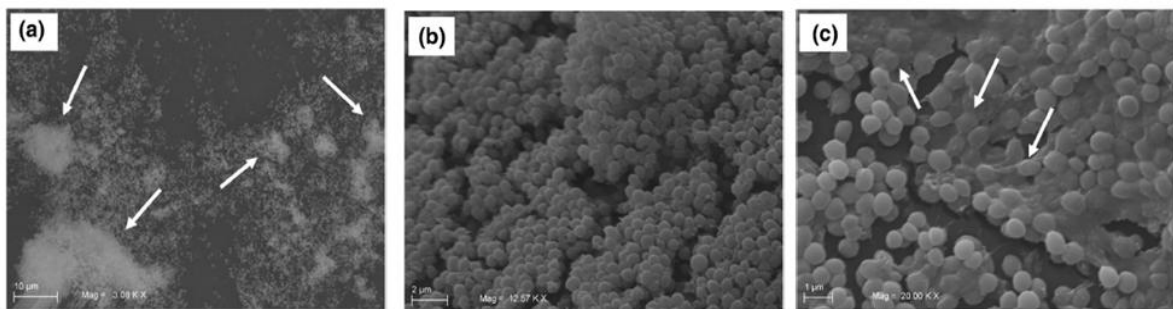


Figura 4. Imagens obtidas a partir de microscopia eletrônica de varredura de biofilmes formados por *Staphylococcus pseudintermedius* em superfície de poliestireno após 72 horas de incubação. A: o biofilme exibe uma organização espacial heterogênea, com estruturas *cogumelo-like* indicadas pelas setas. B: células bacterianas e presença de EPS (aumento de 12.500x). C: células bacterianas e presença de EPS (aumento de 20.000x). Adaptado de POMPILIO *et al.* (2015).

Uma análise de MEV foi realizada para monitorar a cinética de formação do biofilme durante 72 h de incubação e para analisar as características morfológicas do biofilme (POMPILIO *et al.*, 2015). Os autores observaram após apenas 30 minutos, cocos individuais aderindo aleatoriamente ao poliestireno (fase de adesão). Após 4 h, o biofilme inicial apareceu como microcolônias, consistindo principalmente de células agrupadas sem qualquer evidência de EPS. Durante a fase de maturação (8 a 72 h), as microcolônias aumentaram

dimensionalmente, cobrindo a maior parte da superfície. Em particular, a adição de azul de alciano à solução fixadora revelou uma produção significativa de EPS após 48 h, aparecendo como uma extensa rede de filamentos. O EPS, então, cobriu a maior parte da superfície, cercou as células do biofilme e conectou-as ao substrato (Figura 5) (POMPILIO *et al.*, 2015).

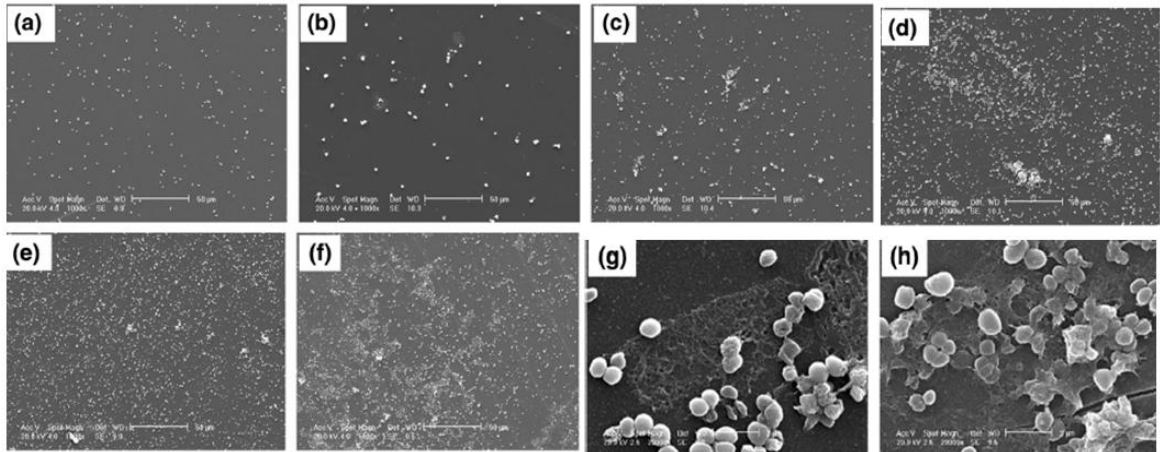


Figura 5. Imagens obtidas a partir de microscopia eletrônica de varredura de biofilmes formados por *Staphylococcus pseudintermedius* em superfície de poliestireno após 72 horas de incubação. A-F: representam imagens da formação de biofilme em 1, 4, 8, 24, 48 e 72 horas de incubação (aumento de 1.000 vezes). G: aumento de 20.000 vezes do biofilme formado em 48 horas. H: aumento de 20.000 vezes do biofilme formado em 72 horas. Adaptado de POMPILIO *et al.* (2015).

Conforme pode ser observado na Figura 6, através de imagens geradas por microscopia eletrônica de transmissão, as bactérias mostram típica forma esférica, mais alongada bilateralmente no estágio de divisão. O citoplasma é finamente granular e moderadamente denso quando comparado com a membrana celular. Biofilme foi demonstrado com contraste, variável (fraco, moderado e forte) e estendendo ramos fibrilares em todas as amostras. As estruturas semelhantes a fibras ramificadas são cercados por um material amorfo moderadamente denso. A rede de biofilme parece surgir da superfície bacteriana, aderindo parcialmente a parede e ligando bactérias contíguas e em parte destacando. A coloração PATCH revela a natureza polissacarídica do biofilme que, assemelha-se a uma matriz pequena organizada linearmente e como manchas altamente densas que se encontram ao longo da rede fibrilar (STEFANETTI *et al.*, 2017).

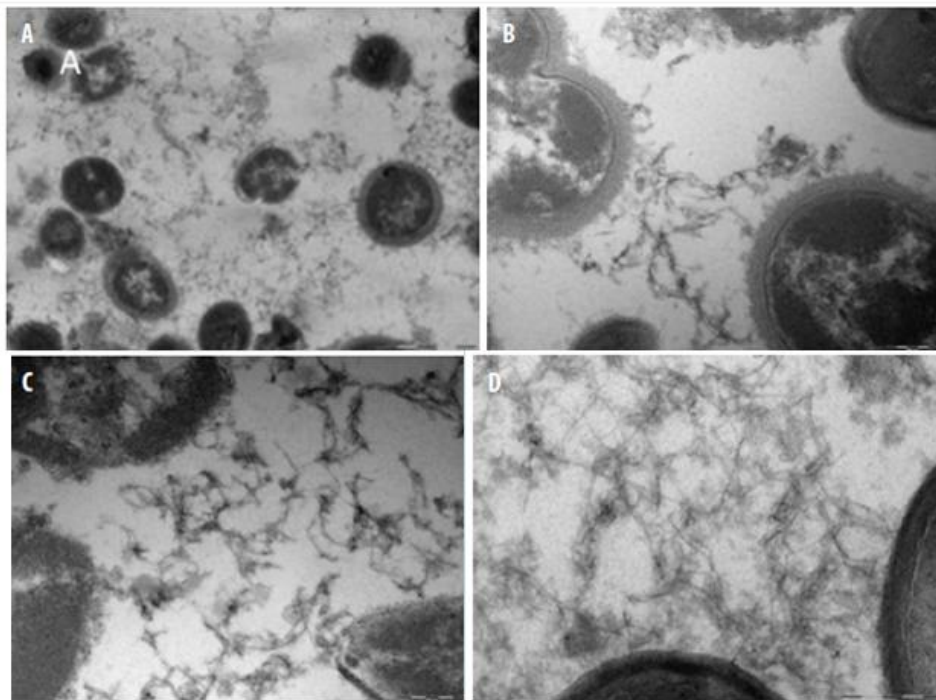


Figura 6. Imagens obtidas a partir de microscopia eletrônica de transmissão de biofilmes formados por *Staphylococcus pseudintermedius*. A: distribuição espacial da estrutura do biofilme. B: isolado considerado fraco produtor de biofilme. C: isolado considerado moderado produtor de biofilme. D: isolado considerado forte produtor de biofilme. Adaptado de STEFANETTI *et al.* (2017).

2.7. Suscetibilidade do biofilme formado por *Staphylococcus pseudintermedius*

Devido à dificuldade atribuída ao tratamento de infecções associadas a biofilmes produzidos por *S. pseudintermedius* – MRSP ou MSSP –, cada vez mais, atualmente, procuram-se alternativas eficazes para o tratamento dessas afecções.

Em estudo realizado para a observação da suscetibilidade de isolados de *S. pseudintermedius* e efeitos na formação de biofilme através da utilização de óleo de manuka, todos os isolados foram sensíveis ao óleo, demonstrando inibição da formação de biofilme, sem diferença entre os grupos de MRSP e MSSP (SONG *et al.*, 2013).

Buscando alternativas para o tratamento de doenças associadas a biofilmes, Turk *et al.* (2013) utilizaram a Dispersina B, uma enzima produzida pela espécie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, para a inibição da produção de biofilme de *S. pseudintermedius*. A enzima Dispersina B demonstrou atividade de degradação da matriz extracelular no biofilme de uma variedade de bactérias, incluindo *S. aureus* e *S. epidermidis*. A partir do estudo

realizado por Turk *et al.* (2013) foi possível observar a influência da enzima Dispersina B sobre a redução da formação de biofilme e sobre a diminuição da estabilidade do biofilme formado. Os resultados sugerem que a utilização da Dispersina B no tratamento adjuvante de biofilmes causados por cepas MRSP podem ser uma alternativa para o futuro. Apesar da enzima Dispersina B não apresentar efeitos diretos quanto ao crescimento das cepas MRSP, ela age na diminuição da formação de biofilme e degradação do biofilme estável (TURK *et al.*, 2013). Interessantemente, quando comparado o crescimento das cepas MRSP com e sem Dispersina B, não se observou diferença significativa. Porém, quando comparada a formação de biofilme entre as cepas que foram submetidas ao tratamento com Dispersina B e as cepas do grupo controle, observou-se diferença entre os dois grupos, sendo que, foi possível observar a erradicação da formação de biofilme em algumas linhagens (TURK *et al.*, 2013).

Em estudo realizado por DiCicco *et al.* (2014), verificou-se a eficácia do sinergismo entre fosfomicina e claritromicina sobre a diminuição da produção de biofilme de MRSP. Foi possível observar uma maior diminuição na formação de biofilme quando utilizada a ação sinérgica entre fosfomicina e claritromicina. Através da observação por microscopia eletrônica de varredura foi possível verificar a ação da fosfomicina na diminuição da formação de biofilme em próteses ortopédicas. Além disso, foi proposto que a atividade bacteriostática da claritromicina é acentuada quando a fosfomicina está presente, pois pode permitir uma melhor penetração na matriz do biofilme, permitindo o acesso da fosfomicina a bactérias sésseis perto da superfície de adesão (DICICCO *et al.*, 2014). A eficácia da fosfomicina, utilizada individualmente no tratamento de biofilmes formados em próteses de titânio, foi verificada sendo possível observar uma diminuição da aderência e da estrutura do biofilme formado (DICICCO *et al.*, 2014). Além da diminuição na formação de biofilme, foi possível observar diferenças quanto à estrutura das células bacterianas, com algumas células lizadas após o tratamento. As células que sofreram tratamento possuíam diâmetro de 97 nanômetros e as células do tratamento controle apresentaram diâmetro de um micrômetro (DICICCO *et al.*, 2014).

Em outro estudo, verificou-se a eficácia do uso da claritromicina na diminuição da formação de biofilme por cepas MRSP (DICICCO *et al.*, 2012). Nesse estudo, foi possível constatar que não houve impacto quanto à formação de biofilme em cepas que foram submetidas ao tratamento com claritromicina.

Em estudo realizado por Walker *et al.* (2016) comparando a suscetibilidade de biofilmes formados por *S. pseudintermedius* e células planctônicas frente a diferentes antimicrobianos, constatou-se diferença significativa na MIC de todos os antibióticos testados

(amicacina, cefazolina, enrofloxacina e gentamicina). Surpreendentemente, foi observada uma diferença maior que 667 vezes na MIC entre isolados associados a biofilme e células planctônicas tratadas com amicacina; maior que 4.000 vezes a diferença na MIC para isolados tratados com cefazolina; maior que 2.000 vezes a diferença na MIC para isolados tratados com enrofloxacina; e maior que 1.000 vezes na MIC para isolados tratados com gentamicina. Além do mais, para todos os antimicrobianos, houve diferenças significativas na MIC planctônica da MRSP e MSSP, mas não houve diferenças entre a MIC associada ao biofilme para a MRSP e MSSP.

Pompilio *et al.* (2015) desenvolveram um trabalho avaliando uma cepa de *S. pseudintermedius* oriunda de um paciente com uma ferida crônica e portador da Doença do Enxerto contra Hospedeiro (GVHD). A partir da avaliação da atividade antimicrobiana sobre o biofilme pré-formado, testados em concentrações iguais ou múltiplas de MIC em biofilmes maduros, foi possível observar os seguintes resultados: a rifampicina é o antibiótico mais ativo contra biofilmes pré-formados com erradicação mínima de 50% do biofilme (MBEC50) 1xMIC e erradicação mínima de 90% do biofilme (MBEC90) 2xMIC. Em particular, a vancomicina mostrou MBEC50 e MBEC90 de 8x e 16xMIC, respectivamente, seguido de cefoxitina (MBEC50 e MBEC90: 1x e 64xMIC, respectivamente). Cloranfenicol (MBEC50 e MBEC90: 4x e 128xMIC, respectivamente), linezolida, tetraciclina e tigeciclina (MBEC50 e MBEC90: 1x e maior que 128xMIC, respectivamente) mostraram atividade semelhante. A gentamicina foi a menos ativa entre os antibióticos testados (MBEC50 e MBEC90: 64xMIC), estimulando até mesmo a produção de quantidades significativamente maiores de biofilme em 1x e 2xMIC, em comparação aos controles. Todos os antibióticos exibiram um efeito dependente da dose, exceto para linezolida, rifampicina e tigeciclina. É importante ressaltar que nenhum dos antibióticos estudados foi capaz de erradicar os biofilmes maduros nas concentrações testadas. Considerando as concentrações correspondentes aos valores de MBEC90, confirmou-se que a rifampicina é o antibiótico mais ativo, seguido pela vancomicina e gentamicina, enquanto o cloranfenicol foi o menos eficaz.

A produção de biofilme é influenciada por diversos fatores como temperatura, concentração de fontes de carbono e pH. Em trabalho realizado por Pompilio *et al.* (2015), avaliou-se a influência da atividade de soro e pH na formação de biofilme por *S. pseudintermedius*. Na ausência de soro, a formação de biofilme em pH 7,1 foi significativamente maior do que a obtida em pH 5,5 ou 8,7. Na presença de soro, a capacidade de formar biofilme foi significativamente afetada, independente do valor de pH (POMPILIO *et al.*, 2015).

O pré-tratamento do poliestireno com soro reduziu significativamente a formação de biofilme em condições ácidas, mas apenas na presença de soro 1:2 e 1:10 e pH neutro. Com pH 8,7, o pré-tratamento com soro não reduziu a formação de biofilme. O efeito antibiofilmes e mostrou dependente apenas dos níveis de concentração no caso do soro livre, independentemente do valor de pH considerado (POMPILIO *et al.*, 2015).

Em um estudo desenvolvido por Lopes (2017), avaliou-se a formação de biofilme por *S. pseudintermedius* em duas condições de pH: neutra (pH 7,2) e básica (pH 8), onde 79% dos isolados apresentaram maior formação de biofilme em pH básico.

Além de testarem o efeito de antimicrobianos em biofilme pré-formado, Pompilio *et al.* (2015) testaram os efeitos de concentrações subinibitórias de antibióticos na formação de biofilme. Os efeitos dos antibióticos testados em concentrações subinibitórias (1/2x, 1/4x e 1/8x MIC), de maneira geral, causaram uma redução significativa na formação de biofilme de maneira dependente.

Recentes estudos vêm demonstrando que a eficácia do tratamento com clorexidine tópico pode ser semelhante ou melhor no tratamento de piodermatites causadas por *Staphylococcus* (BORIO *et al.*, 2015; FERRAN *et al.*, 2016). Ferran *et al.* (2016) demonstraram em um trabalho comparando a atividade de seis compostos antimicrobianos (amoxicilina, cefalexina, clindamicina, doxiciclina, marbofloxacina e clorexidine) sobre a produção de biofilme de um cepa de *S. aureus* e um exemplar de *S. pseudintermedius*. A partir dos resultados obtidos foi possível observar que a contagem de UFC do biofilme diminuíram frente aos antibióticos testados, mas o clorexidine foi o agente mais eficaz para a diminuição da produção de biofilme do *S. pseudintermedius*.

Em um trabalho realizado por Morrison *et al.* (2015), avaliou-se a formação de biofilme por *S. pseudintermedius* em esferas de polimetilmetacrilato (PMMA, acrílico) impregnadas com prata e gentamicina, empregando microscopia eletrônica de varredura para confirmação. As correntes formadas por esferas de acrílico são utilizadas em cirurgias como artroplastia total de articulação, fixação de fraturas de coluna e em outras cirurgias ortopédicas e neurológicas como método profilático bem como, pode ser utilizado como método de tratamento local de SSI. A partir dos resultados obtidos no trabalho, nenhum dos aditivos de PMMA inibiu completamente a formação de biofilme de MRSP, porém, quando todos os isolados foram agrupados, independentemente da suscetibilidade à gentamicina, houve um efeito significativo do tratamento que utilizou apenas gentamicina e do tratamento que utilizou gentamicina associada à prata, comparado aos controles (MORRISON *et al.*, 2015).

Em trabalho realizado por Morrison *et al.* (2016), comparando a formação de biofilme em diferentes tipos de fios de sutura foi possível observar que houve significativamente menos adesão de MSRP ao monofilamento de polidioxanona revestido com triclosan do que a poliglecaprone 25, poliglactina 910, monofilamento de polidioxanona farpado e polidioxanona monofilamentar. Também, houve significativamente menos aderência do MSRP ao poliglecaprone do que à poliglactina 910.

A sutura farpada apresentou um perfil de adesão bacteriana comparável ao da sutura monofilamentar. A adesão do MRSP foi maior para poliglactina trançada 910. O uso de polidioxanona monofilamentar revestido com triclosan pode ser considerado para pacientes com alto risco de desenvolver infecções de sítio cirúrgico. A avaliação das imagens da microscopia eletrônica revela a presença de bactérias aderentes em todos os tipos de sutura, exceto no monofilamento de polidioxanona revestido de triclosan.

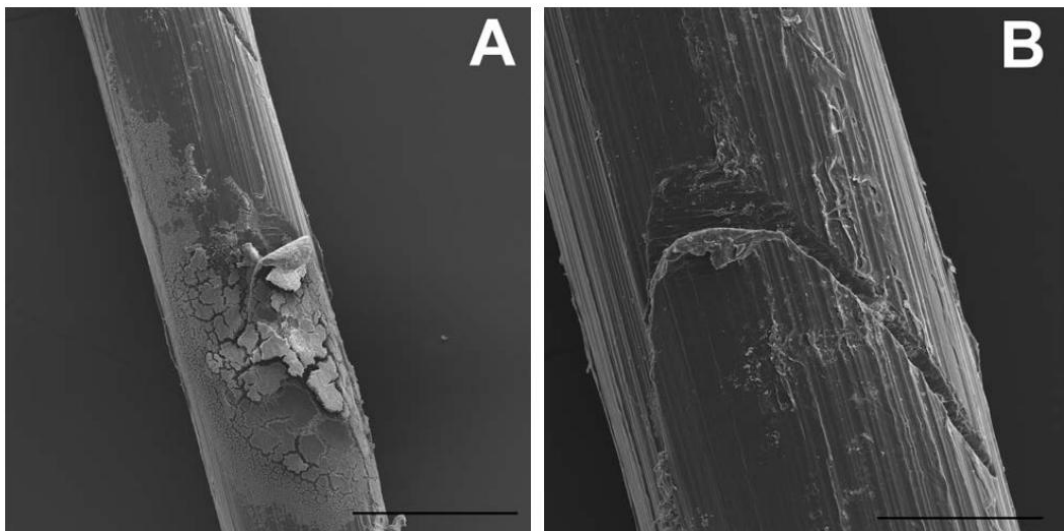


Figura 7. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura da formação de biofilme por *Staphylococcus pseudintermedius* sobre a superfície do monofilamento de polidioxanona barbado. A: antes de o monofilamento ser submetido ao processo de sonicação. B: após o monofilamento ser submetido ao processo de sonicação. Adaptado de MORRISON *et al.* (2016).

3. CONCLUSÃO

A produção de biofilme por *S. pseudintermedius* pode desempenhar um papel importante na fisiopatologia da doença e potencial colonização, e pode ter sido um fator contribuinte para o rápido surgimento mundial da MRSP.

Com a observação do surgimento de cepas multirresistentes de *S. pseudintermedius* e sua potencial capacidade de formação de biofilme, houve um aumento da preocupação em se desenvolver medidas alternativas para tratamento e prevenção da formação de biofilme. Apesar de *Staphylococcus* ser um agente largamente distribuído em todas as espécies de mamíferos é possível, através de práticas corretas de utilização de antimicrobianos, evitar demasiada pressão de seleção nesses micro-organismos.

A partir dos estudos apresentados foi possível observar que não há diferença na produção de biofilme de cepas MRSP e cepas MSSP. Sendo necessários estudos futuros para a elucidação da associação da produção de biofilme com diversas doenças e a grande distribuição de determinados clones de *S. pseudintermedius*.

Atualmente, não estão disponíveis métodos alternativos para a avaliação da produção de biofilme que se assemelhem as condições *in vivo*. Esse fator representa um grande empecilho no momento da identificação do potencial patogênico do *S. pseudintermedius*. Hoje, sabe-se que a maioria dos isolados de *S. pseudintermedius* apresenta uma grande capacidade de produção de biofilme, *in vitro*, até mesmo cepas oriundas de animais saudáveis. Levando em conta que há distintos padrões de expressão gênica em biofilmes formados em diferentes superfícies, a utilização de estruturas que diminuam o potencial de desenvolvimento de biofilme pode ser uma alternativa de prevenção.

Finalmente, apesar de pouco elucidados os mecanismos de *quorum sensing* associados às diversas espécies bacterianas produtoras de biofilme, a interrupção destes mecanismos pode ser uma potencial ferramenta para o tratamento de doenças associadas a biofilme.

4. REFERÊNCIAS

Bannoehr J e Guardabassi L. ***Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity.** Veterinary Dermatology, v. 23, p. 253–e52, 2012.

Bardiau M, Yamazaki K, Ote I, Misawa N, Mainil JG. **Characterization of methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs and cats.** Microbiology and Immunology, v. 57, p. 496-501, 2013.

Borio S, Colombo S, La Rosa G, De Lucia M, Damborg P, Guardabassi, L. **Effectiveness of a combined (4% chlorhexidinedigluconate shampoo and solution) protocol in MRS and non-MRS canine superficial pyoderma: a randomized, blinded, antibiotic-controlled study.** Veterinary Dermatology, v. 23, p. 339-344, 2012.

Chuang CY, Yang YL, Hsueh PR, Lee PI. **Catheter-related bacteremia caused by *Staphylococcus pseudintermedius* refractory to antibiotic-lock therapy in a hemophilic child with dog exposure.** Journal of Clinical Microbiology, p. 1497–1498, 2010.

Costerton JW. **The Biofilm Primer.** Springer. Verlag Berlin Heidelberg, 2007.

Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Götz F. **The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation.** Infection and Immunity, p. 5427-5433, 1999.

Crawford EC, Singh A, Gibson TWG, Weese S. **Biofilm-associated gene expression in *Staphylococcus pseudintermedius* on a variety of implant materials.** Veterinary Surgery, v. 46, p. 499-506, 2016.

Crawford, EC, Singh A, Metcalf D, Gibson TWG, Weese SJ. **Identification of appropriate reference genes for qPCR studies in *Staphylococcus pseudintermedius* and preliminary assessment of *icaA* gene expression in biofilm-embedded bacteria.** BioMed Central Research Notes, v. 7, p. 451, 2007.

Devriese LA, De Pelsmaecker K. **The anal region as a main carrier site of *Staphylococcus intermedius* and *Streptococcus canis* in dogs.** Veterinary Record, v. 121, p. 302-303, 1987.

Devriese LA, Hermans K, Baele M, Haesebrouck F. ***Staphylococcus pseudintermedius* versus *Staphylococcus intermedius*.** Veterinary Microbiology, v. 133, p. 206–207, 2009.

Devriese LA, Vancanneyt M, Baele M, Vaneechoutte M, De Graef E, Snauwaert C, Cleenwerck I, Dawyndt P, Swings J, Decostere A, Haesebrouck F. ***Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals.** International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 55, p. 1569-1573, 2005.

DiCicco M, Neethirajan S, Singh A, Weese JS: **Efficacy of clarithromycin on biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*.** BioMed Central Veterinary Research, v. 8, p. 225, 2012.

DiCiccoM, Neethirajan S, Weese JS, Singh A. ***In vitro* synergism of fosfomicina and clarithromycin antimicrobials against methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*.** BioMedCentral Microbiology, v. 14, p. 129, 2014.

Diribe O, Thomas S, AbuOun M, Fitzpatrick N, La Ragione R. **Genotypic relatedness and characterization of *Staphylococcus pseudintermedius* associated with post-operative surgical infections in dogs.** Journal of Medical Microbiology, v. 64, p. 1074–1081, 2015.

Fazakerley J, Nuttall T, Sales D, Schmidt V, Carter SD, Hart CA, McEwan NA. **Staphylococcal colonization of mucosal and lesional skin sites in atopic and healthy dogs.** Veterinary Dermatology, v. 20, p. 179-184, 2009.

Ferran AA, Liu JJ, Toutain PL, Bousquet-Melou A. **Comparison of the *in vitro* activity of five antimicrobial drugs against *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus aureus* biofilms.** Frontiers in Microbiology, v. 7, p. 1187, 2016.

Fuente-Nunez C, Reffuveille F, Fernandez L, Hancock REW. **Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies.** Current Opinion in Microbiology, v. 16, p. 1-10, 2013.

Garbacz, K., Żarnowska, S., Piechowicz, L., Haras, K. **Pathogenicity potential of *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from canine carriers and from dogs with infection signs.** Virulence, v. 4,p. 255-259, 2013.

Götz F. ***Staphylococcus* and biofilms.** Molecular Microbiology, v. 43, p. 1367-1378, 2002.

Grönthal T, Moodley A, Nykasenoja S, Junnila J, Guardabasi L, Thomson K, Rantala M. **Large outbreak caused by methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71 in a finnish veterinary teaching hospital – From outbreak control to outbreak prevention.** PLOS ONE, v. 9, p. 1-11, 2014.

Guadarrama NV, Cervantes ALO, Salinas E, Martínez L, Escorcía M, Oropeza R, Rosas I. **Presence of environmental coagulase-positive staphylococci, their clonal relationship, resistance factors and ability to form biofilm.** Revista Argentina de Microbiología, v. 49, p. 15-23, 2017.

Haenni M, Châtre P, Keck N, Franco A, Battisti A, Madec JY. **Hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a french veterinary hospital.** Journal of Global Antimicrobial Resistance, v. 1, p. 225-227, 2013.

Hajek V. ***Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals.** International Journal of Systematic Bacteriology, v. 26, p. 401-408, 1976.

Han JI, Yang CH, Park HM. **Emergence of biofilm-producing *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from healthy dogs in South Korea.** Veterinary Quarterly, v. 35, p. 207-210, 2015.

Lopes BC. **Avaliação da capacidade de formação de biofilme de isolados de *Staphylococcus pseudintermedius* provenientes de amostras clínicas de cães.** In: Salão de Iniciação Científica 28.: 2016set. 12-16: UFRGS, Porto Alegre, RS.

Lopes BC. **Avaliação da capacidade de formação de biofilme de isolados de *Staphylococcus pseudintermedius* de amostras clínicas de cães em diferentes condições de pH.** In: Salão de Iniciação Científica 29.: 2017 out. 16-20: UFRGS, Porto Alegre, RS.

Markey BK, Leonard FC, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. ***Staphylococcus* species**. In: Markey BK, Leonard FC, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. *Clinical Veterinary Microbiology*. Second Edition. Elsevier. Mosby, 2013. 915, 105-120.

Morrison S, Singh A, Rosseau J, Walker M, Nazarali A, Crawford E, Brisson B, Sears WC, Weese JS. **Impact of polymethylmethacrylate additives on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* biofilm in vitro**. *American Journal of Veterinary Research*, v. 76, p. 395-401, 2015.

Morrison S, Singh A, Rosseau J, Weese JS. **Adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* to suture materials commonly used in small animal surgery**. *American Journal of Veterinary Research*, v. 77, p. 194-198, 2016.

Osland AM, Vestby LK, Fanuelson H, Slettemeas JS, Sunde M. **Clonal diversity and biofilm-forming ability of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius***. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy Advance*, v. 67, p. 841-848, 2012.

Otto M. **Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity**. *Annual Review of Medicine*, v. 64, p. 175-188, 2013.

Perreten V, Kadlec K, Schwarz S. **Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicenter study**. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 65, p. 1145-1154, 2010.

Pompilio A, De Nicola S, Crocetta V, Guarnieri S, Savini V, Caretto E, Di Bonaventura G. **New insights in *Staphylococcus pseudintermedius* pathogenicity: antibiotic-resistant biofilm formation by a human wound-associated strain**. *BioMed Central Microbiology*, v. 15, p. 1-14, 2015.

Prado MR1, Rocha MF, Brito EH, Girão MD, Monteiro AJ, Teixeira MF, Sidrim JJ. **Survey of bacterial microorganisms in the conjunctival sac of clinically normal dogs and dogs with ulcerative keratitis in Fortaleza, Ceará, Brazil**. *Veterinary Ophthalmology*, v. 8, p. 33-37, 2005.

Proietti PC, Stefanetti V, Hyatt DR, Marenzoni ML, Capomaccio S, Coletti M, Bietta A, Franciosini MP, Passamonti F. **Phenotypic and genotypic characterization of canine pyoderma isolates of *Staphylococcus pseudintermedius* for biofilm formation.** Journal of Veterinary Medical Science, v. 77, p. 945-951, 2015.

Sasaki T, Kikuchi K, Tanaka Y, Takahashi N, Kamata S, Hiramatsu K. **Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains.** Journal Clinical Microbiology, v. 45, p. 2770-2778, 2007.

Singh A, Walker M, Rousseau J, Weese JS. **Characterization of the biofilm forming ability of *Staphylococcus pseudintermedius* from dogs.** BioMed Central Veterinary Research, v. 9, p. 1-6, 2013.

Song C, Nam E, Park S, Hwang C. ***In vitro* efficacy of the essential oil from *Leptospermum scoparium* (manuka) on antimicrobial susceptibility and biofilm formation in *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from dogs.** Veterinary Dermatology, v. 24, p. 404-e87, 2013.

Stefanetti V, Bietta A, Pascucci L, Marenzoni ML, Coletti M, Franciosini MP, Passamonti F, Proietti PC. **Investigation of the antibiotic resistance and biofilm formation of *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from canine pyoderma.** Veterinaria Italiana, v. 53, p. 289-296, 2017.

Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. **A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation.** Journal of Microbiological Methods, v. 40, p. 175-179, 2000.

Stewart OS, Costerton JW. **Antibiotic resistance of bacteria in biofilms.** Lancet, v. 358, p. 135-138, 2001.

Turk, R., Singh, A., Rousseau, J., Weese, S. ***In vitro* evaluation of Dispersin B on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* biofilm.** Veterinary Microbiology, v. 166, p. 576-579, 2013.

Varaldo PE, Kilpper-Balz R, Biavasco F, Satta G, Schleifer AH. ***Staphylococcus delphini* sp. nov., a coagulase-positive species isolated from dolphins.** International Journal Systematic Bacteriology, v. 38, p.436–439, 1988.

Varges R, Penna B, Martins G, Martins R, Lilenbaum W. **Antimicrobial susceptibility of *Staphylococci* isolated from naturally occurring canine external ocular disease.** Veterinary Ophthalmology, v. 12, p.216-220, 2009.

Walker M, Singh A, Nazarli A, Gibson TWG, Rosseau J, Weese JS. **Evaluation of the impact of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* biofilm formation on antimicrobial susceptibility.** Veterinary Surgery, p. 1-4, 2016.

Weese JS, van Duijkeren E. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine.** Veterinary Microbiology, v. 140, p.418–429, 2010.