

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Renato Geraldo da Silva Filho

**PRODUÇÃO DE BIOFILME EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE *S. epidermidis*: INFLUÊNCIA  
DE CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DE ANTISSEPTICOS (ETANOL E  
CLOREXIDINA) E ASSOCIAÇÃO COM POTENCIAIS MARCADORES DE VIRULÊNCIA**

Rio de Janeiro

2014

Renato Geraldo da Silva Filho

**PRODUÇÃO DE BIOFILME EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE *S. epidermidis*:  
INFLUÊNCIA DE CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DE ANTISSÉPTICOS  
(ETANOL E CLOREXIDINA) E ASSOCIAÇÃO COM POTENCIAIS MARCADORES  
DE VIRULÊNCIA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Vigilância Sanitária

Orientadoras: Maria Helena Simões Villas Bôas

Verônica Viana Vieira

Rio de Janeiro

2014

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Silva Filho, Renato Geraldo da

Produção de biofilme em amostras clínicas de *S. epidermidis*: influência de concentrações subinibitórias de antissépticos (etanol e clorexidina) e associação com potenciais marcadores de virulência. / Renato Geraldo da Silva Filho. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2014.

xv, 152 f. : il., tab.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária)– Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2014.

Orientadoras: Maria Helena Simões Villas Bôas e Verônica Viana Vieira

1. *Staphylococcus epidermidis*. 2. Biofilmes. 3. Operon. 4. Marcadores de biológicos. I. Título.

Renato Geraldo da Silva Filho

**PRODUÇÃO DE BIOFILME EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE *S. epidermidis*:  
INFLUÊNCIA DE CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DE ANTISSÉPTICOS  
(ETANOL E CLOREXIDINA) E ASSOCIAÇÃO COM POTENCIAIS MARCADORES  
DE VIRULÊNCIA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Vigilância Sanitária

Aprovado em 15 / 07 / 2014

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Fabio Coelho Amendoeira – presidente (FIOCRUZ)

---

Prof. Dr. Raphael Hirata Júnior (UERJ)

---

Prof. Dr. Ernesto Hofer (FIOCRUZ)

---

Profa. Dra. Maria Helena Simões Villas Bôas (FIOCRUZ) - Orientadora

---

Profa. Dra. Verônica Viana Vieira - (FIOCRUZ) - Orientadora

Ao meu pai (*in memoriam*) e minha querida mãe pela oportunidade que me deram.

A Joana e Carol que tornaram minha jornada por esta oportunidade tão prazerosa.

Aos amigos cuja ajuda foi imprescindível em todas as conquistas que tive.

## AGRADECIMENTOS

Ter a oportunidade de agradecer é a melhor etapa da realização de um trabalho. Muitos contribuíram e certamente os agradecimentos que faço não estão à altura da ajuda recebida:

- À minha orientadora Dra. Maria Helena Simões Villas Bôas, por me aceitar no programa de pós-graduação, pela serenidade, humildade e por sempre tentar ensinar, mesmo eu tendo “errado” tantas vezes;
- Aos membros da banca examinadora deste trabalho pelas contribuições ao longo deste trabalho;
- Aos Professores do programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do INCQS pela contribuição na minha formação;
- Ao Prof. Agostinho, amigo e mestre, pela inestimável contribuição, ajuda incondicional e estímulo constante nesta jornada, sempre com apoio da “*Revisora Chefe*” (Alice, muito obrigado!);
- A Profa. Carmen, pela amizade e contribuições neste trabalho, mas sobretudo, por estar sempre do nosso lado, nos ensinando e mostrando como sermos pessoas e profissionais melhores;
- A Profa. Cleonice Bento (mais que uma irmã), por ter criado as condições para que esta, e muitas outras, oportunidades se concretizassem;
- A Dra. Maria José, minha amiga desde os meus primeiros passos na graduação e grande mentora na microbiologia;
- Ao Prof. Eduardo Nogueira, por ter viabilizado os experimentos de biologia molecular, e o mais importante por sua paciência e dedicação em ensinar;

- A Dra. Rosa Presman (*in memoriam*) pelo exemplo e por ter criado um grupo indissolúvel nos seus compromissos e objetivos profissionais;
- Ao amigo Leonardo Paiva pela disposição de sempre contribuir e estímulo constante da busca de soluções;
- A Prof. Rosa Haido pelo apoio e contribuições ao longo desta realização;
- Aos colegas de Departamento Marco Aurélio, Landi Costilha, Vera Bittencour, Cláudia Lessa, Jairo Barreira, Marcello Xavier, Maria do Carmo, Valéria Magalhães, Ana Patricia e Patricia Ocampo pelo apoio;
- Aos professores do Instituto Biomédico pelo incentivo;
- A Isabel Souza, por todo comprometimento, disciplina e capacidade de vencer desafios que a tornam uma estagiária tão especial;
- Aos “estagiários” Glauco, Carol, Alice, Bruna, Thaíssa, Nathalie e Luisa por estarem sempre dispostos a ajudar e, muitas vezes, a nos ensinar;
- A Lurdes, por sua dedicação em zelar pelo nosso bem-estar, e ao Herval pela amizade e ajuda nas tarefas do dia-a-dia;
- Aos amigos da Baktron, Fernanda, Jaqueline e Rosemary, por todo apoio, ajuda e incentivo;
- Aos amigos Marcio e Vinícius Biasoli da Controllab, por se manterem sempre presentes, mesmo diante da minha ausência continuada;
- Aos meus familiares: Helena por sua dedicação, Ricardo e Gabryela por terem suprido minha ausência na família, Rosane pelo estímulo, Cynthia e Patrícia por nos deixarem orgulhosos com suas realizações e ao Rubens pela constante alegria.

## RESUMO

*S. epidermidis* é o principal agente de infecções associadas a dispositivos médicos implantados, sendo sua habilidade para formar biofilme em superfícies inertes o fator determinante para a persistência desse micro-organismo. Neste estudo avaliamos 52 isolados clínicos desta espécie quanto à susceptibilidade a antimicrobianos, produção de biofilme/natureza química, presença de genes relacionados à virulência (*atlE*, *capB*, *aap*, *embp*, *bhp*, IS256 e IS257), e o efeito de concentrações subinibitórias (sub-CIMs) de etanol e clorexidina na produção de biofilme. Além disso, algumas das amostras biofilme-positivas foram estudadas quanto ao efeito de sub-CIMs destes antissépticos na expressão de *icaA*, *icaR*, *sigB* e *sarA*. Mais de 60% das amostras apresentaram resistência para  $\geq 10$  drogas e as amostras produtoras de biofilme mostraram, no geral, maior percentual de resistência a antimicrobianos. No teste em placa de microtitulação (MTP), 23 amostras foram produtoras de biofilme, sendo 14 de natureza polissacarídica, 8 proteica e 3 indeterminada. No teste em Ágar Vermelho Congo, somente amostras produtoras de biofilme polissacarídico apresentaram reação positiva. Genes do operon *ica* foram detectados em 23 isolados, sendo 17 destes classificados como produtores e 6 como não produtores de biofilme no MTP. A frequência dos outros genes relacionados à produção de biofilme foi: *embp* (69%), *aap* (29%) e *bhp* (12%), não sendo detectada correlação entre estes e a produção de biofilme do tipo PIA-independente. Os genes *aap* (29%) e IS256 (23%) mostraram correlações significativas com: produção de biofilme, presença de *ica*, perfil biofilme+/*ica*+, e produção de nível forte de biofilme. O gene IS256 foi ainda correlacionado significativamente com resistência a alguns antimicrobianos. Sub-CIMs de etanol (2 e/ou 4%) determinaram aumento na produção de biofilme em 15 das 17 amostras PIA-dependentes e nas 8 PIA-independentes, mas não induziram produção de biofilme em amostras originalmente não produtoras. Ao contrário do etanol, sub-CIMs de clorexidina não somente não induziram produção, como determinaram redução da produção de biofilme nas amostras biofilme-positivas. Nas amostras PIA-dependentes, o etanol (1%) acarretou aumento da expressão relativa de *icaA* e redução da expressão de *icaR*, além de aumento da expressão dos reguladores globais (*sarA* e *sigB*), enquanto a amostra PIA-independente mostrou redução na expressão destes reguladores globais. Ao contrário do etanol, a clorexidina (0,5 µg/mL) determinou aumento da expressão de *icaR* e redução de *icaA*

nas amostras PIA-dependentes, além de redução na expressão de *sarA* e *sigB* na amostra PIA-independente. Os resultados indicaram que a produção de biofilme mostrou-se associada com alguns dos potenciais marcadores de virulência, sendo também evidenciada associação de alguns desses marcadores com resistência a certos antimicrobianos. As amostras PIA-dependentes foram prevalentes, destacando-se, porém, o encontro de número expressivo de amostras PIA-independentes. Os genes *aap*, *ebp* e *bhp* não se mostraram correlacionados com a produção de biofilme proteico, indicando existência de outros mecanismos envolvidos na formação desse tipo de biofilme. Nas amostras PIA-dependentes, etanol e clorexidina mostraram efeitos opostos na expressão de *icaA* e *icaR*, corroborando dados fenotípicos previamente obtidos, e enfatizando a necessidade de ampliação do estudo da clorexidina, tendo em vista o potencial de aplicação prática deste achado.

Palavras-chave: *Staphylococcus epidermidis*, Biofilme, Operon *ica*, Biofilme PIA-independente, Marcadores de virulência.

## ABSTRACT

*S. epidermidis* is the main agent of infections associated with implanted medical devices, being its ability to form biofilms on inert surfaces the determinant factor for the persistence of this microorganism. Fifth two clinical isolates of this species were evaluated for susceptibility to antimicrobials, biofilm production/chemical nature, presence of genes related to virulence (*atlE*, *capB*, *aap*, *embp*, *bhp*, IS256 and IS257), and the effect of subinhibitory concentrations (sub-MICs) of ethanol and chlorhexidine in biofilm production. Moreover, some of biofilm-positive samples were studied for the effect of sub-MICs of these antiseptics in the expression of *icaA*, *icaR*, *sigB* and *sarA*. Over 60% of the samples showed resistance to  $\geq 10$  drugs and biofilm producers showed, in general, a higher percentage of antimicrobial resistance. In microtiter plate test (MTP), 23 strains were biofilm producers, being 4 of polysaccharide nature, 8 proteinaceous and 3 undetermined. In Congo Red Agar test, only biofilm polysaccharide producer strains showed a positive reaction. *ica* operon genes were detected in 23 isolates, being 17 of these classified as producers and 6 as non-biofilm producers in MTP. The frequency of other production-related biofilm genes was: *embp* (69%), *aap* (29%) and *bhp* (12%), no being detect a correlation between them and the production of PIA-independent biofilm. The *aap* (29%) and IS256 (23%) genes showed significant correlations with: biofilm production, presence of *ica* biofilm, biofilm+/*ica*+ profile, and strong level of production of biofilm. The IS256 gene was also significantly correlated with resistance to some antibiotics. Sub-MIC of ethanol (2 and / or 4%) led to an increase in biofilm production in 15 of 17 samples PIA-dependent and in the 8 PIA-independent, but did not induce biofilm production in not originally producing samples. Unlike ethanol, sub-MICs of chlorhexidine not only did not induce production as determined reduction of biofilm production in biofilm-positive samples. In PIA-dependent strains, ethanol (1%) caused an increase in the relative expression of *icaA* and reduced expression of *icaR*, in addition to increased expression of global regulators (*sarA* and *sigB*), while the PIA-independent strain showed reduction in the expression of these global regulators. Unlike ethanol, chlorhexidine (0.5 mg/mL) determined increased expression of *icaR* and reduction of *icaA* in PIA-dependent strains, besides a reduction in the expression of *sarA* and *sigB* in the PIA-independent strain. The results indicated that biofilm production was associated with some of potential virulence markers, and also evidenced some combination of these markers

and resistance to certain antibiotics. The PIA-dependent strains were prevalent, highlighting, however, the encounter of significant number of PIA-independent strains. The *aap*, *embp* and *bhp* genes were not correlated with the production of proteinaceous biofilm, indicating the existence of other mechanisms involved in the formation of such biofilms. In PIA-dependent strains, ethanol and chlorhexidine showed opposite effects on the expression of *icaA* and *icaR*, corroborating phenotypic data previously obtained, and emphasizing the need to expand the study of chlorhexidine, in view of the potential of practical application of this finding.

Key-words: *Staphylococcus epidermidis*. Biofilm. *ica* Operon. PIA-independent biofilm. Virulence markers.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Oligonucleotídeos iniciadores, temperatura de anelamento e tamanho dos produtos amplificados dos genes envolvidos no estudo e analisados através da técnica de PCR simples .....	58
<b>Tabela 2:</b> Oligonucleotídeos iniciadores empregados na técnica de PCR quantitativa em tempo real .....	64
<b>Tabela 3:</b> Origem das amostras de <i>S. epidermidis</i> .....	67
<b>Tabela 4:</b> Classificação das amostras de <i>S. epidermidis</i> produtoras de biofilme, com base no resultado da Densidade Óptica do extrato do biofilme pelo método da placa de microtitulação .....	69
<b>Tabela 5:</b> Apresentação dos resultados obtidos em Ágar Vermelho Congo e no teste de produção de biofilme pelo método da placa de microtitulação em 52 amostras de <i>S. epidermidis</i> .....	69
<b>Tabela 6:</b> Apresentação dos resultados obtidos em Ágar Vermelho Congo e os níveis de produção de biofilme determinados pelo método da placa de microtitulação em 25 amostras de <i>S. epidermidis</i> .....	70
<b>Tabela 7:</b> Apresentação da relação entre a natureza química e os níveis de produção de biofilme determinados pelo método da placa de microtitulação em 25 amostras de <i>S. epidermidis</i> .....	71
<b>Tabela 8:</b> Apresentação da relação entre a natureza química do biofilme e a reação em Ágar Vermelho Congo em 25 amostras de <i>S. epidermidis</i> .....	72
<b>Tabela 9:</b> Correlação entre a presença dos genes do operon <i>icaADBC</i> , do gene <i>icaR</i> e a produção de biofilme determinada pelo método da placa de microtitulação em 52 amostras de <i>S. epidermidis</i> .....	73
<b>Tabela 10:</b> Apresentação da relação entre a presença dos genes do operon <i>icaADBC</i> , do gene <i>icaR</i> e o nível de produção de biofilme determinado pelo método da placa de microtitulação em 25 amostras de <i>S. epidermidis</i> .....	73
<b>Tabela 11:</b> Frequência dos genes <i>aap</i> , <i>bhp</i> e <i>ebp</i> em 52 amostras de <i>S. epidermidis</i> e sua associação com a produção de biofilme determinada pelo método da placa de microtitulação.....	74
<b>Tabela 12:</b> Frequência de detecção dos genes <i>atlE</i> e <i>capB</i> , e das transposases das sequências de inserção IS256 e IS257 em 52 amostras de <i>S. epidermidis</i> .....	75

<b>Tabela 13:</b> Correlação da Presença do Gene <i>aap</i> e da sequência de inserção IS256 com características fenotípicas e genotípicas relacionadas à produção de biofilme em amostras de <i>S. epidermidis</i> .....	76
<b>Tabela 14:</b> Relação entre a resistência aos antimicrobianos em amostras de <i>S. epidermidis</i> produtoras e não produtoras de biofilme.....	78
<b>Tabela 15:</b> Resistência a antimicrobianos nas amostras de <i>S. epidermidis</i> , com 10 ou mais marcadores de resistência, produtoras e não produtoras de biofilme.....	81
<b>Tabela 16:</b> Consolidação dos resultados do tipo e nível de produção de biofilme, e da influência do etanol (2 e 4%) e da clorexidina (0,5 e 1,0 µg/mL) na produção de biofilme determinada pelo método da placa de microtitulação das amostras de <i>S. epidermidis</i> cuja expressão gênica foi avaliada por qRT-PCR.....	93

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Número antimicrobianos para os quais as 52 amostras de <i>S. epidermidis</i> , produtoras e não produtoras de biofilme apresentaram resistência.....	79
<b>Figura 2:</b> Associação entre a presença da sequência de inserção IS256 e a resistência a antimicrobianos em 52 amostras de <i>S. epidermidis</i> .....	82
<b>Figura 3:</b> Variações percentuais dos resultados da DOsa e DOeb das amostras de <i>S. epidermidis</i> biofilme positivo/operon <i>ica</i> positivo crescidas em TSB adicionado de 2 e 4% de etanol (a barra de erros indica o desvio padrão dos resultados) .....	85
<b>Figura 4:</b> Densidade óptica da diluição seriada (1/2) em álcool da solução de cristal violeta de Hucker a 2% (barra de erros indica o desvio padrão) .....	86
<b>Figura 5:</b> Variações percentuais dos resultados da DOsa e DOeb das amostras de <i>S. epidermidis</i> biofilme positivo / operon <i>ica</i> negativo crescidas em TSB adicionado de 2% e 4% de etanol (a barra de erros indica o desvio padrão dos resultados).....	87
<b>Figura 6:</b> Reduções percentuais dos resultados da DOsa e DOeb das amostras de <i>S. epidermidis</i> biofilme positivo / operon <i>ica</i> positivo crescidas em TSB adicionado de 0,5 e 1,0 µg/mL de clorexidina (a barra de erros indica o desvio padrão dos resultados) .....	89
<b>Figura 7:</b> Reduções percentuais dos resultados da DOsa e DOeb das amostras de <i>S. epidermidis</i> biofilme positivo / operon <i>ica</i> negativo crescidas em TSB adicionado de 0,5 e 1,0 µg/mL de clorexidina (a barra de erros indica o desvio padrão dos resultados).....	90
<b>Figura 8:</b> Expressão relativa (%) dos genes <i>icaA</i> , <i>icaR</i> , <i>sarA</i> e <i>sigB</i> , estudada por qRT-PCR, das amostras de <i>S. epidermidis</i> crescidas em TSB adicionado de etanol a 1% (a barra de erros indica o desvio padrão dos resultados) .....	95

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1	IMPORTÂNCIA DE <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	17
1.2	MECANISMO DE FORMAÇÃO E COMPONENTES DO BIOFILME..	19
1.2.1	Etapa de aderência.....	20
1.2.2	Etapa de acumulação/maturação.....	21
1.2.3	Etapa de dispersão.....	24
1.3	CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL, REGULAÇÃO DA PRODUÇÃO DA ADESINA POLISSACARÍDICA INTERCELULAR E EXPRESSÃO DE <i>icaADBC</i> .....	25
1.3.1	Características químicas e estruturais da adesina polissacarídica intercelular.....	25
1.3.2	Mecanismos genéticos envolvidos na síntese da Adesina Polissacarídica Intercelular.....	26
1.4	FATORES REGULATÓRIOS QUE AFETAM A EXPRESSÃO DO OPERON <i>ica</i> .....	27
1.4.1	Fatores regulatórios que afetam negativamente a expressão do operon <i>ica</i> .....	27
1.4.1.2	<i>Variação de fase em S. epidermidis</i> .....	28
1.4.2	Fatores regulatórios que afetam positivamente a expressão do operon <i>ica</i> .....	29
1.4.2.1	<i>Regulador Acessório de Estafilococos – Sar</i> .....	29
1.4.2.2	<i>Fator sigma B alternativo - <math>\sigma^B</math></i> .....	30
1.4.2.3	<i>Ciclo dos ácidos tricarboxílicos e expressão do operon ica</i> .....	32
1.4.2.4	<i>Ygs e GdpS</i> .....	33
1.5	Biofilmes PIA-independentes.....	33
1.6	FATORES DE VIRULÊNCIA PRESENTES NO BIOFILME E OUTROS POTENCIAIS DETERMINANTES DA VIRULÊNCIA DE <i>S. epidermidis</i> .....	35
1.7	MÉTODOS DE ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILMES....	38
1.7.1	Método da placa de microtitulação de poliestireno.....	39
1.7.2	Método do cultivo em Ágar Vermelho Congo.....	40
1.8	INFLUÊNCIA DE FATORES AMBIENTAIS E NUTRICIONAIS DA PRODUÇÃO DE BIOFILME.....	41
1.9	PRODUTOS ANTISSÉPTICOS.....	43

1.10	RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM ESTAFILOCOCOS.....	44
1.11	JUSTIFICATIVA.....	46
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>48</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	48
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>50</b>
3.1	AMOSTRAS BACTERIANAS.....	50
3.2	IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MINIMA DE ANTIMICROBIANOS..	51
3.3	MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME EM PLACA DE MICROTITULAÇÃO.....	51
3.4	MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME EM ÁGAR VERMELHO CONGO.....	53
3.5	TESTE DE DESAGREGAÇÃO DO BIOFILME.....	54
3.6	CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DAS AMOSTRAS.....	55
3.6.1	Extração do DNA.....	55
3.6.2	Identificação molecular das amostras.....	56
3.6.3	Condições de amplificação da técnica de PCR simples.....	56
3.6.4	Detecção de genes relacionados à virulência das amostras.....	57
3.7	AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DE ANTISSÉPTICOS NA PRODUÇÃO DE BIOFILME.....	60
3.8	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA PELA TÉCNICA DE PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL.....	61
3.8.1	Extração do RNA total.....	61
3.8.2	Pureza, integridade, quantificação e tratamento do RNA com DNase	62
3.8.3	Síntese de cDNA.....	63
3.8.4	Técnica de PCR quantitativa em tempo real.....	63
663.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	66
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>67</b>
4.1	AMOSTRAS BACTERIANAS.....	67
4.2	IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MINIMA DE ANTIMICROBIANOS..	68
4.3	DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME EM PLACA DE MICROTITULAÇÃO.....	68
4.4	DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME EM ÁGAR VERMELHO CONGO.....	69

4.5	TESTE DE DESAGREGAÇÃO DO BIOFILME.....	70
4.6	CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DAS AMOSTRAS.....	72
4.6.1	Identificação molecular das amostras.....	72
4.6.2	Pesquisa dos genes do operon <i>icaADBC</i> e do gene <i>icaR</i> .....	72
4.6.3	Pesquisa dos Genes <i>aap</i> , <i>bhp</i> e <i>embp</i> .....	74
4.6.4	Detecção de outros genes relacionados à virulência ( <i>atlE</i> e <i>capB</i> ) e das transposases das sequências de inserção IS256 e IS257.....	75
4.6.5	Correlação do gene <i>aap</i> e da sequência de inserção IS256 com a produção de biofilme pelas amostras.....	76
4.7	RESISTÊNCIA DAS AMOSTRAS A ANTIMICROBIANOS.....	77
4.7.1	Frequência de resistência a antimicrobianos e sua correlação com a produção de biofilme.....	77
4.7.2	Marcadores de resistência a antimicrobianos.....	79
4.7.3	Associação da sequência de inserção IS256 com a resistência a antimicrobianos.....	82
4.8	AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DE ANTISSÉPTICOS NA PRODUÇÃO DE BIOFILME.....	83
4.8.1	Influência do etanol em amostras biofilme positivo / operon <i>ica</i> positivo.....	83
4.8.2	Influência do etanol em amostras biofilme positivo / operon <i>ica</i> negativo.....	87
4.8.3	Influência do etanol em amostras não produtoras de biofilme.....	88
4.8.4	Influência da clorexidina em amostras biofilme positivo / operon <i>ica</i> positivo.....	88
4.8.5	Influência da clorexidina em amostras biofilme positivo / operon <i>ica</i> negativo.....	90
4.8.6	Influência da clorexidina em amostras biofilme negativo.....	91
4.9	AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DE ANTISSÉPTICOS NA EXPRESSÃO GÊNICA	91
4.9.1	Influência do etanol nas amostras produtoras de biofilme PIA-dependente.....	94
4.9.2	Influência do etanol na amostra produtora de biofilme PIA-independente.....	95
4.9.3	Influência da clorexidina nas amostras produtoras de biofilme PIA-dependente.....	95
4.9.4	Influência da clorexidina na amostra produtora de biofilme PIA-independente.....	97

<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>98</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>130</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>132</b>
	<b>ANEXO A</b> - Aparência das macrocolônias de <i>S. epidermidis</i> em AVC.....	<b>152</b>
	<b>ANEXO B</b> - Resultados do nível de produção de biofilme, do teste em AVC, da composição do biofilme e da pesquisa do operon <i>ica</i> das 25 amostras de <i>S. epidermidis</i> produtoras de biofilme.....	<b>153</b>
	<b>ANEXO C</b> - Poços, após a coloração na técnica do MTP, apresentando biofilmes com coloração uniforme e irregular.....	<b>154</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 IMPORTÂNCIA DE *Staphylococcus epidermidis*

As espécies do gênero *Staphylococcus* apresentam-se morfo-tintorialmente como cocos Gram positivos, com diâmetros que variam de 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$ . São imóveis, anaeróbias facultativas e produtoras da enzima catalase. O nome do gênero foi proposto por Ogston (1882), derivando do grego *staphylē*, pelo fato dos agrupamentos celulares de culturas crescidas em meio sólido lembrarem a disposição de cachos de uva, ao serem submetidos à coloração. Com base na capacidade de produzirem ou não a enzima coagulase, classicamente os estafilococos são divididos em dois grupos: os coagulase-positivos, cuja espécie de importância médica humana é *S. aureus*, e os coagulase-negativos (ECNs), cuja espécie mais importante é *S. epidermidis*.

*Staphylococcus epidermidis* é encontrado na microbiota da pele e mucosas de mamíferos, sendo a espécie deste gênero mais frequentemente isolada dos epitélios superficiais do homem (OTTO, 2009). Esta espécie foi considerada por muito tempo como não patogênica para indivíduos imunocompetentes, em virtude da sua constante presença na microbiota da pele e das mucosas, bem como por não produzir fatores de virulência como toxinas e enzimas relacionadas à disseminação tecidual. Eventualmente, era relatada sua associação com infecções em indivíduos imunocomprometidos, como usuários de drogas injetáveis, pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) ou que recebiam terapia imunossupressora, e em recém-nascidos prematuros (OTTO, 2008, 2009).

Contudo, nas últimas décadas, *S. epidermidis* emergiu como patógeno oportunista e consolidou sua posição como uma das principais causas de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), em particular aquelas relacionadas à implantação de dispositivos médicos como cateteres intravasculares, intratecais e urinários, eletrodos de marca-passos, lentes intraoculares e próteses articulares (ZIEBUHR et al., 2006). Este tipo de infecção provavelmente é favorecido pelo fato de *S. epidermidis* ser um permanente e ubíquo colonizador da pele humana, o que resulta em maior probabilidade de contaminação destes dispositivos durante sua inserção,

aliado ao fato desta bactéria ser capaz de sintetizar produtos estruturais e extracelulares (ácidos teicóicos, autolisinas bifuncionais AtlE e Aae, DNA extracelular – eDNA, proteínas de ligação à matriz extracelular: SdrF – colágeno, Fbe/SdrG – fibrinogenio, Ebp – elastina) que auxiliam na colonização de tais dispositivos (OTTO, 2009). Os dispositivos médicos implantáveis representam um dos mais notáveis avanços da medicina, cujo uso aumenta com a mudança no perfil demográfico da população. Uçkay e cols. (2009), com base em dados obtidos na literatura, relataram que somente nos Estados Unidos da América (EUA) são implantados por ano 150 milhões de dispositivos intravasculares e 400 mil próteses de quadril e joelho.

Mesmo com todo progresso observado nas medidas de prevenção, o número de infecções associadas aos dispositivos médicos implantáveis é cada vez mais expressivo. Na Alemanha, por ano, o número estimado dessas infecções é superior a 2,5 milhões (MACK et al., 2006). Nos EUA, ocorrem anualmente, cerca de 250 a 500 mil casos de Infecções da Corrente Sanguínea Relacionadas a Cateteres Venosos Centrais (MAKI; KLUGER; CRNICH, 2006). Os ECNs são os patógenos mais frequentemente isolados das infecções associadas a dispositivos médicos, tendo a espécie *S. epidermidis* um papel de destaque, tornando-se atualmente um dos cinco patógenos mais importantes nas IRAS (ROHDE et al., 2010).

A colonização dos dispositivos médicos implantáveis tanto pode ocorrer durante sua inserção cirúrgica, como após alguns meses. Sendo os materiais utilizados na confecção destes dispositivos na maioria das vezes hidrofóbicos, a colonização no momento da sua implantação é resultante de interações inespecíficas, em geral de natureza hidrofóbica. A grande hidrofobicidade da sua superfície celular é apontada como um dos fatores que confere uma maior capacidade de aderência de *S. epidermidis* à superfície dos dispositivos médicos, em particular aqueles constituídos de polímeros plásticos, que são naturalmente hidrofóbicos (ROHDE et al., 2010). Certamente, a presença significativa de *S. epidermidis* na superfície dos epitélios dos pacientes e dos profissionais da área de saúde, constitui uma vantagem sobre outras bactérias na colonização precoce dos dispositivos médicos, conferindo um caráter oportunista a estas infecções (OTTO, 2008, 2009).

As infecções decorrentes da colonização de dispositivos de implantes por *S. epidermidis* em pacientes imunocompetentes se caracterizam por terem uma evolução subaguda ou crônica, contrastando com os quadros agudos observados em processos infecciosos causados por outros patógenos. Esta diferença seria explicada

pela falta de produção por *S. epidermidis* de toxinas e outros fatores de virulência tipicamente produzidos pelos outros patógenos (SCHOENFELDER et al., 2010). Contudo, nestas infecções existe caracteristicamente a formação de biofilme, considerado o mecanismo de patogenicidade mais importante de *S. epidermidis* (OTTO, 2008).

## 1.2 MECANISMO DE FORMAÇÃO E COMPONENTES DO BIOFILME

Biofilme é uma associação de bactérias aderidas sobre uma superfície, organizada em multicamadas finas, e envolvida por uma matriz polimérica amorfa e hidratada, produzida pelos próprios micro-organismos. Essa estrutura dificulta a ação dos mecanismos de defesa do hospedeiro e confere maior resistência aos antimicrobianos, resultando em infecções de difícil tratamento e que na maioria das vezes exigem a remoção do implante colonizado para resolução do processo infeccioso (ROHDE et al., 2010, FEY; OLSON, 2010).

As propriedades dos biofilmes, que resultam em resistência do micro-organismo a antibióticos, podem incluir um crescimento mais lento deste dentro do biofilme, heterogeneidade fenotípica, inativação do antibiótico no interior da matriz exopolissacarídica, e limitações na penetração da droga através da matriz do biofilme (STEWART, 2002).

A formação do biofilme é um processo complexo e multifatorial, sendo que o mecanismo exato requerido para a síntese de um biofilme funcional ainda não está totalmente esclarecido. Classicamente, tem sido descrito como um processo composto por quatro etapas sequenciais: aderência, acumulação/maturação e desprendimento, tendo como principal substância envolvida na fase de acumulação um polissacarídeo de superfície, poli- $\beta$ (1,6)-N-acetil-D-glicosamina (PNAG), denominado Adesina Polissacarídica Intercelular (PIA) (MACK et al., 1996, ROHDE et al., 2010).

### 1.2.1 Etapa de aderência

A adesão de *S. epidermidis* a superfícies plásticas como a dos dispositivos implantáveis envolve uma diversidade de fatores específicos e não específicos, e representa o primeiro passo para o desenvolvimento de infecções associadas a implantes. Esta etapa inicial da colonização é dependente de características físico-químicas do dispositivo implantado e da superfície bacteriana, sendo este tipo de ligação governado por interações hidrofóbicas ou eletrostáticas entre ambas as superfícies (OTTO, 2013).

Além destes fatores, a ligação direta a superfícies hidrofóbicas pode ser mediada por moléculas da superfície bacteriana, tais como proteínas denominadas autolisinas (Atl) (em estágio não processado) da parede celular. Estas moléculas possivelmente atuam também na fase de acumulação do biofilme (HOUSTON et al., 2011).

A autolisina E (AtlE) parece ser a molécula mais importante para a adesão direta a superfícies hidrofóbicas. Mutações por inserção de transposon para essa autolisina em *S. epidermidis* acarretou perda da capacidade do micro-organismo de aderir ao poliestireno, mas não ao vidro (HEILMANN et al., 1996, HEILMANN et al., 1997).

Estudos demonstraram que além de mediar a aderência diretamente a dispositivos plásticos, AtlE apresenta também a capacidade de se ligar especificamente à proteína vitronectina da matriz extracelular do hospedeiro (HEILMANN et al., 1996, LI; LJUNGH, 2001), sendo, portanto, um integrante do grupo dos componentes microbianos de superfície que reconhecem moléculas da matriz extracelular (MSCRAMMs - *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*). Complementarmente, ácidos teicóico e lipoteicóico podem também auxiliar nesta ligação inicial (GROSS et al., 2001).

Apesar da existência de evidências quanto à capacidade de *S. epidermidis* se ligar diretamente a superfícies plásticas, não está ainda devidamente dimensionada a contribuição deste processo para a formação de biofilme em dispositivos médicos, uma vez que estes são prontamente revestidos com proteínas do hospedeiro ao serem instalados (FRANÇOIS; VAUDAUX; LEW, 1998).

Este evento parece desempenhar importante papel na etapa inicial da formação do biofilme, uma vez que tais proteínas podem atuar como receptores para as adesinas MSCRAMMs da superfície de *S. epidermidis*. Assim, tão logo o dispositivo é introduzido, uma aderência específica é estabelecida por meio de proteínas pertencentes ao grupo das MSCRAMMs, como SdrG (também conhecida como Fbe), GehD e Embp, AtlE e Aae, as quais se ligam a proteínas da matriz extracelular e do plasma (fibrinogênio, colágeno, fibronectina, vitronectina e vitronectina, respectivamente) (BOWDEN et al., 2002, DAVIS et al., 2001, HARTFORD et al., 2001, HEILMANN et al., 1997, 2003, WILLIAMS et al., 2002).

Segundo Otto (2012) as proteínas de ligação ao fibrinogênio (SdrG/Fbe) e fibronectina (Embp) representam MSCRAMMs no senso estrito, com ancoragem covalente ao peptídeo glicano catalizada por sortase e função primária de adesina, enquanto AtlE e Aae são autolisinas ligadas não covalentemente à superfície celular, com função adicional de adesina às suas funções primárias na recomposição da parede celular. Já a GehD atua primariamente como uma lipase, com também provável função de ligação ao fibrinogênio (BOWDEN et al., 2002).

Acredita-se que na fase de adesão inicial do biofilme produzido por *S. epidermidis*, também possa ser um fator importante a liberação de eDNA, através de um processo envolvendo hidrolases de mureína, como a AtlE. Uma evidência disto é que o tratamento com DNase I pode inibir a formação do biofilme nascente (IZANO et al., 2008, QIN et al., 2007).

### 1.2.2 Etapa de acumulação/maturação

Uma vez tendo sido estabelecida a ligação a uma superfície, os estafilococos iniciam processo replicativo, se acumulando e formando aglomerados de células dispostos em várias camadas. A distribuição em camadas faz com que a maioria dos micro-organismos presentes nesta etapa não mantenha contato com a superfície colonizada, mas sua inserção no biofilme é assegurada por mecanismos de agregação intercelular, destacando-se para tal função, tanto em *S. epidermidis* como em *S. aureus*, a Adesina Polissacarídica Intercelular (PIA) (MACK et al., 1996, ROHDE et al., 2010).

As interações intercelulares mediadas por esse exopolissacarídeo decorrem de sua carga líquida positiva, que promove sua ligação à superfície negativamente carregada das células bacterianas. Para promover as interações intercelulares, a PIA pode ou não interagir com ácidos teicóicos e lipoteicóicos (O'GARA, 2007, VERGARA-IRIGARAY et al., 2008).

Além da PIA, outros polissacarídeos, como o PS/A (*Capsular Polysaccharide Adhesin* - Adesina Polissacarídica Capsular), PNSG (*Poly N-Succinyl Glucosamine* - Poli N-succinil Glicosamina), que posteriormente foi definido como PNAG (TOJO et al., 1998, MAIRA-LITRÁN et al., 2002) e SAA (*Slime Associated Antigen* - Antígeno Associado ao Slime), já foram apontados como estando envolvidos na fase de acumulação do biofilme, ou com a adesão inicial a superfícies (CHRISTENSEN et al., 1990; BALDASSARRI et al., 1996). Porém, análises efetuadas posteriormente apontaram que, a despeito de algumas variações, estes polissacarídeos, quimicamente, são estreitamente relacionados, senão idênticos, e representam uma mesma entidade, denominada PIA (GÖTZ, 2002, MACK et al., 2009).

A importância desse polissacarídeo para a formação de biofilme *in vitro* e *in vivo* tem sido demonstrada em numerosos estudos (OTTO, 2013). Além da PIA, na etapa de acumulação/maturação do biofilme estão também presentes como componentes essenciais proteínas e DNA (CUE; LEI; LEE, 2012). Um exemplo de proteína importante na etapa de acumulação do biofilme é a Aap (*Accumulation-Associated Protein* – Proteína Associada à Acumulação). Evidência inicial para o papel desta proteína de 140 kDa foi fornecida por Schumacher-Perdreau e cols. (1994), ao constatarem que um mutante de *S. epidermidis*, deficiente para Aap, se mostrou incapaz de acumulação, quando ligado à superfície de plástico ou vidro.

Aap pode ser encontrada tanto ancorada à parede celular, como também no meio extracelular, mediante excreção pelas células bacterianas ligadas no biofilme (SUN; ACCAVITTI; BRYERS, 2005). Esta proteína parece ser capaz não só de aumentar a adesão de PIA, mediante ligação do polissacarídeo aos seus domínios G5 (OTTO, 2009), como também atuar como um substituto da PIA na adesão intercelular (ROHDE et al., 2005). Este aspecto é muito importante porque, embora a PIA tenha sido considerada por um longo tempo indispensável para a formação do biofilme estafilocócico, mais recentemente foram identificadas amostras destituídas do operon codificante da PIA (*icaADBC*) que são capazes de produzir biofilme *in vivo* e *in vitro* (KOGAN et al., 2006, ROHDE et al., 2007). Assim, Aap é um importante exemplo de

proteína que pode determinar a formação de biofilme PIA- independente, com matriz de composição proteica.

Outra proteína que pode estar presente nesta etapa é a Bap (*Biofilm Associated Protein* – Proteína Associada ao Biofilme), descrita por Cucarella e cols. (2001) em amostras de *S. aureus* isoladas de casos de mastite bovina. Esta proteína mostrou-se capaz de atuar não só no processo de aderência direta a superfícies abióticas, como também na fase de acumulação do biofilme, onde a adesão intercelular desempenha importante papel. A presença da Bap foi suficiente para induzir a formação de biofilme em amostras de *S. aureus ica* negativas (CUCARELLA et al., 2004).

Em *S. epidermidis*, uma proteína homóloga da Bap, denominada Bhp (*Bap Homologue Protein*), foi sugerida por Tormo e cols. (2005b) como provavelmente envolvida na formação de biofilme devido a sua notável similaridade estrutural com a Bap. Ao contrário de gene *aap*, que é encontrado em cerca de 90% das amostras de *S. epidermidis*, *bhp* é detectado em aproximadamente 15 a 45% dos isolados, dependendo do estudo realizado (ROHDE et al., 2007; BOWDEN et al., 2005).

Similarmente ao que se observa para a Aap, Embp (*Extracellular Matrix-Binding Protein* – Proteína de Ligação à Matriz Extracelular) é outra importante proteína capaz de atuar tanto na fase inicial do biofilme, mediante ligação à fibronectina, quanto na fase de acumulação, funcionando como adesina intercelular (CHRISTNER et al., 2010).

Portanto, um biofilme maduro de *S. epidermidis* consiste de uma variedade de moléculas adesivas, que incluem ou não a PIA, fatores proteínáceos como Bhp, Aap e Embp, ácidos teicóicos e eDNA (FEY; OLSON, 2010), embora este último pareça atuar de modo mais importante na etapa de adesão inicial da formação do biofilme (QIN et al., 2007).

Além dos processos adesivos que promovem a ligação das bactérias durante a etapa de acumulação, a maturação do biofilme envolve também a ocorrência de processos disruptivos que formam canais em sua estrutura (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000), os quais são necessários para que as células localizadas nas camadas mais profundas tenham acesso a nutrientes. Os processos disruptivos participam também na estruturação do biofilme, acarretando o desprendimento de agregados de células, o que controla a expansão do biofilme.

### 1.2.3 Etapa de dispersão

Com o amadurecimento do biofilme, células bacterianas ou seções intactas de biofilme podem se desprender e, “metastaticamente”, atingir outros órgãos ou sistemas, levando à disseminação sistêmica do processo infeccioso. Entre os fatores que poderiam contribuir para o desprendimento de frações do biofilme foi aventada a participação de agentes tensoativos, capazes de interromper as interações não covalentes entre as moléculas agregativas do biofilme, conduzindo ao seu descolamento.

Assim, em *Staphylococcus* foi caracterizada a produção de uma família de peptídeos com suposta capacidade surfactante, devido ao seu caráter  $\alpha$ -helicoidal anfipático. Estes peptídeos foram denominados de modulinas solúveis em fenol (*phenol-soluble modulins* [PSMs]), e descritos pela primeira vez em *S. epidermidis* (MEHLIN et al., 1999).

As PSMs de *S. epidermidis* formam um complexo que determina uma variedade de propriedades pró-inflamatórias e consistem em pelo menos 4 componentes peptídicos: PSM $\alpha$ , PSM $\beta$ , PSM $\gamma$  ( $\delta$ -toxina) (MEHLIN; HEADLEY; KLEBANOFF, 1999) e PSM $\delta$  (OTTO et al., 2004). Entre estes peptídeos, a  $\delta$ -toxina foi sugerida como a primeira PSMs envolvida no processo de desprendimento do biofilme em *S. epidermidis*, inibindo as etapas de acumulação/maturação de sua formação (VUONG et al., 2003).

A expressão das PSMs, bem como de outros fatores envolvidos na formação de biofilme e virulência de *S. epidermidis* e *S. aureus*, é regulada por um sistema *quorum sensing* denominado *agr* (*Accessory Gene Regulator* – Gene Regulador Acessório) (VUONG et al., 2004a).

A expressão de todas as PSMs de *S. epidermidis* encontra-se sob controle excepcionalmente estrito deste sistema *quorum sensing*, na medida em que tal processo é realizado por meio da ligação direta da proteína reguladora de resposta AgrA a promotores do operon *psm*. Assim, este controle é mais direto do que o de muitos outros determinantes de virulência Agr regulados, os quais são controlados por meio de um RNA regulador (WANG et al., 2007, VUONG et al., 2004a, QUECK et al., 2008).

### 1.3 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL, REGULAÇÃO DA PRODUÇÃO DA ADESINA POLISSACARÍDICA INTERCELULAR E EXPRESSÃO DE *icaADBC*

#### 1.3.1 Características químicas e estruturais da adesina polissacarídica intercelular

A estrutura da PIA foi originalmente descrita por Mack e cols. (1996), que purificaram e caracterizaram um antígeno polissacarídico específico obtido das amostras produtoras de biofilme *S. epidermidis* 1457 e *S. epidermidis* RP62A. Mediante análise de filtração em gel Sephadex G-200, seguida de separação por cromatografia Q-Sepharose, foi observado que este polissacarídeo é constituído por duas frações: uma principal, representada pelo polissacarídeo I (> 80%), e uma menor, denominada polissacarídeo II, representando menos de 20% do polímero, e que se mostrou moderadamente aniônica.

O polissacarídeo I é uma homoglicana linear, com pelo menos 130 resíduos de 2-deoxi-2-amino-D-glucopiranosil  $\beta$ -1,6-ligados. Em média 80 a 85% desses resíduos são N-acetilados, sendo o restante dos resíduos da fração não N-acetilados e positivamente carregados. A fragmentação do polissacarídeo I por desaminação com ácido nitroso revelou uma distribuição mais ou menos aleatória dos resíduos glucosaminil não-N-acetilados. A estrutura polissacarídica não ramificada favorece uma longa faixa de contato e interação entre as fitas polissacarídicas e as proteínas da parede celular, levando à adesão intercelular e acumulação do biofilme. A estrutura homoglicana não ramificada é reminiscente de outros polissacáridos estruturais, tais como celulose e quitina, mas a substituição de ligações  $\beta$ -1,4 por  $\beta$ -1,6 torna a estrutura total do polissacarídeo de *S. epidermidis* menos compacta e menos rígida (MACK et al.,1996).

O polissacarídeo II é estruturalmente relacionado ao polissacarídeo I, sendo constituído exclusivamente por glicosamina, mas apresenta um menor conteúdo de resíduos D-glicosaminil não N-acetilados, e contém fostato e succinato ligado à ester, proporcionando seu caráter aniônico. Tal composição introduz, simultaneamente, cargas negativas e positivas no polissacarídeo. Acredita-se que sejam fatores importantes para a adesão intercelular e formação de biofilme por *S. epidermidis* tanto

a estrutura não ramificada e os resíduos de glicosamina positivamente carregados no polissacarídeo I, quanto os grupos de carga positiva e negativa no polissacarídeo II (ROHDE et al., 2010).

### 1.3.2 Mecanismos genéticos envolvidos na síntese da Adesina Polissacarídica Intercelular

A PIA é a molécula acumulativa mais prevalente e mais estudada em isolados clínicos de *S. epidermidis*. Este polissacarídeo é sintetizado, exportado e modificado pelos produtos codificados pelo operon *icaADBC*, o qual foi identificado inicialmente nesta espécie bacteriana (HEILMANN et al., 1996). A transcrição deste operon é, em parte, controlada por um regulador transcricional denominado *icaR*, o qual codifica um repressor com papel central na regulação da expressão desse operon (CONLON; HUMPHREYS; O'GARA, 2002).

O operon *icaADBC* codifica as proteínas IcaA, IcaD, IcaB e IcaC, sendo que IcaA e IcaD são proteínas transmembrana que apresentam atividade de N-acetilglicosaminil-transferase, tendo UDP-N-acetilglicosamina como substrato. Essas duas proteínas trabalham em conjunto para sintetizar oligômeros de  $\beta$ -1,6-N-acetilglicosamina. IcaD é requerida para a completa atividade de IcaA *in vitro*, atuando como uma chaperona que dirige a inserção de IcaA na membrana, podendo atuar também na ligação entre IcaA e IcaC (GERKE et al., 1998). Quando somente o gene *icaA* é expresso, ocorre indução de uma baixa atividade desta enzima. Porém, quando o gene *icaA* é co-expresso com o gene *icaD*, observa-se um aumento de cerca de 20 vezes na atividade da transferase, que atua determinando a formação de oligômeros com 10 a 20 resíduos de  $\beta$ -1,6-N-acetilglicosamina (GERKE et al., 1998).

O produto do gene *icaC* é também uma proteína de membrana, com 10 domínios transmembrana, cuja atuação é igualmente essencial para uma PIA inteiramente funcional. Aparentemente, esta proteína está envolvida na externalização e alongamento do polissacarídeo crescente (GERKE et al., 1998). Enquanto a co-expressão de *icaA* e *icaD* permite a produção de oligômeros de N-acetilglicosamina com comprimento máximo de somente 20 resíduos, a co-expressão destes com *icaC* determina a síntese de cadeias mais longas, de cerca de 130

resíduos, e que reagem com anti-soro PIA-específico, ao contrário do que ocorre com oligômeros curtos (GERKE et al., 1998).

Diferentemente do observado para *icaA*, *icaD* e *icaC*, o produto de *icaB* é encontrado principalmente no sobrenadante das culturas, estando também associado à superfície da célula, sendo responsável pela deacetilação e atividade da PIA (VUONG et al., 2004b). A deacetilação da PIA é o fator que resulta em um polímero positivamente carregado, o que é importante para sua interação com a superfície negativamente carregada da célula bacteriana. Em cepas mutantes de *S. epidermidis* nas quais o gene *icaB* foi suprimido, a PIA mostrou-se escassamente retida na superfície da célula, provavelmente devido à perda de seu caráter catiônico, pela ausência de acetil-glicosamina não-N-acetilada (VUONG et al., 2004b).

#### 1.4 FATORES REGULATÓRIOS QUE AFETAM A EXPRESSÃO DO OPERON *ica*

A regulação do operon *icaADBC* é bastante complexa e numerosos fatores regulatórios tem se mostrado implicados em seu controle. Muitos desses fatores atuam como reguladores transcricionais globais, enquanto outros, como o gene *icaR*, parecem afetar a expressão de, relativamente, poucos genes. As diferentes proteínas reguladoras que afetam a expressão do operon *ica* foram revisadas por Cue e cols. (2012).

##### 1.4.1 Fatores regulatórios que afetam negativamente a expressão do operon *ica*

O gene *icaR*, situado antes do gene *icaA*, é um regulador que apresenta transcrição num sentido divergente daquele que ocorre nos genes do operon *ica*. O produto codificado por esse gene é uma proteína com cerca de 22 kDa da família TetR de reguladores transcricionais. Existem evidências que sugerem que o produto do gene *icaR* pode atuar como um repressor transcricional que desempenha um papel adaptativo na formação de biofilme de *S. epidermidis*, mediante modulação da

regulação da expressão do operon *ica*, em resposta a condições ambientais específicas (CONLON; HUMPHREYS; O'GARA, 2002).

Conlon e cols. (2002) estudando o efeito do estímulo da glicose, cloreto de sódio e etanol na expressão do operon *ica* em amostras variantes de *S. epidermidis* *icaR*<sup>+</sup> e *icaR*<sup>-</sup>, observaram que a indução da expressão desse operon por etanol foi *icaR* dependente, ao contrário da indução por glicose-cloreto de sódio, cuja regulação mostrou-se *icaR* independente.

O mecanismo de atuação da proteína IcaR provavelmente envolve a ligação direta desse repressor ao promotor do operon *ica* (CONLON; HUMPHREYS; O'GARA, 2002). Por sua vez, o gene *icaR* pode ter sua transcrição reprimida pelo fator  $\sigma^B$ , um importante regulador de resposta global ao estresse.

Outros reguladores negativos de *ica* são as proteínas TcaR (JEFFERSON et al., 2004), LuxS (XU et al., 2006) e Spx (WANG, 2010).

#### 1.4.1.2 Variação de fase em *S. epidermidis*

Vários estudos têm demonstrado um fenômeno pelo qual uma parcela da população de amostras de *S. epidermidis* produtoras de biofilme PIA-dependente passa a não expressar este fenótipo. Este processo foi denominado de variação fenotípica ou variação de fase, e é usualmente detectado com o emprego do meio Ágar Vermelho Congo (AVC) (FEY; OLSON, 2010).

Segundo Handke e cols. (2004) a variação de fase ocorre em uma frequência razoavelmente elevada ( $10^{-3}$  a  $10^{-4}$ ) em quase todas as amostras de *S. epidermidis*, quando cultivadas durante um longo período de tempo (5-7 dias).

Ziebuhr e cols. (1999) foram os primeiros autores a demonstrar que em uma parcela expressiva de casos desta variação fenotípica existia a inserção reversível do elemento de inserção IS256 no locus *ica*, resultando em uma mudança fenotípica de biofilme-positivo para biofilme-negativo.

Posteriormente, Conlon e cols. (2004) e Handke e cols. (2004) apontaram que inserções do IS256 no gene *rsbU* do operon *sigB* ou no locus *sarA* (ambos reguladores globais que afetam a expressão de *ica*), também resultaram em expressão diminuída do operon *ica*, e foram associadas com a mudança fenotípica na produção de biofilme.

A frequência significativamente maior da presença do IS256 em isolados de origem clínica tem sido considerada como um fator sugestivo para o seu emprego como um marcador para discriminar cepas invasivas de amostras comensais de *S. epidermidis* (KOZITSKAYA et al., 2004, KIEM et al., 2004, GU et al., 2005).

Deve-se ressaltar ainda que, embora a expressão do operon *ica* em *S. epidermidis* possa ser “ligada” ou “desligada” pela alternância de inserção/excisão do IS256 em sítios específicos do genoma (CONLON; HUMPHREYS; O’GARA, 2004, HANDKE et al., 2004, ZIEBUHR et al., 1999), e desse modo abolir ou restaurar a capacidade de síntese de PIA, este elemento transponível não tem sido tratado como um regulador típico do operon.

#### 1.4.2 Fatores regulatórios que afetam positivamente a expressão do operon *ica*

Os fatores regulatórios que determinam efeito positivo na expressão do operon *ica-ADBC* englobam as proteínas da família Sar,  $\sigma^B$ , Rbf, SrrAB, Ygs, GdpS e CcpA.

##### 1.4.2.1 Regulador Acessório de Estafilococos - Sar

A família Sar (*Staphylococcal Accessory Regulator*- Regulador Acessório de Estafilococos) é constituída por, pelo menos, onze diferentes proteínas, sendo que algumas, como SarA, SarR e SarX, são encontradas tanto em *S. epidermidis* quanto *S. aureus* (CUE; LEI; LEE, 2012).

SarA, a proteína que tem sido mais estudada, apresenta ação regulatória global, afetando a expressão de múltiplos genes em *S. aureus*, inclusive muitos genes envolvidos na patogenicidade dessa bactéria. Sua atuação pode se dar tanto ao nível da ativação quanto da transcrição (BAYER; HEINRICHS; CHEUNG, 1996, BEENKEN; BLEVINS; SMELTZER, 2003, TORMO et al., 2005a, OSCARSSON et al., 2006).

A atuação de SarA como um regulador positivo na transcrição do locus *ica* de *S. epidermidis* foi demonstrada por Tormo e cols. (2005a). Em duas diferentes amostras clínicas de *S. epidermidis* (O-47 e CH845), a eliminação do gene que

codifica essa proteína tornou os mutantes *sarA* negativos completamente defectivos na formação de biofilme, tanto nas condições de teste em estado estacionário (placa de microtitulação), como nas condições de fluxo em microfermentador. A proteína SarA purificada mostrou alta afinidade de ligação à região promotora de *icaA*, enquanto a transcrição de *icaR* não foi afetada.

Deve-se destacar, porém, que nem sempre a proteína codificada por este gene determina um papel positivo na regulação do biofilme estafilocócico. Em caminho inverso aos dados anteriores, Christiner e cols. (2012) identificaram *sarA* como um regulador negativo para a formação de biofilme dependente da proteína Embp e de eDNA. Com base no fato de que expressiva proporção de isolados invasivos de *S. epidermidis* não formou biofilme *in vitro*, os autores testaram a hipótese de que sistemas regulatórios sobrepostos podem atuar suprimindo esta expressão. Mutagênese de uma amostra clínica de *S. epidermidis* biofilme-negativa por meio de inserção de Tn917 em *sarA* revelou que a inativação desse gene induziu formação de biofilme através da sobre-expressão da proteína gigante de ligação à matriz extracelular, Embp, a qual atuou nessa amostra como uma adesina intercelular. Além do aumento da expressão de Embp, observou-se pronunciada liberação de eDNA, que contribuiu significativamente para a formação de biofilme no mutante *sarA* negativo. Os autores concluíram que a liberação de eDNA resultou indiretamente da regulação positiva da metaloprotease SepA, levando ao processamento aumentado de autolisina AtlE, que, por sua vez, induziu aumento da autólise e liberação de eDNA. Estas regulações permitiriam que *S. epidermidis* pudesse mudar os mecanismos e a natureza do biofilme produzido, garantindo sua adaptação a ambientes hostis.

Outros componentes da família Sar que se destacam por atuarem na formação de biofilme em *Staphylococcus* são as proteínas SarX e SarZ, ambas atuando sobre o promotor de *agr* (MANNA; CHEUNG, 2006, ROWE et al., 2011).

#### 1.4.2.2 Fator sigma B alternativo - $\sigma^B$

Outro agente global que regula a formação de biofilme e outros processos por diferentes caminhos é  $\sigma^B$ , um fator sigma alternativo encontrado em estafilococos e

outras bactérias Gram positivas (CONLON; HUMPHREYS; O'GARA, 2004; CUE; LEI; LEE, 2012).

Entre os fatores sigma alternativos, o  $\sigma^B$  é um dos mais estudados em bactérias Gram positivas, atuando como um regulador central e modulando a expressão de numerosos genes, em resposta ao estresse ambiental e após a entrada na fase estacionária, em bactérias como *Staphylococcus*, *Bacillus* e *Listeria* (BECKER et al., 1998, KULLIK; GIACHINO; FUCHS, 1998). Além de atuar em respostas de resistência ao estresse, o fator  $\sigma^B$  está envolvido em expressões de virulência, por exemplo, a formação de biofilme em bactérias como *S. epidermidis* e *S. aureus* (GOMES et al., 2011, SHAW et al., 2006).

*S. epidermidis* possui um operon *sigB* altamente homólogo ao de *S. aureus*, com a mesma ordem dos genes (*rsbU*, *rsbV*, *rsbW*, *sigB*), codificando o fator sigma alternativo  $\sigma^B$ , e três proteínas regulatórias (KNOBLOCH et al., 2001). Na ausência de estresse o fator  $\sigma^B$  é inativo, devido a sua associação com RsbW, que atua como um fator anti- $\sigma$ . Além disso, RsbW atua também fosforilando o fator anti-anti  $\sigma$ , RsbV, inativando-o. Sob condições de estresse RsbU atua como uma fosfatase defosforilando RsbV. Este último pode então se ligar a RsbW, interrompendo a associação deste com  $\sigma^B$ , o qual, uma vez liberado, pode se associar com o cerne da RNA polimerase (KNOBLOCH et al., 2004). Portanto, a ativação de  $\sigma^B$  envolve a participação de um fator anti-sigma (RsbW) e de um fator anti-anti-sigma (RsbV).

Knobloch e cols. (2001) demonstraram que a inativação por inserção do elemento de transposição Tn917 no primeiro gene do operon  $\sigma^B$  (*rsbU*) em *S. epidermidis* diminuiu drasticamente a transcrição do operon *icaADBC*, síntese PIA, e a formação de biofilme.

Posteriormente foi demonstrado que esta influência do fator  $\sigma^B$  no operon *ica* decorria da repressão da transcrição de *icaR*, via um regulador intermediário não identificado (KNOBLOCH et al., 2004). Várias condições de estresse ambiental estimulam a formação do fator  $\sigma^B$ , levando à repressão de *icaR*, o que favorece a transcrição do operon *ica* e a produção de PIA. Porém, podem existir vias distintas de regulação do operon *ica* dependendo do agente estressante. Por exemplo, a regulação positiva de *RsbU* sobre o fator  $\sigma^B$  é essencial para a produção de PIA em condições de estresse por altas concentrações salinas, mas em condições de estresse por etanol, a produção de PIA ocorre por um mecanismo independente deste (KNOBLOCH et al., 2001, 2004).

#### 1.4.2.3 Ciclo dos ácidos tricarboxílicos e expressão do operon *ica*

Diferentes investigações já apontaram que certas condições ambientais, além da disponibilidade de nutrientes no meio de cultura, representam variáveis que podem influenciar fortemente a expressão de diversos fatores de virulência, a formação de biofilme e a síntese de exopolissacarídeos (DEIGHTON; BORLAND, 1993, DOBINSKY et al., 2003, VUONG et al., 2005).

Em *S. epidermidis* existem relatos de que a formação de biofilme é dependente do estado metabólico da célula (CRAMTON et al., 2001, SADYKOV et al., 2008, SCHLAG et al., 2007, VUONG et al., 2005). Nesta espécie bacteriana, por exemplo, a formação de biofilme é aumentada durante o crescimento em meio suplementado com glicose, sugerindo participação de um regulador responsivo a catabólitos de carbono que é capaz de ativar genes necessários para a formação de biofilme, e/ou reprimir genes que inibem a formação de biofilme (DOBINSKY et al., 2003).

Vuong e cols. (2005) observaram que certos fatores determinadores de estresse (como aumento da osmolaridade, exposição ao etanol ou aumento da temperatura), conhecidos por aumentarem a expressão do operon *ica* e a produção de PIA, são também condições que podem promover alterações nos níveis de produtos intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e inibi-lo. Os autores demonstraram que a inibição deste ciclo com fluorocitrato, um inibidor da enzima aconitase, determinou acentuado aumento na produção de PIA em *S. epidermidis*, sem comprometer o catabolismo da glicose e a taxa de crescimento. Isto os levou a especular que um mecanismo pelo qual os estafilococos percebem a mudança ambiental externa seria através de alterações na atividade do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, levando a mudanças nos níveis intracelulares de intermediários biossintéticos, ATP ou do estado redox da célula. Tais mudanças no estado metabólico podem afetar a expressão de *ica* e resultar na atenuação ou aumento da produção de PIA.

#### 1.4.2.4 *Ygs* e *GdpS*

As proteínas Ygs e GdpS também são apontadas como indutoras da formação de biofilme em *S. epidermidis*. A proteína Ygs contém 127 aminoácidos e é codificada por um novo gene descrito em *S. epidermidis* 1457, sendo expressa em uma resposta geral ao estresse. Segundo Wang e cols. (2011), a atuação desta proteína se dá de modo *icaR* independente.

GdpS (*GGDEF Domain Protein from Staphylococcus* – proteína do domínio GGDEF de *Staphylococcus*) é uma proteína estafilocócica descrita por Holland e cols. (2008) que mostrou aumentar a produção de biofilme, a expressão de *icaADBC* e a produção de PIA em meio suplementado com cloreto de sódio. A expressão de *icaR*, bem como de outros reguladores (*SarA*, *TcaR*, and *LuxS*) não foi afetada por esta proteína, mas o modo como se dá a regulação da expressão de *icaADBC* não ficou claramente compreendido pelos autores.

### 1.5 Biofilmes PIA-independentes

Cucarella e cols (2001) foram os primeiros pesquisadores a sinalizar para a possibilidade de existência de formação de biofilme por um mecanismo *ica* independente. Como anteriormente mencionado, estes autores identificaram em amostras de *S. aureus* implicadas em casos de mastite bovina uma proteína de superfície denominada Bap, que se mostrou envolvida não só no processo de adesão primária a superfícies abióticas, como também na segunda etapa da formação do biofilme, onde a adesão intercelular desempenha importante papel. Assinala-se nesse caso, portanto, uma diferença relacionada à atuação do produto do operon *ica*, já que este não intervém na etapa primária da formação do biofilme.

Com base na constatação de que amostras de *S. aureus* portadoras do gene *bap* são produtoras fortes de biofilme, Tormo e cols. (2005b) investigaram a capacidade de produção de biofilme de amostras de *S. epidermidis* isoladas de casos de mastite de ovinos e caprinos, além de isolados de portadores humanos. Adicionalmente, várias outras espécies de ECNs foram analisadas. Nenhuma das amostras humanas e somente 4 isolados de mastite animal apresentaram fenótipo de biofilme forte. Análise por *southern blot* sugeriu a presença de um gene similar ao *bap*

de *S. aureus* em 3 das 4 amostras produtoras, o qual não se mostrou presente em nenhuma das amostras não produtoras investigadas. O gene *bap* de um dos isolados foi clonado e sequenciado, constatando-se que a interrupção deste gene aboliu a capacidade para produzir biofilme, ao passo que a complementação heteróloga com a proteína Bap de *S. epidermidis* em uma amostra de *S. aureus* biofilme-negativa conferiu a esta a capacidade para produzir biofilme. Um achado interessante neste estudo foi a ausência do operon *ica* em todos os estafilococos coagulase negativos-Bap positivos investigados. Outro resultado relatado pelos autores foi a detecção da proteína Bhp em isolados humanos de *S. epidermidis*. Ao pesquisarem bancos de dados com o genoma de eubactérias em busca de sequências de homologia com a proteína Bap de *S. aureus*, os autores encontraram em *S. epidermidis* RP62A, uma amostra produtora forte de biofilme PIA-dependente, uma proteína semelhante à Bap, a qual denominaram de Bhp. Um relato adicional sobre a presença do gene *bhp* em isolados humanos de *S. epidermidis* foi feito por Bowden e cols (2005), envolvendo tanto amostras clínicas quanto colonizadoras de pele.

Outra evidência de formação de biofilme PIA-independente foi obtida por Rohde e cols. (2005), ao estudarem uma amostra de *S. epidermidis* isolada de um caso de infecção persistente de cateter de derivação liquórica. Este isolado revelou fenótipo biofilme-negativo em decorrência da presença do elemento de inserção IS257, inserido na posição bp1301 do gene *icaA*, que suprimia a transcrição do operon *icaADBC*. Durante esta investigação os autores obtiveram uma amostra revertente que apresentou fenótipo biofilme-positivo, apesar da presença do IS257 inserido na mesma posição da amostra parental. No biofilme produzido por essa amostra não foi detectada imunologicamente a presença de PIA, nem obtida a sua desagregação pelo metaperiodato de sódio, um agente químico que atua sobre polissacarídeos. Estudos complementares mostraram que o biofilme formado pela amostra revertente sofreu desagregação com proteinase K, indicando sua natureza proteica. A análise das proteínas de superfície da amostra, com SDS-PAGE, revelou a presença de uma proteína de 140 kDa, similar a uma proteína descrita anteriormente por Hussain e cols. (1997), denominada de Aap, e que estaria envolvida na etapa de acumulação bacteriana.

Segundo Rohde e cols. (2005), Aap requer processamento proteolítico por proteases de estafilococos para obter a função adesiva, uma vez que a adição de  $\alpha$ -

2-macroglobulina, um inibidor de protease de amplo espectro, determinou inibição da formação de biofilme.

Ao lado da proteína Aap, merece também destaque na formação de biofilme em *S. epidermidis* o papel da Embp, uma proteína gigante (1 MDa) que se liga à fibronectina, participando assim do processo de aderência primária do micro-organismo. Adicionalmente, Embp atua na fase de acumulação do biofilme, uma vez que, tal como a PIA e Aap, apresenta a propriedade de promover adesão intercelular.

A evidência inicial da atuação de Embp como adesina intercelular proteica, com capacidade para, por si só, mediar a formação de biofilme, foi encontrada por Christner e cols. (2010). Estes autores obtiveram uma variante de *S. epidermidis* biofilme positiva (1585v), a partir de um isolado clínico operon *ica* negativo / *aap* negativo (1585), cujo biofilme era facilmente degradado pelo tratamento com proteinase K, mas não com dispersina B, um agente degradador de PIA. A inserção de elementos transponíveis no gene *embp* da amostra 1585v permitiu o isolamento de mutantes com expressão negativa para produção de biofilme e, reforçando este achado, antisoro específico anti Embp inibiu a formação de biofilme em *S. epidermidis* 1585v. Por outro lado o tipo selvagem 1585 formou biofilme após indução da expressão de Embp pela adição de 25% de soro de cabra no meio de cultura, enquanto um mutante correspondente Embp-negativo permaneceu como não produtor de biofilme.

## 1.6 FATORES DE VIRULÊNCIA PRESENTES NO BIOFILME E OUTROS POTENCIAIS DETERMINANTES DA VIRULÊNCIA DE *S. epidermidis*

Em uma etapa inicial da infecção, previamente à síntese de PIA ou outros produtos estruturantes do biofilme, como já apontado previamente, a participação de componentes que contribuem para a virulência de *S. epidermidis* envolvem fatores como a hidrofobicidade de sua superfície e uma grande diversidade de moléculas que atuam como adesinas. Estes componentes medeiam a aderência do micro-organismo diretamente a polímeros plásticos e/ou proteínas receptoras presentes na matriz extracelular do hospedeiro, e que normalmente revestem a superfície dos dispositivos de poliestireno logo após seu implante. São exemplos destas moléculas adesivas AtlE, Bhp, EmbP, Fbe (SdrG), GehD, Aae, SdrF, Ssp-1 e Ssp-2 (VAN MELLAERT et

al., 2012). Entre estas, convém assinalar que a autolisina AtlE foi descrita também como estando envolvida na internalização de *S. epidermidis* em células endoteliais, o que pode proporcionar a este patógeno nosocomial um novo mecanismo para se evadir do sistema imune do hospedeiro (HIRSCHHAUSEN et al., 2010). Incluem-se ainda no grupo de componentes que medeiam a aderência inicial os ácidos teicóicos (HOLLAND; CONLON; O'GARA, 2011).

Uma vez estabelecida a aderência sobre a superfície de dispositivos médicos de permanência prolongada, a capacidade para produzir um biofilme aderente e altamente organizado, é sem dúvida o processo que mais se destaca entre os componentes envolvidos na virulência de *S. epidermidis*. Na maioria dos casos a PIA é encontrada como o principal composto estrutural da matriz do biofilme, determinando, entre outras ações, proteção das bactérias contra a fagocitose por leucócitos polimormonucleares e contra a ação de peptídeos antimicrobianos do hospedeiro.

O mecanismo de proteção da PIA aos mecanismos da resposta imune inata foi atribuído à natureza catiônica desse polissacarídeo quando deacetilado, o que é importante não somente para as interações intercelulares bacterianas, mas também por promover uma barreira mecânica que inibe ação de células fagocitárias e bloqueia a passagem de peptídeos antibacterianos. Amostras *ica* negativas de *S. epidermidis* mostraram aumentada sensibilidade para leucócitos e peptídeos antimicrobianos catiônicos da pele (LL37, 3-defensina  $\beta$  e dermicidina). Suscetibilidade comparável foi detectada em mutantes *icaB* negativos de *S. epidermidis*. A proteção contra peptídeos antibacterianos catiônicos provavelmente está baseada, em parte, na repulsão eletrostática, mas mesmo o peptídeo aniônico dermicidina pode ser aprisionado e inativado dentro da rede catiônica de PIA (VUONG et al., 2004b).

Já a ação dos neutrófilos é contida por sua imobilização no biofilme estafilocócico, de modo que a fagocitose ocorre somente para células bacterianas na vizinhança imediata destes fagócitos (GUENTHER, 2009). Nestas condições, Kristian e cols. (2008) apontaram que, apesar de uma maior ativação do sistema complemento, existe uma menor deposição de C<sub>3b</sub>, assim como de IgG, na superfície das bactérias dentro da matriz do biofilme, o que as protege da morte por polimorfonucleares.

Além da PIA, outro exopolímero associado à virulência de *S. epidermidis* é o ácido poli- $\gamma$ -DL-glutâmico (PGA), um pseudopeptídeo aniônico extracelular que foi

originalmente descrito em bactérias como *Bacillus anthracis*, *Leptospira interrogans* e *Fusobacterium nucleatum* (KAPATRAL et al., 2002, REN et al., 2003). Em *B. anthracis* o PGA é considerado um importante fator de virulência antifagocítico (KOEHLER, 2009).

A possibilidade de produção deste polímero em *S. epidermidis* foi detectada por estudos de sequenciamento realizados por Gill e cols. (2005) que, surpreendentemente, revelaram em uma ilha genômica de *S. epidermidis* RP62A e *S. epidermidis* American Type Culture Collection (ATCC) 12228 a presença do operon *capBCAD*, que codifica a síntese do PGA. A presença deste operon em *S. epidermidis* foi atribuída à transferência de genes mediada por plasmídio, a partir do *B. anthracis*.

Kocianova e cols. (2005) mostraram que o PGA protegeu eficientemente *S. epidermidis* contra peptídeos antimicrobianos e da fagocitose por neutrófilos, ambos componentes-chave do sistema imune inato, além de se mostrar indispensável para a persistência do micro-organismo em infecção experimental em cateteres implantados subcutaneamente. Adicionalmente, foi demonstrado que o PGA protegia *S. epidermidis* contra altas concentrações de cloreto de sódio, uma das adversidades enfrentadas pela bactéria no seu ambiente natural, a pele humana.

Na etapa de acumulação, além da especial atuação da PIA que propicia evasão da resposta imune do hospedeiro, outros produtos estruturantes nesta fase de formação do biofilme podem atuar com a mesma função. Christner e cols. (2010) demonstraram que a formação de biofilme mediada por Embp protegeu *S. epidermidis* da fagocitose por macrófagos, o que indica um papel multifuncional desta proteína de superfície, permitindo a ligação a receptores na matriz extracelular do hospedeiro e na superfície de dispositivos de implantes, acumulação do biofilme, e evasão da resposta imune. Schommer e cols. (2011) mostraram também que biofilme formado por Aap protegeu *S. epidermidis* da fagocitose por células macrofágicas de camundongo com eficiência similar aos biofilmes de PIA ou Embp.

Em contraste com o vasto repertório de toxinas de *S. aureus*, a produção de toxina por *S. epidermidis* é limitada principalmente às PSMs (OTTO, 2009). Estas moléculas, como já descrito na seção 1.2.3 (etapa de dispersão do biofilme), consistem em um grupo de peptídeos anfipáticos solúveis em fenol, que apresentam atividade pró-inflamatória, e por vezes, função citolítica. Com exceção de cepas naturalmente *agr* disfuncionais, todas as amostras de *S. epidermidis* produzem PSMs.

Uma PSM de *S. epidermidis* a ser destacada é a  $\delta$ -toxina (também chamada PSM $\gamma$ ), um peptídeo de 24 aminoácidos, que difere do seu homólogo de *S. aureus* apenas na posição de um aminoácido, e que tem sido sugerido como envolvido na enterocolite necrotizante neonatal (SCHEIFELE et al., 1987).

Embora algumas PSMs de *S. epidermidis* estejam relacionadas com as congêneres de *S. aureus*, estas últimas apresentam pronunciada capacidade para lisar neutrófilos humanos (WANG et al., 2007), enquanto a  $\delta$ -toxina seria moderadamente citolítica. Assim, o padrão de produção de PSMs, em adição à ausência geral de toxinas altamente agressivas em *S. epidermidis*, contrasta com o elevado potencial citolítico de *S. aureus*, o que dá sustentação ao modelo proposto por Massey e cols. (2006), referente a uma vantagem evolutiva para a baixa agressividade de *S. epidermidis*.

A comparação anterior referente a toxinas, estabelecida entre *S. aureus* e *S. epidermidis*, de certo modo, também pode ser estendida para exoenzimas. Entre as enzimas com potencial de virulência relatadas em *S. epidermidis* podem ser destacadas as proteases SepA, que degradam peptídeos antimicrobianos humanos, e Esp, que degrada fibrinogênio e o fator C<sub>5</sub> do complemento. Foi relatada ainda uma enzima modificadora de ácidos graxos (FAME - *Fatty-acid modifying enzyme*), capaz de atuar sobre ácidos graxos prejudiciais ao micro-organismo (OTTO, 2012).

## 1.7 MÉTODOS DE ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILMES

Existe uma grande diversidade de procedimentos metodológicos *in vivo* e *in vitro* para o estudo de biofilme, os quais podem ser complementados por métodos moleculares (MCLANDBOROUGH et al., 2006, LEBEAUX et al., 2013). Os procedimentos para detecção de biofilmes incluem:

- a) Métodos Microscópicos, os quais se baseiam na análise direta de imagens de biofilme geradas por diferentes tipos de microscopia (eletrônica de transmissão ou de varredura, confocal de varredura a laser e de epifluorescência);

- b) Métodos Dinâmicos, que empregam sistemas de crescimento do tipo “fed-batch”, desenvolvimento de biofilme em reatores capilares, reatores de fluxo celular, e outros reatores similares;
- c) Estudo de Biofilmes em Microcosmos e Modelos *In Vivo*;
- d) Sistemas Estáticos, onde o desenvolvimento do biofilme é feito sobre membranas de policarbonato, no sistema *BioFilm Ring Test* e pelos métodos em tubo e da placa de microtitulação de poliestireno (MTP);
- e) Cultivo em Ágar Vermelho Congo (AVC), onde são analisadas as reações das bactérias no meio de cultura.

Os métodos estáticos, por sua praticidade, apresentam ampla aceitação e utilização, destacando-se, entre estes, o MTP. Outro método rotineiramente utilizado é o do cultivo em AVC.

#### 1.7.1 Método da placa de microtitulação de poliestireno

O teste de produção de biofilme em placa de microtitulação foi proposto originalmente por Christensen e cols. (1985), ao verificarem que esta técnica apresentou desempenho muito superior ao método qualitativo do tubo, desenvolvido anteriormente pela mesma equipe (CHRISTENSEN et al., 1982). Inúmeras modificações foram introduzidas na técnica, sendo estas consolidadas e avaliadas por Stepanović e cols. (2007).

A relativa simplicidade e custo acessível, a obtenção de resultados quantitativos e desempenho favorável quando comparado com outros métodos, faz com que a técnica da placa de microtitulação seja apontado por muitos investigadores que trabalham rotineiramente com biofilme como o método padrão-ouro (HASSAN et al., 2011, LOS et al., 2010, MATHUR et al., 2006).

### 1.7.2 Método do cultivo em Ágar Vermelho Congo

O vermelho congo é um corante ácido aniônico, quimicamente constituído por um sal sódico do ácido benzidinodiazó-bis-1-naftilamina-4-sulfônico. Por sua forte afinidade de ligação a fibras de celulose já foi muito utilizado na indústria de tingimento de produtos à base de celulose. Porém, apresenta significativa toxicidade, sendo considerado um produto com potencial carcinogênico, além de determinar outras manifestações prejudiciais à saúde (YANEVA; GEORGIEVA, 2012). Apesar disso, o corante ainda apresenta diferentes aplicações na área médica e de pesquisa, como por exemplo, no diagnóstico histopatológico da amiloidose, uma vez que emite uma característica birrefringência de tonalidade verde ao exame em luz polarizada ao se ligar à proteína amiloide presente nesta doença (FALK; COMENZO; SKINNER, 1997).

Adicionalmente, o vermelho congo tem sido utilizado em investigações de tipagem e patogenicidade de diferentes tipos de bactérias (MAURELLI; BLACKMON; CURTISS, 1984, BERKHOFF; VINAL, 1986, QADRI et al., 1988, NUNES; HOFER, 1994, PEREIRA et al., 2014).

O método do AVC para a pesquisa de biofilme foi proposto por Freeman, Falkiner e Keane (1989), em estudo com estafilococos coagulase negativos, como uma alternativa ao método do tubo elaborado por Christensen e cols. (1982). Este teste qualitativo foi descrito pelos autores como de fácil execução, rápido, sensível e reprodutível, apresentando como uma das vantagens adicionais o fato das colônias permanecerem viáveis no meio.

O teste se baseia no cultivo das amostras em BHI (*Brain Heart Infusion* – Infusão de Cérebro e Coração) adicionada de ágar, sacarose e do corante vermelho congo. A interpretação das reações das colônias que se desenvolvem no meio de cultura leva em conta a morfologia (aspecto liso ou rugoso) e coloração (variações do rosa ao preto) (FREEMAN; FALKINER; KEANE, 1989, ARCIOLA et al., 2002).

A adição de substâncias que potencialmente induzem a produção de biofilme pelas bactérias quando crescidas no meio de cultura, como a vancomicina e o cloreto de sódio e de cálcio, substituição da sacarose por glicose e diferentes atmosferas de incubação já foram avaliadas como modificações ao método originalmente proposto (KAISER et al., 2010, MARIANA et al., 2009)

Embora o mecanismo envolvido nas reações das colônias não seja completamente conhecido, acredita-se que as alterações na morfologia e tonalidade do cultivo sejam resultantes da ligação do corante ao exopolissacarídeo bacteriano, cuja produção é intensificada pelo suplemento nutricional do meio (FREEMAN; FALKINER; KEANE, 1989). A grande correlação da positividade do teste em AVC com a detecção da presença do operon *ica* reforçaria esta hipótese (ARCIOLA; BALDASSARRI; MONTANARO, 2001, ARCIOLA et al., 2002, 2005, LOS et al., 2010, OLIVEIRA; CUNHA, 2010).

Há que se considerar, porém, a existência de amostras produtoras de biofilme de outra natureza que não a polissacarídica (PIA-independente), e que, portanto, não seriam detectadas como positivas pelo teste molecular para pesquisa de genes do operon *ica*, ou pelo teste em AVC.

## 1.8 INFLUÊNCIA DE FATORES AMBIENTAIS E NUTRICIONAIS DA PRODUÇÃO DE BIOFILME

Além dos fatores genéticos que determinam e regulam a formação de biofilme em *Staphylococcus*, esta expressão também é influenciada por uma diversidade de fatores ambientais e nutricionais. Entre estes, pode-se destacar o aumento da concentração de glicose no meio (RACHID et al., 2000, CONLON; HUMPHREYS; O'GARA, 2002), a osmolaridade (RACHID et al., 2000, KNOBLOCH et al., 2001), limitação de oxigênio (CRAMTON et al., 2001), temperatura (RACHID et al., 2000), presença de heparina (SHANKS et al., 2005), concentração de ferro (DEIGHTON; BORLAND, 1993), exposição a concentrações sub-inibitórias de certas drogas antimicrobianas (RACHID et al., 2000) e baixas concentrações de alcóois (KNOBLOCH et al., 2002).

A ação indutora da produção de biofilme por fatores ambientais ou nutricionais decorre, em muitos casos, de sua atuação como agente promotor de estresse, determinando, por diferentes caminhos de ativação, aumento da expressão do operon *ica* (KNOBLOCH et al., 2001, CONLON; HUMPHREYS; O'GARA, 2002). Porém, algumas investigações apontam que o efeito de fatores ambientais estimuladores da produção de biofilme pode ocorrer também em amostras desprovidas do operon

*icaADBC*. Agarwal e Jain (2013) observaram, por exemplo, que a suplementação do meio de cultura com cloreto de sódio e/ou glicose aumentou significativamente a produção de biofilme em diferentes espécies de *Staphylococcus* de procedência clínica, sendo que, além dos isolados *ica* positivos, algumas amostras *ica* negativas converteram-se em produtoras de biofilme em pelo menos uma das condições testadas.

A estimulação da produção de biofilme por agentes causadores de estresse é complexa e envolve múltiplas variáveis. Um dos agentes que exerce papel chave na resposta ao estresse ambiental em *Staphylococcus* é o fator alternativo  $\sigma^B$ . Esse fator não responde diretamente aos sinais ambientais, sendo ativado por transdução de sinais em resposta a situações como alta temperatura, osmolaridade, antibióticos, ou extremos de pH. No controle da formação de biofilme por *S. epidermidis*, além de  $\sigma^B$ , é também importante como regulador global de resposta ao estresse a participação de RsbU, uma vez que este atua como um regulador positivo de  $\sigma^B$  (KNOBLOCH et al., 2001).

Embora a maioria dos estudos seja referente ao papel de  $\sigma^B$  como agente indutor da ativação do operon *ica*, deve-se levar em consideração o fato de que este fator sigma também pode ativar a formação de biofilme por via *ica*-independente (LAUDERDALE et al., 2009).

Além do papel indutor exercido por reguladores como  $\sigma^B$  na formação de biofilme por *S. epidermidis*, outro fator que pode influenciar esta expressão é o estado metabólico da célula. Particularmente, isto diz respeito à atuação de certos agentes determinadores de estresse que podem atuar promovendo a inibição do ciclo dos ácidos tricarbóxicos. Consequentemente, esta inibição pode acarretar o aumento da expressão do operon *ica* e da produção de biofilme (VUONG et al., 2005). Tais eventos podem contar com a participação da proteína A de controle de catabólitos (CcpA - *Catabolite control protein A*), que atua como um efetor positivo para transcrição de *icaADBC* e como repressor do ciclo dos ácidos tricarbóxicos (SADYKOV et al., 2011).

## 1.9 PRODUTOS ANTISSÉPTICOS

Os produtos antissépticos são rotineiramente utilizados nos estabelecimentos de assistência à saúde com objetivo de controlar a transmissão de micro-organismos, objetivando, particularmente, eliminar ou restringir o crescimento dos micro-organismos na pele e mucosas. Tais produtos possuem constituintes com atividade antimicrobiana intrínseca, sendo os mais frequentemente utilizados os álcoois, clorexidina, iodóforos, compostos quaternários de amônio e triclosan (O'GRADY et al., 2002). Sua utilização comumente está voltada para procedimentos como antisepsia da pele das mãos ou no preparo pré-operatório da pele de sítios cirúrgicos, assim como das mãos e antebraços da equipe cirúrgica envolvida em procedimentos invasivos que determinam a perfuração de pele e mucosas. Adicionalmente, seu emprego é necessário quando ocorre o contato com tecidos estéreis, em procedimentos invasivos como punções venosas e arteriais, cateterismo vascular e vesical, ou qualquer outro onde haja a ruptura das barreiras normais de defesa do indivíduo (PADOVANI, 2008).

A clorexidina é uma biguanida catiônica, que possui atividade microbicida e ação microbiostática residual importante. Geralmente é apresentada na concentração de 2 a 4%, em formulações aquosas ou contendo detergentes (O'GRADY et al., 2002). É um dos biocidas mais amplamente utilizados em produtos antissépticos, em especial na lavagem das mãos, e na forma de produtos enxaguatórios para uso oral. Isto se deve principalmente à sua eficácia como um agente de amplo espectro, boa persistência na pele e baixa capacidade para causar irritações. Sua ação bactericida envolve rápida absorção pelo micro-organismo e ocorrência de danos à membrana celular, o que acarreta perda de constituintes intracelulares. Em concentrações mais elevadas este agente determina precipitação de proteínas e ácidos nucleicos (McDONNELL; RUSSELL, 1999).

O etanol, o isopropanol e o n-propanol estão entre os álcoois mais utilizados em produtos antissépticos, sendo recomendada sua utilização na forma de soluções contendo 60 a 95% (p/p) de álcool. Sua ação é microbicida e rápida, não possuindo ação persistente (residual). Os produtos à base de álcool, de uso hospitalar, estão disponíveis como soluções líquidas com baixa viscosidade, apresentados sob a forma de gel ou espuma (O'GRADY et al., 2002).

Muitos produtos alcoólicos incluem níveis baixos de outros biocidas, em particular a clorexidina, que permanecem sobre a pele após a evaporação do álcool. PVP-I, compostos quaternários de amônio e triclosan, por sua ação microbiostática residual, também comumente compõe estas formulações. Outro componente que pode estar presente são os excipientes (incluindo emolientes) que aumentam o tempo de evaporação do álcool, podendo aumentar significativamente a eficácia do produto (McDONNELL; RUSSELL, 1999).

Com base no aumento da eficácia dos álcoois na presença de água, acredita-se que o modo específico de ação destas substâncias envolva a ocorrência de danos na membrana celular e rápida desnaturação de proteínas, com subsequente interferência no metabolismo e lise de células (McDONNELL; RUSSELL, 1999).

Um aspecto importante referente aos antissépticos é que diferentes investigações têm apontado que, em concentrações não inibitórias, vários destes produtos podem influenciar na produção de biofilme por *S. epidermidis* (KNOBLOCH et al., 2001, KNOBLOCH et al., 2002, MILISAVLJEVIC et al., 2008, HOUARI; MARTINO, 2007, ODUWOLE et al., 2010, CHAIEB et al., 2011).

## 1.10 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM ESTAFILOCOCOS

A emergência e disseminação de cepas de *Staphylococcus* multirresistentes a antimicrobianos nas últimas décadas tem se tornado cada vez mais um sério problema terapêutico, particularmente no que se refere ao tratamento das infecções adquiridas no ambiente hospitalar.

A resistência de *S. aureus* às penicilinas naturais, devido à produção de beta-lactamases, foi observada ainda na década de 1940, pouco tempo após sua introdução na clínica em 1941, como consequência de seu uso continuado. Entre 1944 e 1945 os índices de resistência atingiram taxas de 12% a 22% (MOREIRA; DAUM, 1995), e em 1950 já alcançavam cerca de 30% em amostras hospitalares norte-americanas. A partir daí, a resistência a essas penicilinas mostrou aumento vertiginoso, atingindo valores de cerca de 80% nas amostras hospitalares de *S. aureus* isoladas nos EUA. Durante a década de 1950, na medida em que os índices de resistência às penicilinas naturais iam aumentando, novas drogas foram

introduzidas na prática clínica. A consequência disto foi que, já em 1957, muitas amostras de *S. aureus* apresentavam resistência múltipla envolvendo drogas como penicilina, tetraciclina, estreptomicina, cloranfenicol e eritromicina (SHANSON, 1981).

A necessidade de antimicrobianos alternativos para contornar o problema da resistência mediada por beta-lactamases levou ao desenvolvimento das penicilinas semi-sintéticas. Desse modo, no início dos anos 1960 foi introduzida a metilina, uma droga de primeira geração das penicilinas estáveis à ação de beta-lactamases. A esta, seguiu-se o lançamento de outras drogas penicilinase-estáveis, como a oxacilina que, inclusive, veio a substituir a primeira, devido a sua maior estabilidade em pH ácido, possibilitando a administração tanto por via oral quanto parenteral.

Infelizmente, pouco tempo depois já foram detectadas cepas de *S. aureus* resistentes à metilina e outras penicilinas penicilinase-estáveis (JEVONS, 1961, HOLT; STEWART, 1963). Estas amostras ficaram conhecidas universalmente pelo acrônimo MRSA (*Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus* – *Staphylococcus aureus* resistente à metilina) e, embora a metilina tenha sido substituída na prática terapêutica, esta denominação ainda é utilizada. Aliás, convém ressaltar que há muito tempo vem se empregando a oxacilina para a caracterização fenotípica das cepas MRSA, e não a metilina. O mesmo se aplica às cepas de ECNs.

Tal como ocorre com o *S. aureus*, a resistência à metilina em ECNs se tornou amplamente disseminada entre isolados hospitalares, e particularmente em *S. epidermidis* (MRSE), com ocorrência de um fenômeno denominado de heterorresistência, que também é encontrado em *S. aureus*, no qual apenas uma entre  $10^4$  e  $10^8$  células expressam nível elevado de resistência à metilina (OTTO, 2012, TOMASZ; NACHMAN; LEAF, 1991).

Resistência a drogas como aminoglicosídeos e macrolídeos, e, em menor medida, à tetraciclina, cloranfenicol e clindamicina, frequentemente são também observadas nas cepas de *S. epidermidis* causadoras de IRAS. Em relação a drogas mais recentes, como linezolida e estreptograminas, as taxas de resistência têm sido baixas (OTTO, 2012), e para daptomicina ou tigeciclina, embora já detectadas (BRZYCHCZY-WLOCH, 2013), ainda são raras.

A emergência e ampla disseminação mundial das cepas MRSA e de ECNs resistentes à metilina, frequentemente expressando resistência múltipla a outras drogas além das  $\beta$ -lactâmicas, foi um fator determinante para a escolha de antimicrobianos glicopeptídicos (vancomicina e teicoplanina) para o tratamento das

infecções causadas por estes agentes microbianos, uma vez que, até por volta de meados dos anos 1990, estas drogas eram consideradas as únicas disponíveis uniformemente ativas contra os estafilococos multirresistentes. A vigilância para a emergência de resistência dos estafilococos a estas drogas passou então a configurar uma situação estratégica.

Após diferentes relatos sobre o isolamento de amostras de *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina (VISA) em todo o mundo, incluindo o Brasil (HOWDEN et al., 2010), entre os anos 2002 e 2006 foram notificados sete casos de infecções causadas por *S. aureus* com resistência completa à vancomicina (VRSA) (SIEVERT et al., 2008), e em 2014 foi descrito o primeiro caso de resistência completa a esta droga no Brasil, envolvendo um caso de óbito em São Paulo (ROSSI et al., 2014).

Quanto aos ECNs, diferentes casos de isolados com reduzida suscetibilidade a glicopeptídeos foram identificados entre os anos de 1996 e 1999 (CERCENADO et al., 1996, SIERADZKI; VILLARI; TOMASZ, 1998, DEL'ALAMO et al., 1999). Posteriormente, novos relatos de suscetibilidade reduzida a estas drogas neste grupo bacteriano foram publicados (MA et al., 2011, IWERIEBOR et al., 2013), mas amostragens com completa suscetibilidade também foram encontradas (PAIVA et al., 2010).

Embora a evolução para a resistência a glicopeptídeos não venha demonstrando a mesma dinâmica que se observa para *S. aureus*, é interessante notar que o primeiro caso notificado de resistência estafilocócica à vancomicina, em um isolado clinicamente significativo, não se referiu a *S. aureus*, mas a um ECN (*S. haemolyticus*) (SCHWALBE; STAPLETON; GILLIGAN, 1987).

## 1.11 JUSTIFICATIVA

*Staphylococcus epidermidis* é uma bactéria onipresente nos epitélios do homem. Nas últimas décadas, se destacou como o oportunista mais importante e frequente em infecções associadas a implantes de dispositivos médicos, apesar de não dispor de um conjunto de mecanismos de agressão ao hospedeiro comum aos

patógenos clássicos. A relevância médica e a importância do estudo deste micro-organismo se inserem neste cenário de aparente paradoxo.

A capacidade de formar biofilme é apontada como o principal fator responsável pela sobrevivência de *S. epidermidis* às defesas do hospedeiro, não podendo ser desvinculada da crescente multirresistência a antimicrobianos apresentada pela bactéria.

Métodos qualitativos, como o Teste em Ágar Vermelho Congo, e quantitativos, como o Teste em Placa de Microtitulação são empregados na detecção laboratorial da produção de biofilme. Estes métodos, muito utilizados por sua praticidade, possuem princípios de detecção do biofilme diferentes e, quando utilizados conjuntamente, podem apresentar resultados contraditórios. A complementação da investigação da produção de biofilme, com a determinação da sua natureza química e a pesquisa de genes relacionados com sua formação, pode contribuir para uma melhor abordagem desse problema.

Até o momento, o estudo fenotípico e genotípico dos marcadores de virulência de *S. epidermidis* não possibilitou a distinção de amostras tipicamente oportunistas das meramente comunitárias. Evidências de que fatores como concentrações subinibitórias de antissépticos e antimicrobianos, agentes comuns no ambiente hospitalar, podem induzir a formação de biofilme, introduzem uma variável não prevista nos métodos fenotípicos para sua detecção.

Neste contexto, o estudo da formação e natureza química do biofilme, juntamente com a detecção de marcadores de virulência e a expressão dos genes diretamente ligados a estas características, podem contribuir para o entendimento do comportamento desta bactéria, e das estratégias de prevenção e tratamento de infecções causadas por este micro-organismo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar, por meio de métodos fenotípicos e genotípicos, a produção de biofilme por amostras de *S. epidermidis*, provenientes de materiais clínicos, direta ou indiretamente relacionados com implantes de dispositivos médicos, de um hospital federal do Rio de Janeiro com nível de atenção à saúde terciário, buscando correlacionar esta expressão com a presença de potenciais fatores de virulência e resistência a antimicrobianos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar, fenotipicamente e genotipicamente, amostras de *S. epidermidis* isoladas a partir de materiais de hemoculturas e culturas semiquantitativas de catéteres venosos centrais;

- Pesquisar a produção de biofilme nas amostras de *S. epidermidis* empregando um método quantitativo, o teste em placas de microtitulação de poliestireno, e um método qualitativo, o teste em cultivo em Ágar Vermelho Congo;

- Avaliar o desempenho do método da placa de microtitulação, mediante comparação das leituras da Densidade Ótica sem álcool (DOsa) com a da Densidade Ótica do extrato do biofilme (DOeb), visando determinar a sensibilidade do teste para discriminação entre os resultados referentes a diferentes níveis de produção de biofilme;

- Determinar a natureza polissacarídica ou proteica dos tipos de biofilmes produzidos pelas amostras de *S. epidermidis*, através de testes de desagregação com solução de metaperiodato e proteinase K, correlacionado o tipo de biofilme com o seu nível de sua produção;

- Pesquisar a presença dos genes do operon *ica* e do gene *icaR*, correlacionando sua frequência com o fenótipo produtor e não produtor de biofilme, bem como com o nível de produção expresso pelas amostras;

- Determinar a frequência de genes associados à virulência de *S. epidermidis* (*aap*, *bhp*, *embp*, *atlE* e *capB*), bem como dos genes das Transposases das Sequências de Inserção IS256 e IS257, e correlacionar suas presenças com os fenótipos produtor/não produtor de biofilme, nível de produção de biofilme e a presença do operon *ica*;

- Avaliar a frequência de resistência a antimicrobianos nas amostras de *S. epidermidis* e sua correlação com a produção de biofilme, bem como com os determinantes de virulência pesquisados;

- Estudar o efeito da exposição das amostras de *S. epidermidis* a concentrações subinibitórias de etanol e clorexidina na produção de biofilme;

- Por meio da utilização da técnica de PCR quantitativa em tempo real, analisar a expressão dos genes *icaA*, *icaR*, *sarA* e *sigB* nas amostras produtoras de biofilme PIA-dependente, sob ação de concentrações subinibitórias de etanol e clorexidina, assim como de *sarA* e *sigB* nas amostras produtoras de biofilme PIA-independente.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 AMOSTRAS BACTERIANAS

Foram estudadas 52 amostras de *S. epidermidis* isoladas no período de 2011 e 2012, a partir de materiais clínicos de pacientes internados em um hospital de atendimento terciário da rede pública da cidade do Rio de Janeiro.

Quarenta e oito amostras foram isoladas de sangue periférico, a partir de hemoculturas realizadas no sistema BacT / Alert™ (*bioMérieux, Inc., Durham, NC*), e quatro amostras, a partir de pontas de cateteres venosos centrais que apresentaram contagens significativas ( $\geq 100$  ufc), quando analisadas pelo método semiquantitativo de rolagem em placa de ágar sangue (MAKI; WEISE; SARAFIN, 1977).

Após confirmação da identificação em nível de espécie das amostras isoladas, fenotípica e genotipicamente, procedeu-se a conservação em temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  em caldo *Brain Heart Infusion Broth* (BHI, *Oxoid, Hampshire, England*) adicionado de 10% de glicerol (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). No momento da utilização, as amostras foram ativadas por meio de repique para Caldo Triptona de Soja (TSB, *HiMedia, Mumbai, India*), e incubadas a  $35^{\circ}\text{C}$  por 18 h, seguido da confirmação de pureza por semeadura da cultura em Ágar Triptona de Soja (TSA, *HiMedia, Mumbai, India*).

Como controles nos experimentos fenotípicos e genotípicos, quando aplicável, foram utilizadas as cepas de *S. epidermidis* ATCC 12228, não produtora de biofilme, e *S. epidermidis* ATCC 35984 (RP62A), produtora de biofilme PIA-dependente.

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital dos Servidores do Estado, com o número de referência 000.417.

### 3.2 IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE ANTIMICROBIANOS

O sistema Microscan® WalkAway®-96 (*Microscan® WalkAway®-96 System - Dade Behring Inc., West Sacramento, CA 96*) foi utilizado para identificação fenotípica e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de antimicrobianos das amostras incluídas nesse estudo.

Na determinação da CIM, foram testados os seguintes antimicrobianos: amoxicilina / ácido clavulânico (AMC), ampicilina / sulbactam (SAM), ampicilina (AMP), ceftriaxona (CRO), clindamicina (DA), daptomicina (DAP), eritromicina (E), gentamicina (GM), levofloxacina (LVX), linezolid (LZD), a moxifloxacina (MXF), oxacilina (OX), penicilina (P), quinupristina/dalfopristina (SIN), rifampicina (RD), tetraciclina (TE), sulfametoxazol/trimetoprima (SXT) e vancomicina (VA).

### 3.3 MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME EM PLACA DE MICROTITULAÇÃO

A determinação da produção de biofilme pelas amostras estudadas, bem como sua quantificação nas amostras produtoras, foi realizada por meio do método da placa de microtitulação, seguindo as recomendações de Stepanovic e cols. (2007), com pequenas modificações nas etapas de lavagem e coloração-extração. Em vez de 300 µL de tampão fosfato-salina (pH 7,2), como originalmente preconizado, a lavagem dos poços foi feita com 200 µL de água destilada. Além disso, os volumes do corante e do extrator utilizados foram aumentados de 150 µL para 200 µL.

Nos experimentos foram empregadas placas estéreis de poliestireno, com 96 poços, de fundo plano e tampa (*Nunc™ MicroWell™ 96-Well Microplates, cat. 167008, Nunc, Roskilde, Denmark*). Como inóculo, foram utilizadas suspensões bacterianas preparadas a partir da diluição 1/100 em caldo TSB de uma cultura da amostra ativada e crescida por 18 h a 35°C. Três alíquotas de 200 µL da suspensão bacteriana de

cada amostra foram transferidas para poços da placa de microtitulação, sendo esta tampada e incubada a 35°C por 24 h, em aerobiose e condições estáticas.

Após a incubação, o grau de crescimento das amostras foi avaliado pela determinação da densidade óptica (DO) a 620 nm em um leitor de placas de microtitulação (modelo *TP - Reader*, *Thermo Plate Devices*, *China*), sendo o resultado obtido denominado Densidade Óptica da cultura (DOc).

Imediatamente após as leituras da DOc, as culturas da placa de microtitulação foram removidas e os poços foram lavados 3 vezes com 200 µL água destilada, para remoção do material não aderido às paredes dos poços. A placa de microtitulação foi então colocada em posição invertida para a drenagem completa da água de lavagem, sendo, a seguir, adicionados 200 µL de metanol em cada poço, visando à fixação do biofilme eventualmente presente. Após 20 min, o metanol foi removido e a placa de microtitulação foi mantida em temperatura ambiente para secagem. Em seguida, foram colocados 200 µL de solução de cristal violeta de Hucker a 2% em cada poço. Após 15 min de contato, o corante foi removido por meio de inversão da placa de microtitulação, e os poços foram lavados com água destilada corrente. A placa de microtitulação foi então mantida em temperatura ambiente para secagem e, em seguida, a densidade óptica dos poços foi determinada no leitor de placas de microtitulação, sendo os resultados obtidos denominados de Densidade Óptica sem álcool (DOsa).

Após a determinação da DOsa, 200 µL de álcool etílico a 95% (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) foram colocados em cada poço, visando à ressolubilização do corante ligado às células eventualmente presentes no biofilme fixado à parede dos poços. Após 30 minutos à temperatura ambiente, a densidade óptica a 570 nm do extrato alcoólico foi determinada no leitor de placas de microtitulação, sendo os resultados obtidos denominados de Densidade Óptica do extrato do biofilme (DOeb).

Os experimentos foram executados em triplicata e o resultado considerado para as amostras estudadas foi a média dos resultados de 3 experimentos independentes. O controle da reprodutibilidade da metodologia foi realizado com base nos resultados das amostras de referência, *S. epidermidis* (ATCC) 12228 e *S. epidermidis* ATCC 35984.

Por meio da metodologia utilizada, a caracterização da produção ou não de biofilme pelas amostras foi estabelecida com base no valor da Densidade Óptica do “ponto de corte” (DOpc). Quando o resultado da DOsa foi empregado nesta avaliação,

o valor da DO<sub>pc</sub> foi de 0,100, seguindo o recomendado por Stepanovic e cols. (2007). Já para o resultado da DO<sub>eb</sub> utilizado nesta caracterização, a DO<sub>pc</sub> foi determinada a partir da média dos resultados da DO<sub>eb</sub> de 10 experimentos independentes com a amostra de *S. epidermidis* ATCC 12228 (controle não produtor), acrescida de 3 vezes o valor do desvio padrão dos resultados.

As amostras com DO<sub>sa</sub> ou DO<sub>eb</sub> abaixo do “ponto de corte” correspondente foram caracterizados como não produtores de biofilme, enquanto que os que apresentaram resultados superiores ao da DO<sub>pc</sub> foram classificados como produtores.

Com base no valor do ponto de corte as amostras produtoras foram classificadas quanto ao nível de produção de biofilme em fraco, moderado e forte. Foi considerado como nível fraco quando o resultado da DO da amostra foi de até duas vezes o valor da DO<sub>pc</sub>, moderado quando de duas a quatro vezes, e forte quando este resultado foi superior a 4 vezes.

#### 3.4 MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME EM ÁGAR VERMELHO CONGO

O meio AVC, proposto por Freeman, Falkiner e Keane (1989), possibilita a detecção de amostras formadoras de biofilme de natureza polissacarídica, com base nas características apresentadas pelas colônias.

O meio AVC foi preparado pela mistura de uma solução aquosa a 3% de vermelho congo (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) ao meio-base, sendo ambos previamente esterilizados, separadamente, por autoclavação durante 15 min a 121°C. O meio base foi constituído de 37 g do extrato de caldo BHI (*Oxoid, Hampshire, England*), 50 g de sacarose (*Merck, Darmstadt, Germany*), 10 g de ágar (*Agar N°1, Oxoid, Hampshire, England*) e 1 L de água destilada. Após a esterilização do meio-base, seguida de resfriamento a 55°C e adição assepticamente de 27 mL da solução de vermelho congo, o meio foi vertido em placas de Petri estéreis.

A semeadura das placas de meio AVC foi realizada, na forma de *spots*, com 10 µL de culturas crescidas por 24 h a 35°C em caldo TSB. A seguir, as placas semeadas foram incubadas aerobicamente durante 24 h a 35°C, permanecendo, após esse

período, por 24 h à temperatura ambiente. Os resultados do teste foram interpretados com base nas características dos crescimentos desenvolvido no meio de cultura.

As amostras cujos *spots* apresentaram coloração negra e consistência seca foram consideradas como tendo uma reação positiva no teste, enquanto as que se apresentaram vermelhas e lisas foram caracterizadas como negativas. Os crescimentos com coloração vermelha que apresentaram progressivo escurecimento, contudo sem apresentar consistência seca, foram considerados como tendo resultado indeterminado (FREEMAN; FALKINER; KEANE, 1989). Para esta última reação, foi utilizada a denominação *bordeaux*, introduzida por Arciola e cols. (2002) (**ANEXO A**).

### 3.5 TESTE DE DESAGREGAÇÃO DO BIOFILME

A natureza química da matriz extracelular do biofilme formado pelas amostras foi determinada por meio da avaliação de sua degradação ou não com metaperiodato de sódio ou proteinase K. O metaperiodato de sódio é um agente oxidante capaz de quebrar ligações 1-6 de polímeros de glicosamina como a PIA (poli-N-acetil-(1→6)-β-D-glucosamina), sendo, portanto, eficaz na desagregação de biofilmes PIA-dependentes. A proteinase K é uma serina endopetidase de amplo espectro, com especificidade para ligações peptídicas adjacentes ao grupo carboxílico de aminoácidos alifáticos e aromáticos, sendo capaz, assim, de promover a desagregação de biofilmes PIA-independentes, de natureza proteica (KOGAN et al., 2006, QIN et al., 2007).

A metodologia do teste de desagregação de biofilme foi baseada naquela descrita por Kogan e cols. (2006) e assemelha-se a do teste de produção de biofilme em placa de microtitulação, descrito no item anterior. A principal diferença é a inclusão de uma etapa, na qual o biofilme formado no poço tem a sua estabilidade avaliada frente às soluções dos agentes de desagregação. Nessa avaliação, foram empregadas a solução de metaperiodato de sódio a 10 mM (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) preparada em tampão acetato de sódio (50 mM, pH 4,5) (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), e a solução de proteinase K (100 µg mL<sup>-1</sup>, pH 7,5) (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*) preparada em tampão Tris-NaCl (20 mM de Tris - 100 mM de NaCl) (*Tris Base - Hexapur® Amsterdam, Netherlands*; NaCl - Vetec, Rio de Janeiro, Brasil).

Na execução do teste, 200 µL do inóculo bacteriano, preparado pela diluição 1:100 da cultura em caldo TSB, foram distribuídos em 12 poços da placa de microtitulação. Após o crescimento das amostras a 35°C por 24 h, em aerobiose e condições estáticas, as culturas foram removidas e os poços foram lavados com 200 µL de água destilada. Foram colocados então, a cada 3 poços, as seguintes soluções: tampão acetato de sódio, solução de metaperiodato de sódio, tampão Tris-NaCl e solução de proteinase K. A placa de microtitulação foi incubada a 35°C por 2 h e, após esse período, os poços foram lavados duas vezes com 200 µL de água destilada. Em seguida, procedeu-se a fixação com metanol por 20 min, seguido de remoção do agente fixador, coloração com solução de cristal violeta de Hucker a 2% por 15 min, e lavagem dos poços com água destilada corrente. Após secagem em temperatura ambiente, foram adicionados 200 µL de etanol em cada poço, sendo as placas mantidas em temperatura ambiente por período de 30 min. A densidade óptica a 570 nm do extrato alcoólico foi então determinada no leitor de placas de microtitulação.

Os experimentos foram realizados em triplicata e a interpretação dos resultados foi feita por meio de comparação da média dos resultados da DO dos poços tratados com o agente de desagregação com a média dos resultados dos poços tratados com os tampões correspondentes utilizados no preparo das soluções dos agentes desagregantes. Uma redução igual ou superior a 50% foi indicativa de biofilme dependente de polissacarídeo quando determinada pelo metaperiodato de sódio, e de biofilme dependente de proteína, no caso da proteinase K.

### 3.6 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DAS AMOSTRAS

#### 3.6.1 Extração do DNA

O DNA, das amostras de origem clínica e das amostras de referência, utilizado nas reações em cadeia da polimerase (PCR) para caracterização genotípica das bactérias foi extraído pela técnica do choque térmico (NININ et al., 2006).

Uma suspensão bacteriana com turbidez equivalente ao tubo de valor 1,0 da escala de McFarland foi preparada em água ultrapurificada estéril, a partir de colônias crescidas em TSA por 24 h a 35°C. A seguir, 600 µL dessa suspensão foram

transferidos para um microtubo com capacidade de 1,5 mL e, após centrifugação a 12.000 *xg* por 5 min a 4°C, o sobrenadante da suspensão foi descartado e as células sedimentadas ressuspensas em 200 µL de água ultrapurificada estéril. O microtubo foi mantido, então, por 5 min em banho-maria com água em ebulição e, em seguida, por 5 min em banho de gelo. A suspensão foi então novamente centrifugada a 12.000 *xg* por 5 min a 4°C, visando à remoção dos debris celulares. Três alíquotas de 50 µL do sobrenadante contendo o DNA bacteriano foram transferidas para microtubos de 0,6 mL, os quais foram mantidos congelados em freezer a -20°C até sua utilização.

### 3.6.2 Identificação molecular das amostras

A análise molecular das amostras foi realizada pelo emprego da técnica de PCR, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores para o fragmento de DNA genômico de 705 pb específico da espécie *S. epidermidis* (FDGESe), descrito por Martineau e cols. (1996). Os oligonucleotídeos iniciadores, a temperatura de anelamento e o tamanho dos produtos amplificados na reação estão descritos na **tabela 1**.

### 3.6.3 Condições de amplificação da técnica de PCR simples

As reações de amplificação dos fragmentos gênicos das amostras pela técnica de PCR foram feitas com emprego do reagente *Taq DNA polimerase Ampliqon 2x Master Mix* (*Ampliqon A/S, Denmark*). Este reagente é composto por Tris-HCl (pH 8,5), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,2 U/µL de Taq DNA polimerase, 0,4 mM de cada dNTP, 0,2% de Tween 20 e MgCl<sub>2</sub> para um concentração final de 1,5 mM. As misturas de reação foram preparadas para um volume final de 25 µL contendo 12,5 µL do reagente *Taq DNA polimerase Ampliqon 2x Master Mix*, 2 µL da mistura dos oligonucleotídeos iniciadores (10 mM), 1 µL de DNA bacteriano e 9,5 µL de água ultrapurificada estéril.

As misturas de reação foram submetidas à amplificação em um termociclador *LifePro* (*Hangzhou Bioer Technology Co., China*). O equipamento foi programado para desenvolver um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos

de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento por 1 min nas temperaturas de cada oligonucleotídeo iniciador especificadas na **tabela 1**, extensão a 72°C por 1 min, e um ciclo final de extensão a 72°C por 5 min.

A análise dos produtos da PCR foi realizada através de eletroforese em gel de agarose padrão de baixa eletroendosse (*Agargen, Hispanagar S.A., España*) a 1,5% em tampão tris-borato-EDTA (TBE) 0,5 X (TBE 1 X = 0,089 M Tris, 0,089 M ácido bórico, 0,002 M EDTA, pH 8,0) (*Tris base, boric acid, EDTA - Hexapur® Amsterdam, Netherlands*). A mistura termociclada foi misturada com tampão de carregamento (6 X *Bromophenol Blue/Xylene Cyanol DNA Loading Dye, Norgen, Biotek Corp, Ontario, Canada*) e solução 1:500 de GelRed™ (*Biotium Inc., Hayward, CA, USA*), aplicada no gel de agarose e submetida a uma corrente elétrica de 100 V por 30 a 45 min, dependendo do tamanho do produto amplificado. Após a eletroforese, procedeu-se a visualização dos produtos amplificados por meio de um fotodocumentador (L-PIX, Loccus Biotecnologia Ltda, São Paulo, Brasil) com transiluminação por luz UV, sendo o tamanho dos produtos amplificados estimados por comparação com marcador de tamanho de DNA de 100 a 1500 pb (*100 bp DNA Ladder, Invitrogen™ -Life Technologies, Canada*). Em todas as reações realizadas, foi incluído um controle negativo, no qual o DNA bacteriano foi substituído por igual volume de água ultrapurificada estéril.

#### 3.6.4 Detecção de genes relacionados à virulência das amostras

A técnica de PCR simples foi utilizada na detecção dos genes do operon *ica* (*icaA, icaD, icaB e icaC*), do seu gene regulador *icaR*, do gene codificador da transposase dos elementos de inserção *IS256* e *IS257*, e dos genes codificadores das proteínas Aap, AtlE, Bhp e Embp, assim como do gene *cap* codificante de PGA. Os oligonucleotídeos iniciadores, a temperatura de anelamento da técnica de PCR e o tamanho dos produtos amplificados na reação empregados nas reações também estão descritos na **tabela 1**.

Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores, temperatura de anelamento e tamanho dos produtos amplificados dos genes envolvidos no estudo e analisados através da técnica de PCR simples

<b>Elemento Pesquisado</b>	<b>Sequência do Oligonucleotídeo Iniciador (5'→3')</b>	<b>Temperatura de Anelamento</b>	<b>Produto Amplificado (pb)</b>	<b>Referência</b>
<b>FDGESe</b>	ATCAAAAAGTTGGCGAACCTTTTCA CAAAGAGCGTGGAGAAAAGTATCA	55°C	124	MARTINEAU et al., 1996
<b><i>icaA</i></b>	GACCTCGAAGTCAATAGAGGT CCCAGTATAACGTTGGATACC	60°C	814	ZIEBUHR et al., 1999
<b><i>icaB</i></b>	ATGGCTTAAAGCACACGACGC TATCGGCATCTGGTGTGACAG	59°C	526	
<b><i>icaC</i></b>	ATAAACTTGAATTAGTGTATT ATATATAAACTCTCTTAACA	45°C	989	
<b><i>icaD</i></b>	AGGCAATATCCAACGGTAA GTCACGACCTTTCTTATATT	59°C	371	DE SILVA et al., 2002
<b><i>icaR</i></b>	TAATCCCGAATTTTTGTGAA AACGCAATAACCTTATTTTCC	54°C	469	ARCIOLA et al., 2004

Tabela 1(cont.) - Oligonucleotídeos iniciadores, temperatura de anelamento e tamanho dos produtos amplificados dos genes envolvidos no estudo e analisados através da técnica de PCR simples

<b>Elemento Pesquisado</b>	<b>Sequência do Oligonucleotídeo Iniciador (5'→3')</b>	<b>Temperatura de Anelamento</b>	<b>Produto Amplificado (pb)</b>	<b>Referência</b>
<b><i>aap</i></b>	AAACGGTGGTATCTTACGTGAA CAATGTTGCACCATCTAAATCAGCT	60°C	150	ROHDE et al., 2004
<b><i>bhp</i></b>	ATGGTATTAGCAAGCTCTCAGCTGG AGGGTTTCCATCTGGATCCG	61°C	466	
<b><i>embp</i></b>	AGCGGTACAAATGTCAATATC AGAAGTGCTCTAGCATCATCC	52°C	455	WILLIAMS et al., 2002
<b><i>atIE</i></b>	CAACTGCTCAACCGAGAACA TTTGTAGATGTTGTGCCCCA	55°C	682	ROHDE et al., 2004
<b><i>capB</i></b>	CATGAAGCTGAGAATGCACTTGTATT CTATCCCTTCTATGAATTCCGCTATT	56°C	85	KOCIANOVA et al., 2005
<b>Transposase do IS256</b>	TGAAAAGCGAAGAGATTCAAAGC ATGTAGGTCCATAAGAACGGC	52°C	1102	ZIEBUHR et al., 1999
<b>Transposase do IS257</b>	CTATCTAAGATATGCATTGAG TTAACTTGCTAGCATGATGC	51°C	576	GU et al., 2005

### 3.7 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DE ANTISSÉPTICOS NA PRODUÇÃO DE BIOFILME

O método de determinação da produção de biofilme em placa de microtitulação foi utilizado para avaliar a influência dos antissépticos (etanol e clorexidina) na formação de biofilme pelas amostras estudadas.

Cada linha da placa de microtitulação foi dividida em três setores, com quatro poços cada um. Suspensões bacterianas preparadas pela diluição 1:100 de uma cultura da amostra bacteriana, ativada e crescida por 18 h a 35°C em TSB, foram preparadas em TSB (condição controle) e TSB adicionado dos antissépticos (condição teste). O meio de cultura foi adicionado de 2 e 4% de etanol absoluto (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) (KNOBLOCH et al., 2002) ou de clorexidina (*Smaart Pharmaceutticals, Jalgoan, India*) (HOUARI; DI MARTINO, 2007), sob a forma de digluconato de clorexidina, nas concentrações de 0,5 e 1,0 µg/mL. Volumes de 200 µL de TSB e do meio adicionado dos antissépticos foram transferidos para os poços de cada setor da microplaca. As etapas seguintes do teste seguiram o protocolo descrito no método de determinação da produção de biofilme em placa de microtitulação.

Os resultados da DO<sub>sa</sub> e da DO<sub>eb</sub> nas condições controle e de teste foram determinados por meio do cálculo da média dos resultados dos 4 poços de cada setor da placa de microtitulação. A influência dos antissépticos testados na produção de biofilme das amostras testadas foi avaliada com base na variação percentual entre os resultados da DO<sub>sa</sub> e da DO<sub>eb</sub> obtidos nos cultivos em caldo TSB, em comparação aos resultados do meio adicionado de antisséptico.

As amostras que apresentaram aumento da produção de biofilme, induzido pelos antissépticos estudados, foram submetidas novamente ao teste de desagregação do biofilme descrito na seção 3.5. Neste teste, o meio de cultura empregado foi adicionado da concentração de antisséptico que determinou os maiores aumentos na DO<sub>sa</sub> e/ou DO<sub>eb</sub> da amostra, com objetivo de verificar se a composição química do biofilme formado sob indução do antisséptico permaneceu similar à observada na condição controle.

## 3.8 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA PELA TÉCNICA DE PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL

### 3.8.1 Extração do RNA total

A extração do RNA total para ser empregado nos experimentos de PCR Quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR) foi realizada com base no método do fenol-clorofórmio a 70°C descrito por Atshan e cols. (2012). Após ativação e confirmação de pureza, realizada como descrito na seção 3.1, a amostra foi repicada em TSB e incubada a 35°C por 18 h. A cultura foi então diluída 1/100 em TSB, ou em TSB adicionado de antisséptico. Volumes de 3 mL da cultura diluída foram distribuídos em tubos 13 x 100 mm estéreis e incubados a 35°C por 16 h. Os antissépticos foram adicionados ao TSB imediatamente antes da sua inoculação e as concentrações utilizadas foram de 1% de etanol ou 0,25 µg de clorexidina. Em experimentos prévios, estas concentrações foram determinadas como sub-inibitórias para as amostras estudadas com base na DO do crescimento nas condições de teste.

Para extração do RNA total, a cultura foi agitada vigorosamente em um agitador mecânico, após o que 1 mL da cultura foi transferido para um microtubo, de fundo cônico e capacidade de 1,5 mL, que foi centrifugado a 8000  $xg$  por 3 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado por inversão do tubo e a massa de células ressuspensa em 100 µL de água ultrapurificada tratada com 0,1% de dietilpirocarbonato (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*) (Água-DEPC). O microtubo foi então agitado vigorosamente por 3 min e em seguida foram adicionados à suspensão bacteriana, 100 µL de uma mistura 1:1 de fenol ácido saturado com tampão citrato (pH 4,3) (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*) e clorofórmio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) saturado com Água-DEPC. O microtubo foi agitado por 1 min e colocado a 70°C por 30 min, sendo agitado por 1 min a cada 5 min. A mistura foi então centrifugada a 12000 $xg$  por 10 min e a fase aquosa transferida para um novo microtubo, sendo adicionada de 200 µL de isopropanol (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) para precipitação do RNA. Após agitação por 3 min, o microtubo foi centrifugado a 12000  $xg$  por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi descartado por inversão do tubo. Um volume de 200 µL de solução de etanol a 70% em Água-DEPC foi transferido para o microtubo que foi centrifugado

a 8000 xg por 5 min a 4°C. Esta etapa de lavagem do RNA precipitado, com a solução de etanol a 70%, foi repetida por mais duas vezes. A solução de etanol foi descartada por inversão do tubo e o seu resíduo completamente removido com o emprego de uma centrifuga a vácuo (*Concentrator Plus, Eppendorf North America, New York, USA*). O RNA extraído foi ressuspensão em 23 µL de Água-DEPC e conservado a -20°C até o momento do uso.

### 3.8.2 Pureza, integridade, quantificação e tratamento do RNA com DNase

A eventual contaminação do RNA total extraído com fenol, por DNA e proteínas foi avaliada espectrofotometricamente pela razão da absorbância a 260/280 e 260/230 nm no sistema NanoDrop2000 (*Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA*). Extratos que apresentaram uma razão 260/280 e 260/230 nm entre 1,80 e 2,00 foram considerados de pureza adequada para a continuidade do experimento.

A integridade do RNA extraído foi avaliada pela visualização das bandas 23S e 16S de RNA em gel de agarose submetido à eletroforese (100 V por 35 min). Para isso, em um gel de agarose (*Agargen, Hispanagar S.A., Espanha*) a 1,4% em TBE 1X, foram aplicados 2 µl do extrato de RNA adicionado de 2 µl solução 1:500 de GelRed™ (*Biotium Inc., Hayward, CA, USA*) e 2 µl de tampão de carregamento, composto por 0,25% p/v de Azul de Bromofenol (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*) e 30% v/v de Glicerol (*Merck, Darmstadt, Germany*) em Água-DEPC. Após a eletroforese, o gel foi observado em um fotodocumentador (L-PIX, Loccus Biotecnologia Ltda, São Paulo, Brasil) com transiluminação de luz UV.

Confirmada a integridade do RNA do extrato, a sua concentração foi determinada utilizando um Kit (*Qubit® RNA BR Assay Kit, Invitrogen, New York, USA*) com leitura da reação em Fluorímetro (*Qubit® 2.0 Fluorometer, Life Technologies Corporation, New York, USA*) seguindo as especificações dos fabricantes.

Para eliminar o DNA eventualmente presente no extrato de RNA, destinado a reação de transcrição reversa, foi empregada DNase I recombinante (*Recombinant DNase I, Ambion®, Life Technologies Corporation, New York, USA*) seguindo as recomendações do fabricante. Um volume contendo 450 ng de RNA do extrato foi transferido para um microtubo de 0,2 mL sendo em seguida adicionados ao extrato

0,1 U de DNase I recombinante, 0,8 µl tampão de reação (*10X DNase I Reaction Buffer, Ambion®*, Life Technologies Corporation, New York, USA) e Água-DEPC na quantidade suficiente para completar 8 µL. A mistura foi incubada a 37°C por 30 min, para potencializar a ação da enzima, e em seguida aquecida a 70°C por 10 min, para inativação da DNase. Esse extrato de RNA tratado com DNase foi então utilizado para a síntese de DNA complementar (cDNA).

### 3.8.3 Síntese de cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA foi feita com o emprego do kit de transcrição reversa (*TaqMan Reverse Transcription Reagents, Life Technologies Corporation, New York, USA*) seguindo as recomendações do fabricante. Para a reação de síntese um volume contendo 450 ng de RNA do extrato de RNA total, tratado com DNase, foi misturado com 1,0 µL de tampão (*10X RT Buffer*), 2,2 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2,0 µL de uma mistura de dNTPs (2,5 mM), 0,5 µL de iniciadores randômicos (50 µM), 0,2 µL de inibidor de RNase (20 U/µL), 0,25 µL de transcriptase reversa (50 U/µL) (*MultiScribe™ Reverse Transcriptase*) e Água-DEPC para um volume final de 10 µL. Em um termociclador (*LifePro, Hangzhou Bioer Technology Co., China*), a mistura foi incubada por 10 min a 25°C, seguidos de 30 min a 48°C e 5 minutos a 95°C, sendo então armazenada a -20°C até o momento do uso.

### 3.8.4 Técnica de PCR quantitativa em tempo real

A técnica de qRT-PCR foi utilizada para análise da expressão dos genes *icaA*, *icaR*, *sarA* e *sigB* nas amostras EP48, EP54 e EP40 que apresentavam, respectivamente, níveis fraco, moderado e forte de biofilme PIA-dependente. Na amostra EP05, produtora fraca de biofilme PIA-independente, foi analisada a expressão dos genes *sarA* e *sigB*. Em todos os experimentos o gene *gyrB* foi utilizado como gene normalizador (controle endógeno) das reações. Os oligonucleotídeos iniciadores empregados estão descritos na **tabela 2**.

Tabela 2: Oligonucleotídeos iniciadores empregados na técnica de PCR quantitativa em tempo real

<b>Elemento Pesquisado</b>	<b>Sequência do Oligonucleotídeo Iniciador (5'→3')</b>	<b>Referência</b>
<b><i>icaA</i></b>	AACAAGTTGAAGGCATCTCC GATGCTTGTTTGATTCCCT	CONLON et al., 2004
<b><i>icaR</i></b>	CATTGACGGACTTTACCAGTTTT ATCCAAAGCGATGTGCGTAG	WANG et al., 2011
<b><i>sarA</i></b>	TCAGCTTTGAAGAATTTGCAG TCTTTCATCGTGTTTCATTACGTTT	WANG et al., 2011
<b><i>sigB</i></b>	TCACCTGAACAAATTAACCAATG CACCTATTAGACCAACCATACC	WU et al., 2012
<b><i>gyrB</i></b>	TGACGAGGCATTAGCAGGTT GTGAAGACCGCCAGATACTTT	WANG et al., 2011

As reações foram realizadas em um termociclador para PCR em Tempo Real *StepOnePlus™* (Life Technologies Corporation, New York, USA), sendo utilizado como reagente de amplificação-deteção o *Power SYBR®GreenPCR Master Mix* (Life Technologies Corporation, New York, USA). A análise dos resultados das reações foi feita com o auxílio do software *StepOne™ v2.3* (Life Technologies Corporation, New York, USA).

Inicialmente, foram realizados ensaios para determinação das concentrações ótimas da primeira fita de cDNA e avaliação do método de quantificação. Nestes ensaios foram empregadas placas de 96 poços de RT-PCR (*MicroAmp® FastOptical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL - Life Technologies Corporation, New York, USA*). Nos poços da placa foram colocados 15 µL de uma mistura 1:2 do reagente de amplificação-deteção com uma solução 0,8 µM dos oligonucleotídeos iniciadores, sendo adicionados a essa mistura, em triplicata, 5 µL da primeira fita de cDNA de uma das amostras produtoras de biofilme PIA-dependente estudadas (EP11) e das suas diluições (1/2, 1/4 e 1/8). Em seguida, os poços foram selados com filme adesivo óptico (*MicroAmp / Optical Adhesive Film – Life Technologies Corporation, New York, USA*), as placas centrifugadas rapidamente e colocadas no termociclador, sendo empregada a seguinte programação: desnaturação inicial a 95°C por 10 min;

40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s, anelamento a 60°C por 1 min. Na sequência, para verificar a especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados, foi feita a curva de dissociação pelo emprego de desnaturação a 95°C por 15 s, anelamento a 60°C por 1 min e aquecimento progressivo, com incrementos de 0,3°C a cada 15 s, até 95°C.

A análise dos resultados obtidos foi feita pela construção de uma curva correlacionando a concentração da primeira fita de cDNA com a média dos valores de Ct (*threshold cycle*) da triplicata para cada oligonucleotídeo iniciador. Com base nos resultados obtidos, a diluição 1/4 da primeira fita foi selecionada para ser utilizada nos experimentos de qRT-PCR por apresentar a melhor relação de “custo-benefício” na reação.

Os experimentos de qRT-PCR foram feitos de maneira semelhante ao descrito nas reações para determinação das concentrações ótimas da primeira fita de cDNA e avaliação do método de quantificação. Nestes, 5 µL da primeira fita de cDNA diluída 1:4 das amostras estudadas foram adicionados a 15 µL da mistura 1:2 de oligonucleotídeos iniciadores (0,8 µM) com o reagente de amplificação-deteção. Esta reação foi feita em triplicata nos poços da placa de RT-PCR, sendo feitos também controles negativos para cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, onde 5 µL de água ultrapurificada foram utilizados no lugar da primeira fita de cDNA. As placas foram então seladas com filme adesivo óptico, centrifugadas rapidamente e colocadas no termociclador.

Para amplificação de todos os genes estudados foi utilizada a programação padrão do termociclador que consistia de: desnaturação inicial a 95°C por 10 min; 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s, anelamento a 60°C por 1 min. Em seguida, para verificar a especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados, foi feita a curva de dissociação pelo emprego de desnaturação a 95°C por 15 s, anelamento a 60°C por 1 min e aquecimento progressivo, com incrementos de 0,3°C a cada 15 s, até 95°C.

A análise dos dados gerados na reação de qRT-PCR foi feita com o auxílio do software *StepOne™* v2.3 (*Life Technologies Corporation, New York, USA*), sendo empregado o método de quantificação relativa da expressão gênica normalizada pelos níveis do controle endógeno ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ).

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nas correlações entre aspectos fenotípicos, genotípicos e/ou de resistência a antimicrobianos das amostras estudadas foi empregado o teste do qui-quadrado ou teste exato de Fischer, com auxílio software BioEstat 5.0, sendo valores de  $p < 0,05$  considerados estatisticamente significantes.

O teste t pareado foi utilizado na avaliação da significância ( $p < 0,05$ ) dos resultados da expressão gênica obtidos nos experimentos de qRT-PCR, tendo sido empregado o programa *GraphPad Prism 5*.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 AMOSTRAS BACTERIANAS

As 52 amostras bacterianas incluídas neste estudo foram isoladas na rotina de trabalho do laboratório do hospital participante desta pesquisa. O isolamento das amostras foi realizado a partir de sangue periférico analisado em hemoculturas (48), e de culturas semiquantitativas de cateteres venosos centrais (4).

Metade das amostras recebidas teve como origem espécimes clínicos e materiais coletados nos diferentes centros de tratamento intensivo (CTI) do hospital: CTI de adultos, Unidade Coronariana, Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) Neonatal e CETIP (Terapia Intensiva Pediátrica) (**Tabela 3**).

Os cateteres de onde foram isoladas as quatro amostras estudadas tiveram origens distintas, sendo três de unidades de tratamento intensivo e uma do setor de Clínica Médica.

**Tabela 3:** Origem das amostras de *S. epidermidis*

Setor do Hospital	Número de Amostras
Centros de Tratamento Intensivo	26
CTI* Adultos	9
Unidade Coronariana	8
UTI** Neonatal	6
CETIP*** - Terapia Intensiva Pediátrica	3
Nefrologia	3
Transplante Renal	2
Hemodiálise	2
Doenças Infecciosas e Parasitárias	4
Clínica Médica	4
Outros Setores	11
<b>Total</b>	<b>52</b>

\* CTI = Centro de Tratamento Intensivo; \*\* UTI = Unidade de Tratamento Intensivo; \*\*\* CETIP= Setor de Terapia Intensiva Pediátrica

## 4.2 IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE ANTIMICROBIANOS

Todas as amostras bacterianas utilizadas neste estudo foram identificadas fenotipicamente como *S. epidermidis*, e tiveram a concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos determinada pelo sistema automatizado Microscan® WalkAway®-96. Os resultados da CIM serão apresentados na seção 4.7 correlacionados com a presença e o tipo de biofilme produzido pela amostra.

## 4.3 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME EM PLACA DE MICROTITULAÇÃO

A produção de biofilme pelas amostras estudadas foi determinada por meio de testes quantitativos em placas de microtitulação de poliestireno. Inicialmente, procedeu-se a padronização visando diferenciar as amostras produtoras e não produtoras de biofilme. Para isso, o “ponto de corte” para os resultados da DO<sub>sa</sub> foi arbitrado em 0,100 com base nos valores referenciados em diferentes estudos revisados por Stepanovic e cols. (2007). Já o valor de 0,330 foi empregado como “ponto de corte” para os resultados da DO<sub>eb</sub>, sendo este determinado com base nos resultados da amostra não produtora *S. epidermidis* ATCC 12228, valor este acrescido de 3 vezes o valor do desvio padrão dos resultados.

Considerando o valor do “ponto de corte” da DO<sub>sa</sub>, 17 (33%) amostras foram consideradas produtoras de biofilme, enquanto que com base nas leituras da DO<sub>eb</sub>, 25 amostras (48%) foram classificadas como produtoras. Em virtude do maior percentual de amostras produtoras de biofilme obtido com a utilização do resultado da DO<sub>eb</sub>, a determinação por este método foi empregada como referência para classificação das amostras, bem como para as correlações estabelecidas nas próximas seções deste estudo.

As 25 amostras caracterizadas como produtoras de biofilme foram classificadas quanto ao nível de produção de biofilme (**Tabela 4**). A maioria destas (56%)

apresentou forte produção de biofilme, enquanto que níveis fraco e moderado foram observados, respectivamente, em 24% e 20% das amostras.

**Tabela 4:** Classificação das amostras de *S. epidermidis* produtoras de biofilme, com base no resultado da Densidade Óptica do extrato do biofilme pelo método da placa de microtitulação

Nível de Produção de Biofilme no MTP*	Número de Amostras
Fraco	6 (24%)
Moderado	5 (20%)
Forte	14 (56%)
Total	25 (100%)

\*MTP= Método da Placa de Microtitulação; Fraco=  $DO_{pc} < DO_{eb} \leq 2 \times DO_{pc}$ ; moderado=  $2 \times DO_{pc} \leq DO_{eb} \leq 4 \times DO_{eb}$ ; Forte=  $DO_{eb} > 4 \times DO_{pc}$

#### 4.4 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME EM ÁGAR VERMELHO CONGO

A produção de biofilme das amostras foi também avaliada em Ágar Vermelho Congo (AVC). Das 52 amostras testadas, 14 (27%) apresentaram reação positiva, 35 (65%) reação negativa, e 3 (6%) resultado *bordeaux*.

Das 25 amostras classificadas como produtoras de biofilme pelo MTP, somente 14 (56%) apresentaram reação positiva no AVC, sendo que, entre as 11 amostras restantes, 8 (32%) apresentaram reação negativa e 3 (12%) resultado *bordeaux*. Por outro lado, todas as 27 amostras classificadas como não produtoras de biofilme no MTP apresentaram também reação negativa em AVC (**Tabela 5**).

**Tabela 5:** Apresentação dos resultados obtidos em Ágar Vermelho Congo e no teste de produção de biofilme pelo método da placa de microtitulação em 52 amostras de *S. epidermidis*

Produção de Biofilme no MTP*	Número de Amostras	Reação em Ágar Vermelho Congo		
		Positiva	Negativa	<i>Bordeaux</i>
Produtora	25	14 (56%)	8 (32%)	3 (12%)
Não Produtora	27	0	27 (100%)	0

\*MTP= Método da Placa de Microtitulação;

Na **tabela 6** podem ser observados os resultados obtidos em AVC em relação ao nível de produção de biofilme das amostras. A associação da reação positiva no AVC com a produção de um nível forte de biofilme foi observada em 13 (93%) amostras, não tendo sido observada esta associação em nenhuma das 6 amostras que apresentaram nível fraco de produção de biofilme. Somente uma das 5 amostras produtoras de nível moderado apresentou reação positiva em AVC.

**Tabela 6:** Apresentação dos resultados obtidos em Ágar Vermelho Congo e os níveis de produção de biofilme determinados pelo método da placa de microtitulação em 25 amostras de *S. epidermidis*

Nível de Produção de Biofilme no MTP*	Número de Amostras	Reação em Ágar Vermelho Congo		
		Positiva	Negativa	<i>Bordeaux</i>
Fraco	6	0	5 (83%)	1 (17%)
Moderado	5	1 (20%)	3 (60%)	1 (20%)
Forte	14	13 (93%)	0	1 (7%)

\* MTP= Método da Placa de Microtitulação; Fraco=  $DO_{pc} < DO_{eb} \leq 2 \times DO_{pc}$ ; Moderado=  $2 \times DO_{pc} \leq DO_{eb} \leq 4 \times DO_{eb}$ ; Forte=  $DO_{eb} > 4 \times DO_{pc}$

#### 4.5 TESTE DE DESAGREGAÇÃO DO BIOFILME

A composição polissacarídica, típica de biofilmes PIA-dependentes, foi avaliada por meio da desagregação com solução de metaperiodato de sódio, enquanto a composição proteica, prevalente em biofilmes PIA-independentes, foi avaliada por meio da desagregação por solução de proteinase K.

Considerando o total de amostras produtoras de biofilme (25), biofilmes de natureza polissacarídica foram encontrados em 14 amostras (56%) e de natureza proteica foram 8 (32%), enquanto que em 3 (12%) não foi possível determinar a natureza química do biofilme.

Das 14 amostras produtoras fortes de biofilme, 13 (93%) tiveram o biofilme degradado por solução de metaperiodato, indicando sua natureza polissacarídica. Na amostra restante, o nível de degradação não atingiu o valor mínimo de 50%, necessário para a caracterização da natureza química do biofilme produzido, apresentando, assim, um resultado indeterminado pelo método utilizado (**Tabela 7**).

Biofilmes de natureza proteica foram encontrados em 5 (83%) das amostras produtoras fracas e em 3 (60%) das produtoras moderadas. Uma das amostras com nível de produção fraco (17%) e uma das com nível moderado (20%) apresentaram biofilme de natureza indeterminada (**Tabela 7**).

**Tabela 7:** Apresentação da relação entre a natureza química e os níveis de produção de biofilme determinados pelo método da placa de microtitulação em 25 amostras de *S. epidermidis*

Nível de Produção de Biofilme no MTP*	Número de Amostras	Natureza Química do Biofilme		
		Polissacarídica	Proteica	Não Determinada
Fraco	6	0	5 (83%)	1 (17%)
Moderado	5	1 (20%)	3 (60%)	1 (20%)
Forte	14	13 (93%)	0	1 (7%)

\* MTP= Método da Placa de Microtitulação; Fraco=  $DO_{pc} < DO_{eb} \leq 2 \times DO_{pc}$ ; Moderado=  $2 \times DO_{pc} \leq DO_{eb} \leq 4 \times DO_{eb}$ ; Forte=  $DO_{eb} > 4 \times DO_{pc}$

A natureza química do biofilme, determinada pelo método de desagregação, foi correlacionada com os resultados da reação em AVC, tendo em vista que uma reação positiva em AVC seria, presuntivamente, indicativa de biofilmes de natureza polissacarídica (**Tabela 8**). Como pode ser observado nesta **tabela**, somente apresentaram reação positiva em AVC aquelas amostras cujo biofilme foi caracterizado como de natureza polissacarídica. As amostras cujo biofilme foi de natureza proteica, bem como os de composição indeterminada pelo teste de desagregação, apresentaram reação negativa ou *bordeaux* em AVC.

Os resultados do nível de produção de biofilme no MTP, do teste em AVC e do teste de desagregação por metaperiodato ou proteinase, de cada amostra individualmente, são apresentados no **ANEXO B**.

**Tabela 8:** Apresentação da relação entre a natureza química do biofilme e a reação em Ágar Vermelho Congo em 25 amostras de *S. epidermidis*

Reação em AVC	Número de Amostras	Natureza Química do Biofilme*		
		Polissacarídica	Proteica	Não Determinada
Positiva	14	14 (100%)	0	0
Negativa	8	0	8 (100%)	0
<i>Bordeaux</i>	3	0	0	3 (100%)

\*Teste de desagregação com metaperiodato de sódio e proteinase K

## 4.6 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DAS AMOSTRAS

### 4.6.1 Identificação molecular das amostras

As amostras isoladas a partir dos materiais clínicos foram caracterizadas fenotipicamente como pertencentes à espécie *S. epidermidis* pelo sistema automatizado Microscan® WalkAway®-96. Esta identificação foi confirmada molecularmente pela técnica de PCR simples, mediante pesquisa de um fragmento espécie-específico da região 16S do DNA genômico. Foi observada plena concordância entre as identificações fenotípica e genotípica para todas as 52 amostras utilizadas neste estudo.

### 4.6.2 Pesquisa dos genes do operon *icaADBC* e do gene *icaR*

Por sua relação direta com a produção de PIA e, conseqüentemente, a formação de biofilme PIA-dependente, os genes que formam o operon *icaADBC* (*icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD*) foram pesquisados nas amostras estudadas pela técnica de PCR simples. O gene regulador (*icaR*), por sua ação de controle da expressão gênica do operon *ica*, também foi pesquisado.

Todos os genes do operon *ica*, assim como o gene *icaR*, foram detectados concomitantemente em 23 (44%) amostras. A correlação da presença destes genes

com a produção de biofilme determinada pelo MTP através da DOeb é apresentada na **tabela 9**.

**Tabela 9:** Correlação entre a presença dos genes do operon *icaADBC*, do gene *icaR* e a produção de biofilme determinada pelo método da placa de microtitulação em 52 amostras de *S. epidermidis*

Produção de Biofilme no MTP*	Número de Amostras	Detecção do operon <i>ica</i> + gene <i>icaR</i> *	
		Positiva	Negativa
Produtora	25	17 (68%)	8 (32%)
Não Produtora	27	6 (22%)	21 (78%)

\* MTP= Método da Placa de Microtitulação; Detecção pela técnica de PCR simples

A presença do operon *ica* e do gene *icaR* foi observada em 17 (68%) amostras produtoras de biofilme, sendo significativamente maior ( $p= 0,0024$ ) que nas amostras não produtoras 6 (22%).

Considerando-se o nível de produção de biofilme expresso pelas amostras, a correlação da presença do operon *ica* e do gene *icaR* com a produção de biofilme fica ainda mais evidente, sendo ambos os elementos gênicos encontrados em todas as amostras produtoras fortes (**Tabela 10**). No **ANEXO B**, além destes dados são apresentados também os resultados do teste em AVC e do teste de desagregação por metaperiodato ou proteinase, de cada amostra individualmente.

**Tabela 10:** Apresentação da relação entre a presença dos genes do operon *icaADBC*, do gene *icaR* e o nível de produção de biofilme determinado pelo método da placa de microtitulação em 25 amostras de *S. epidermidis*

Nível de Produção de Biofilme no MTP*	Número de Amostras	Detecção do operon <i>ica</i> + gene <i>icaR</i> **	
		Positiva	Negativa
Fraco	6	1 (17%)	5 (83%)
Moderado	5	2 (40%)	3 (60%)
Forte	14	14 (100%)	0

\* MTP= Método da Placa de Microtitulação; Fraco=  $DO_{pc} < DO_{eb} \leq 2 \times DO_{pc}$ ; Moderado=  $2 \times DO_{pc} \leq DO_{eb} \leq 4 \times DO_{eb}$ ; Forte=  $DO_{eb} > 4 \times DO_{pc}$ ; \*\* Detecção pela técnica de PCR simples

#### 4.6.3 Pesquisa dos Genes *aap*, *bhp* e *embp*

O genes *aap*, *bhp* e *embp* foram pesquisados pelo fato de poderem determinar a formação de biofilme PIA-independente. Os percentuais de detecção destes genes nas amostras estudadas são apresentados na **tabela 11**.

**Tabela 11:** Frequência dos genes *aap*, *bhp* e *embp* em 52 amostras de *S. epidermidis* e sua associação com a produção de biofilme determinada pelo método da placa de microtitulação

Gene Pesquisado*	Número de Amostras Positivas	Biofilme (MTP)	
		Produtoras	Não Produtoras
<i>aap</i>	15 (29%)	11 (44%)	4 (15%)
<i>bhp</i>	6 (12%)	0	6 (22%)
<i>embp</i>	36 (69%)	18 (72%)	18 (67%)

\* MTP= Método da Placa de Microtitulação; Detecção pela técnica de PCR simples

O gene *embp* foi o mais frequentemente observado (69%) na amostragem estudada, contudo, não foram notadas diferenças estatisticamente significativas de sua presença entre amostras produtoras (72%) e não produtoras (67%) de biofilme.

A detecção do gene *aap*, apesar de relativamente baixa (29%), foi significativamente maior em amostras produtoras (44%;  $p = 0,0317$ ) do que em não produtoras (15%). A presença desse gene também pode ser correlacionada com características genóticas e/ou fenotípicas das amostras, sendo esta correlação apresentada na seção 4.6.5.

O gene *bhp* foi o menos frequentemente observado (12%), sendo detectado somente em amostras não produtoras de biofilme.

#### 4.6.4 Detecção de outros genes relacionados à virulência (*atIE* e *capB*) e das transposases das sequências de inserção IS256 e IS257

Os genes *atIE* e *capB*, e as sequências de inserção IS256 e IS257 foram selecionados para serem pesquisados neste estudo por sua relação com a virulência e/ou com a resistência a antimicrobianos em amostras de *S. epidermidis*. A frequência de detecção destes elementos gênicos nas amostras estudadas é apresentada na **tabela 12**.

O gene *atIE* foi detectado em todas as amostras estudadas, independentemente de seu fenótipo de produtora ou não de biofilme. O gene da transposase do IS257 também apresentou elevada frequência, não sendo encontrado somente em uma amostra não produtora de biofilme, enquanto que o gene da transposase do IS256 foi detectado em 23% da amostragem estudada, sendo significativamente maior em amostras produtoras de biofilme (36%;  $p=0,0490$ ). Outra característica importante observada em relação a este último gene foi sua correlação com a presença dos genes do operon *ica*, não tendo sido ele encontrado em amostras negativas para este operon.

Quanto ao gene *capB*, sua frequência foi de 81%, sendo esta discretamente mais elevada em amostras produtoras de biofilme (84%) do que nas não produtoras (78%).

**Tabela 12:** Frequência de detecção dos genes *atIE* e *capB*, e das transposases das sequências de inserção IS256 e IS257 em 52 amostras de *S. epidermidis*

Gene Pesquisado*	Número de Amostras Positivas	Produção de Biofilme	
		Produtoras (25)	Não Produtoras (27)
<i>atIE</i>	52 (100%)	25 (100%)	27 (100%)
<i>capB</i>	42 (81%)	21 (84%)	21 (78%)
IS256	12 (23%)	9 (36%)**	3 (11%)
IS257	51 (98%)	25 (100%)	26 (96%)

\*Detecção pela técnica de PCR simples; \*\* Valor de  $p < 0,05$  para presença do gene entre amostras produtoras e não produtoras

#### 4.6.5 Correlação do gene *aap* e da sequência de inserção IS256 com a produção de biofilme pelas amostras

A correlação do gene *aap* e da sequência de inserção IS256 com as principais características fenotípicas e genotípicas relacionadas à produção de biofilme pelas amostras estudadas é apresentada na **tabela 13**.

A presença do gene *aap* foi observada em 44% ( $p= 0,0317$ ) das amostras produtoras de biofilme, sendo significativamente maior em amostras positivas para o operon *ica* (48%;  $p= 0,0126$ ) do que nas amostras em que este elemento gênico não foi detectado (14%).

Quando consideradas as amostras produtoras de biofilme nas quais a presença do operon *ica* foi positiva, o percentual de detecção de *aap* aumentou para 59% ( $p= 0,0421$ ), e para 64% ( $p= 0,0419$ ) quando se considera as amostras com nível forte de produção de biofilme, cujo genotipo é exclusivamente *ica* positivo.

O gene da transposase de IS256 foi detectado em 9 (36%;  $p = 0,0490$ ) das amostras produtoras de biofilmes e em 12 (52%;  $p < 0,001$ ) das amostras positivas para o operon *ica*, não sendo encontrado em nenhum isolado *ica* negativo. A associação do gene da transposase de IS256 com a presença do operon *ica* ficou mais realçada quando se considera a sua relação com o perfil de biofilme positivo / *ica* positivo (53%;  $p= 0,0218$ ), e com as produtoras de nível forte de biofilme (57%;  $p= 0,0330$ ).

**Tabela 13:** Correlação da Presença do Gene *aap* e da sequência de inserção IS256 com características fenotípicas e genotípicas relacionadas à produção de biofilme em amostras de *S. epidermidis*

Característica Fenotípica e/ou Genotípica	Presença de	
	Gene <i>aap</i>	IS256*
Produção de Biofilme (n= 25)	11 (44%)**	9 (36%)**
Presença do Operon <i>ica</i> (n= 23)	11 (48%)**	12 (52%)**
Produção de Biofilme + Operon <i>ica</i> (n= 17)	10 (59%)**	9 (53%)**
Produção de Biofilme Forte (n= 14)	9 (64%)**	8 (57%)**

\* Gene da transposase do IS256; \*\* Valor de  $p < 0,05$  para presença do gene entre amostras que apresentam a característica fenotípica/genotípica especificada

## 4.7 RESISTÊNCIA DAS AMOSTRAS A ANTIMICROBIANOS

### 4.7.1 Frequência de resistência a antimicrobianos e sua correlação com a produção de biofilme

A CIM de 18 antimicrobianos para as amostras estudadas foi determinada pelo sistema automatizado Microscan® WalkAway®-96. A distribuição dos resultados da CIM e sua correlação com a produção e o tipo de biofilme das amostras estudadas está apresentada na **tabela 14**.

Nenhuma das amostras estudadas foi resistente à vancomicina ou à linezolida, e baixos percentuais de resistência foram observados para daptomicina (2%), quinupristina-dalfopristina (13%), tetraciclina (13%), rifampicina (17) e moxifloxacina (21%). Para a maioria dos outros antimicrobianos testados, os percentuais de resistência foram superiores a 50%. Com relação aos antibióticos beta-lactâmicos utilizados, incluindo a sua combinação com inibidores de beta-lactamase, os percentuais de resistência obtidos foram expressivos, variando de 83 a 96%. Especificamente em relação à oxacilina, 85% das amostras foram resistentes.

Para a grande maioria dos antimicrobianos testados os percentuais de resistência das amostras produtoras de biofilme foram ligeiramente superiores aos das amostras não produtoras. As exceções ficaram por conta de quinupristina-dalfopristina e tetraciclina.

Quando se compara as amostras, produtoras de biofilme PIA-dependente e PIA-independente, os percentuais de resistência foram muito próximos para a maioria dos antimicrobianos testados. Contudo, para quinupristina-dalfopristina, as três amostras que apresentaram resistência eram PIA-dependentes e o percentual de resistência a sulfametoxazol-trimetoprima foi significativamente superior nas amostras PIA-dependentes ( $p=0,0472$ ).

Por outro lado, a resistência à gentamicina foi observada em todas as amostras produtoras de biofilme PIA-independente, enquanto nas amostras produtoras de biofilme PIA-dependente o percentual de resistência para essa droga foi somente de 43% ( $p= 0,0029$ ).

**Tabela 14:** Relação entre a resistência aos antimicrobianos em amostras de *S. epidermidis* produtoras e não produtoras de biofilme

Antimicrobiano	Total (n= 52)	Não Produtora de Biofilme (n= 27)	Produtora de Biofilme		
			Total (n= 25)	PIA-Dependente (n= 14)	PIA-Independente (n= 11)
Amoxicilina-Ácido clavulânico	43 (83%)	21 (78%)	22 (88%)	12 (86%)	10 (91%)
Ampicilina-Sulbactan	43 (83%)	21 (78%)	22 (88%)	12 (86%)	10 (91%)
Ampicilina	50 (96%)	25 (93%)	25 (100%)	14 (100%)	11 (100%)
Ceftriaxona	44 (85%)	21 (78%)	23 (92%)	13 (93%)	10 (91%)
Clindamicina	34 (65%)	14 (52%)	20 (80%)	12 (86%)	8 (73%)
Daptomicina	1 (2%)	0	1 (4%)	1 (7%)	0
Eritromicina	38 (73%)	18 (67%)	20 (80%)	12 (86%)	8 (73%)
Gentamicina	32 (62%)	15 (56%)	17 (68%)	6 (43%)	11 (100%)*
Levofloxacina	39 (75%)	17 (63%)	22 (88%)	12 (86%)	10 (91%)
Linezolid	0	0	0	0	0
Moxifloxacina	11 (21%)	5 (19%)	6 (24%)	3 (21%)	3 (27%)
Oxacilina	44 (85%)	21 (78%)	23 (92%)	13 (93%)	10 (91%)
Penicilina	50 (96%)	25 (93%)	25 (100%)	14 (100%)	11 (100%)
Quinupristina-Dalfopristina	7 (13%)	4 (15%)	3 (12%)	3 (21%)	0
Rifampicina	9 (17%)	3 (11%)	6 (24%)	4 (29%)	2 (18%)
Sulfametoxazol-Trimetoprima	22 (42%)	9 (33%)	13 (52%)	10 (71%)*	3 (27%)
Tetraciclina	7 (13%)	4 (15%)	3 (12%)	2 (14%)	1 (9%)
Vancomicina	0	0	0	0	0

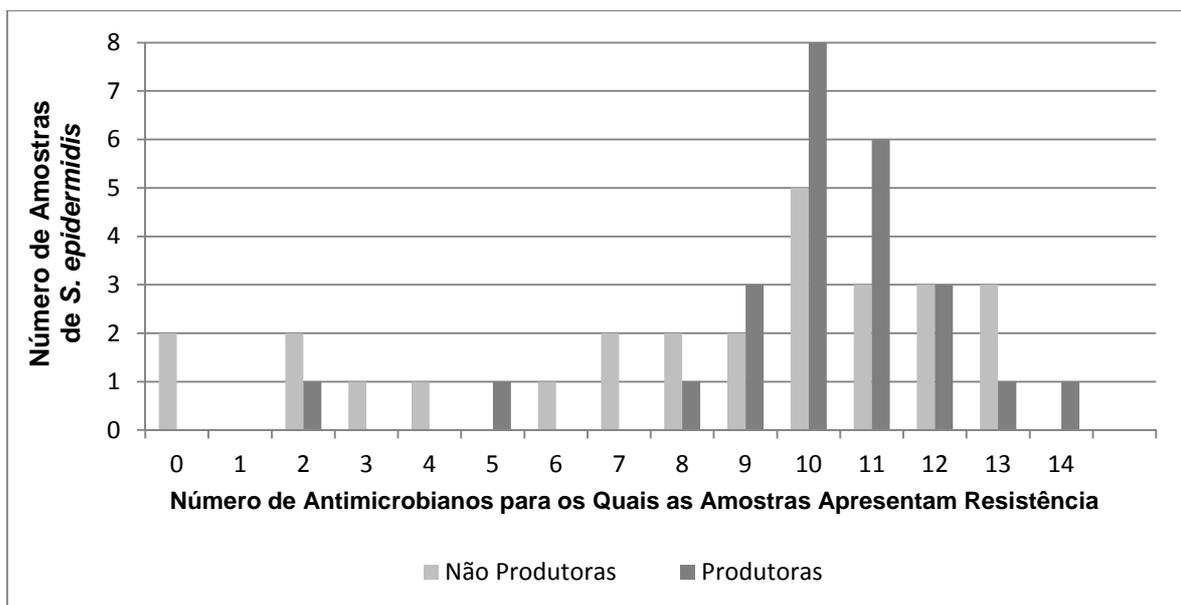
\* Valor de  $p < 0,05$  para a apresentação de resistência ao antimicrobiano entre amostras produtoras de biofilme PIA-dependente e PIA-independente

#### 4.7.2 Marcadores de resistência a antimicrobianos

Na amostragem estudada somente duas amostras foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. As restantes, apresentaram resistência a dois ou mais dos antimicrobianos testados.

O número de antimicrobianos, para os quais as amostras produtoras e não produtoras de biofilme foram resistentes é apresentado na **figura 1**. Pode ser observado que 33 (63%) amostras estudadas apresentaram resistência a 10 ou mais antimicrobianos, sendo 19 (58%) produtoras de biofilme e 14 (42%) não produtoras.

**Figura 1:** Número antimicrobianos para os quais as 52 amostras de *S. epidermidis*, produtoras e não produtoras de biofilme apresentaram resistência



A **tabela 15** apresenta o perfil de resistência a antimicrobianos das amostras que apresentaram 10 ou mais marcadores de resistência. Pode-se observar que 100% das amostras deste grupo apresentaram resistência a todos os antimicrobianos beta-lactâmicos testados (amoxicilina-ácido clavulânico, ampicilina, ceftriaxona, oxacilina, penicilina).

Do mesmo modo, todas as amostras não produtoras de biofilme do grupo, com 10 ou mais marcadores de resistência, foram resistentes à eritromicina, gentamicina e levofloxacina.

Entre as amostras produtoras e não produtoras de biofilme com 10 ou mais marcadores de resistência, a diferença mais expressiva foi observada entre os percentuais de resistência para gentamicina, que foram de 74% e 100%, respectivamente. Esta diferença no percentual de resistência à gentamicina foi estatisticamente significativa ( $p=0,0445$ ) quando se comparam amostras produtoras de biofilme PIA-dependente (55%) e PIA-independente (100%). Outra diferença observada nestas amostras, foi a resistência à associação sulfametoxazol-trimetoprima, observada em 9 (82%) das amostras PIA-dependentes e somente em 3 (38%) das PIA-independentes.

**Tabela 15:** Resistência a antimicrobianos nas amostras de *S. epidermidis*, com 10 ou mais marcadores de resistência, produtoras e não produtoras de biofilme

Antimicrobiano	Amostras Resistentes a 10 ou mais Antimicrobianos (%%)				
	Total (n= 33)	Não Produtoras de Biofilme (n= 14)	Produtoras de Biofilme		
			Total (n= 19)	PIA-Dependente (n= 11)	PIA-Independente (n= 8)
Beta-lactâmicos*	33 (100%)	14 (100%)	19 (100%)	11 (100%)	8 (100%)
Clindamicina	30 (91%)	12 (86%)	18 (95%)	11 (100%)	7 (88%)
Daptomicina	1 (3%)	0	1 (5%)	1 (9%)	0
Eritromicina	32 (97%)	14 (100%)	18 (95%)	11 (100%)	7 (88%)
Gentamicina	28 (85%)	14 (100%)	14 (74%)	6 (55%)	8 (100%)**
Levofloxacina	32 (97%)	14 (100%)	18 (95%)	10 (91%)	8 (100%)
Linezolida	0	0	0	0	0
Moxifloxacina	7 (21%)	3 (21%)	4 (21%)	2 (18%)	2 (25%)
Quinupristina-Dalfopristina	6 (18%)	4 (29%)	2 (11%)	2 (18%)	0
Rifampicina	9 (27%)	3 (21%)	6 (32%)	4 (36%)	2 (25%)
Tetraciclina	4 (12%)	2 (14%)	2 (11%)	1 (9%)	1(13%)
Sulfametoxazol-Trimetoprima	20 (61%)	8 (57%)	12 (63%)	9 (82%)**	3 (38%)
Vancomicina	0	0	0	0	0

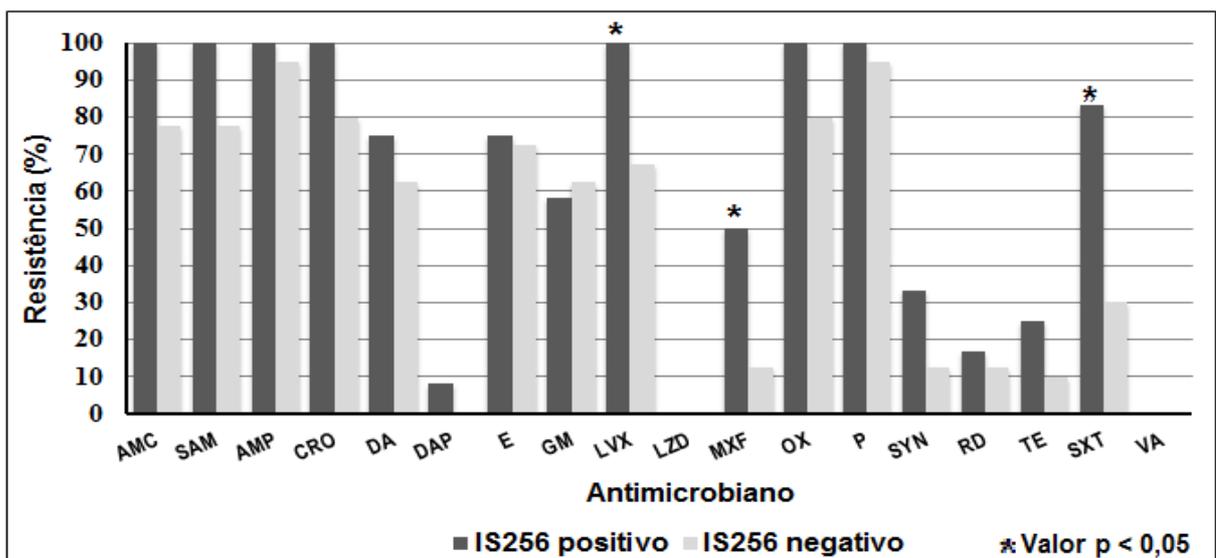
\* Amoxicilina-ácido clavulânico, ampicilina, ceftriaxona, oxacillina e penicilina; \*\* Valor de  $p < 0,05$  para a apresentação de resistência a 10 ou mais antimicrobianos entre amostras produtoras de biofilme PIA-dependente e PIA-independente

#### 4.7.3 Associação da sequência de inserção IS256 com a resistência a antimicrobianos

Como pode ser observado na **figura 2**, a presença do gene da transposase da sequência de inserção IS256 apresentou associação positiva aos percentuais de resistência mais elevados para quase todos os antimicrobianos testados. A única exceção foi a resistência à gentamicina, cujo percentual nas amostras IS256 negativas foi ligeiramente superior.

Além disso, todas as amostras positivas para a presença do IS256 apresentaram resistência a todos os antimicrobianos beta-lactâmicos avaliados. Foi observada também uma associação significativa entre a presença deste elemento genético e a resistência às quinolonas testadas, levofloxacina ( $p= 0,0243$ ) e moxifloxacina ( $p= 0,0113$ ), bem como com a associação sulfametoxazol-trimetoprima ( $p= 0,0019$ ).

**Figura 2:** Associação entre a presença da sequência de inserção IS256 e a resistência a antimicrobianos em 52 amostras de *S. epidermidis*



#### 4.8 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DE ANTISSEPTICOS NA PRODUÇÃO DE BIOFILME

A produção de biofilme pelas amostras de *S. epidermidis* foi avaliada na presença de concentrações subinibitórias de 2 e 4 % de etanol, e de 0,5 e 1,0 µg/mL de clorexidina. Ensaios prévios (dados não apresentados) de determinação da CIM pelo método da placa de microtitulação mostraram que concentrações superiores às citadas acima determinaram redução do crescimento da maioria das amostras.

A influência dos antissépticos sobre a produção de biofilme foi avaliada pela comparação dos resultados da produção de biofilme em TSB (condição controle) com os obtidos na presença dos agentes testados (condições teste). A variação percentual da produção de biofilme foi determinada tanto para os resultados da DOsa como para os da DOeb.

Para facilitar a apresentação dos resultados, as amostras foram divididos em grupos, de acordo com o perfil de produção de biofilme / presença do operon *ica*.

##### 4.8.1 Influência do etanol em amostras biofilme positivo / operon *ica* positivo

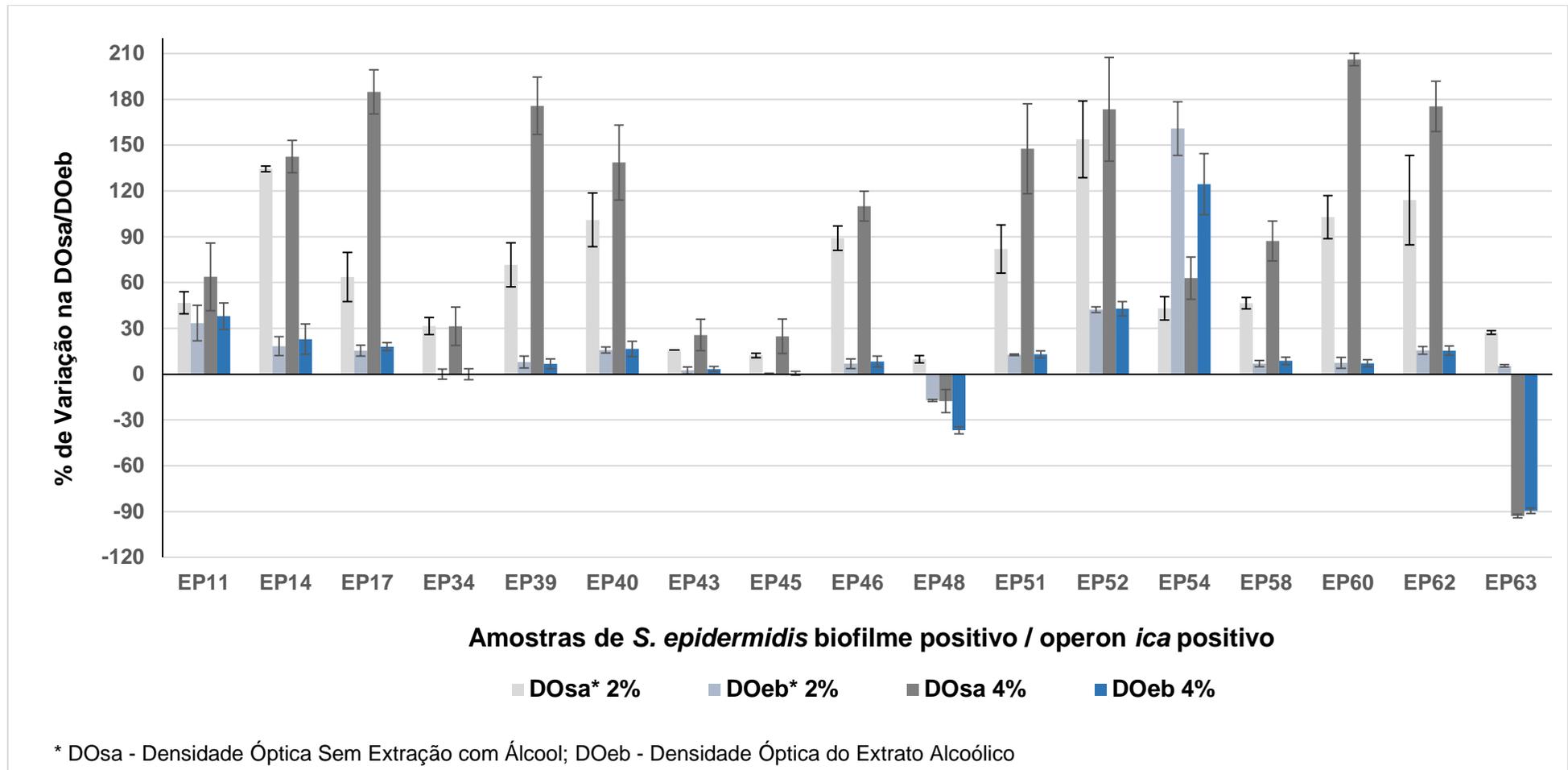
Este grupo foi constituído por 17 amostras, das quais 14 foram classificadas como produtoras forte de biofilme, 2 como moderadas e 1 como fraca. A diferença percentual dos valores da DOsa e DOeb entre as condições teste e controle é apresentada na **figura 3**.

A adição de etanol nas concentrações de 2 e 4% determinou aumento dose-dependente nos resultados da DOsa e da DOeb em 15 das 17 amostras deste grupo, sendo 14 produtores fortes de biofilme e 1 (EP54) moderado. Duas amostras diferiram deste padrão (EP48 e EP63).

EP48, uma amostra produtora fraca de biofilme, apresentou um pequeno aumento da DOsa e redução da DOeb na presença de etanol a 2%, e redução da DOsa / DOeb na concentração de 4%. EP63, uma amostra produtora forte de biofilme, apresentou aumento na DOsa e na DOeb na presença de etanol a 2% e uma expressiva redução (-90 e -93%) nos resultados DOsa e DOeb na condição teste com

etanol a 4%. Contudo, foi observada nestas amostras uma diminuição da DOg (dados não apresentados) na presença de etanol a 4%, mostrando uma ação inibidora sobre o crescimento da amostra, fugindo do caráter subinibitório pretendido no teste.

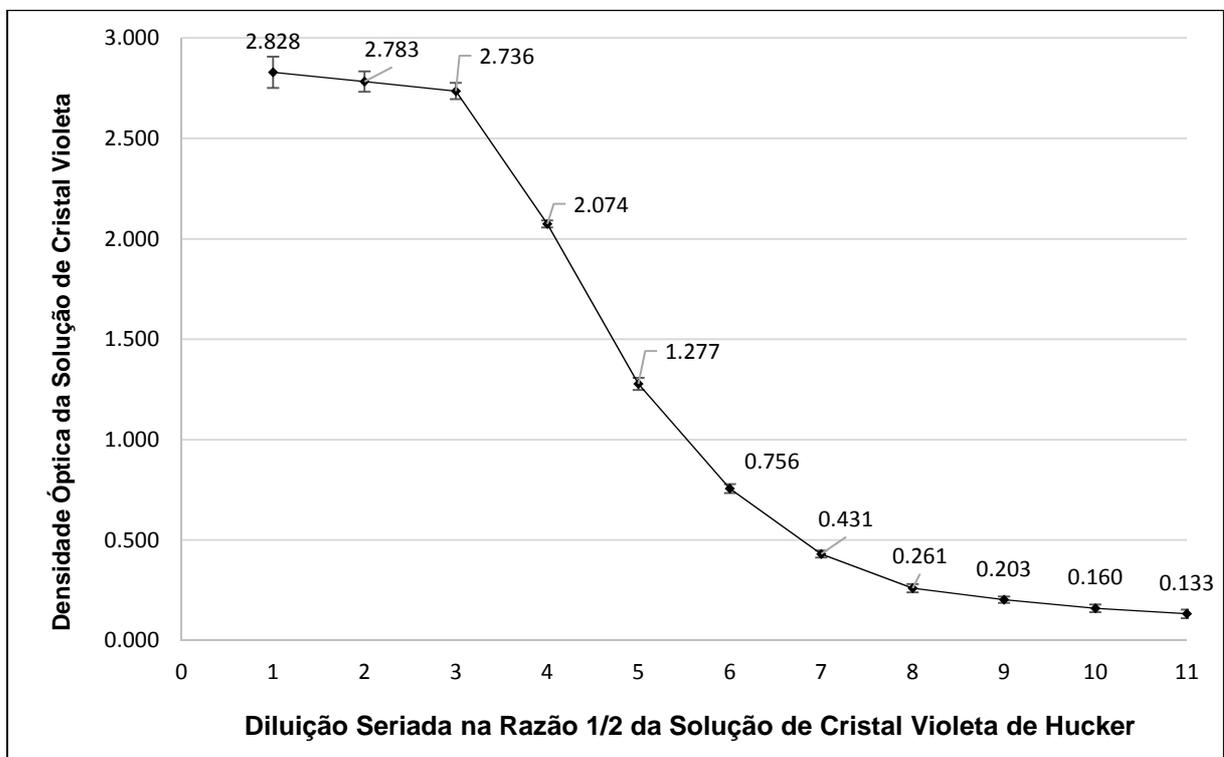
**Figura 3:** Variações percentuais dos resultados da DOsa e DOeb das amostras de *S. epidermidis* biofilme positivo/operon *ica* positivo crescidas em TSB adicionado de 2 e 4% de etanol (a barra de erros indica o desvio padrão dos resultados)



Na maioria das amostras, os aumentos induzidos pelo etanol nos resultados da DO<sub>sa</sub> foram superiores aos da DO<sub>eb</sub>, sendo esta diferença muitas vezes expressiva, atingindo valores cerca de 14 vezes maiores na concentração de 2 %, e de 29 vezes em 4 %. Esta desproporção no aumento dos valores de DO<sub>sa</sub> e DO<sub>eb</sub> foi muito expressiva, particularmente, em algumas amostras que apresentavam níveis consideravelmente elevados de produção de biofilme.

Esta desproporção entre os resultados da DO<sub>sa</sub> e DO<sub>eb</sub> nas condições teste poderia ser decorrente de uma limitação do método em detectar aumentos na concentração de corante do extrato alcoólico do biofilme. Em virtude disso, foram realizados experimentos com diluições em álcool da solução de cristal violeta de Hucker a 2%. A densidade óptica a 570 nm de uma diluição seriada (1/2) do corante em uma placa de microtitulação foi determinada em experimentos realizados em quintuplicada, e os resultados são apresentados na **figura 4**.

**Figura 4:** Densidade óptica da diluição seriada (1/2) em álcool da solução de cristal violeta de Hucker a 2% (barra de erros indica o desvio padrão)



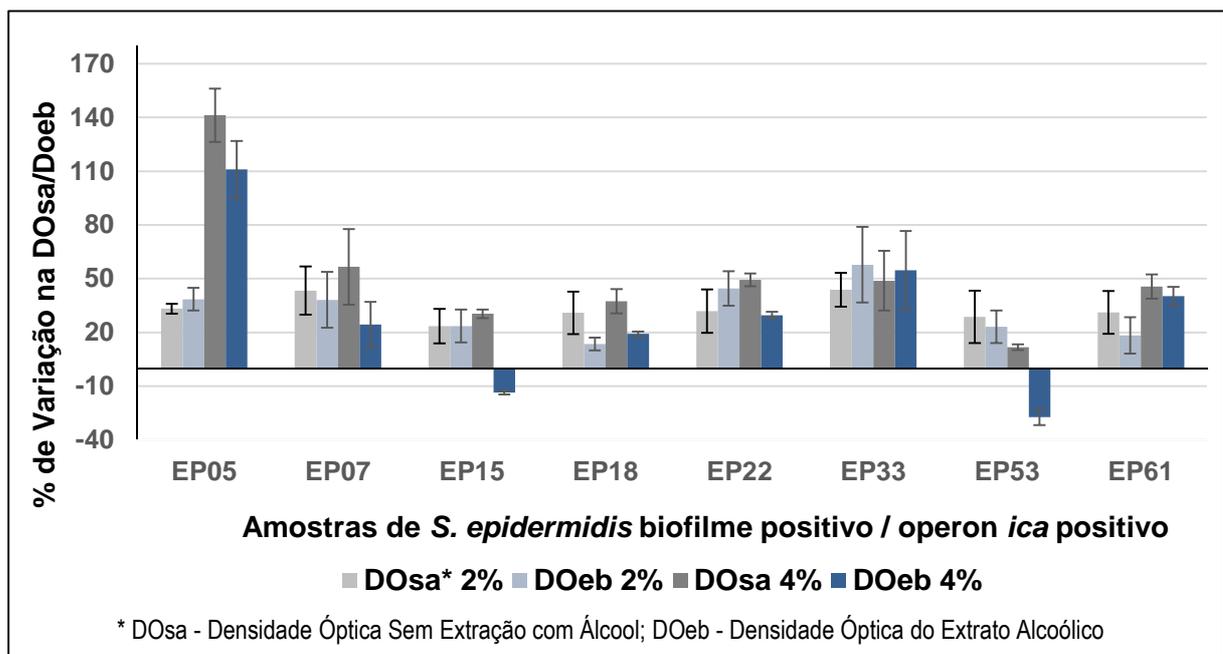
#### 4.8.2 Influência do etanol em amostras biofilme positivo / operon *ica* negativo

Esse perfil foi apresentado por 8 amostras, sendo que 5 apresentavam um nível de produção de biofilme fraco, e 3 moderado.

Todas as amostras com este perfil, biofilme positivo / operon *ica* negativo, apresentaram aumento da produção de biofilme na presença de etanol a 2% (**Figura 5**). Nesta condição teste, os percentuais de aumento, determinados com base nos resultados da DOsa e da DOeb, foram relativamente próximos para a maioria das amostras, não existindo entre estes resultados a desproporcionalidade observada nas amostras com perfil biofilme positivo / operon *ica* positivo (**Figura 3**).

Os resultados da DOsa e da DOeb na condição teste com 4% de etanol também indicaram aumento da produção de biofilme em 6 amostras (EP05, EP07, EP18, EP22, EP33 e EP61). Contudo, as amostras EP15 e EP33 apresentaram variações positivas da DOsa, enquanto que para DOeb estas foram negativas.

**Figura 5:** Variações percentuais dos resultados da DOsa e DOeb das amostras de *S. epidermidis* biofilme positivo / operon *ica* negativo crescidas em TSB adicionado de 2% e 4% de etanol (a barra de erros indica o desvio padrão dos resultados)



#### 4.8.3 Influência do etanol em amostras não produtoras de biofilme

As amostras classificadas como não produtoras de biofilme (6 operon *ica* positivas e 21 operon *ica* negativas), na presença das concentrações de etanol testadas não apresentaram aumento nos resultados da DOsa ou da DOeb que fizessem esses valores superarem aqueles estabelecidos como ponto de corte, permanecendo assim, na condição teste, como não produtoras de biofilme.

#### 4.8.4 Influência da clorexidina em amostras biofilme positivo / operon *ica* positivo

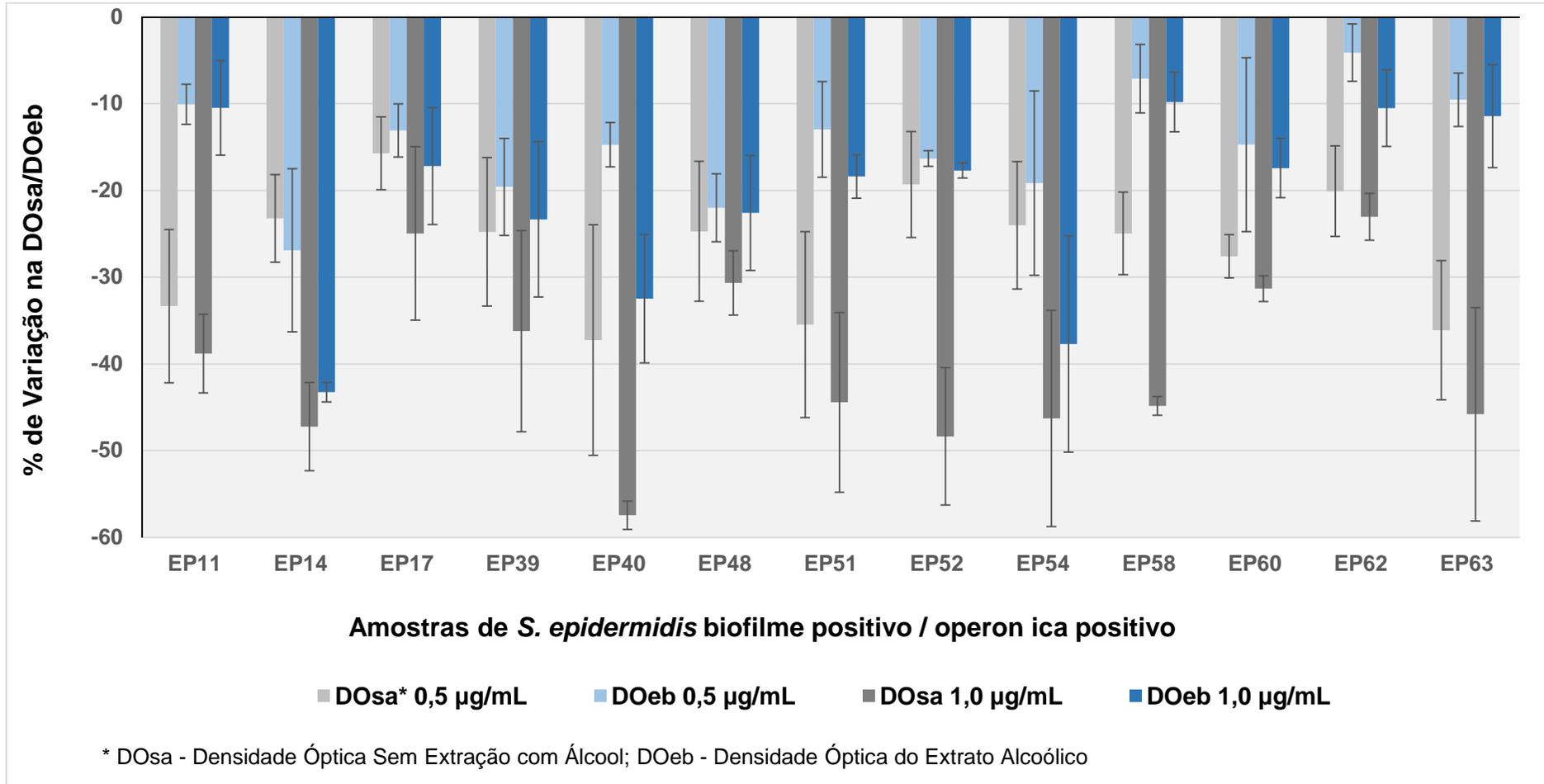
Das 17 amostras com perfil biofilme positivo / operon *ica* positivo, 13 apresentaram redução da produção de biofilme em função da adição de clorexidina ao meio de cultura, sendo os resultados apresentados na **figura 6**.

As 4 amostras restantes não apresentaram variações superiores a 10% nos percentuais dos resultados da DOsa e DOeb na presença de clorexidina, sendo estas variações consideradas inerentes à própria técnica. Estas amostras apresentavam em comum a produção de níveis extremamente elevados de biofilme, mesmo quando comparadas com outras amostras classificadas como produtoras forte de biofilme.

Os percentuais de redução da produção de biofilme nas concentrações de 0,5 e 1,0 µg/mL de clorexidina foram dose dependentes, tanto para DOsa como para DOeb, sendo contudo mais pronunciados na DOsa.

As reduções observadas na DOsa e DOeb nas duas concentrações de clorexidina testadas, mesmo em amostras cujo nível de produção de biofilme foi classificado como moderado (EP11 e EP54) e fraco (EP48), não atingiram valores da densidade óptica de ponto de corte que caracterizariam as amostras como não produtoras de biofilme.

**Figura 6:** Reduções percentuais dos resultados da DOsa e DOeb das amostras de *S. epidermidis* biofilme positivo / operon *ica* positivo crescidas em TSB adicionado de 0,5 e 1,0 µg/mL de clorexidina (a barra de erros indica o desvio padrão dos resultados)

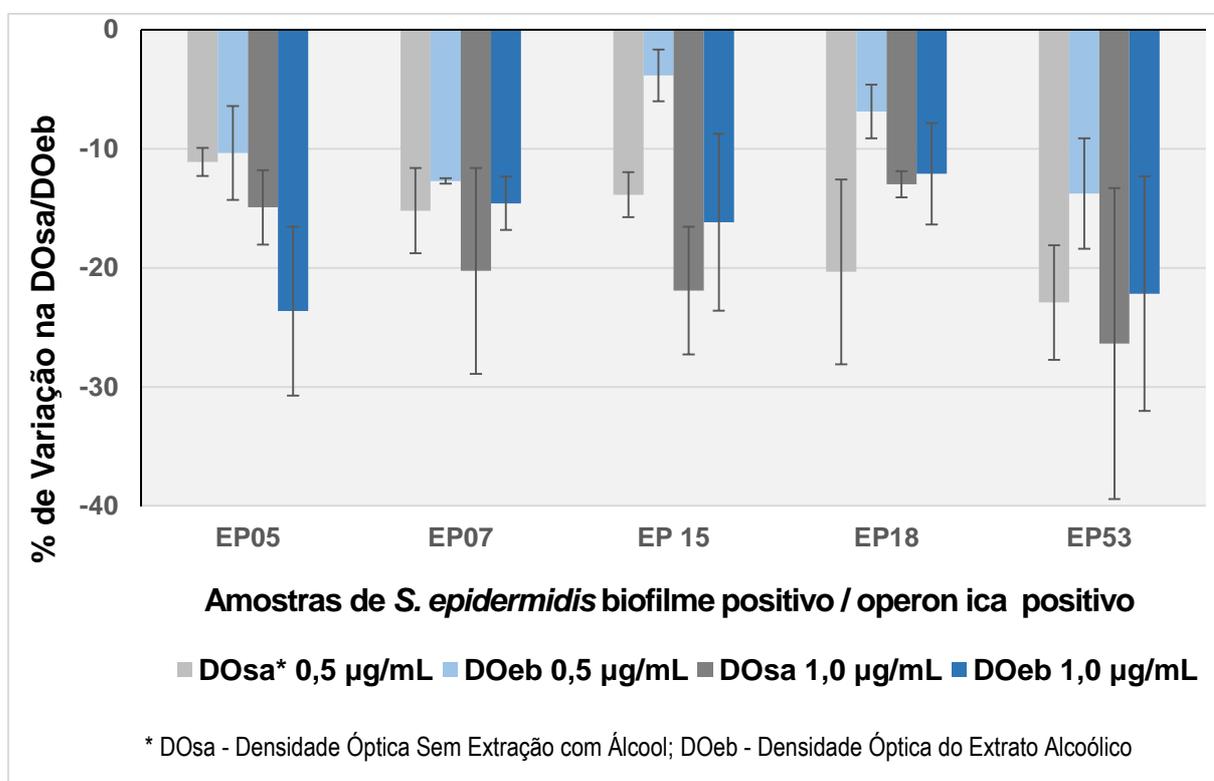


#### 4.8.5 Influência da clorexidina em amostras biofilme positivo / operon *ica* negativo

Este grupo foi constituído de 8 amostras, todas com um nível de produção de biofilme fraco (5) ou moderado (3). A adição de concentrações subinibitórias de clorexidina ao meio de cultura resultou na redução da produção de biofilme em 5 amostras (**Figura 7**), sendo que os resultados da variação dos percentuais da DOsa e DOeb das 3 amostras restantes foram inferiores a 10%, não sendo considerados indicativos de redução da formação de biofilme.

Os percentuais de redução da produção de biofilme determinados pelas concentrações de 0,5 e 1,0 µg/mL de clorexidina foram dose dependentes, exceto na DOsa da amostra EP18.

**Figura 7:** Reduções percentuais dos resultados da DOsa e DOeb das amostras de *S. epidermidis* biofilme positivo / operon *ica* negativo crescidas em TSB adicionado de 0,5 e 1,0 µg/mL de clorexidina (a barra de erros indica o desvio padrão dos resultados)



#### 4.8.6 Influência da clorexidina em amostras biofilme negativo

O crescimento das amostras classificadas como não produtoras de biofilme (6 operon *ica* positivas e 21 operon *ica* negativas), na presença das concentrações de clorexidina testadas das condições teste, não determinou aumento nos resultados da DOsa ou da DOeb de modo que estes superassem os valores estabelecidos como ponto de corte, permanecendo estas amostras classificadas como não produtoras de biofilme.

#### 4.9 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DE ANTISSÉPTICOS NA EXPRESSÃO GÊNICA

A expressão gênica das amostras de *S. epidermidis* foi avaliada pela técnica de qRT-PCR, empregando o método de quantificação relativa da expressão gênica, tendo o gene *gyrB* como controle endógeno ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ).

Para esta avaliação foram selecionadas três amostras produtoras de biofilme PIA-dependente (EP48 – fraco; EP54 – moderado, e EP40 – forte) e uma amostra produtora de biofilme PIA-independente (EP05 - fraca).

Uma consolidação das principais características das amostras selecionadas para avaliação da expressão gênica, relacionando suas principais características e os resultados dos testes de influência de antissépticos na produção de biofilme em MTP são apresentados na **tabela 16**.

Nos experimentos iniciais de avaliação da expressão gênica foram empregadas as mesmas concentrações de etanol (2 e 4%) e de clorexidina (0,5 e 1,0 µg/mL) utilizadas no teste de MTP. Contudo, foi observada em alguns destes experimentos de qRT-PCR uma redução expressiva da Ct (*cycle threshold*) do controle endógeno. Para o etanol, este efeito foi observado nas duas concentrações avaliadas (2 e 4%). Para clorexidina, somente a concentração de 1,0 µg/mL determinou uma redução considerável do Ct do controle endógeno.

Como os resultados da Ct da *gyrB* são empregados em todos os cálculos de quantificação relativa da expressão gênica, foi necessária a redução das concentrações dos antissépticos utilizados nas culturas a serem empregadas no qRT-PCR. Para isso, foi avaliado o crescimento bacteriano, mensurado pela DO a 620 nm das culturas em presença de concentrações seriadas dos antissépticos, nas mesmas condições dos experimentos de qRT-PCR. As concentrações de etanol a 1% e clorexidina a 0,5 µg/mL foram selecionadas por não interferirem na DO das amostras. Estes dados foram complementados com experimentos de qRT-PCR, onde foi observado que a interferência na Ct da *gyrB* nas culturas com antissépticos foi consideravelmente minimizada.

**Tabela 16:** Consolidação dos resultados do tipo e nível de produção de biofilme, e da influência do etanol (2 e 4%) e da clorexidina (0,5 e 1,0 µg/mL) na produção de biofilme determinada pelo método da placa de microtitulação das amostras de *S. epidermidis* cuja expressão gênica foi avaliada por qRT-PCR

Código da Amostra	Biofilme		Influência dos antissépticos determinada pelo MTP*							
			Etanol				Clorexidina			
	Tipo	Nível de Produção	2%		4%		0,5 µg/mL		1,0 µg/mL	
			DOsa*	DOeb*	DOsa	DOeb	DOsa	DOeb	DOsa	DOeb
EP48	PIA-dependente	Fraco	10	-17	-18	-37	-25	-22	-31	-23
EP54	PIA-dependente	Moderado	43	161	63	124	-24	-19	-46	-38
EP40	PIA-dependente	Forte	101	16	139	16	-37	-15	-57	-32
EP05	PIA-independente	Fraco	33	39	143	111	-11	-10	-15	-24

\*MTP= Método do Teste em Placa de Microtitulação; \*DOsa= Densidade óptica sem álcool; DOeb= Densidade óptica do extrato do biofilme

#### 4.9.1 Influência do etanol nas amostras produtoras de biofilme PIA-dependente

Na **figura 8** são apresentados os resultados da influencia do etanol a 1% na expressão relativa dos genes *icaA*, *icaR*, *sarA* e *sigB* das amostras EP48, EP54 e EP40, todas produtoras de biofilme PIA-dependente.

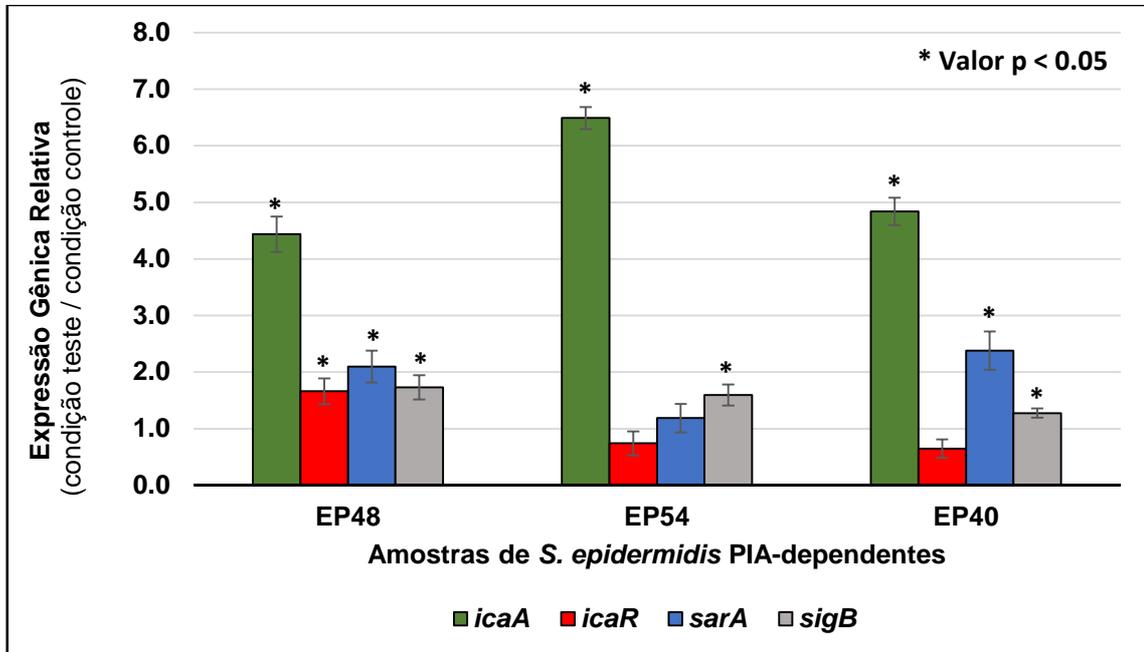
A expressão relativa do gene *icaA* na condição teste da amostra EP48 mostrou aumento de 4,4 vezes ( $p= 0,0308$ ) em relação a condição controle, com meio não adicionado do antisséptico. Nestas mesmas condições, o aumento da expressão deste gene na amostra EP54 foi de 6,5 vezes ( $p= 0,005$ ) e na EP40 de 4,8 vezes ( $p= 0,0014$ ).

Na condição teste, a amostra EP48 apresentou um aumento de 1,7 vezes ( $p= 0,0472$ ) na expressão relativa do gene *icaR*, enquanto EP54 e EP40 apresentaram aumento de 0,74 e 0,65, respectivamente. Para as duas últimas amostras estes resultados indicam, respectivamente, reduções de 26% e 35% na expressão de *icaR* na condição teste em relação a condição controle, não sendo considerados estatisticamente significantes.

Para a expressão relativa do gene *sarA*, as amostras EP48 e EP40 apresentaram aumentos na condição teste de 2,1 ( $p= 0,0187$ ) e 2,4 ( $p= 0,019$ ) vezes em relação à condição controle. Já a amostra EP54 na condição teste apresentou um aumento, não significativo, de 1,2 vezes em relação à condição controle.

Em relação ao gene *sigB*, os resultados da expressão gênica das amostras EP48 e EP54 na condição teste foram próximos, isto é de 1,7 ( $p= 0,0308$ ) e 1,6 ( $p= 0,0351$ ) vezes maiores que os da condição controle. A amostra EP40 apresentou um aumento inferior a estes, aumento de 1,3 ( $p= 0,0153$ ), mas também significativo estatisticamente.

**Figura 8:** Expressão relativa dos genes *icaA*, *icaR*, *sarA* e *sigB*, estudada por qRT-PCR, das amostras de *S. epidermidis* crescidas em TSB adicionado de etanol a 1% (a barra de erros indica o desvio padrão dos resultados)



#### 4.9.2 Influência do etanol na amostra produtora de biofilme PIA-independente

Para a amostra EP05, na condição teste com o meio de cultura adicionado de etanol a 1%, a expressão gênica relativa foi de 0,39 ( $p= 0,0077$ ) para o gene *sarA* e 0,78 para *sigB* ( $p= 0,0128$ ).

#### 4.9.3 Influência da clorexidina nas amostras produtoras de biofilme PIA-dependente

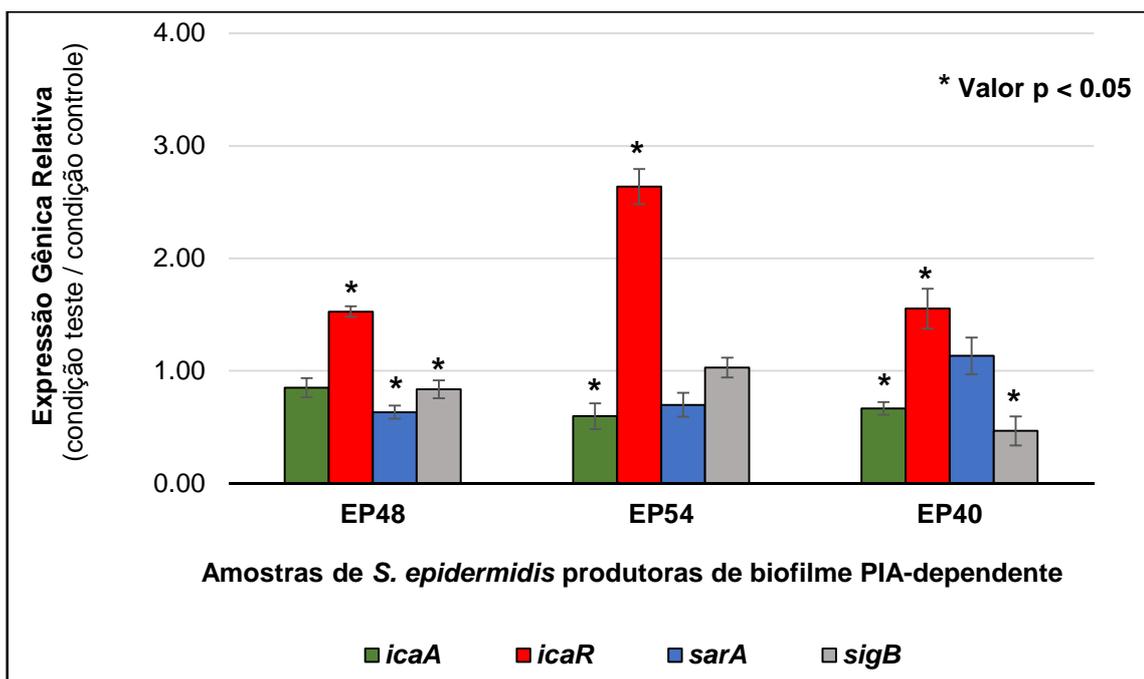
Os resultados da expressão genica relativa das amostras PIA-dependentes EP48, EP54 e EP40, crescidas na presença de clorexidina a 0,5  $\mu\text{g/mL}$  são apresentados na **figura 9**.

A amostra EP48 apresentou uma expressão relativa de 0,85 para o gene *icaA*, indicando uma redução da expressão desse gene na condição teste com clorexidina, enquanto que para *icaR* foi observado um aumento de 1,5 vezes ( $p= 0,0039$ ) em comparação à condição controle. Reduções significativas na expressão genica relativa foram observadas para os genes *sarA* (0,63;  $p= 0,0082$ ) e *sigB* (0,84;  $p= 0,0377$ ).

Na condição teste com clorexidina, a amostra EP54, apresentou redução da expressão relativa de *icaA* (0,60;  $p= 0,0202$ ) e um aumento 2,6 vezes ( $p= 0,0029$ ) na expressão de *icaR*. Para *sarA*, a expressão relativa foi de 0,70 indicando uma redução, não significativa, da expressão do gene na condição teste. Já para *sigB*, a amostra não apresentou diferenças na expressão genica entre as condições controle e teste.

A amostra EP40, na condição teste, apresentou reduções significantes na expressão relativa de *icaA* (33%;  $p= 0,0099$ ) e de *sigB* (53%;  $p= 0,0153$ ). A expressão relativa de *icaR* mostrou um aumento de 1,6 vezes ( $p= 0,0234$ ) e *sarA* apresentou uma expressão relativa próxima (1,13 vezes) da condição controle.

**Figura 9:** Expressão relativa dos genes *icaA*, *icaR*, *sarA* e *sigB*, estudada por qRT-PCR, das amostras de *S. epidermidis* crescidas em TSB adicionado de clorexidina a 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (a barra de erros indica o desvio padrão dos resultados)



#### 4.9.4 Influência da clorexidina na amostra produtora de biofilme PIA-independente

A expressão relativa da amostra EP05 dos genes *sarA* e *sigB* indicou uma redução estatisticamente significativa da expressão destes genes. Para *sarA* a expressão relativa foi de 0,40 ( $p=0,0046$ ) e para *sigB* foi de 0,71 ( $p= 0,0458$ ).

## 5 DISCUSSÃO

Os ECNs representam importante parcela dos micro-organismos componentes da microbiota da pele humana, em particular *S. epidermidis*, espécie de ECN considerada como a mais frequente na superfície corporal, e que parece desempenhar papel benéfico na pele, mediante competição com micro-organismos potencialmente nocivos, como *S. aureus* (OTTO, 2012). Outrora tido apenas como inócuo comensal da pele, nas últimas décadas *S. epidermidis* despontou como um patógeno oportunista dos mais importantes e frequentes em IRAS, especialmente as que envolvem implantes de dispositivos médicos.

Pelo fato de ser um colonizador da pele, o acesso facilitado do micro-organismo aos dispositivos médicos durante o implante seria uma explicação para tal fenômeno (VON EIFF et al., 1999), aliado a sua capacidade de produzir fatores específicos de virulência, que transformam esta bactéria comensal em um dos mais bem sucedido oportunista da medicina moderna. Tais fatores englobam uma vasta gama de produtos que permitem sua fixação à superfície de biomateriais, diretamente ou mediado por proteínas do hospedeiro, bem como sua capacidade de proliferar liberando produtos extracelulares que levam à formação de biofilme. Este parece ser um processo fundamental para o sucesso de *S. epidermidis* como patógeno potencial, uma vez que contribui para a resistência do micro-organismo a mecanismos de defesa da imunidade inata e adquirida, além de propiciar a sobrevivência à terapia antimicrobiana (MACK, 2013). Porém, os relatos referentes à presença, à frequência e à distribuição de potenciais produtos relacionados à patogenicidade deste micro-organismo, bem como de fatores genéticos ligados a sua expressão, ainda se mostram insuficientes para nitidamente delimitar a fronteira que distingue o comensal do patógeno.

Neste estudo procedeu-se ao isolamento e identificação de 52 amostras clínicas de *S. epidermidis* oriundas de sangue periférico (48) e de culturas semiquantitativas de cateteres venosos centrais (4), a partir de coletas realizadas em diferentes centros de tratamento intensivo e outras unidades de um hospital público de atendimento terciário do Rio de Janeiro. As amostras foram submetidas à identificação molecular pela técnica de PCR simples, mediante pesquisa de um fragmento espécie-específico presente no DNA genômico, e os resultados mostraram

100% de concordância com a identificação fenotípica, realizada previamente por meio do sistema automatizado Microscan® WalkAway®-96.

Com base na importância atribuída à capacidade de produção de biofilme como um dos fatores determinantes para a patogenicidade de *S. epidermidis*, as amostras foram investigadas quanto a esta expressão.

Um dos métodos mais utilizados para este estudo é o da placa de microtitulação, um teste quantitativo proposto por Christensen e cols. (1985), que se baseia na leitura direta da densidade óptica (DOsa) do biofilme corado, aderido ao fundo dos poços da placa de poliestireno.

Deve-se atentar para o fato, porém, que o emprego da técnica, tal como originalmente preconizada, pode levar à obtenção de valores incorretos de densidade óptica, caso o biofilme produzido no fundo do poço não seja homogêneo ou seja muito espesso. Isto pode ocorrer porque o instrumento de leitura utilizado mede a densidade óptica em apenas um “ponto” na região central do fundo do poço (**ANEXO C**).

Para contornar este problema, foram sugeridas modificações na técnica, sendo o corante, aderido às paredes do poço, ressolubilizado com agentes como etanol, metanol ou ácido acético (STEPANOVIĆ, 2000, 2007), e o extrato obtido utilizado para a quantificação do biofilme produzido, mediante determinação da densidade óptica do extrato (DOeb).

A distinção entre amostras não produtoras e produtoras de biofilme nesta técnica é feita com base em um valor da DO considerado como ponto de corte. A maioria dos estudos emprega a determinação direta da DO, sendo os valores do ponto de corte, em geral, predefinidos (DO= 0,1 a 0,2) com base em dados da literatura. Nos estudos que empregam um agente de ressolubilização do corante, o valor do ponto de corte é definido com base nos resultados obtidos com uma amostra reconhecidamente não produtora de biofilme (STEPANOVIĆ, 2007).

Em nossos procedimentos de padronização dos experimentos, foi estabelecido em 0,100 o “ponto de corte” para os resultados da DOsa, com base nos valores utilizados em diferentes estudos (STEPANOVIĆ, 2007). Para os resultados da DOeb foi empregado o valor de 0,330, sendo este determinado com base nos resultados da amostra não produtora *S. epidermidis* ATCC 12228, acrescido de 3 vezes o valor do desvio padrão dos resultados.

Comparando os dois tipos de leitura utilizados em nossa amostragem, foi observado que a DOeb apresentou maior sensibilidade para a detecção da produção

de biofilme que a DOsa (48% e 33% de amostras produtoras, respectivamente). Para 44 (85%) amostras foi obtida concordância entre os resultados, sendo 16 classificadas como produtoras e 28 como não produtoras. As 8 restantes (15%) foram consideradas produtoras somente quando a interpretação foi baseada no valor da DOeb. Deve ser destacado que este último grupo apresentou características particulares, sendo constituído por 6 produtoras fracas e 2 produtoras moderadas de biofilme, cuja natureza química foi identificada como proteica. Possivelmente, a falha na caracterização destas amostras como produtoras de biofilme, quando apenas os resultados da DOsa são empregados, seja uma razão para a falta ou baixo reconhecimento deste grupo em outros estudos.

Uma exceção a ser considerada refere-se ao estudo de Rohde e cols. (2007), que detectaram expressivo percentual (27%) de amostras produtoras de biofilme proteico, apesar de empregarem a DOsa como critério de reconhecimento da produção de biofilme. Porém, como observado em nosso estudo, os autores detectaram que a produção de biofilme nestas amostras foi notavelmente mais baixa do que a de amostras produtoras de biofilme PIA-dependentes. Outro importante aspecto destacado, que pode também influenciar no reconhecimento destas amostras, foi que aquelas produtoras de biofilme proteico apresentaram variação fenotípica com frequência mais elevada que as amostras PIA-dependentes, e mostraram maior variabilidade na produção de biofilme em testes subsequentes.

Certamente uma das maiores dificuldades enfrentadas na detecção de amostras produtoras de biofilme por meio do método da placa de microtitulação está relacionada com as condições rotineiramente empregadas no teste, que muitas vezes não são adequadas à expressão desta característica. Apesar do TSB ser o meio de cultura mais utilizado nos estudos sobre a produção de biofilme que empregam esta metodologia, comparações com resultados obtidos no meio de BHI, assim como a suplementação destes meios com carboidratos (glicose ou sacarose) ou cloreto de sódio, permitiram evidenciar a influência de tais fatores na produção de biofilme PIA-dependente (STEPANOVIĆ, 2007).

No caso da detecção dos biofilmes proteicos pelo método da placa de microtitulação, a complexidade do problema aumenta, uma vez que certos fatores que influenciam a produção deste tipo de biofilme não são passíveis de resolução por modificações que atendam a todos os tipos de biofilmes proteicos descritos. Por exemplo, Aap, uma das proteínas envolvidas na formação de biofilme proteico, para

expor os domínios envolvidos na aderência intercelular requer proteólise limitada, mediante adição de tripsina, elastase ou cathepsina G ao meio de cultura (ROHDE et al., 2005). Embp, outra proteína envolvida na formação de biofilme, pode necessitar da adição de 50% (v/v) de soro de cabra ao meio de cultura e tempo de incubação prolongado (48 h), para que o fenótipo biofilme-positivo seja detectado por meio deste teste (CHRISTNER et al., 2010). Já a adição de 1,5 M de NaCl ao meio de cultura aumentaria a expressão do gene *embp*, originando um biofilme heterogêneo e mais espesso. No entanto, este parece ser menos aderente ao poliestireno e se desprende facilmente da superfície dos poços da placa de microtitulação, o que pode dificultar sua detecção (LINNES; MA; BRYERS, 2013).

Em virtude do melhor desempenho da DOeb como método de leitura para detecção das amostras produtoras de biofilme, a sua determinação foi empregada em nosso estudo como referência para classificação das amostras.

O percentual geral de amostras positivas para produção de biofilme (48%) foi quase idêntico ao obtido por Líduma e cols. (2012), em amostras clínicas de *S. epidermidis* provenientes de sangue e cateter intravenoso, testadas pelo método da placa de microtitulação. Resultado similar (54%) foi relatado na Índia (PRASAD et al. 2012) para amostras desta espécie bacteriana isoladas de infecções associadas a dispositivos médicos. No Brasil, percentual semelhante (52%) foi obtido por Rito (2008) em estudo com cepas de *Staphylococcus epidermidis* resistente à meticilina (MRSE) isoladas de pacientes de um hospital universitário, enquanto Lazzarotto (2010) encontrou positividade para esta expressão em 64% dos isolados de *S. epidermidis* obtidos de cateter venoso central. Valor ainda maior (76%) foi relatado por De Araujo (2006) em cepas MRSE de pacientes de um hospital universitário no Rio de Janeiro, ressaltando-se, neste caso, que o TSB utilizado foi acrescido de 1% de glicose.

A maioria das amostras produtoras foi classificada como de nível forte de produção (56%), sendo que os níveis fraco e moderado não mostraram diferenças discrepantes (24% e 20%, respectivamente). Resultados opostos a estes foram encontrados por Lazzarotto (2010), que evidenciou, em amostragem de *S. epidermidis* produtora de biofilme isolada de cateter venoso central, o percentual de 62% para o nível fraco de produção, enquanto os níveis forte e moderado apresentaram-se com valores de 15% e 21%, respectivamente.

Além dos testes quantitativos para produção de biofilme, as amostras foram avaliadas quanto às reações no AVC. Este método foi proposto por Freeman, Falkiner

e Keane (1989) com o objetivo de ser um procedimento rápido, sensível e reprodutível, superando os problemas relacionados ao método em tubo de Christensen (CHRISTENSEN et al., 1982). Sua simplicidade permite o estudo de um grande número de amostras, sem a demanda de recursos técnicos ou equipamentos diferenciados. Além disso, o teste se mostrou extremamente útil no estudo da variação fenotípica apresentada por amostras de estafilococos (NURYASTUTI et al., 2008; ZIEBUHR et al., 2001) e de outras bactérias (IZANO et al., 2008) produtoras de biofilme.

Apesar de amplamente utilizado, o mecanismo específico da resposta envolvida neste método ainda não está totalmente esclarecido. Contudo, alguns dados indicam que a reação positiva, evidenciada pelo escurecimento da colônia produtora de biofilme, decorreria da constituição polissacarídica da matriz extracelular do biofilme. O vermelho congo parece estabelecer uma forte interação com polissacarídeos contendo resíduos  $\beta$ -D-glucanas (TEATHER; WOOD, 1982), o que poderia explicar sua ligação com a PIA, uma homoglicana linear de resíduos de acetilglicosamina. A correlação da produção de PIA com a reação positiva no teste de AVC pode ser observada em *S. epidermidis* produtores de biofilme e que possuem genes do operon *ica*, assim como em outras espécies do gênero *Staphylococcus* produtoras de biofilme que possuem genes homólogos aos do operon *ica* de *S. epidermidis* (*S. aureus*; *S. caprae*, *S. lugdunensis*, *S. haemolyticus*) (ALLIGNET et al., 2001; ROHDE et al., 2010). Também podem apresentar reação positiva no meio AVC outros gêneros/espécies bacterianos produtores de biofilme que possuam genes ortólogos aos do operon *ica*, como *Actinobacillus pleuropneumoniae* (IZANO et al., 2007), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (IZANO et al., 2008), *Bordetella* (PARISE et al., 2007), *Escherichia coli* (WANG; PRESTON; ROMEO, 2004) e *Yersinia pestis* (YOONG; CYWES-BENTLEY; PIER, 2012).

Considerando-se a positividade do resultado da produção de biofilme obtido nos testes com placas de microtitulação (48%), constatamos que o teste em AVC apresentou uma menor positividade (27%). Resultados semelhantes também foram observados em outros estudos com amostras de *S. epidermidis* e outros ECNs (ARCIOLA et al., 2006, GARCIA, 2004, JAIN; AGARWAL, 2009, OLIVEIRA; CUNHA, 2010, LAZZAROTTO, 2010), bem como em *S. aureus* (ATSHAN et al., 2012, JAIN; AGARWAL, 2009, SAISING, 2012).

A diferença observada nos resultados nos dois testes poderia ser explicada pelo suposto mecanismo envolvido na reação positiva no AVC. Neste teste, a reação dependeria da produção de biofilme de natureza polissacarídica, enquanto que o teste em placa de microtitulação detectaria qualquer tipo de biofilme, independentemente da sua composição química. Corroborando esta hipótese, todas as 14 amostras caracterizadas como produtoras de biofilme polissacarídico pelos testes de desagregação com metaperiodato apresentaram reação positiva em AVC, enquanto que as 8 amostras produtoras de biofilme proteico apresentaram reação negativa.

Além disso, em todas as amostras com reação positiva no teste do AVC foi detectada a presença do operon *ica*, indicando a natureza genética da produção do polissacarídeo (PIA) envolvido na formação do biofilme. Outra particularidade desses isolados foi um elevado nível de produção de biofilme, sendo 13 (93%) destes classificados como produtores fortes no teste em placa de microtitulação, e um (7%) como moderado. Desse modo, não se observou no AVC nenhuma reação positiva para as amostras classificadas como produtoras de nível fraco.

A denominação *bordeaux* para colônias que apresentam cor vermelho-escura no teste em AVC foi introduzida em um estudo realizado por Arciola e cols. (2002), onde cerca de 20% das amostras analisadas apresentaram tal reação. Além disso, nenhuma dessas amostras apresentou os genes *icaA* e *icaD*, ou se mostrou produtora de biofilme no teste da placa de microtitulação. Em estudo posterior conduzido pelo mesmo grupo de autores (ARCIOLA et al., 2006), novas amostras foram classificadas como *bordeaux* no teste em AVC, contudo, dentre estas, foram encontrados isolados com diferentes perfis de produção de biofilme no teste em placa de microtitulação, além da presença dos genes *icaA* e *icaD*. Investigações posteriores também utilizaram esta classificação (KOUIDHI et al., 2010, OLIVEIRA; CUNHA, 2010, POURMAND et al., 2011, SAISING, 2012), porém para caracterizar amostras como não produtoras de biofilme.

Em nosso estudo, 3 amostras apresentaram resultado caracterizado como *bordeaux* no teste em AVC, sendo todas produtoras de biofilme no teste em placa de microtitulação e operon *ica* positivas. Outra particularidade destas amostras foi a impossibilidade de caracterizar, por meio do teste de desagregação por periodato-proteínase, a natureza do biofilme produzido. Este resultado, contudo, não afasta a possibilidade de participação de PIA na constituição do biofilme, uma vez que ao ser investigada a expressão do gene *icaA* em experimentos de RT-qPCR nestas

amostras, os resultados evidenciaram a sua transcrição. Considerações adicionais sobre estes resultados serão tecidas mais a frente, ao se analisar a associação destes resultados com a presença do operon *ica*.

A análise da composição do biofilme por meio do teste de desagregação com metaperiodato-proteinase revelou o predomínio (56%) de biofilme de natureza polissacarídica na amostragem, destacando-se que todas as amostras que apresentaram esta composição foram produtores fortes, exceto uma amostra que foi classificada como produtora moderada. De modo oposto, entre as 8 amostras caracterizadas como produtoras de biofilme proteico, representando 32% do total de amostras produtoras de biofilme, nenhuma apresentou o fenótipo de produtora forte.

Embora o mecanismo de produção de biofilme por meio da expressão de PIA pareça ser predominante em *Staphylococcus*, deve-se considerar que este polissacarídeo não é indispensável para a formação do biofilme, uma vez que ele atua essencialmente como uma adesina intercelular, existindo outras moléculas que podem desempenhar tal função (ROHDE et al., 2005, SUN; ACCAVITTI; BRYERS, 2005, QIN et al., 2007). Consequentemente, nem todas as amostras de *S. epidermidis* produtoras de biofilme mostram-se capazes de produzir PIA, ou possuem o locus dos genes *icaADBC* codificando as enzimas envolvidas para produção desse polissacarídeo (MACK et al., 2013).

A despeito da escassez de dados na literatura referentes à caracterização da composição química do biofilme produzido, e consequentemente do dimensionamento da frequência com que ocorre o biofilme de constituição proteica em isolados clínicos, destaca-se que, em estudo com *S. epidermidis* causadores de infecções associadas a próteses de articulações, Rohde e cols. (2007) caracterizaram como biofilme PIA-independente, em parte mediado por Aap, 27% dos isolados biofilme-positivos estudados, resultado este, portanto, similar ao obtido em nosso estudo.

A importância da caracterização do tipo de biofilme produzido por *S. epidermidis* pode ser analisada sob dois aspectos. O primeiro, como já mencionado nos resultados descritos acima, refere-se a uma questão metodológica, relativa à sensibilidade do procedimento utilizado para a detecção de biofilme. Assim, as amostras produtoras de biofilme dependente de proteína foram classificadas como produtoras fracas ou moderadas de acordo com a leitura da DO<sub>eb</sub> no teste da placa de microtitulação, mas apresentaram resultados de DO<sub>sa</sub> muito próximos ou abaixo

do valor pré-definido como ponto de corte para a discriminação entre amostras positivas ou negativas para a produção de biofilme. Portanto, se eventualmente os resultados de DO<sub>500</sub> forem utilizados para classificar estas amostras, elas poderão ser erroneamente identificadas como não produtoras. Além disso, se a matriz do biofilme não é polissacarídica, como evidenciado em nossos resultados, a classificação da amostra será realizada equivocadamente no teste do AVC como não produtora de biofilme. Soma-se ainda a estes aspectos o fato de que os mecanismos envolvidos na formação de biofilme *ica*-independente podem estar silenciosos nas condições dos testes *in vitro* (ROHDE et al., 2005, SELLMAN et al., 2005, CHRISTNER et al., 2010). Assim, um fenótipo biofilme-negativo obtido sob condições-padrão de cultivo não necessariamente reflete a incapacidade geral de uma amostra de *S. epidermidis* produzir biofilme, o que pode levar a um subdimensionamento da população produtora, em especial a de biofilme não polissacarídico.

O segundo aspecto a ser levado em conta refere-se à possibilidade de consequências em nível da terapêutica no caso de infecções por *S. epidermidis* associadas a biofilme. Embora os biofilmes constituídos unicamente por proteína não pareçam ser tão robustos quanto aqueles constituídos por polissacarídeo, e que ambos os componentes pareçam ser requeridos para a formação de biofilmes mais eficientes (OTTO, 2009), é interessante assinalar a investigação promovida por Qin e cols. (2007). Esses autores ao analisarem 2 amostras *ica*-negativas produtoras de biofilme (SE1 e SE4), procedentes de uma coleção de cerca 100 isolados clínicos de *S. epidermidis*, observaram uma heterogeneidade na arquitetura do biofilme em comparação a uma cepa de referência biofilme-positiva/*ica* positiva (RP62A), sendo que o biofilme dos 2 isolados clínicos, ao contrário da cepa de referência, mostrou-se inalterado frente à exposição ao metaperiodato, e desagregado quando tratado com proteinase K. A resistência de células plantônicas e do biofilme a antibióticos e outros agentes foi comparada entre as três amostras, concluindo-se que os isolados SE1 e SE4 mostraram-se mais tolerantes à vancomicina e a lisostafina que a amostra RP62A. Assim, podemos presumir a existência de um campo que se faz merecedor de estudos mais aprofundados, relativos às amostras de *S. epidermidis* produtoras de biofilme de composição proteica, principalmente no que se refere ao seu comportamento frente a antimicrobianos.

Além de auxiliar na investigação dos mecanismos genéticos envolvidos na formação de biofilme, métodos moleculares frequentemente são utilizados como

complemento aos métodos fenotípicos para pesquisa da produção de biofilme. Entre as técnicas moleculares, a mais utilizada é a de PCR. Devido à diversidade de genes envolvidos na formação de biofilme muitos estudos se concentram na detecção dos genes do operon *ica*, ou de uma parte destes genes, como *icaA* e *icaD* (NASR; ABUSHADY; HUSSEIN, 2012, OLIVEIRA; CUNHA, 2010, ARCIOLA et al., 2001, SATORRES; ALCARÁZ, 2007, TERKI; HASSAINE; OUFRID, 2013, ZHOU et al., 2013), uma vez que a co-expressão destes dois é requerida para a completa síntese de biofilme (GERKE et al., 1998).

Em nosso estudo optamos por investigar a presença de todos os genes do operon *ica* (*icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD*), além do gene regulador *icaR*, devido a sua ação de controle da expressão do operon *ica*. Adicionalmente, outros genes potencialmente associados à virulência de *S. epidermidis* foram estudados.

Em 23 (44%) amostras foi detectada a presença do operon *ica*, resultado que está situado dentro da faixa de 40 a 65% relatada em diferentes estudos, sendo a maioria destes com *S. epidermidis* isolados de sangue, cateter venoso central e de infecções associadas a próteses articulares (ARCIOLA et al., 2001, 2002, 2003, DE SILVA et al., 2002, CAFISO et al., 2004, ROHDE et al., 2007, KOSKELA et al., 2009, LI et al., 2009, KAISER, 2010, MEKNI et al., 2012, CHERIFI et al., 2013).

O operon *ica* foi encontrado sempre de modo completo (*icaA*, *icaD*, *icaB*, *icaC*), acompanhado do gene regulador *icaR*. A presença do operon *ica* completo em isolados de *S. epidermidis* e outros ECNs tem sido observada em vários estudos (DE SILVA et al., 2002, CAFISO et al., 2004, ARCIOLA et al., 2005, NININ et al., 2006, KOSKELA et al., 2009), embora alguns autores relatem também a detecção de amostras contendo somente uma parte dos genes desse operon (DIEMOND-HERNÁNDEZ et al., 2010, OLIVEIRA; CUNHA, 2010, PALUCH-OLEŚ et al., 2011).

Quanto a *icaR*, como na maioria das vezes este gene não é pesquisado, são poucos os dados disponíveis sobre sua ocorrência, ressaltando-se, porém, que Arciola e cols. (2005) e Cafiso e cols. (2004) encontraram resultados semelhantes aos de nosso estudo, isto é, detecção de *icaR* concomitantemente com o operon *ica* completo. Já Esteban e cols. (2010) relataram o encontro de duas amostras isoladas de um mesmo paciente, onde *icaR* não foi detectado, apesar da presença de genes do operon *ica*.

Na maioria (68%) das amostras classificadas como produtoras de biofilme pelo teste da placa de microtitulação foi detectada a presença de *ica*, ressaltando-se

também a sua detecção em um considerável percentual das amostras não produtoras (22%).

A ausência do operon *ica* em uma parcela razoável de amostras é mais um indicativo de que esse elemento gênico, embora importante, não apresenta exclusividade na virulência de *S. epidermidis*, e que essa parece ser realmente multifatorial. Analisando a distribuição de *ica* e de outros potenciais marcadores de virulência em isolados clínicos e comensais dessa espécie (respectivamente isolados de próteses articulares e pele/cavidade nasal de indivíduos saudáveis), Koskela e cols. (2009) não evidenciaram uma diferença significativa para a presença do operon nas amostras clínicas, em comparação aos isolados comensais, e constataram, inclusive, um número expressivo de amostras *ica* negativas (50%) envolvidas em infecções associadas a dispositivos implantados.

Em nosso estudo seis amostras *ica* positivas apresentaram resultado negativo para produção de biofilme, tanto no teste da placa de microtitulação quanto nas reações do AVC, o que representou 52% das amostras não produtoras. Resultados relacionados a não expressão do operon *ica* em amostras *ica*-positivas não são incomuns, e já foram relatados em estudos similares a este (ARCIOLA et al., 2006, KOSKELA et al., 2009, LÍDUMA et al., 2012, OLIVEIRA; CUNHA, 2010, ROHDE et al., 2007, STEVENS et al., 2008). A inoperância do operon *ica* frequentemente decorre de inserções do IS256 no operon *ica* (ZIEBUHR et al., 1999) ou em genes dos reguladores globais (CONLON; HUMPHREYS; O'GARA, 2004, HANDKE et al., 2004).

A correspondência entre a reação caracteristicamente positiva no AVC e a presença do operon *ica* foi de 100%, mas cabe enfatizar novamente que em 3 isolados produtores no teste da placa de microtitulação, e que apresentaram reação *bordeaux* em AVC, este operon também foi detectado. Ao contrário do que foi observado para as amostras produtoras de biofilme com composição polissacarídica, nenhum isolado produtor de biofilme classificado como proteico mostrou-se portador do operon *ica*. Embora este último resultado seja aparentemente óbvio demais para ser mencionado, deve-se considerar a existência de amostras de *S. epidermidis* *ica* positivas que são produtoras de biofilme de composição proteica (KOGAN et al., 2006).

Associando a pesquisa dos genes *icaA* e *icaD* com os resultados obtidos em teste de AVC otimizado envolvendo uma escala de leitura de seis cores (3 tons classificados como positivos e 3 como negativos), Arciola e cols. (2002) encontraram em isolados de *S. epidermidis* uma refinada consistência entre o método genotípico e

o fenotípico, observando-se que o percentual de amostras *icaA/icaD* positivas distribuiu-se dentro da faixa de cores do AVC adotadas como positivas. Do mesmo modo, a distribuição das amostras *icaA / icaD* negativas incidiu nas 3 tonalidades classificadas como negativas no AVC. Entretanto, em estudo posterior com 80 amostras clínicas de *S. epidermidis*, Arciola e cols. (2006) também constataram que 3 das amostras *icaA/icaD* positivas foram negativas no AVC. Ainda com relação a esta investigação, 57% de todos os isolados foram *icaA/icaD* positivos, enquanto o percentual de amostras produtoras de biofilme pelo teste da placa de microtitulação foi de 66%. Essa discrepância foi atribuída à ocorrência do perfil *icaA/icaD*(+) / teste da placa de microtitulação (-) em 8% das amostras e *icaA/icaD* (-) / teste da placa de microtitulação (+) em 16%. A categoria dos produtores fracos de biofilme foi apontada como responsável por proporcionar a maior contribuição para esses resultados discordantes.

Ao pesquisarem os genes *icaA/icaD* e a formação de biofilme em 44 amostras clínicas de *Staphylococcus* spp, Terki, Hassaine e Oufriid (2013) constataram que duas amostras *icaA/icaD* positivas apresentaram resultado negativo no teste da placa de microtitulação, mesmo em condições de crescimento estimuladoras da expressão de PIA. Foi aventado pelos autores que a não detecção da produção de biofilme, a despeito da presença de *ica*, pode ter resultado de fatores como a inativação do operon pelo elemento de inserção IS256 no gene *icaC*, ou a ação de um repressor como *icaR*. Nesse caso, convém ressaltar que em nenhuma das 6 amostras *ica* positivas/biofilme negativas de nosso estudo foi detectada a inserção dos elementos IS256 ou IS257 em genes do operon *ica*.

Ainda considerando os achados de Terki, Hassaine e Oufriid (2013), contrariamente aos nossos resultados, foi detectado que duas das amostras positivas em AVC foram negativas para *icaA* e *icaD*. Com base em Chokr e cols. (2006), os autores levantaram a possibilidade de variabilidade na sequência do locus *ica*, a despeito da produção de um polissacarídeo com as características da PIA que seria capaz de promover a reação positiva no AVC.

Petrelli e cols. (2006), em estudo com 67 amostras de *S. epidermidis* isoladas de infecções associadas a catéteres venosos centrais, encontraram positividade para os genes *icaADBC* em 70% dos isolados, com correspondência de 89% no teste do AVC. Nenhuma das amostras *ica*-negativas apresentou positividade neste meio. Porém, de modo interessante, das 64 amostras classificadas como produtoras de

biofilme no teste da placa de microtitulação, resultado este corroborado por microscopia, em 20 o operon *ica* não foi detectado sendo, conseqüentemente, PIA-negativas. O encontro de amostras produtoras de biofilme PIA-independente destes autores se apresentou mais expressivo que o detectado em nosso estudo. Talvez a origem das amostras estudadas pelos autores (todas isoladas de infecções associadas a dispositivos de implantes) seja uma razão que explique estes resultados. De todo modo, acreditamos que ambos reforçam a necessidade de mais investigações referentes à frequência da ocorrência de biofilme PIA-independente em *S. epidermidis*. Isto porque o operon *ica* é considerado um dos principais determinantes genéticos envolvidos na fase de acumulação durante a formação de biofilme, e a sua detecção já foi sugerida, em trabalhos da década passada, como um instrumento para a discriminação entre cepas invasivas e de contaminação em espécimes clínicos (FREBOURG et al., 2000, GALDBART et al., 2000).

Todas as amostras classificadas como produtoras fortes de biofilme mostraram-se portadoras do operon *ica*, enquanto nas amostras com fenótipo de produtoras fracas e moderadas a frequência de *ica* apresentou-se mais negativa que positiva. Petrelli e cols. (2006) também detectaram que alguns dos isolados *ica*-positivos de *S. epidermidis* de sua investigação produziram biofilme cuja quantidade foi equivalente, ou ainda menor do que a do grupo *ica*-negativo, constatação essa que já havia sido relatada por Cafiso e cols. (2004) e De Silva e cols. (2002).

Apesar do encontro de correlação absoluta entre produção de biofilme forte e *ica*, a julgar pelo estudo de De Silva e cols. (2002), somente a primeira expressão (biofilme forte) teria maior relevância como um marcador de patogenicidade de *S. epidermidis*. Estes autores investigaram a presença de *ica* e produção de biofilme em ECNs isolados de indivíduos portadores e de doentes em uma unidade neonatal de cuidados intensivos, e constataram inexistência de diferenças significativas para a ocorrência do operon ou positividade no AVC entre os grupos estudados. No entanto, a produção quantitativa de biofilme em testes com placa de microtitulação foi significativamente maior em cepas isoladas de sangue ou da pele de recém-nascidos com bacteremia por *S. epidermidis*, sugerindo aos autores que a quantidade de biofilme produzida poderia ser associada com a capacidade dos ECNs causarem infecção.

Mekni e cols. (2012) também elegeram o fenótipo de produtor forte de biofilme como critério útil, mas para diferenciar cepas de infecções relacionadas a cateter (IRC)

de cepas provenientes de bacteremias não associadas a cateter (BNAC). Neste estudo, a análise da resistência a antimicrobianos, bem como de um amplo leque de genes associados à virulência (*icaABC*, *aap*, *atlE*, *bhp*, *fbe*, *embp*, IS256), além de síntese de PIA e formação de biofilme, indicou que o fenótipo de produtora forte de biofilme foi significativamente mais frequente nas cepas de IRC do que nas de BNAC.

Quando comparado ao *S. aureus*, na medida em que a produção de toxinas e de outros fatores de virulência constituem expressões menos óbvias em *S. epidermidis*, a capacidade deste micro-organismo para formar biofilme tem sido apontada como o principal fator envolvido na sua virulência, mediante proteção contra a ação do sistema imune e persistência ao tratamento com antimicrobianos. Porém, além da formação de biofilme e dos genes diretamente relacionados a essa expressão, é necessária a caracterização de outros fatores que, encontrados de modo associado ou não com a presença de genes que codificam a produção de biofilme, possam atuar como componentes da virulência desse micro-organismo. Afinal, isoladamente, a pesquisa de genes que codificam a formação de biofilme e/ou a simples detecção fenotípica desta expressão não parecem configurar resultados conclusivos para tal discriminação, uma vez que esta expressão pode ser detectada também no micro-organismo colonizador da pele.

Analisando os resultados referentes à pesquisa dos genes *aap*, *embp*, *bhp* na amostragem estudada, convém inicialmente destacar que Aap é uma proteína de superfície capaz de exercer distintas funções na formação do biofilme por *S. epidermidis*, sendo capaz de determinar a formação de biofilme PIA-independente quando atuando sozinha, ou aumentar a adesão de PIA nos produtores de biofilme PIA-dependentes, mediante ligação ao polissacarídeo por meio de seus domínios G5 (OTTO, 2009). No primeiro caso, portanto, Aap pode funcionalmente substituir a PIA, ao atuar como uma adesina intercelular (ROHDE et al., 2005).

A frequência do gene *aap* (29%) em nossas amostras foi considerada baixa se comparada a outros estudos realizados com amostras clínicas ou até mesmo, com comensais de *S. epidermidis* (DE ARAUJO et al., 2006, PETRELLI et al., 2006, HAMID et al., 2011, ROHDE et al., 2004, 2007, STEVENS et al., 2008, VANDECASTEELE et al., 2003), mas foi significativamente maior (44%) nas amostras produtoras de biofilme do que nas não produtoras (15%). Além disso, sua presença foi expressivamente mais elevada em amostras *ica* positivas (48%) que em *ica* negativas (14%), e também em

amostras com perfil biofilme (+)/ *ica* (+) (59%). E se considerarmos o perfil de biofilme forte/*ica* (+) o percentual de detecção de *aap* aumenta para 64%.

Embora não exista um consenso de que a produção de biofilme e / ou a presença do operon *ica* possa ser usado como um marcador de virulência em isolados clinicamente relevantes de *S. epidermidis* (GU et al., 2005, LÍDUMA et al., 2012, ROHDE et al., 2004), alguns estudos indicam que a associação da detecção do gene *aap* e de *ica* com o fenótipo produtor forte de biofilme possui uma melhor correlação com a patogenicidade do que estes marcadores individualmente (MATEO et al., 2008, MEKNI et al., 2012, STEVENS et al., 2008).

Incluindo na análise a detecção dos genes *embp* e *bhp*, ressalta-se que apesar do primeiro ter sido o que apresentou frequência mais elevada (69%), sua distribuição entre amostras produtoras (72%) e não produtoras de biofilme (67%) não mostrou diferenças significativas, o que, em princípio, impede de relacioná-lo automaticamente como um componente chave na formação de biofilme e/ou virulência das amostras estudadas. Já *bhp*, curiosamente, foi detectado somente nas amostras classificadas como não produtoras de biofilme, com percentual de 22% neste grupo bacteriano.

*Embp* é uma proteína gigante de 1 MDa que, provavelmente, se liga não covalentemente à superfície da célula bacteriana, e estudos demonstraram que ela, tal como *Aap*, pode funcionar como adesina intercelular de modo independente ou em paralelo à atuação da PIA, sendo capaz de promover a formação de biofilme em amostras, simultaneamente, *ica* negativas/*aap* negativas (CHRISTNER et al., 2010). A proteína *Bhp*, que recebeu este nome devido a sua homologia com a proteína *Bap* descrita em *S. aureus*, foi sugerida como provável participante na formação de biofilme em *S. epidermidis* (TORMO et al., 2005b).

Em nosso estudo, deve-se levar em consideração o fato de que o alto percentual de *embp* detectado não implica em uma situação de direta correspondência com a produção da proteína pelas amostras, uma vez que existem amostras de *S. epidermidis* em que o gene *embp* é expresso somente na presença de soro (CHRISTNER et al., 2010). A partir desta constatação foi sugerido que *Embp* seja preferencialmente produzida *in vivo*, uma situação similar à detectada para a proteína ligadora de fibrinogênio, *Fbe*, também chamada de *SdrG* (SELLMAN et al., 2008, CHRISTNER et al., 2010).

Mekni e cols (2012) observaram que os genes *embp* e *bhp*, bem como outros como *aap*, apresentaram-se igualmente distribuídos em cepas invasivas e comensais

de *S. epidermidis*, resultados que foram similares aos previamente relatados por Rohde e cols (2004). Contrariamente a estes autores, em estudo de caracterização genética de amostras de *S. epidermidis* isoladas de pacientes com infecções oculares e indivíduos normais, Duggirala e cols. (2007) demonstraram a presença do gene *ebp* nos isolados de endoftalmite, indicando o seu potencial como marcador de virulência para esta espécie bacteriana.

Quanto à presença de *ebp* em amostras comensais de *S. epidermidis*, convém mencionar uma hipótese interessante levantada por Linnes, Ma e Bryers (2013). Estes investigadores caracterizaram o padrão de expressão de *Embp* em culturas planctônicas e de biofilme, bem como sob condições de estresse osmótico elevado, o que representaria o ambiente comensal da pele. A expressão de *Embp* sem estresse osmótico foi similar para culturas planctônicas e aderentes, enquanto a exposição ao estresse osmótico através de NaCl causou ligeiros aumentos na expressão de *ebp* em culturas planctônicas. Contudo, em culturas aderentes foi observado um aumento de 100 vezes na expressão de *ebp* na presença de NaCl em relação aos controles, o que também coincidiu com morfologia alterada do biofilme. Segundo os autores, os resultados foram sugestivos de que o papel central da proteína *Embp* seria o de permitir a residência do micro-organismo como colonizador comensal da pele, mediante estabilização da parede celular contra o estresse osmótico, em vez de atuar primariamente como um fator de virulência promotor da adesão.

Ao contrário do que esperávamos, a pesquisa dos genes *aap*, *ebp* e *bhp* nas amostras não se mostrou útil ou conclusiva para explicar a natureza da constituição química das 8 amostras produtoras de biofilme não polissacarídico. A começar por *bhp*, que foi encontrado somente em amostras não produtoras de biofilme. Já *aap* mostrou-se presente em somente uma das amostras produtoras de biofilme de composição proteica, resultado diferente do relatado por Rohde e cols. (2007) em isolados de casos de infecções de próteses articulares, nos quais o gene *aap* foi detectado em 90% das amostras produtoras de biofilme PIA-independente. Nas outras 7 amostras foi detectado o gene *ebp*, mas a similar distribuição de sua presença entre amostras produtoras e não produtoras de biofilme dificulta estabelecer associações com a composição do biofilme.

Além de *aap*, *ebp* e *bhp*, genes considerados como associados à produção de biofilme, foram investigados também *atlE* e *capB*, além dos genes da transposase

das sequências de inserção IS256 e IS257. O interesse nestes genes teve por base o fato deles serem apontados como potencialmente relacionados à virulência e/ou resistência a antimicrobianos em *S. epidermidis* (OTTO, 2009).

A autolisina *atlE* é uma molécula envolvida na aderência direta do *Staphylococcus* a superfícies hidrofóbicas, e que também possivelmente atua na fase de acumulação do biofilme (HOUSTON et al., 2011), além de se ligar à proteína vitronectina da matriz extracelular (HEILMANN et al., 1996, LI; LJUNGH, 2001).

O gene *atlE* foi detectado em 100% das amostras, estando sua presença, portanto, desvinculada de uma associação diferenciada com o fenótipo produtor ou não produtor de biofilme. Mekni e cols. (2012) também constataram a onipresença de *atlE* em isolados clínicos e comensais de *S. epidermidis*. Do mesmo modo, Frebourg e cols. (2000) e Rohde e cols. (2004) são outros autores que evidenciaram a presença ubíqua deste gene em isolados de *S. epidermidis*, sem distinção de origem clínica ou comensal. Nossos achados, portanto, vem se juntar a outros relatos da literatura, que são indicativos de que a pesquisa deste gene não contribui como marcador de patogenicidade para este micro-organismo.

Outro gene que mostrou frequência bastante elevada nas amostras de nosso estudo foi *capB* (81%), não sendo evidenciada diferenças expressivas entre amostras produtoras e não produtoras de biofilme, ou associação a algum dos outros marcadores genéticos estudados.

O produto codificado por *capB* é PGA, um exopolímero antifagocítico de ácido poli- $\gamma$ -DL-glutâmico que pode ser detectado em algumas espécies bacterianas (KAPATRAL et al., 2002, REN et al., 2003), incluindo *S. epidermidis* (GILL et al., 2005). Kocianova e cols. (2005) observaram sua síntese por todas as amostras dessa espécie testadas, bem como, por uma série de ECNs estreitamente relacionados, sem diferença significativa na produção entre amostras comensais e clínicas, o que permitiu hipotetizar que este polímero é importante para a sobrevivência de *S. epidermidis* em ambas as situações, como organismo comensal na pele e durante a processos infecciosos. Esta é uma observação interessante, uma vez que este polímero está presente em algumas outras bactérias, sendo considerado um importante fator de virulência antifagocítico para a virulência do *Bacillus anthracis* (KOEHLER, 2009).

O gene da transposase da IS256 foi o marcador genético que se mostrou menos prevalente em nossa investigação, com percentual de 23%. A principal importância

deste elemento genético está ligada a sua capacidade de se integrar reversivelmente em sítios do operon *ica*, determinando um fenômeno denominado de variação de fase, que afeta a formação do biofilme em decorrência do comprometimento da síntese de PIA (KIEM et al., 2004, ZIEBUHR et al., 1999). Sua frequência parece ser significativamente maior em amostras de *S. epidermidis* de origem clínica, sugerindo que este elemento possa ser utilizado como marcador para discriminar cepas invasivas de comensais (KOZITSKAYA et al., 2004, GU et al., 2005). Adicionalmente, a presença desse determinante genético pode estar associada à de genes de resistência a antimicrobianos (CONLON; HUMPHREYS, O'GARA, 2004, HENNIG; ZIEBUHR, 2010).

Rohde e cols. (2004) encontraram este gene em 93% dos isolados clínicos de pacientes que receberam transplante de medula óssea e em 76% dos isolados comensais de pacientes também receptores deste tipo de transplante, não existindo sua detecção em amostras de indivíduos saudáveis. Nestes grupos bacterianos, a frequência de *icaADBC*, embora com valores um pouco inferiores, de certo modo acompanhou a distribuição do IS256, o que, juntamente com mais alguns dados, levou os autores a hipotetizarem que o próprio ambiente hospitalar determina processos seletivos para populações bacterianas endógenas, fazendo com que a detecção destes genes talvez não seja adequada para discriminar adequadamente cepas invasivas das cepas colonizantes hospitalares de *S. epidermidis*.

Gu e cols. (2005) também detectaram em amostras clínicas de *S. epidermidis* uma frequência do IS256 bem superior (85%) à obtida em nosso estudo, com incidência significativamente maior em isolados clínicos que nos isolados oriundos da pele da equipe médica e de indivíduos da comunidade. Os autores, ao contrário de Rohde e cols. (2004), apontaram este gene como um marcador molecular útil para diferenciar cepas invasivas das cepas comensais.

Outra investigação que evidenciou alta frequência de IS256 em isolados clínicos foi a realizada por Koskela e cols. (2009). Comparando amostras clínicas e comensais de *S. epidermidis* (respectivamente, próteses articulares e pele/cavidade nasal de indivíduos saudáveis), foi constatada a presença desse elemento genético em 81% dos isolados clínicos e em apenas um dos comensais, o que permitiu apontá-lo como um marcador superior aos genes do operon *ica* para denotar a capacidade de invasão de *S. epidermidis*.

Apesar da frequência de IS256 em nosso estudo não ter sido alta, deve-se destacar que este elemento apresentou significativa associação com a produção de biofilme (36% para amostras produtoras frente 11% das não produtoras), bem como com o fenótipo de produtora forte (57%) e com o operon *ica* (52%).

Essa associação tem sido observada por outros autores e é apontada como uma característica que, junto com a resistência a antimicrobianos, pode indicar clones específicos de *S. epidermidis* altamente adaptados ao ambiente hospitalar (LI et al., 2009, RHODE et al., 2004). Em nosso estudo, a associação de IS256 com alguns marcadores de resistência a antimicrobianos também foi detectada, e será discutida mais à frente.

Outra sequência de inserção que pode ser encontrada inserida no locus *ica* de amostras clínicas de *S. epidermidis* é a IS257, cuja presença pode estar associada à resistência a antimicrobianos (LEELAPORN et al., 1994, KOZITSKAYA et al., 2004). A detecção do gene da transposase do IS257 mostrou uma frequência similar à de *atlE*, não sendo detectada somente em uma amostra não produtora de biofilme e, portanto, sem predomínio entre amostras produtoras e não produtoras de biofilme. Este elemento tem sido pouco estudado, mas alguns autores apontam que sua incidência ocorre indistintamente em amostras clínicas e comensais (KOZITSKAYA et al., 2004).

A relevância de *S. epidermidis* como potencial patógeno em IRAS não pode ser desvinculada da crescente multirresistência a drogas adquirida por este micro-organismo, o que deve ser motivo de permanente monitoração, não só pelas dificuldades no tratamento das infecções, como também pelo papel que este micro-organismo pode desempenhar como reservatório de genes de resistência, os quais podem ser transferidos para outras espécies de estafilococos (OTTO, 2012).

As amostras analisadas em nosso estudo apresentaram elevadas taxas de resistência para todos os antimicrobianos beta-lactâmicos, incluindo a combinação destes agentes com inibidores de beta-lactamases. Os percentuais variaram de 83% a 96%, e especificamente para oxacilina, o valor foi de 85%, resultados estes que estão de acordo com os obtidos em estudos similares (CABRERA-CONTRERAS et al., 2013, SADER; MOET; JONES, 2009a).

As taxas de resistência a penicilinas penicilinase-resistentes em ECNs tem se apresentado mundialmente com um padrão que parece mais uniforme que o que é expresso por *S. aureus*. Um abrangente estudo do Programa Sentry realizado entre

1997 e 1999, envolvendo EUA, Canadá, América Latina e região do Pacífico Asiático mostrou que, enquanto a resistência à meticilina em *S. aureus* variou de cerca de 2% (Suíça) a 74% (China), para os ECNS foram encontrados níveis regularmente altos de resistência, com todas as taxas envolvendo valores superiores a 70% (DIEKEMA et al., 2001). Dados anteriores de um estudo realizado pelo Sistema Nacional de Vigilância de Infecções Nosocomiais do Hospital da Universidade de Michigan (EUA), de 1980 a 1989, já haviam indicado que a incidência de ECNs resistentes à meticilina aumentara de 20% para 70% (SCHABERG; CULVER; GAYNES, 1991).

Em nosso meio, considerando amostras clínicas de *S. epidermidis* (ou de ECNs em que *S. epidermidis* foi predominante) isoladas de diferentes espécimes clínicos, especialmente de hospitais públicos, os percentuais relatados para resistência à oxacilina também são bastante altos, variando de 50% (KEIM, 2005), 68% a 72% (BARROS, 2009; KAISER, 2010), 80% a 88% (BRATFICH, 2005; BRITO, 2011; SOUZA, 2009), e superior a 90% (TEIXEIRA, 2009; CORDEIRO, 2007).

Para linezolida ou vancomicina foi constatada sensibilidade absoluta, bem como uma taxa insignificante de resistência para daptomicina, resultados considerados compatíveis com os frequentes relatos de ausência ou baixas taxas de resistência para essas drogas em isolados clínicos de *S. epidermidis* (SADER et al., 2009b; BARROS, 2009; KAISER, 2010; SOUZA, 2009; KEIM 2005; BRATFICH, 2011).

Apesar dos dados apresentados acima, convém destacar que, ao contrário da grande maioria dos relatos sobre resultados negativos ou discretos para glicopeptídeos e outras drogas para as quais a frequência de resistência é normalmente baixa em ECNs, resultados muito expressivos foram encontrados para isolados de ECNs (entre eles, 36 *S. epidermidis*) do trato respiratório de pacientes HIV<sup>+</sup> na África do Sul. Entre os anos de 2007 e 2008, Iweriebor e cols. (2013) evidenciaram taxa de resistência de 100% para, entre outras drogas, linezolida e daptomicina. Adicionalmente foi apontado que todas as amostras apresentaram reduzida suscetibilidade a glicopeptídeos, devendo-se ressaltar, porém, que os autores não mencionaram as CIMs encontradas.

Percentuais relativamente baixos de resistência foram também observados em nosso estudo para as drogas quinupristina-dalfopristina (13%), tetraciclina (13%), rifampicina (17%) e moxifloxacina (21%), enquanto para a maioria dos outros antimicrobianos testados os percentuais de resistência foram superiores a 50%. No

caso da quinupristina-dalfopristina, apesar de discreto, o percentual de resistência detectado em nossa investigação foi maior que os obtidos por Cordeiro (2007) e Bratfich (2011) (4,1% e 2,5 %, respectivamente). Chama também a atenção em nossos isolados o baixo percentual de resistência para tetraciclina, droga de amplo espectro, em uso clínico há várias décadas para o tratamento de diferentes tipos de infecções bacterianas. Esse achado parece comum em nosso meio, tendo sido constatado em diferentes amostragens clínicas de *S. epidermidis*: Keim (2005): 12,7%; Barros (2009): 21%; Teixeira (2009): 21,7%; Kaiser (2010): 7,7%. Porém, a julgar pelo estudo de Araujo (2006), o mesmo pode não ocorrer para esta resistência quando se analisa isolados da comunidade. Comparando cepas de MRSE hospitalar, comunitárias, e de sistema *home care*, a autora encontrou percentuais de resistência a tetraciclina, respectivamente, de 8%, 89% e 20%.

Avaliando a associação da resistência a drogas com a produção de biofilme, no geral, embora a resistência para a maioria dos antimicrobianos testados tenha sido maior nas amostras produtoras que nas não produtoras, diferenças expressivas não foram observadas. Do mesmo modo, diferenças expressivas não foram detectadas para a maioria dos antimicrobianos testados quando se compara as amostras com fenótipo de produtora PIA-dependente e PIA-independente. Nesse caso, a exceção ficou por conta da resistência a sulfametoxazol-trimetoprima, que incidiu de modo significativamente superior nos isolados PIA-dependente. Adicionalmente, todas as amostras produtoras PIA-independente foram resistentes à gentamicina, enquanto nos isolados PIA-dependente o percentual de resistência a esse aminoglicosídeo foi de 43%.

Resultados parcialmente diferenciados dos nossos foram obtidos por Arciola e cols. (2005) em amostras de *S. epidermidis* de infecções de implantes ortopédicos. Neste estudo foi observado que as cepas produtoras de PIA apresentaram maior prevalência de resistência para todas as drogas testadas que as cepas não produtoras, com associação estatisticamente significante para todos os aminoglicosídeos, além de sulfametoxazol-trimetoprima e ciprofloxacina

A julgar pelos achados de Klingenberg e cols. (2007), associação entre a produção de biofilme e resistência a antimicrobianos parece constituir um fenômeno mais incidente em *S. epidermidis* que em outros ECNs. Em estudo com ECNs provenientes de sepse em neonatos os autores encontraram resistência a

antimicrobianos significativamente correlacionada com produção de biofilme em *S. epidermidis*, mas não em outros ECNs.

Os perfis de resistência predominantes encontrados em nosso estudo foram os que envolveram a combinação de 10 ou mais drogas (63% dos isolados), especialmente no nível de 10 e 11 marcadores. Estes perfis de multirresistência mostraram-se mais prevalentes nas amostras produtoras de biofilme que nas não produtoras (58% e 42%, respectivamente), resultado que foi similar aos observados por Arciola e cols. (2005) e Cabrera-Contreras e cols. (2013). Em estudo com isolados de *S. epidermidis* de um hospital no México testados para produção de biofilme e 17 antimicrobianos, os últimos autores encontraram maior percentagem de resistência a antimicrobianos e maior número de marcadores em amostras produtoras de biofilme (perfis de resistência simultânea para 9 a 14 drogas) que nas não produtoras (3 a 8).

Convém salientar porém, que ao comparar cepas de MRSE, De Araujo (2006) encontrou resultados diferenciados de acordo com a procedência dos isolados. Enquanto as amostras isoladas de pacientes de um hospital universitário do RJ, bem como de pacientes de sistema *home care* e de profissionais de saúde deste sistema exibiram percentuais de multirresistência igualmente elevados nos grupos de amostras produtoras e não produtoras de biofilme, nos isolados produtores de biofilme da comunidade a multirresistência foi de 71%, e ausente no grupo das não produtoras.

Além da associação com produção de biofilme, foi observado que a presença do elemento de inserção IS256 mostrou-se associada a percentuais de resistência mais elevados para quase todos os antimicrobianos testados. Apesar de todas as amostras portadoras do elemento IS256 apresentarem-se resistentes a todos os antimicrobianos beta-lactâmicos, a elevadíssima frequência da resistência a estas drogas na amostragem total impossibilita apontar a existência de um verdadeiro fenômeno de associação entre ambos. De todo modo, este achado está em concordância com os dados de outros estudos (CAMPOCCIA et al., 2009; MONTONARO et al., 2007).

Porém, deve ser destacada a ocorrência de associação significativa da presença desse elemento de inserção com resistência às quinolonas testadas, e com sulfametoxazol-trimetoprima. Já com a resistência à gentamicina tal associação não foi detectada.

No caso de quinolonas como a levofloxacina, os alvos primários são a DNA girase e a topoisomerase IV. Mutações que ocorram nas regiões altamente

conservadas de determinantes de resistência às quinolonas (QRDR) dos genes que codificam estas enzimas podem causar resistência a esta droga (YAMADA et al., 2008). Não há nenhuma evidência na literatura que nos permita correlacionar tais mutações ao IS256. No entanto, é necessária uma investigação mais ampla para elucidar esta questão, considerando que a presença do elemento IS256 pode afetar a resistência a antimicrobianos, a exemplo do que já foi demonstrado para outras drogas (ZIEBUHR et al., 2006).

Quanto à associação de IS256 com a resistência a sulfametoxazol-trimetoprima e ausência de associação com a gentamicina, o resultado é interessante, na medida em que este elemento de inserção foi inicialmente descrito como uma região de flanqueamento do transposon composto Tn4001 que determina resistência à gentamicina e outros aminoglicosídeos (BYRNE, ROUCH, SKURRAY; 1989). Hell e cols. (2013) encontraram IS256 em todos os isolados clínicos de *S. epidermidis* resistentes à gentamicina estudados, e ausência deste elemento de inserção nas amostras sensíveis. Apesar desta estreita associação, é importante notar que a IS256 também pode ser encontrada em múltiplas cópias livres no genoma de *Staphylococcus* (KOZITSKAYA et al, 2004).

Por outro lado, também é interessante notar que a resistência à trimetoprima em *Staphylococcus* é mediada pelo transposon Tn4003, que apresenta estreita associação com a sequência IS257 (CRUPPER et al., 1999), que se mostrou amplamente disseminada nos isolados de nosso estudo.

A influência dos antissépticos, etanol e clorexidina, na produção de biofilme por amostras de *S. epidermidis* foi avaliada pelo seu crescimento em meio de cultivo adicionado de concentrações subinibitórias destes agentes. Em cada experimento realizado, tanto na condição controle (TSB) como na condição teste (TSB + antisséptico), a densidade óptica do crescimento bacteriano das culturas foi mensurada com objetivo de se certificar que as concentrações eram subinibitórias. As diferenças percentuais entre a DO<sub>sa</sub> e a DO<sub>eb</sub> das condições teste e controle foram calculadas para se determinar se o antisséptico testado apresentava efeito de indução ou de inibição da formação de biofilme.

Nas condições teste, o etanol não determinou a indução da formação de biofilme nas 27 amostras estudadas (6 operon *ica* positivas e 21 operon *ica* negativas). Era esperado que pelo menos sobre as 6 amostras biofilme negativo / *ica* positivo existisse indução, pois sabidamente o etanol aumenta a formação de biofilme PIA-

dependente por uma sucessão de regulações positivas, do RsbU sobre o fator alternativo sigma B, e deste sobre o operon *ica*.

Estudos semelhantes ao nosso tiveram sucesso na indução da formação de biofilme pelo etanol em amostras *ica* positivas não produtoras de biofilme. Knobloch e col. (2002) estudando 20 amostras observaram que 4 (20%) tiveram a produção induzida por este agente. Do mesmo modo, Milisavljevic et al. (2008), estudando 19 amostras clínicas e 16 comensais, obtiveram indução da formação de biofilme em 9 (47%) das clínicas e 10 (63%) das comensais.

Uma das condições para que a indução pelo etanol em amostras biofilme negativo / operon *ica* positivo ocorra é que o operon seja funcional. Uma das principais causas para o não funcionamento do operon *ica*, que determina variação fenotípica na produção de biofilme, decorre da inserção do IS256 neste operon. Knobloch et al. (2002), afastaram a possibilidade de inserção do IS256 no operon *ica* pois os tamanhos dos produtos amplificados por PCR do segmento gênico de *icaR* a *icaC* das amostras se situaram dentro do que seria esperado. Sendo assim os autores concluíram que havia potencialidade funcional no operon *ica* destas amostras. Contudo, ressaltam os autores que este tipo de conclusão não afastava a possibilidade de mutações pontuais dentro do operon *ica*.

Abordagem semelhante pode ser estabelecida para as nossas amostras. Isto porque os oligonucleotídeos iniciadores empregados na detecção dos genes *icaA* e *icaC* amplificavam segmentos do DNA que abrangiam os sítios de inserção do IS256 no operon *ica*, isto é, o nucleotídeo com posição 1708 do gene *icaA* e os de posição 3285 e 3742 do gene *icaC* (ZIEBUHR et al., 1999).

Não se pode estabelecer a mesma conclusão sobre as amostras estudadas por Milisavljevic et al. (2008), pois estes autores fizeram a detecção por PCR somente dos genes *icaA* e *icaB*, não tendo estudado *icaC* onde ficam localizados os sítios de inserção que, mais frequentemente, são alvo do IS256 (ZIEBUHR et al., 1999).

Mais recentemente, Chaieb et al. (2011) estudaram a ação de diferentes antissépticos na formação de biofilme, empregando uma variação do método da placa de microtitulação. Neste método, a população bacteriana de células metabolicamente ativas aderida na superfície dos poços da placa é avaliada pela redução a formazana do sal sódico de 2,3-bis(2-metóxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilamida (XTT). Um isolado clínico, S22 *icaA* positivo / biofilme negativo, sofreu indução da

produção de biofilme pela adição de álcoois, etanol e iso-propanol a 1%, ao meio de cultura.

O aumento da produção de biofilme PIA-dependente em amostras de *S. epidermidis* crescidas em meio adicionado de etanol parece ser o efeito mais constantemente observado. Estudos realizados por Knobloch et al. (2002) e Milisavljevic et al. (2008), constataram que 14 (82%) e 52 (100%), respectivamente, das amostras classificadas como produtoras fracas apresentaram aumentos da produção de biofilme nos testes em placa de microtitulação com meio acrescido de etanol. A amostra clínica E24, biofilme negativo / *icaA* positivo estudada por Chaieb et al. (2011), também apresentou indução da produção de biofilme na presença de álcoois.

Em nosso estudo, 17 amostras biofilme positivo / operon *ica* positivo apresentaram um comportamento semelhante ao descrito em outros estudos (KNOBLOCH et al., 2002, MILISAVLJEVIC et al., 2008, CHAIEB et al., 2011), exibindo aumento nos valores da diferença percentual da DOeb ou da DOsa em uma das condições teste (etanol a 2 e 4%). Duas amostras apresentaram resultados diferenciados. A EP48, uma amostra produtora fraca, apresentou aumento na DOsa em presença de etanol a 2% com redução a 4%, e redução da DOeb em ambas as condições avaliadas. A EP63, uma amostra produtora forte, apresentou reduções expressivas da DOsa e DOeb (-90 e -93, respectivamente) em presença de etanol a 4%.

Não foi encontrada uma explicação para o comportamento apresentado pela EP48. A produção fraca de biofilme, aparentemente não poderia ser correlacionada a esta característica, pois estudos anteriormente citados observaram aumento da formação de biofilme justamente em amostras classificadas como produtoras fracas (KNOBLOCH et al., 2002, MILISAVLJEVICH et al., 2008). Já a redução da produção de biofilme, no meio de cultura adicionado de etanol a 4%, pode ser explicada pela inibição do crescimento da amostra, tomando como base os resultados da DOg (dados não apresentados).

A maioria das amostras biofilme positivo / operon *ica* positivo, na condição teste com etanol apresentou uma desproporção no aumento dos resultados da DOsa – DOeb. Na tentativa de esclarecer as causas desta desproporção dos resultados foi construída uma curva correlacionando DOeb e concentração de uma diluição seriada em álcool da solução de cristal violeta de Hucker a 2%. Sua análise mostra de forma

conclusiva que os resultados dos extremos da curva não apresentam linearidade. Isto explica o pequeno percentual de variação da DO<sub>eb</sub> nas amostras produtoras fortes de biofilme. Como estas, na condição controle, já apresentavam uma DO<sub>eb</sub> consideravelmente elevada (> 2,400), o sistema empregado (placa de microtitulação + leitor de ELISA) não teve condição de detectar corretamente variações na concentração já elevada do corante, subestimando os resultados na condição teste.

As oito amostras biofilme positivo / ica negativo, todas produtoras de níveis fraco ou moderado de biofilme proteico, apresentaram aumento nos valores da diferença percentual de DO<sub>sa</sub> e DO<sub>eb</sub> na presença de etanol a 2%. Quando o meio na condição teste foi adicionado de 4% de etanol, 6 amostras apresentaram aumentos na DO<sub>sa</sub> e DO<sub>eb</sub>, enquanto que em 2 os resultados foram divergentes, ou seja aumento na DO<sub>sa</sub> e redução na DO<sub>eb</sub>.

Como os mecanismos de produção de biofilme proteico são pouco estudados, é difícil explicar o comportamento das amostras estudadas frente ao etanol. Contudo, cabe ressaltar que o fator alternativo  $\sigma^B$ , envolvido na ativação da transcrição do operon *ica* não tem ação exclusiva sobre este, sendo um fator regulador global, com ação sobre diferentes sistemas gênicos relacionados à resposta ao estresse.

Concentrações subinibitórias de clorexidina não induziram a produção de biofilme nas amostras não produtoras de biofilme, inclusive as que possuíam o operon *ica*. Já a maioria das amostras produtoras de biofilme estudadas, 13 (76%) PIA-dependentes e 5 (63%) PIA-independentes, quando crescidas na presença das concentrações subinibitórias de clorexidina empregadas, apresentaram redução dos valores da DO<sub>sa</sub> e DO<sub>eb</sub> em relação à condição controle. As reduções observadas foram proporcionais às concentrações de clorexidina (0,5 e 1,0 µg/mL) adicionadas ao meio de cultura, exceto para os resultados da DO<sub>sa</sub> de uma amostra PIA-independente (EP18). Os valores da DO<sub>sa</sub> refletiram redução da formação de biofilme de forma mais expressiva que os da DO<sub>eb</sub>.

A influência da clorexidina na produção de biofilme por amostras de *S. epidermidis* é bem menos estudada que a do etanol. Resultados semelhantes aos nossos foram descritos por Knobloch e cols. (2002). Estes autores observaram redução da formação de biofilme por concentrações subinibitórias de clorexidina em 14 amostras biofilme positivo / ica positivo e 4 amostras biofilme negativo / ica positivo, que apresentavam indução da produção de biofilme mediada pelo etanol. Entretanto, Houari e DiMartino (2007), estudando *S. epidermidis* CIP54124 (*Collection de l'Institut*

*Pasteur*), crescido na presença de concentrações correspondentes a 1/2 a 1/8 da CIM de clorexidina, observaram aumento na produção de biofilme.

Quatro amostras produtoras de biofilme PIA-dependente pertencentes ao nosso estudo apresentaram um comportamento singular. Os valores da DO<sub>sa</sub> e DO<sub>eb</sub> na condição teste com clorexidina não apresentaram variações em relação aos da condição controle. Uma particularidade comum destas amostras é que dentro do grupo de bactérias produtoras de biofilme PIA-dependente, estas se destacavam das demais por serem as produtoras das maiores quantidades de biofilme. Como a quantidade de biofilme foi avaliada pelo valor da DO<sub>sa</sub>/DO<sub>eb</sub>, valores elevados são decorrentes de uma população bacteriana elevada, uma vez que são as células, e não a matriz polimérica extracelular, as responsáveis pela retenção do corante no método da placa de microtitulação. Com isso, valores elevados de DO<sub>sa</sub>/DO<sub>eb</sub> refletem uma maior presença de células no biofilme, indicando uma maior eficiência dos mecanismos de retenção de células por aderência intercelular. Isto permite supor que nestas amostras existe também uma maior quantidade da matriz polimérica extracelular no biofilme. Uma hipótese para a falta de influência da clorexidina nesta população bacteriana pode estar relacionada com uma menor penetração do agente no biofilme, em função da compactação estrutural decorrente da maior quantidade de matriz extracelular.

Corroboram com esta hipótese os resultados obtidos por He et al. (2013). Estes autores demonstraram que biofilmes formados por bactérias da cavidade oral se comportavam a semelhança de materiais poliméricos, ou seja, a composição e a estrutura dos biofilmes influenciam nas suas propriedades viscoelásticas, que estão diretamente relacionadas com o fluxo de substâncias para o seu interior.

Ao se avaliar inicialmente a influência na expressão gênica das concentrações subinibitórias de antissépticos que haviam sido empregadas nos testes de MTP, foi detectada uma redução expressiva da Ct do controle endógeno. Possivelmente este efeito decorreu de uma inibição parcial do metabolismo bacteriano devido às concentrações de antissépticos utilizadas, as quais não atenderam a condição subinibitória pretendida para a execução do qRT-PCR, ao contrário do que ocorreu nos testes de MTP. Em virtude da baixa aderência à parede interna dos tubos de vidro empregados para preparo das culturas para extração de RNA, a população bacteriana desenvolvida seria constituída predominantemente por células planctônicas, mais suscetíveis à ação dos agentes antissépticos. Certamente isto não ocorreu no teste

de MTP, porque parte da população bacteriana se desenvolveu formando biofilme na superfície do poliestireno dos poços das placas de microtitulação, ficando assim menos exposta à ação de substâncias inibidoras. Para o qRT-PCR, tal problema foi sanado com o ajuste adequado das concentrações dos antissépticos no meio de cultura, tendo como base a densidade ótica das populações bacterianas que se desenvolveram.

Todas as três amostras produtoras de biofilme PIA-dependente que tiveram a expressão relativa de *icaA* avaliada pela técnica do qRT-PCR apresentaram aumentos significantes da expressão deste gene na condição teste com etanol. Estes resultados estão em concordância com o que foi observado no MTP, sobretudo para as amostras EP54 e EP40, que apresentaram aumentos expressivos na produção de biofilme, com valores de DO<sub>sa</sub> e DO<sub>eb</sub> superiores a 100% em relação à condição controle.

A amostra EP54, uma produtora moderada de biofilme na condição controle, foi a que apresentou o maior nível de expressão do gene *icaA* (6,5 vezes) sob estímulo do etanol. Ao lado do aumento da expressão de *icaA*, foi observada repressão de 26% na expressão de *icaR* (0,74 vezes), bem como um pequeno aumento de *sarA* (1,2 vezes) e um discreto aumento de *sigB* (1,6 vezes).

Aumento considerável no nível de expressão de *icaA* (4,8 vezes) também foi observado para a amostra EP40, uma produtora de biofilme de nível forte na condição controle. Este aumento foi acompanhado de expressiva repressão da atividade de *icaR* (35% - 0,65 vezes) e do maior aumento para *sarA* (2,4 vezes) registrado neste estudo, enquanto *sigB* mostrou apenas um pequeno aumento (1,3 vezes).

Para ambos os resultados, a interpretação do aumento na expressão de *icaA* na condição teste com etanol deve ser iniciada com base na constatação de que este aumento foi acompanhado de significativa redução da atividade de *icaR*. Este gene é responsável pela codificação da proteína IcaR, um repressor da transcrição que se liga em uma região do códon de iniciação de *icaA*, interferindo na ligação da RNA-polimerase (CONLON; HUMPHREYS; O'GARA, 2002, JEFFERSON et al., 2004).

Conlon, Humphreys e O'Gara (2002) apontaram que o etanol pode promover a ativação do operon *ica* de um modo *icaR*-dependente, mediante ação tanto na fase de transcrição como de pós-tradução de *icaR*, interferindo assim na capacidade deste repressor transcricional de regular negativamente o operon *ica*.

No caso da EP40, aliado à inibição de *icaR*, o aumento da atividade de *sarA* induzido pelo etanol na condição teste também pode ser um fator que contribuiu para

aumentar ainda mais a expressão de produção de biofilme de nível forte, observada previamente nos testes em MTP da amostra. Neste teste fenotípico, a leitura de DO<sub>500</sub> da EP40 apresentou aumento de 101% na concentração de 2% de etanol, e de 139% na concentração de 4%, em relação a condição controle.

O produto codificado pelo fator regulatório transcricional global *sarA* é uma proteína que afeta a transcrição de vários genes envolvidos direta ou indiretamente com a produção de biofilme. A importância desse regulador na produção de biofilme pode ser constatada pelo fato de sua deleção determinar substancial redução na transcrição do operon *ica* (CUE; LEI; LEE, 2012).

Comparando as amostras EP54 e EP40 em termos da atividade de *icaA*, a primeira apresentou aumento bem superior na expressão deste gene, apesar da atividade de *sarA* ter mostrado um aumento menor que o da segunda amostra. Nesse caso, na medida em que a atividade de *sigB*, outro regulador global que modula a formação de biofilme (VAN SCHAİK; ABEE, 2005), não apresentou diferenças expressivas entre as duas amostras, podemos admitir que o fenótipo de produtora moderada de biofilme detectado no cultivo em TSB da amostra EP54 decorra da ação de algum outro regulador que controla parcialmente a atividade de *icaA*. Na presença de etanol, a atuação deste regulador seria minimizada ou neutralizada, o que juntamente com o aumento da repressão da expressão de *icaR*, promoveria a conversão desta amostra de produtora moderada em produtora forte de biofilme. Nesse caso, o aumento da expressão de *icaA* não parece ser totalmente dependente da atividade do regulador *sarA*, uma vez que o aumento na transcrição deste gene foi baixo. O mesmo se aplica ao regulador *sigB*.

Um dos possíveis agentes com papel na regulação de *icaA* seria TcaR, um membro da família MarR de reguladores transcricionais (BRANDENBERGER et al., 2000). Jefferson e cols. (2004) demonstraram que esta proteína exerceu uma fraca atividade reguladora negativa da transcrição do locus *ica* em *S. aureus*, e na sua ausência a produção de PIA e formação de biofilme mostraram-se aumentadas.

Embora na literatura não existam investigações sobre o efeito do etanol sobre a atividade de TcaR, é interessante observar que substâncias como salicilato e diferentes tipos de antibióticos em baixas concentrações demonstraram capacidade de interferir com a ligação deste inibidor ao DNA, o que acarretou indução da expressão de *ica* e estímulo para a produção de biofilme em *S. epidermidis* (CHANG et al., 2010).

Além de TcaR, outro regulador recentemente descrito que vale a pena mencionar é o codificado pelo gene *ygs*, que influencia a formação de biofilme e a resposta geral ao estresse em *S. epidermidis*. Wang e cols. (2011) demonstraram que este gene pode regular a expressão do operon *ica* e modular a síntese de PIA. Em mutantes *ygs* negativos a transcrição de *icaB* mostrou-se negativamente regulada, nove vezes, em relação à amostra parental, enquanto a expressão de *icaR* mostrou regulação positiva de duas vezes. Além do mutante responder negativamente a estresse térmico e salino, seu crescimento mostrou-se significativamente reduzido em meio contendo 5% ou 10% de etanol, indicando a atuação de *ygs* na resposta geral ao estresse. É importante assinalar ainda que os mutantes não mostraram, em relação as amostras parentais, alterações nos níveis de transcrição de reguladores globais como *sarA* (regulador PIA-dependente) e *agr* (regulador de biofilme PIA-independente).

Ainda quanto à amostra EP54, convém destacar que, entre as três amostras *ica* positivas que tiveram a expressão gênica estudada pela técnica do qRT-PCR, esta foi a única em que a presença do gene *aap* foi previamente detectada pela técnica de PCR simples. Este pode ser um dado importante, uma vez que a proteína codificada por este gene é capaz de aumentar a adesão de PIA em seus domínios G5, incrementando a formação de biofilme em amostras de *S. epidermidis* produtoras de biofilme PIA-dependentes (OTTO, 2009).

Por outro lado, ao contrário da EP54, podemos admitir que, por ser uma produtora de biofilme de nível forte mesmo na ausência de estímulo indutivo, a amostra EP40 já parte de uma alta atividade transcricional de *icaA* e, embora ainda responda ao estímulo do etanol aumentando em 4,4 vezes a expressão relativa de *icaA*, este aumento é inferior ao da amostra EP54, que parte de um patamar mais baixo de transcrição de *icaA*.

No caso da amostra EP48, os resultados são interessantes porque evidenciam um aumento considerável no nível de expressão relativa de *icaA* (4,4 vezes) aliado a um aumento de 1,7 vezes na expressão de *icaR* e de 2,1 vezes na expressão de *sarA*. Esse aumento na atividade de *icaA* ocorreu na vigência de aumento de *sarA*, e a despeito da existência de certa atividade repressiva de *icaR* sobre *icaA*. Apesar do dado aparentemente contraditório, é necessário levar em consideração que esta amostra foi previamente classificada como uma produtora de biofilme de nível fraco, tendo mostrado discreto aumento desta expressão no MTP com etanol a 2%, aumento

este somente registrado por meio da leitura da DOsa. É possível que o efeito combinado da atividade de *sigB*, e sobretudo de *sarA*, seja suficiente para suplantar a atividade repressora de *icaR* dessa amostra, resultando em uma ação estimulatória fraca de *icaA*.

Tormo e cols. (2005a) demonstraram que SarA purificada mostrou alta afinidade de ligação à região promotora do gene *icaA* em *S. epidermidis*, sem afetar a transcrição de *icaR*, o que poderia explicar o aumento da atividade deste gene na amostra EP48. Além disso, é importante considerar que Conlon, Humphrey e O'GARA (2002) constataram que o crescimento de *S. epidermidis* na presença de etanol pode resultar na ativação do operon *ica* na ausência de repressão por *icaR*. Os autores especularam que devido a ativação deste operon por etanol ser *icaR*-dependente, e na medida em que baixas concentrações de etanol não reprimem a transcrição de *icaR*, interações diretas entre a proteína *icaR* e etanol podem interferir com a capacidade dessa proteína reprimir a expressão do operon *ica*. Já em concentrações mais elevadas o etanol promoveria, direta ou indiretamente, a repressão de *icaR*.

Ainda com relação à amostra EP48, apesar do aumento da atividade de *sigB* na amostra não ter sido marcante, na medida em que este foi encontrado na vigência de um discreto aumento de *icaR*, tal resultado sugere a necessidade de investigações adicionais, uma vez que Knobloch e cols. (2004) apontaram que a expressão de *icaR* é reprimida indiretamente pelo fator alternativo  $\sigma^B$ .

A amostra EP05, uma amostra PIA-independente classificada como produtora de biofilme com nível fraco no teste em MTP, na condição teste com etanol analisada pelo qRT-PCR apresentou expressão relativa do gene *sarA* com valor de 0,39 vezes, e de 0,78 vezes para *sigB*, caracterizando, portanto, reduções na atividade destes genes, respectivamente, de 61% e 22%. É importante destacar que esta amostra foi caracterizada pelo teste de PCR simples como sendo negativa para *aap* e *bhp*, e positiva para *embp*.

Os resultados obtidos com essa amostra produtora de biofilme PIA-independente são sugestivos de que o etanol pode ter aumentado a produção de biofilme, via inibição do gene *sarA*, e talvez de *sigB*. Ao contrário do que se observa nas amostras de *S. epidermidis* portadoras do operon *ica*, nas cepas PIA-independentes o produto do gene *sarA* pode atuar como um regulador negativo da formação de biofilme. Christner e cols. (2012) obtiveram um mutante insercional em *sarA* da amostra clínica 1585 de *S. epidermidis* não produtora de biofilme, e negativa

para *ica* e *aap*. Constataram os autores que a inativação do gene codificador deste regulador induziu formação de biofilme via super-expressão de *embp*, atuando a proteína Embp produzida como adesina intercelular de modo análogo à PIA. Adicionalmente à expressão de *embp*, ocorreu aumentada liberação de eDNA, o que contribuiu significativamente para a formação de biofilme no mutante. Indo ao encontro deste relato, convém destacar que a amostra EP05, apesar de já se apresentar como produtora de biofilme em TSB no MTP, o que a diferencia da cepa 1585, ao ser exposta ao etanol apresentou expressiva produção de biofilme, com mudança do perfil de produtora fraca para produtora moderada, próxima do limite com o forte.

Quanto à redução da atividade de *sigB* observada na amostra EP05 ao ser exposta ao etanol, o resultado não é passível de uma conclusão final, uma vez que o valor foi muito discreto (22%). Porém, por ser um regulador global de resposta ao estresse, e pelo fato de não existir na literatura dados similares ao descrito para *sarA*, o esperado seria encontrar aumento na expressão deste elemento gênico. Desconsiderando o fato de que o resultado pode estar situado em um patamar sujeito a imprecisões da técnica, podemos supor que, aparentemente, exista um padrão sugestivo de uma deficiência intrínseca dessa amostra para expressar *sigB*. Esta premissa se baseia no fato de que nos testes com clorexidina, o resultado foi muito próximo ao que foi evidenciado para etanol. A exposição desta amostra a outros agentes promotores de estresse, como pressão osmótica e temperatura, poderia fornecer maiores esclarecimentos sobre esta questão.

Diferentemente do que foi observado para o etanol, a exposição à clorexidina determinou um aumento na expressão relativa de *icaR*, com simultânea redução na expressão de *icaA*, em todas as amostras PIA-dependentes, o que está de pleno acordo com os dados que foram obtidos por meio do teste em MTP. Neste teste fenotípico foi observado que a clorexidina determinava a redução da formação de biofilme.

Os níveis da atividade de *sarA* apresentaram-se com redução na expressão relativa para as amostras EP48 e EP54, enquanto para a EP40 situou-se próximo do valor expresso pelo controle. Resultados similares foram observados para *sigB*, o que indica uma ausência de rotas estimulatórias induzidas pela clorexidina para a ativação de *ica*, seja diretamente por inibição de *icaR*, seja via atuação dos reguladores globais estudados.

A amostra EP05, produtora de biofilme PIA-independente de nível fraco, ao contrário do que se observou para o etanol no MTP, e de modo similar ao que se observou para as amostras PIA-dependentes expostas à clorexidina, apresentou redução da produção de biofilme no teste fenotípico em MTP, e os experimentos de qRT-PCR evidenciaram a redução na expressão dos reguladores globais *sarA* e *sigB*.

Poucos estudos têm sido realizados para avaliar o efeito da clorexidina sobre a formação de biofilme estafilocócico. Houari e Martino (2007) ao investigarem várias espécies bacterianas encontraram que somente uma amostra de referência de *S. epidermidis* (CIP53124) mostrou um aumento pouco expressivo na formação de biofilme no teste em MTP induzido por concentrações subinibitórias deste antisséptico.

Desse modo, os resultados obtidos pelo estudo molecular corroboram os dados fenotípicos obtidos previamente, indicando que a clorexidina em concentrações não inibitórias, ao contrário do etanol, o outro antisséptico testado, pode atuar determinando a redução da produção de biofilme por *S. epidermidis*, independentemente da constituição do biofilme ser PIA-dependente ou independente.

## CONCLUSÕES:

- A variação da técnica no teste em MTP, empregando a leitura da densidade óptica do extrato do biofilme (DOeb), se mostrou mais eficaz na caracterização da produção de biofilme pelas amostras do que aquela baseada na DOsa. Isto decorreu de uma maior sensibilidade da leitura da DOeb para detectar amostras produtoras de biofilme PIA-independente, as quais apresentaram-se neste estudo como produtoras de níveis fraco ou moderado de biofilme.
- O teste em AVC foi plenamente eficaz na caracterização de amostras produtoras de biofilme polissacarídico, assim como na detecção de amostras não produtoras de biofilme. Porém, deve-se ter em conta que cepas produtoras de biofilme não polissacarídico podem estar presentes em número considerável em uma amostragem de *S. epidermidis*, e este método não se destina a detecção destas amostras.
- Três amostras caracterizadas como produtoras de biofilme no teste em MTP apresentaram reação *bordeaux* no teste em AVC. A constituição do biofilme destas amostras não pôde ser determinada no teste de degradação pelo metaperiodato ou proteinase K, mas a presença do operon *ica* e a constatação da sua funcionalidade, pela evidenciação da transcrição do gene *icaA*, sugerem a possibilidade da participação de PIA na formação deste biofilme. Deste modo, considerar como negativa a reação *bordeaux* no teste em AVC, preliminarmente e sem testes adicionais, pode levar a erros na classificação deste tipo de amostras.
- A presença do operon *ica* foi detectada em 44% do total de amostras, em 68% das amostras produtoras de biofilme pelo teste em MTP, e em 22% dos isolados não produtores. Com base no fato de que as amostras estudadas são de procedência clínica, os resultados são indicativos de que esse elemento gênico, embora importante, não apresenta exclusividade na virulência do *S. epidermidis*, e que essa deve envolver múltiplos fatores.

- Apesar de menos frequentes entre os marcadores de virulência estudados, os genes *aap* e da transposase do IS256 foram os que apresentaram maior correlação com outros marcadores de virulência considerados importantes, como a produção de biofilme, o operon *ica* e a produção de níveis fortes de biofilme.
- O percentual de resistência das amostras aos antimicrobianos testados foi, em geral, mais elevado nas amostras produtoras do que nas não produtoras de biofilme, o mesmo ocorrendo com as amostras que apresentaram  $\geq 10$  marcadores de resistência.
- A detecção do gene da transposase do IS256 apresentou correlação com os percentuais de resistência mais elevados para todos os antimicrobianos testados, exceto para gentamicina. Esta exceção é singular, pois os relatos na literatura têm apontado associação do IS256 com o Tn4001, o qual condiciona resistência a aminoglicosídeos.
- O gene da transposase do IS256 apresentou correlação significativa com a resistência às quinolonas testadas, bem como com sulfametoxazol-trimetoprima. A associação desta sequência de inserção com os últimos quimioterápicos também parece singular, uma vez que tal associação tem sido apontada com a IS257.
- Apesar dos antissépticos serem considerados agentes estressantes, sub-CIMs de etanol e clorexidina apresentaram efeitos contrários nas amostras produtoras de biofilme, com o etanol determinando aumento na produção de biofilme, enquanto a clorexidina promoveu uma redução desta expressão. A escassez de estudos envolvendo a clorexidina nesse campo torna tal achado de potencial importância prática.
- Os dados moleculares obtidos por qRT-PCR permitiram não somente corroborar resultados fenotípicos referentes ao efeito dos antissépticos sobre a formação de biofilme em *S. epidermidis*, como também evidenciar aspectos multifatoriais envolvidos nesta expressão. Como exemplo, pode-se destacar o não envolvimento dos reguladores globais *sarA* e *sigB* na produção de biofilme pela amostra PIA-independente submetida a estresse pelos antissépticos testados.

## REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; JAIN, A. Glucose & sodium chloride induced biofilm production & ica operon in clinical isolates of staphylococci. **The Indian journal of medical research**, v. 138, p. 262–6, jan. 2013.

ALLIGNET, J. et al. Staphylococcus caprae strains carry determinants known to be involved in pathogenicity: a gene encoding an autolysin-binding fibronectin and the ica operon involved in biofilm formation. **Infection and immunity**, v. 69, n. 2, p. 712–8, fev. 2001.

ARCIOLA, C. R.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. Presence of icaA and icaD genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 6, p. 2151–6, jun. 2001.

ARCIOLA, C. R. et al. Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in Staphylococcus epidermidis clinical isolates genotyped for ica locus. **Biomaterials**, v. 23, n. 21, p. 4233–9, nov. 2002.

ARCIOLA, C. R. et al. Occurrence of ica genes for slime synthesis in a collection of Staphylococcus epidermidis strains from orthopedic prosthesis infections. **Acta orthopaedica Scandinavica**, v. 74, n. 5, p. 617–21, out. 2003.

ARCIOLA, C. R. et al. Presence of fibrinogen-binding adhesin gene in Staphylococcus epidermidis isolates from central venous catheters-associated and orthopaedic implant-associated infections. **Biomaterials**, v. 25, n. 19, p. 4825–9, ago. 2004.

ARCIOLA, C. R. et al. A multiplex PCR method for the detection of all five individual genes of ica locus in Staphylococcus epidermidis. A survey on 400 clinical isolates from prosthesis-associated infections. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 75, n. 2, p. 408–13, 1 nov. 2005.

ARCIOLA, C. R. et al. Detection of biofilm formation in Staphylococcus epidermidis from implant infections. Comparison of a PCR-method that recognizes the presence of ica genes with two classic phenotypic methods. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 76, n. 2, p. 425–30, fev. 2006.

ATSHAN, S. S. et al. Improved method for the isolation of RNA from bacteria refractory to disruption, including S. aureus producing biofilm. **Gene**, v. 494, n. 2, p. 219–24, 25 fev. 2012.

BALDASSARRI, L. et al. Purification and characterization of the staphylococcal slime-associated antigen and its occurrence among Staphylococcus epidermis clinical isolates. **Infection and immunity**, v. 64, n. 8, p. 3410–5, ago. 1996.

- BARROS, F. L. **Avaliação da formação de biofilme e resistencia antimicrobiana por cepas de Staphylococcus epidermidis isolados de hemoculturas em hospitais públicos da cidade do Rio de Janeiro**. 2009. 78 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal Fluminense, 2009.
- BAYER, M. G.; HEINRICHS, J. H.; CHEUNG, A. L. The molecular architecture of the sar locus in Staphylococcus aureus. **Journal of bacteriology**, v. 178, n. 15, p. 4563–70, ago. 1996.
- BECKER, L. A. et al. Identification of the gene encoding the alternative sigma factor sigmaB from Listeria monocytogenes and its role in osmotolerance. **Journal of bacteriology**, v. 180, n. 17, p. 4547–54, set. 1998.
- BEENKEN, K. E.; BLEVINS, J. S.; SMELTZER, M. S. Mutation of sarA in Staphylococcus aureus limits biofilm formation. **Infection and immunity**, v. 71, n. 7, p. 4206–11, 1 jul. 2003.
- BERKHOFF, H. A.; VINAL, A. C. Congo red medium to distinguish between invasive and non-invasive Escherichia coli pathogenic for poultry. **Avian diseases**, v. 30, n. 1, p. 117–21, 1986.
- BOWDEN, M. G. et al. Is the GehD lipase from Staphylococcus epidermidis a collagen binding adhesin? **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 45, p. 43017–23, 8 nov. 2002.
- BOWDEN, M. G. et al. Identification and preliminary characterization of cell-wall-anchored proteins of Staphylococcus epidermidis. **Microbiology**, v. 151, n. Pt 5, p. 1453–64, maio 2005.
- BRANDENBERGER, M. et al. Inactivation of a novel three-cistronic operon tcaR-tcaA-tcaB increases teicoplanin resistance in Staphylococcus aureus. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1523, n. 2-3, p. 135–139, out. 2000.
- BRATFICH, O. J. **EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE Staphylococcus epidermidis ISOLADOS DE INFECÇÕES DE CORRENTE SANGÜÍNEA EM PACIENTES DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UNICAMP**. 2005. 171 f. Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, 2005.
- BRITO, C. S. DE. **Etiopatogenia de infecções de corrente sanguínea por Staphylococcus epidermidis associadas e relacionadas ao uso de cateter vascular central em neonatos críticos**. 2011. 86 f. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Uberlândia, 2011.
- BRZYCHCZY-WLOCH, M. et al. Prevalence of antibiotic resistance in multi-drug resistant coagulase-negative staphylococci isolated from invasive infection in very low birth weight neonates in two Polish NICUs. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 12, p. 41, jan. 2013.

BYRNE, M. E.; ROUCH, D. A.; SKURRAY, R. A. Nucleotide sequence analysis of IS256 from the *Staphylococcus aureus* gentamicin-tobramycin-kanamycin-resistance transposon Tn4001. **Gene**, v. 81, n. 2, p. 361–7, 30 set. 1989.

CABRERA-CONTRERAS, R. et al. Antibiotic Resistance and Biofilm Production in *Staphylococcus epidermidis* Strains, Isolated from a Tertiary Care Hospital in Mexico City. **ISRN microbiology**, v. 2013, p. 918921, jan. 2013.

CAFISO, V. et al. Presence of the *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. **Clinical microbiology and infection**, v. 10, n. 12, p. 1081–8, dez. 2004.

CAMPOCCIA, D. et al. Cluster analysis of ribotyping profiles of *Staphylococcus epidermidis* isolates recovered from foreign body-associated orthopedic infections. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 88, n. 3, p. 664–72, 1 mar. 2009.

CERCENADO, E. et al. Emergence of teicoplanin-resistant coagulase-negative staphylococci. **Journal of clinical microbiology**, v. 34, n. 7, p. 1765–8, jul. 1996.

CHAIEB, K. et al. XTT assay for evaluating the effect of alcohols, hydrogen peroxide and benzalkonium chloride on biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. **Microbial pathogenesis**, v. 50, n. 1, p. 1–5, jan. 2011.

CHANG, Y.-M. et al. Structural study of TcaR and its complexes with multiple antibiotics from *Staphylococcus epidermidis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 19, p. 8617–22, 11 maio 2010.

CHERIFI, S. et al. Comparative epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* isolates from patients with catheter-related bacteremia and from healthy volunteers. **Journal of clinical microbiology**, v. 51, n. 5, p. 1541–7, maio 2013.

CHOKR, A. et al. Correlation between biofilm formation and production of polysaccharide intercellular adhesin in clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. **International journal of medical microbiology**, v. 296, n. 6, p. 381–8, out. 2006.

CHRISTENSEN, G. D. et al. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. **Infection and immunity**, v. 37, n. 1, p. 318–26, jul. 1982.

CHRISTENSEN, G. D. et al. 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**, v. 22, n. 6, p. 996–1006, dez. 1985.

CHRISTENSEN, G. D. et al. Identification of an antigenic marker of slime production for *Staphylococcus epidermidis*. **Infection and immunity**, v. 58, n. 9, p. 2906–11, set. 1990.

CHRISTNER, M. et al. The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. **Molecular microbiology**, v. 75, n. 1, p. 187–207, jan. 2010.

CHRISTNER, M. et al. sarA negatively regulates *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by modulating expression of 1 MDa extracellular matrix binding protein and autolysis-dependent release of eDNA. **Molecular microbiology**, v. 86, n. 2, p. 394–410, out. 2012.

CONLON, K. M.; HUMPHREYS, H.; O'GARA, J. P. icaR encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of ica operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of bacteriology**, v. 184, n. 16, p. 4400–8, ago. 2002.

CONLON, K. M.; HUMPHREYS, H.; O'GARA, J. P. Inactivations of rsbU and sarA by IS256 represent novel mechanisms of biofilm phenotypic variation in *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 18, p. 6208–19, set. 2004.

CORDEIRO, D. N. DA G. **SIGNIFICÂNCIA CLÍNICA DA PRESENÇA DE STAPHYLOCOCCUS COAGULASE-NEGATIVO ISOLADOS DE RECÉM-NASCIDOS DE UMA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL EM BRASÍLIA-DF**. 2007. 141 f. Dissertação de Mestrado - Universidade de Brasília, 2007.

CRAMTON, S. E. et al. Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Infection and immunity**, v. 69, n. 6, p. 4079–85, jun. 2001.

CRUPPER, S. S. et al. Cloning and expression of cadD, a new cadmium resistance gene of *Staphylococcus aureus*. **Journal of bacteriology**, v. 181, n. 13, p. 4071–5, jul. 1999.

CUCARELLA, C. et al. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 9, p. 2888–96, maio 2001.

CUCARELLA, C. et al. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. **Infection and immunity**, v. 72, n. 4, p. 2177–85, 23 abr. 2004.

CUE, D.; LEI, M. G.; LEE, C. Y. Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in staphylococci. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, p. 38, jan. 2012.

DAVIS, S. L. et al. SdrG, a fibrinogen-binding bacterial adhesin of the microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules subfamily from *Staphylococcus epidermidis*, targets the thrombin cleavage site in the Bbeta chain. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 30, p. 27799–805, 27 jul. 2001.

- DE ARAUJO, G. L. et al. Commensal isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* are also well equipped to produce biofilm on polystyrene surfaces. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 855–64, maio 2006.
- DE SILVA, G. D. I. et al. The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative *Staphylococci* associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 2, p. 382–8, fev. 2002.
- DEIGHTON, M.; BORLAND, R. Regulation of slime production in *Staphylococcus epidermidis* by iron limitation. **Infection and immunity**, v. 61, n. 10, p. 4473–9, out. 1993.
- DEL' ALAMO, L. et al. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci and characterization of isolates with reduced susceptibility to glycopeptides. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 34, n. 3, p. 185–91, jul. 1999.
- DIEKEMA, D. J. et al. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillanc. **Clinical infectious diseases**, v. 32 Suppl 2, p. S114–32, 15 maio 2001.
- DIEMOND-HERNÁNDEZ, B. et al. Production of *ica*A<sub>DBC</sub>-encoded polysaccharide intercellular adhesin and therapeutic failure in pediatric patients with *Staphylococcal* device-related infections. **BMC infectious diseases**, v. 10, p. 68, jan. 2010.
- DOBINSKY, S. et al. Glucose-Related Dissociation between *ica*A<sub>DBC</sub> Transcription and Biofilm Expression by *Staphylococcus epidermidis*: Evidence for an Additional Factor Required for Polysaccharide Intercellular Adhesin Synthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 9, p. 2879–2886, 1 maio 2003.
- DUGGIRALA, A. et al. High-resolution genome profiling differentiated *Staphylococcus epidermidis* isolated from patients with ocular infections and normal individuals. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 48, n. 7, p. 3239–45, jul. 2007.
- ESTEBAN, J. et al. Biofilm development by clinical isolates of *Staphylococcus* spp. from retrieved orthopedic prostheses. **Acta orthopaedica**, v. 81, n. 6, p. 674–9, dez. 2010.
- FALK, R. H.; COMENZO, R. L.; SKINNER, M. The systemic amyloidoses. **The New England journal of medicine**, v. 337, n. 13, p. 898–909, 25 set. 1997.
- FEY, P. D.; OLSON, M. E. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. **Future microbiology**, v. 5, n. 6, p. 917–33, jun. 2010.
- FRANÇOIS, P.; VAUDAUX, P.; LEW, P. D. Role of plasma and extracellular matrix proteins in the physiopathology of foreign body infections. **Annals of vascular surgery**, v. 12, n. 1, p. 34–40, jan. 1998.

FREBOURG, N. B. et al. PCR-Based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 2, p. 877–80, fev. 2000.

FREEMAN, D. J.; FALKINER, F. R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal of clinical pathology**, v. 42, n. 8, p. 872–4, ago. 1989.

GALDBART, J. O. et al. Screening for *Staphylococcus epidermidis* markers discriminating between skin-flora strains and those responsible for infections of joint prostheses. **The Journal of infectious diseases**, v. 182, n. 1, p. 351–5, jul. 2000.

GARCÍA, P. et al. Coagulase-negative staphylococci: clinical, microbiological and molecular features to predict true bacteraemia. **Journal of medical microbiology**, v. 53, n. Pt 1, p. 67–72, jan. 2004.

GERKE, C. et al. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 29, p. 18586–93, 17 jul. 1998.

GILL, S. R. et al. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 7, p. 2426–38, abr. 2005.

GOMES, F. et al. Virulence gene expression by *Staphylococcus epidermidis* biofilm cells exposed to antibiotics. **Microbial drug resistance**, v. 17, n. 2, p. 191–6, jun. 2011.

GÖTZ, F. *Staphylococcus* and biofilms. **Molecular microbiology**, v. 43, n. 6, p. 1367–78, mar. 2002.

GROSS, M. et al. Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. **Infection and immunity**, v. 69, n. 5, p. 3423–6, maio 2001.

GU, J. et al. Bacterial insertion sequence IS256 as a potential molecular marker to discriminate invasive strains from commensal strains of *Staphylococcus epidermidis*. **The Journal of hospital infection**, v. 61, n. 4, p. 342–8, dez. 2005.

GUENTHER, F. et al. Phagocytosis of staphylococci biofilms by polymorphonuclear neutrophils: *S. aureus* and *S. epidermidis* differ with regard to their susceptibility towards the host defense. **The International journal of artificial organs**, v. 32, n. 9, p. 565–73, set. 2009.

HAMID, M. E. et al. Prevalence of Bacterial Pathogens in Aseer Region, Kingdom of Saudi Arabia: Emphasis on Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus*. **Oman medical journal**, v. 26, n. 5, p. 368–70, set. 2011.

HANDKE, L. D. et al. Genetic and phenotypic analysis of biofilm phenotypic variation in multiple *Staphylococcus epidermidis* isolates. **Journal of medical microbiology**, v. 53, n. Pt 5, p. 367–74, 1 maio 2004.

HARTFORD, O. et al. The Fbe (SdrG) protein of *Staphylococcus epidermidis* HB promotes bacterial adherence to fibrinogen. **Microbiology**, v. 147, n. Pt 9, p. 2545–52, set. 2001.

HASSAN, A. et al. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. **The Brazilian journal of infectious diseases**, v. 15, n. 4, p. 305–11, 2011.

HE, Y. et al. Stress relaxation analysis facilitates a quantitative approach towards antimicrobial penetration into biofilms. **PloS one**, v. 8, n. 5, p. e63750, jan. 2013.

HEILMANN, C. et al. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. **Molecular microbiology**, v. 20, n. 5, p. 1083–91, jun. 1996.

HEILMANN, C. et al. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. **Molecular microbiology**, v. 24, n. 5, p. 1013–24, jun. 1997.

HEILMANN, C. et al. Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. **Microbiology**, v. 149, n. Pt 10, p. 2769–78, out. 2003.

HELL, E. et al. Attachment and biofilm forming capabilities of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from preterm infants. **Current microbiology**, v. 67, n. 6, p. 712–7, dez. 2013.

HENNIG, S.; ZIEBUHR, W. Characterization of the transposase encoded by IS256, the prototype of a major family of bacterial insertion sequence elements. **Journal of bacteriology**, v. 192, n. 16, p. 4153–63, ago. 2010.

HIRSCHHAUSEN, N. et al. A novel staphylococcal internalization mechanism involves the major autolysin Atl and heat shock cognate protein Hsc70 as host cell receptor. **Cellular microbiology**, v. 12, n. 12, p. 1746–64, dez. 2010.

HOLLAND, L. M. et al. A staphylococcal GGDEF domain protein regulates biofilm formation independently of cyclic dimeric GMP. **Journal of bacteriology**, v. 190, n. 15, p. 5178–89, ago. 2008.

HOLLAND, L. M.; CONLON, B.; O'GARA, J. P. Mutation of tagO reveals an essential role for wall teichoic acids in *Staphylococcus epidermidis* biofilm development. **Microbiology**, v. 157, n. Pt 2, p. 408–18, fev. 2011.

HOLT, R. J.; STEWART, G. T. Techniques for the rapid and sensitive detection of penicillinase. **Journal of clinical pathology**, v. 16, p. 263–7, maio 1963.

HOUARI, A.; DI MARTINO, P. Effect of chlorhexidine and benzalkonium chloride on bacterial biofilm formation. **Letters in applied microbiology**, v. 45, n. 6, p. 652–6, dez. 2007.

HOUSTON, P. et al. Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype. **Infection and immunity**, v. 79, n. 3, p. 1153–65, mar. 2011.

HOWDEN, B. P. et al. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. **Clinical microbiology reviews**, v. 23, n. 1, p. 99–139, jan. 2010.

HUSSAIN, M. et al. A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. **Infection and immunity**, v. 65, n. 2, p. 519–24, fev. 1997.

IWERIEBOR, C. Vancomycin resistant coagulase-negative *Staphylococcal* isolates from HIV positive patients in the Limpopo Province, South Africa. **Journal of Microbiology and Antimicrobials**, v. 5, n. 2, p. 18–24, 28 fev. 2013.

IZANO, E. A et al. Poly-N-acetylglucosamine mediates biofilm formation and antibiotic resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Microbial pathogenesis**, v. 43, n. 1, p. 1–9, jul. 2007.

IZANO, E. A. et al. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 2, p. 470–6, jan. 2008.

JAIN, A.; AGARWAL, A. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. **Journal of microbiological methods**, v. 76, n. 1, p. 88–92, jan. 2009.

JEFFERSON, K. K. et al. The teicoplanin-associated locus regulator (TcaR) and the intercellular adhesin locus regulator (IcaR) are transcriptional inhibitors of the *ica* locus in *Staphylococcus aureus*. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 8, p. 2449–56, abr. 2004.

JEVONS, M. P. “Celbenin” - resistant *Staphylococci*. **Br Med J.**, v. 1, n. 5219, p. 124–125, 1961.

KAISER, T. D. L. **ANÁLISE DE PRODUÇÃO DE BIOFILME EM AMOSTRAS DE *Staphylococcus epidermidis* HOSPITALARES E DA COMUNIDADE POR DIFERENTES MÉTODOS.** 2010. 99 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Espírito Santo, 2010.

KAPATRAL, V. et al. Genome sequence and analysis of the oral bacterium *Fusobacterium nucleatum* strain ATCC 25586. **Journal of bacteriology**, v. 184, n. 7, p. 2005–18, abr. 2002.

KEIM, R. **MAPEAMENTO DOS ESTAFILOCOCOS COAGULASE NEGATIVO NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO ANTÔNIO PEDRO DA UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE , NO PERÍODO DE 1998 A 2002.** 2005. 113 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal Fluminense, 2005.

KIEM, S. et al. Phase variation of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* by IS 256 insertion and its impact on the capacity adhering to polyurethane surface. **Journal of Korean medical science**, v. 19, n. 6, p. 779–82, dez. 2004.

KLINGENBERG, C. et al. Persistent strains of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: virulence factors and invasiveness. **Clinical microbiology and infection**, v. 13, n. 11, p. 1100–11, nov. 2007.

KNOBLOCH, J. K. et al. Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the sigB operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 8, p. 2624–33, abr. 2001.

KNOBLOCH, J. K.-M. et al. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. **Medical microbiology and immunology**, v. 191, n. 2, p. 101–6, out. 2002.

KNOBLOCH, J. K.-M. et al. RsbU-dependent regulation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation is mediated via the alternative sigma factor sigmaB by repression of the negative regulator gene icaR. **Infection and immunity**, v. 72, n. 7, p. 3838–48, jul. 2004.

KOCIANOVA, S. et al. Key role of poly-gamma-DL-glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 3, p. 688–94, mar. 2005.

KOEHLER, T. M. *Bacillus anthracis* physiology and genetics. **Molecular aspects of medicine**, v. 30, n. 6, p. 386–96, dez. 2009.

KOGAN, G. et al. Biofilms of clinical strains of *Staphylococcus* that do not contain polysaccharide intercellular adhesin. **FEMS microbiology letters**, v. 255, n. 1, p. 11–6, fev. 2006.

KOSKELA, A. et al. Prevalence of the ica operon and insertion sequence IS256 among *Staphylococcus epidermidis* prosthetic joint infection isolates. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 28, n. 6, p. 655–60, jun. 2009.

KOUIDHI, B. et al. Cell surface hydrophobicity, biofilm formation, adhesives properties and molecular detection of adhesins genes in *Staphylococcus aureus* associated to dental caries. **Microbial pathogenesis**, v. 49, n. 1-2, p. 14–22, 2010.

KOZITSKAYA, S. et al. The bacterial insertion sequence element IS256 occurs preferentially in nosocomial *Staphylococcus epidermidis* isolates: association with

biofilm formation and resistance to aminoglycosides. **Infection and immunity**, v. 72, n. 2, p. 1210–5, fev. 2004.

KRISTIAN, S. A. et al. Biofilm formation induces C3a release and protects *Staphylococcus epidermidis* from IgG and complement deposition and from neutrophil-dependent killing. **The Journal of infectious diseases**, v. 197, n. 7, p. 1028–35, 1 abr. 2008.

KULLIK, I.; GIACHINO, P.; FUCHS, T. Deletion of the alternative sigma factor sigmaB in *Staphylococcus aureus* reveals its function as a global regulator of virulence genes. **Journal of bacteriology**, v. 180, n. 18, p. 4814–20, set. 1998.

LAUDERDALE, K. J. et al. Interconnections between Sigma B, agr, and proteolytic activity in *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. **Infection and immunity**, v. 77, n. 4, p. 1623–35, abr. 2009.

LAZZAROTTO, C. **Formação de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* isolado de cateter venoso central através de métodos fenotípicos e genotípicos** Formação de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* isolado de cateter venoso central através de métodos fenotípicos e genotípicos. 2010. 75 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

LEBEAUX, D. et al. From in vitro to in vivo Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. **Pathogens**, v. 2, n. 2, p. 288–356, 13 maio 2013.

LEELAPORN, A. et al. Possible role of insertion sequence IS257 in dissemination and expression of high- and low-level trimethoprim resistance in staphylococci. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 38, n. 10, p. 2238–44, out. 1994.

LI, D. Q.; LJUNGH, A. Binding of human clusterin by *Staphylococcus epidermidis*. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 31, n. 3, p. 197–202, out. 2001.

LĪDUMA, I. et al. Phenotypic and genetic analysis of biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. **Medicina (Kaunas, Lithuania)**, v. 48, n. 6, p. 305–9, jan. 2012.

LINNES, J. C.; MA, H.; BRYERS, J. D. Giant extracellular matrix binding protein expression in *Staphylococcus epidermidis* is regulated by biofilm formation and osmotic pressure. **Current microbiology**, v. 66, n. 6, p. 627–33, jun. 2013.

LOS, R. et al. A comparative analysis of phenotypic and genotypic methods for the determination of the biofilm-forming abilities of *Staphylococcus epidermidis*. **FEMS microbiology letters**, v. 310, n. 2, p. 97–103, 1 set. 2010.

MA, X. X. et al. Antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci (CoNS): emergence of teicoplanin-non-susceptible CoNS strains with inducible resistance to vancomycin. **Journal of medical microbiology**, v. 60, n. Pt 11, p. 1661–8, nov. 2011.

- MACK, D. et al. Association of biofilm production of coagulase-negative staphylococci with expression of a specific polysaccharide intercellular adhesin. **The Journal of infectious diseases**, v. 174, n. 4, p. 881–4, out. 1996.
- MACK, D. et al. Biofilm formation in medical device-related infection. **The International journal of artificial organs**, v. 29, n. 4, p. 343–59, abr. 2006.
- MACK, D. et al. Staphylococcus epidermidis Biofilms: Functional Molecules, Relation to Virulence, and Vaccine Potential. **Topics in current chemistry**, v. 288, p. 157–82, jan. 2009.
- MACK, D. et al. **Biomaterials Associated Infection**. New York, NY: Springer New York, 2013. p. 25–57
- MAIRA-LITRÁN, T. et al. Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. **Infection and immunity**, v. 70, n. 8, p. 4433–40, ago. 2002.
- MAKI, D. G.; KLUGER, D. M.; CRNICH, C. J. The risk of bloodstream infection in adults with different intravascular devices: a systematic review of 200 published prospective studies. **Mayo Clinic proceedings**, v. 81, n. 9, p. 1159–71, set. 2006.
- MAKI, D. G.; WEISE, C. E.; SARAFIN, H. W. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. **The New England journal of medicine**, v. 296, n. 23, p. 1305–9, 9 jun. 1977.
- MANNA, A. C.; CHEUNG, A. L. Expression of SarX, a negative regulator of agr and exoprotein synthesis, is activated by MgrA in Staphylococcus aureus. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 12, p. 4288–99, jun. 2006.
- MARIANA, N. S. et al. Evaluation of modified Congo red agar for detection of biofilm produced by clinical isolates of methicillin-resistance Staphylococcus aureus. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 36, p. 330–38, mar. 2009.
- MARTINEAU, F. et al. Species-specific and ubiquitous DNA-based assays for rapid identification of Staphylococcus epidermidis. **Journal of clinical microbiology**, v. 34, n. 12, p. 2888–93, dez. 1996.
- MASSEY, R. C. et al. The evolution and maintenance of virulence in Staphylococcus aureus: a role for host-to-host transmission? **Nature reviews. Microbiology**, v. 4, n. 12, p. 953–8, dez. 2006.
- MATEO, M. et al. Strong slime production is a marker of clinical significance in Staphylococcus epidermidis isolated from intravascular catheters. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 27, n. 4, p. 311–4, abr. 2008.
- MATHUR, T. et al. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: an evaluation of three different screening methods. **Indian journal of medical microbiology**, v. 24, n. 1, p. 25–9, jan. 2006.

MAURELLI, A. T.; BLACKMON, B.; CURTISS, R. Loss of pigmentation in *Shigella flexneri* 2a is correlated with loss of virulence and virulence-associated plasmid. **Infection and immunity**, v. 43, n. 1, p. 397–401, jan. 1984.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, A D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 1, p. 147–79, jan. 1999.

MCLANDSBOROUGH, L. . et al. Biofilms: at the interface between biophysics and microbiology. **FOBI**, v. 1, p. 94–114, 2006.

MEHLIN, C.; HEADLEY, C. M.; KLEBANOFF, S. J. An inflammatory polypeptide complex from *Staphylococcus epidermidis*: isolation and characterization. **The Journal of experimental medicine**, v. 189, n. 6, p. 907–18, 15 mar. 1999.

MEKNI, M. A. et al. Strong biofilm production but not adhesion virulence factors can discriminate between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains. **APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 120, n. 8, p. 605–11, ago. 2012.

MILISAVLJEVIC, V. et al. Benzyl alcohol and ethanol can enhance the pathogenic potential of clinical *Staphylococcus epidermidis* strains. **American journal of infection control**, v. 36, n. 8, p. 552–8, out. 2008.

MONTANARO, L. et al. Antibiotic multiresistance strictly associated with IS256 and *ica* genes in *Staphylococcus epidermidis* strains from implant orthopedic infections. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 83, n. 3, p. 813–8, 1 dez. 2007.

MOREIRA, B. M.; DAUM, R. S. Antimicrobial resistance in staphylococci. **Pediatric clinics of North America**, v. 42, n. 3, p. 619–48, jun. 1995.

NASR, R. A.; ABUSHADY, H. M.; HUSSEIN, H. S. Biofilm formation and presence of *icaAD* gene in clinical isolates of staphylococci. **Egyptian Journal of Medical Human Genetics**, v. 13, n. 3, p. 269–274, out. 2012.

NININ, E. et al. Assessment of *ica* operon carriage and biofilm production in *Staphylococcus epidermidis* isolates causing bacteraemia in bone marrow transplant recipients. **Clinical microbiology and infection**, v. 12, n. 5, p. 446–52, maio 2006.

NUNES, Z. G.; HOFER, E. Evaluation of phenotypic markers associated with pathogenicity in the genus *Listeria*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 36, n. 4, p. 293–9, 1994.

NURYASTUTI, T. et al. *recA* mediated spontaneous deletions of the *icaADBC* operon of clinical *Staphylococcus epidermidis* isolates: a new mechanism of phenotypic variations. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 94, n. 2, p. 317–28, ago. 2008.

O'GARA, J. P. ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. **FEMS microbiology letters**, v. 270, n. 2, p. 179–88, maio 2007.

O'GRADY, N. P. et al. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. Centers for Disease Control and Prevention. **MMWR**, v. 51, n. RR-10, p. 1–29, 9 ago. 2002.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual review of microbiology**, v. 54, p. 49–79, jan. 2000.

ODUWOLE, K. O. et al. Anti-biofilm activity of sub-inhibitory povidone-iodine concentrations against *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of orthopaedic research**, v. 28, n. 9, p. 1252–6, set. 2010.

OGSTON, A. Micrococcus Poisoning. **Journal of anatomy and physiology**, v. 17, n. Pt 1, p. 24–58, out. 1882.

OLIVEIRA, A.; CUNHA, M. DE L. R. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. **BMC research notes**, v. 3, p. 260, 2010.

OSCARSSON, J. et al. SarA is a repressor of hla (alpha-hemolysin) transcription in *Staphylococcus aureus*: its apparent role as an activator of hla in the prototype strain NCTC 8325 depends on reduced expression of sarS. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 24, p. 8526–33, dez. 2006.

OTTO, M. et al. Activity of *Staphylococcus epidermidis* phenol-soluble modulin peptides expressed in *Staphylococcus carnosus*. **The Journal of infectious diseases**, v. 190, n. 4, p. 748–55, 15 ago. 2004.

OTTO, M. Staphylococcal biofilms. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 322, p. 207–28, jan. 2008.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis*--the “accidental” pathogen. **Nature reviews. Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 555–67, ago. 2009.

OTTO, M. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. **Seminars in immunopathology**, v. 34, n. 2, p. 201–14, mar. 2012.

OTTO, M. Coagulase-negative staphylococci as reservoirs of genes facilitating MRSA infection: Staphylococcal commensal species such as *Staphylococcus epidermidis* are being recognized as important sources of genes promoting MRSA colonization and virulence. **BioEssays**, v. 35, n. 1, p. 4–11, jan. 2013.

PADOVANI, C. M. **AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS DIFERENTES FORMULAÇÕES ANTI-SÉPTICAS – POLIVILIPIRROLIDONA-ÍODO E CLOREXIDINA – APÓS CONTAMINAÇÃO INTENCIONAL DAS ALMOTOLIAS**. 2008. 69 f. Dissertação de Mestrado - Universidade de São Paulo, 2008.

PAIVA, R. M. et al. Vancomycin MIC for methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococcus isolates: evaluation of the broth microdilution and Etest methods. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 12, p. 4652–4, dez. 2010.

PALUCH-OLEŚ, J. et al. The phenotypic and genetic biofilm formation characteristics of coagulase-negative staphylococci isolates in children with otitis media. **International journal of pediatric otorhinolaryngology**, v. 75, n. 1, p. 126–30, jan. 2011.

PARISE, G. et al. Role of a putative polysaccharide locus in Bordetella biofilm development. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 3, p. 750–60, fev. 2007.

PEREIRA, P. M. A. et al. Staphylococcus haemolyticus disseminated among neonates with bacteremia in a neonatal intensive care unit in Rio de Janeiro, Brazil. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 78, n. 1, p. 85–92, jan. 2014.

PETRELLI, D. et al. Analysis of different genetic traits and their association with biofilm formation in Staphylococcus epidermidis isolates from central venous catheter infections. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 25, n. 12, p. 773–81, dez. 2006.

POURMAND, M. R. et al. Slime layer formation and the prevalence of mecA and aap genes in Staphylococcus epidermidis isolates. **Journal of infection in developing countries**, v. 5, n. 1, p. 34–40, jan. 2011.

PRASAD, S. et al. Molecular & phenotypic characterization of Staphylococcus epidermidis in implant related infections. **The Indian journal of medical research**, v. 136, n. 3, p. 483–90, set. 2012.

QADRI, F. et al. Congo red binding and salt aggregation as indicators of virulence in Shigella species. **Journal of clinical microbiology**, v. 26, n. 7, p. 1343–8, jul. 1988.

QIN, Z. et al. Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of Staphylococcus epidermidis. **Microbiology**, v. 153, n. Pt 7, p. 2083–92, jul. 2007.

QUECK, S. Y. et al. RNAIII-independent target gene control by the agr quorum-sensing system: insight into the evolution of virulence regulation in Staphylococcus aureus. **Molecular cell**, v. 32, n. 1, p. 150–8, 10 out. 2008.

RACHID, S. et al. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming Staphylococcus epidermidis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 12, p. 3357–63, 1 dez. 2000.

REN, S.-X. et al. Unique physiological and pathogenic features of Leptospira interrogans revealed by whole-genome sequencing. **Nature**, v. 422, n. 6934, p. 888–93, 24 abr. 2003.

RITO, P. D. N. **CHARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE STAPHYLOCOCCUS RESISTENTES À METICILINA QUANTO A PRODUÇÃO DE BIOFILME, RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E REALIZAÇÃO DO PERFIL E DA**

**TIPIFICAÇÃO CLONAL.** 2008. 68 f. Dissertação de Mestrado - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

ROHDE, H. et al. Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5614–9, dez. 2004.

ROHDE, H. et al. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. **Molecular microbiology**, v. 55, n. 6, p. 1883–95, mar. 2005.

ROHDE, H. et al. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. **Biomaterials**, v. 28, n. 9, p. 1711–20, mar. 2007.

ROHDE, H. et al. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. **European journal of cell biology**, v. 89, n. 1, p. 103–11, jan. 2010.

ROSSI, F. et al. Transferable vancomycin resistance in a community-associated MRSA lineage. **The New England journal of medicine**, v. 370, n. 16, p. 1524–31, 17 abr. 2014.

ROWE, S. E. et al. A novel role for SarX in *Staphylococcus epidermidis* biofilm regulation. **Microbiology**, v. 157, n. Pt 4, p. 1042–9, abr. 2011.

SADER, H. S.; MOET, G. J.; JONES, R. N. Antimicrobial resistance among Gram-positive bacteria isolated in Latin American hospitals. **Journal of chemotherapy**, v. 21, n. 6, p. 611–20, dez. 2009a.

SADER, H. S.; MOET, G.; JONES, R. N. Update on the in vitro activity of daptomycin tested against 17,193 Gram-positive bacteria isolated from European medical centers (2005-2007). **Journal of chemotherapy**, v. 21, n. 5, p. 500–6, nov. 2009b.

SADYKOV, M. R. et al. Tricarboxylic acid cycle-dependent regulation of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin synthesis. **Journal of bacteriology**, v. 190, n. 23, p. 7621–32, dez. 2008.

SADYKOV, M. R. et al. CcpA coordinates central metabolism and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. **Microbiology**, v. 157, n. Pt 12, p. 3458–68, dez. 2011.

SAISING, J. et al. Lipase, protease, and biofilm as the major virulence factors in staphylococci isolated from acne lesions. **Bioscience trends**, v. 6, n. 4, p. 160–4, ago. 2012.

SATORRES, S. E.; ALCARÁZ, L. E. Prevalence of *icaA* and *icaD* genes in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from

patients and hospital staff. **Central European journal of public health**, v. 15, n. 2, p. 87–90, jun. 2007.

SCHABERG, D. R.; CULVER, D. H.; GAYNES, R. P. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. **The American journal of medicine**, v. 91, n. 3B, p. 72S–75S, 16 set. 1991.

SCHEIFELE, D. W. et al. Delta-like toxin produced by coagulase-negative staphylococci is associated with neonatal necrotizing enterocolitis. **Infection and immunity**, v. 55, n. 9, p. 2268–73, set. 1987.

SCHLAG, S. et al. Inhibition of staphylococcal biofilm formation by nitrite. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 21, p. 7911–9, nov. 2007.

SCHOENFELDER, S. M. K. et al. Success through diversity - how *Staphylococcus epidermidis* establishes as a nosocomial pathogen. **International journal of medical microbiology**, v. 300, n. 6, p. 380–6, ago. 2010.

SCHOMMER, N. N. et al. *Staphylococcus epidermidis* uses distinct mechanisms of biofilm formation to interfere with phagocytosis and activation of mouse macrophage-like cells 774A.1. **Infection and immunity**, v. 79, n. 6, p. 2267–76, jun. 2011.

SCHUMACHER-PERDREAU, F. et al. Comparative analysis of a biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain and its adherence-positive, accumulation-negative mutant M7. **FEMS microbiology letters**, v. 117, n. 1, p. 71–8, 15 mar. 1994.

SCHWALBE, R. S.; STAPLETON, J. T.; GILLIGAN, P. H. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. **The New England journal of medicine**, v. 316, n. 15, p. 927–31, 9 abr. 1987.

SELLMAN, B. R. et al. Identification of immunogenic and serum binding proteins of *Staphylococcus epidermidis*. **Infection and immunity**, v. 73, n. 10, p. 6591–600, out. 2005.

SELLMAN, B. R. et al. Expression of *Staphylococcus epidermidis* SdrG increases following exposure to an in vivo environment. **Infection and immunity**, v. 76, n. 7, p. 2950–7, jul. 2008.

SHANKS, R. M. Q. et al. Heparin stimulates *Staphylococcus aureus* biofilm formation. **Infection and immunity**, v. 73, n. 8, p. 4596–606, ago. 2005.

SHANSON, D. C. Antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Journal of hospital infection**, v. 2, n. 1, p. 11–36, mar. 1981.

SHAW, L. N. et al. Investigations into sigmaB-modulated regulatory pathways governing extracellular virulence determinant production in *Staphylococcus aureus*. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 17, p. 6070–80, set. 2006.

SIERADZKI, K.; VILLARI, P.; TOMASZ, A. Decreased susceptibilities to teicoplanin and vancomycin among coagulase-negative methicillin-resistant clinical isolates of

staphylococci. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 1, p. 100–7, jan. 1998.

SIEVERT, D. M. et al. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002-2006. **Clinical infectious diseases**, v. 46, n. 5, p. 668–74, 1 mar. 2008.

SOUZA, A. G. DE. **Caracterização fenotípica e molecular de amostras de *Staphylococcus coagulase negativo* isoladas de infecções da corrente sanguínea de pacientes de dois hospitais gerais da cidade de São Paulo São Paulo**. 2009. 89 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de São Paulo, 2009.

STEPANOVIC, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of microbiological methods**, v. 40, n. 2, p. 175–9, abr. 2000.

STEPANOVIĆ, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 115, n. 8, p. 891–9, ago. 2007.

STEVENS, N. T. et al. Biofilm and the role of the *ica* operon and *aap* in *Staphylococcus epidermidis* isolates causing neurosurgical meningitis. **Clinical microbiology and infection**, v. 14, n. 7, p. 719–22, jul. 2008.

STEWART, P. S. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. **International journal of medical microbiology**, v. 292, n. 2, p. 107–13, jul. 2002.

SUN, D.; ACCAVITTI, M. A.; BRYERS, J. D. Inhibition of biofilm formation by monoclonal antibodies against *Staphylococcus epidermidis* RP62A accumulation-associated protein. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 12, n. 1, p. 93–100, jan. 2005.

TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and environmental microbiology**, v. 43, n. 4, p. 777–80, abr. 1982.

TEIXEIRA, C. F. E. **ESTAFILOCOCOS COAGULAE NEGATIVA - UM RISCO REAL PARA SAÚDE PÚBLICA**. 2009. 94 f. Tese de Doutorado - FIOCRUZ, 2009.

TERKI, I.; HASSAINE, H.; OUFRID, S. Detection of *icaA* and *icaD* genes and biofilmformation in *Staphylococcus* spp. isolated from urinary catheters at the University Hospital of Tlemcen (Algeria). **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 47, p. 5350–5357, 2013.

TOJO, M. et al. Isolation and characterization of a capsular polysaccharide adhesin from *Staphylococcus epidermidis*. **The Journal of infectious diseases**, v. 157, n. 4, p. 713–22, abr. 1988.

TOMASZ, A.; NACHMAN, S.; LEAF, H. Stable classes of phenotypic expression in methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 35, n. 1, p. 124–9, jan. 1991.

TORMO, M. A. et al. SarA is an essential positive regulator of Staphylococcus epidermidis biofilm development. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 7, p. 2348–56, abr. 2005a.

TORMO, M. A. et al. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of Staphylococcus: evidence of horizontal gene transfer? **Microbiology**, v. 151, n. Pt 7, p. 2465–75, jul. 2005b.

UÇKAY, I. et al. Foreign body infections due to Staphylococcus epidermidis. **Annals of medicine**, v. 41, p. 109–119, 2009.

VAN MELLAERT, L. et al. Immunoprophylaxis and immunotherapy of Staphylococcus epidermidis infections: challenges and prospects. **Expert review of vaccines**, v. 11, n. 3, p. 319–34, mar. 2012.

VAN SCHAİK, W.; ABEE, T. The role of sigmaB in the stress response of Gram-positive bacteria -- targets for food preservation and safety. **Current opinion in biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 218–24, abr. 2005.

VANDECASTEELE, S. J. et al. Reliability of the ica, aap and atlE genes in the discrimination between invasive, colonizing and contaminant Staphylococcus epidermidis isolates in the diagnosis of catheter-related infections. **Clinical microbiology and infection**, v. 9, n. 2, p. 114–9, fev. 2003.

VERGARA-IRIGARAY, M. et al. Wall teichoic acids are dispensable for anchoring the PNAG exopolysaccharide to the Staphylococcus aureus cell surface. **Microbiology**, v. 154, n. Pt 3, p. 865–77, mar. 2008.

VON EIFF, C. et al. Basic aspects of the pathogenesis of staphylococcal polymer-associated infections. **Infection**, v. 27 Suppl 1, p. S7–10, jan. 1999.

VUONG, C. et al. Quorum-sensing control of biofilm factors in Staphylococcus epidermidis. **The Journal of infectious diseases**, v. 188, n. 5, p. 706–18, 1 set. 2003.

VUONG, C. et al. Regulated expression of pathogen-associated molecular pattern molecules in Staphylococcus epidermidis: quorum-sensing determines pro-inflammatory capacity and production of phenol-soluble modulins. **Cellular microbiology**, v. 6, n. 8, p. 753–9, ago. 2004a.

VUONG, C. et al. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 52, p. 54881–6, 24 dez. 2004b.

VUONG, C. et al. Staphylococcus epidermidis polysaccharide intercellular adhesin production significantly increases during tricarboxylic acid cycle stress. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 9, p. 2967–73, maio 2005.

WANG, C. et al. Role of ClpP in biofilm formation and virulence of Staphylococcus epidermidis. **Microbes and infection**, v. 9, n. 11, p. 1376–83, set. 2007.

WANG, Q. et al. Enhancement of biofilm formation by subinhibitory concentrations of macrolides in icaADBC-positive and -negative clinical isolates of Staphylococcus epidermidis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 2707–11, jun. 2010.

WANG, X. et al. ygs is a novel gene that influences biofilm formation and the general stress response of Staphylococcus epidermidis. **Infection and immunity**, v. 79, n. 3, p. 1007–15, mar. 2011.

WANG, X.; PRESTON, J. F.; ROMEO, T. The pgaABCD locus of Escherichia coli promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 9, p. 2724–34, maio 2004.

WILLIAMS, R. J. et al. Identification of a fibronectin-binding protein from Staphylococcus epidermidis. **Infection and immunity**, v. 70, n. 12, p. 6805–10, dez. 2002.

WU, Y. et al. The two-component signal transduction system ArlRS regulates Staphylococcus epidermidis biofilm formation in an ica-dependent manner. **PloS one**, v. 7, n. 7, p. e40041, jan. 2012.

XU, L. et al. Role of the luxS quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of Staphylococcus epidermidis. **Infection and immunity**, v. 74, n. 1, p. 488–96, jan. 2006.

YAMADA, M. et al. Mutations in the quinolone resistance determining region in Staphylococcus epidermidis recovered from conjunctiva and their association with susceptibility to various fluoroquinolones. **The British journal of ophthalmology**, v. 92, n. 6, p. 848–51, 6 jun. 2008.

YANEVA, Z.; GEORGIEVA, N. No Title Insights into Congo Red Adsorption on Agro-Industrial Materials - Spectral, Equilibrium, Kinetic, Thermodynamic, Dynamic and Desorption Studies. A Review. **International Review of Chemical Engineering**, v. 4, n. 2, p. 127–146, 2012.

YOONG, P.; CYWES-BENTLEY, C.; PIER, G. B. Poly-N-acetylglucosamine expression by wild-type Yersinia pestis is maximal at mammalian, not flea, temperatures. **mBio**, v. 3, n. 4, p. e00217–12, jan. 2012.

ZHOU, H. et al. EsxA might as a virulence factor induce antibodies in patients with Staphylococcus aureus infection. **Brazilian journal of microbiology**, v. 44, n. 1, p. 267–71, jan. 2013.

ZIEBUHR, W. et al. A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. **Molecular microbiology**, v. 32, n. 2, p. 345–56, abr. 1999.

ZIEBUHR, W. et al. Methods to detect and analyze phenotypic variation in biofilm-forming *Staphylococci*. **Methods in enzymology**, v. 336, n. 1994, p. 195–205, jan. 2001.

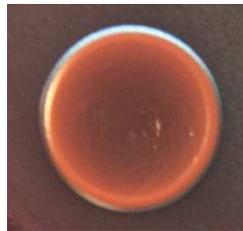
ZIEBUHR, W. et al. Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. **International journal of antimicrobial agents**, v. 28 Suppl 1, p. S14–20, ago. 2006.

**ANEXO A** - Aparência das macrocolônias de *S. epidermidis* em Ágar Vermelho Congo

- Reação negativa:



- Reação *bordeaux*:



- Reação Positiva:



**ANEXO B** – Resultados do nível de produção de biofilme, do teste em Ágar Vermelho Congo, da composição do biofilme e da pesquisa do operon *ica* das 25 amostras de *S. epidermidis* produtoras de biofilme

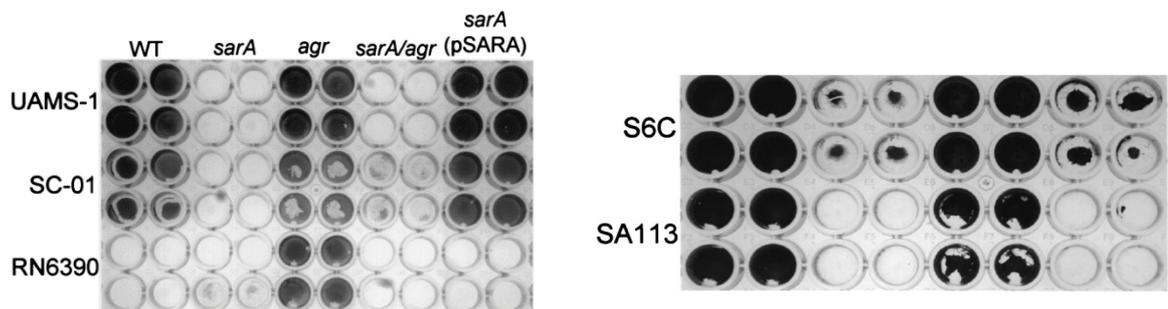
<b>Código da Amostra</b>	<b>Nível de Produção de Biofilme</b>	<b>Teste em Ágar Vermelho Congo</b>	<b>Composição do Biofilme</b>	<b>Pesquisa do Operon <i>ica</i></b>
<b>EP05</b>	Fraco	Negativo	Proteica	Negativa
<b>EP07</b>	Moderado	Negativo	Proteica	Negativa
<b>EP11</b>	Moderado	<i>Bordeaux</i>	Não Determinada	Positiva
<b>EP14</b>	Forte	Positivo	Polissacarídica	Positiva
<b>EP15</b>	Moderado	Negativo	Proteica	Negativa
<b>EP17</b>	Forte	<i>Bordeaux</i>	Não Determinada	Positiva
<b>EP18</b>	Moderado	Negativo	Proteica	Negativa
<b>EP22</b>	Fraco	Negativo	Proteica	Negativa
<b>EP33</b>	Fraco	Negativo	Proteica	Negativa
<b>EP34</b>	Forte	Positivo	Polissacarídica	Positiva
<b>EP39</b>	Forte	Positivo	Polissacarídica	Positiva
<b>EP40</b>	Forte	Positivo	Polissacarídica	Positiva
<b>EP43</b>	Forte	Positivo	Polissacarídica	Positiva
<b>EP45</b>	Forte	Positivo	Polissacarídica	Positiva
<b>EP46</b>	Forte	Positivo	Polissacarídica	Positiva
<b>EP48</b>	Fraco	<i>Bordeaux</i>	Não Determinada	Positiva
<b>EP51</b>	Forte	Positivo	Polissacarídica	Positiva
<b>EP52</b>	Forte	Positivo	Polissacarídica	Positiva
<b>EP53</b>	Fraco	Negativo	Proteica	Negativa
<b>EP54</b>	Moderado	Positivo	Polissacarídica	Positiva
<b>EP58</b>	Forte	Positivo	Polissacarídica	Positiva
<b>EP60</b>	Forte	Positivo	Polissacarídica	Positiva
<b>EP61</b>	Fraco	Negativo	Proteica	Negativa
<b>EP62</b>	Forte	Positivo	Polissacarídica	Positiva
<b>EP63</b>	Forte	Positivo	Polissacarídica	Positiva

**ANEXO C** - Poços de placas de microtitulação, após a coloração na técnica do MTP, apresentando biofilmes com coloração uniforme e irregular

- Neste Estudo:



- Retirado de Beenken e cols. (2003):



- Retirado de Oliveira (2009):

