

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE FARMÁCIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Avaliação do biofilme de *Staphylococcus* spp. de  
Cateter Venoso Central

**ANA LÚCIA SOUZA ANTUNES**

Orientador: Prof. Dr. Afonso Luis Barth  
Co-Orientador: Prof. Dr. Alexandre José Macedo

PORTO ALEGRE, 2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação do biofilme de *Staphylococcus* spp. de  
Cateter Venoso Central

Tese apresentada por **Ana Lúcia Souza Antunes**  
para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências  
Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Luis Barth  
Co-Orientador: Prof. Dr. Alexandre José Macedo

PORTO ALEGRE, 2011

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível Doutorado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 04.05.2011, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Alexandre Prehn Zavascki  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Cícero Armídio Gomes Dias  
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Profa. Dr. Tiana Tasca  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

A636a Antunes, Ana Lúcia Souza  
Avaliação do biofilme de *staphylococcus* spp. de cateter venoso central / Ana Lúcia Souza Antunes. – Porto Alegre: UFRGS, 2011. – xviii, 141p.: il.

Tese (Doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Microbiologia. 2. Staphylococcus. 3. Cateter venoso central. 4. Biofilmes. 5. Resistência bacteriana. 6. Vancomicina. I. Barth, Afonso Luís. II. Macedo, Alexandre José. III. Título.

CDU: 616-074.32

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia, Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana do Centro de Biotecnologia e Laboratório de Biologia Molecular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com suporte financeiro do HCPA/FIPE, NANOBIOTEC/Brasil - CAPES e CNPq (Jovens Pesquisadores em Nanotecnologia).



Ao meu marido Enrique, por todo o apoio, amor, paciência e compreensão.  
Aos meus filhos Felipe e Gabriela que sempre estiveram e estarão dentro do meu coração.  
Aos meus pais Lucília e Eli por terem incentivado a minha caminhada na busca do conhecimento.





## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Afonso Luís Barth, por ter aceitado ser meu orientador, sobretudo pelo alto nível científico e profissional. Obrigada pelas palavras de carinho, amizade, compreensão, apoio e confiança durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Alexandre José Macedo pela co-orientação atenta, dinâmica, entusiasmada e pelos ensinamentos compartilhados durante toda a realização de meu doutorado. Obrigada pelo carinho, amizade, disponibilidade e confiança que muito me auxiliou na realização deste estudo.

À Prof. Dra. Ana Lúcia Peixoto de Freitas pela amizade, carinho, sabedoria, entusiasmo, disponibilidade e parceria dedicadas a mim durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Leandro Reus Rodrigues Perez pela enorme dedicação, carinho, amizade, companheirismo e sem dúvida pelo profissionalismo acadêmico e científico. Obrigada por acreditar e me auxiliar nesta conquista.

As minhas queridas bolsistas Camille, Jéssica e Jaque pela amizade, compreensão, incentivo carinhoso, colaboração nos experimentos e sem dúvida pelo grande companheirismo durante este período tão significativo em minha vida.

Aos colegas do LACT, em especial a Katiane, Dariana, Daniela, Léia e recentemente Luciana e Vivian, que muito me ajudaram para que eu conseguisse alcançar este momento.

Às MSc. Daniele Trentin, Karine Zimmer e Dra. Raquel Giordani pelo carinho, amizade, incentivo e auxílio técnico científico.

À MSc. Cyntia Lazzarotto pelo carinho, amizade, coleguismo e suporte técnico-científico demonstrado durante parte da execução deste trabalho.

As minhas bolsistas do LACT, Juliana, Marlise, Josiele e Mariana pela compreensão por entenderem meus momentos de ausência da bancada de trabalho.

Aos Profs. Dr. Paulo Eduardo Mayorga Borges e Dr. José Angelo Zuanazzi - direção da Faculdade de Farmácia, pelo incentivo a realização desta etapa importante de minha formação profissional.

Aos colegas do laboratório de ensino, Fernanda, Rosana, Simone e Carlos pelo apoio técnico, fundamental para execução deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Clínica e Laboratório de Biologia Molecular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial a Kátia, Denise, Alice e Rodrigo pelo apoio técnico-científico durante a execução deste trabalho.

A CCIH do HCPA, em especial a Ms. Nádia Mora Kuplich e Dr. Rodrigo Pires dos Santos pelo suporte e ensinamentos nesta área de controle de infecção.

Ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, bem como seu corpo docente, funcionários e colegas, pelo auxílio e desenvolvimento que contribuíram para a concretização deste projeto.

Ao HCPA/FIPE – NANOBIOTEC/Brasil - CAPES e CNPq (Jovens Pesquisadores em Nanotecnologia) pelo suporte financeiro.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela parceria e incentivo.

A todos que de uma forma ou outra auxiliaram na realização deste trabalho.

## RESUMO

O gênero *Staphylococcus* está intimamente relacionado às infecções hospitalares onde existe a presença de implantes médicos, em especial os cateteres venosos centrais (CVC). Nestas infecções, a habilidade de formar biofilme é considerada um importante fator de virulência entre *Staphylococcus*. Biofilmes são agregados microbianos envolvidos por uma matriz polimérica extracelular que confere proteção contra a ação do sistema imunológico e ação dos antimicrobianos, dificultando assim o tratamento das infecções relacionadas a implantes médicos. Os objetivos deste estudo foram: (i) avaliar a formação de biofilme em 222 isolados de *Staphylococcus* spp. de CVC através de dois métodos fenotípicos [ágar Congo Red (ACR) e microplacas com cristal violeta] e estabelecer possíveis marcadores genéticos de formação de biofilme, através da pesquisa dos genes *icaA*, *icaD*, *aap* e *atlE*, (ii) estabelecer um teste de suscetibilidade através da técnica de microdiluição em caldo para avaliar a concentração inibitória mínima de vancomicina necessária para erradicar o biofilme formado (CMEB), e comparar estes valores com os resultados obtidos através da técnica de concentração inibitória mínima (CIM) em crescimento planctônico. Das 222 amostras analisadas, encontramos 64,5% (143/222) de isolados formadores de biofilme. A detecção de biofilme em *S. epidermidis* foi de 64,5% e 54% pelos métodos de microplaca e ACR respectivamente, utilizando microplacas com cristal violeta como padrão ouro. Encontramos os genes *icaA* e *icaD* na grande maioria (92% - 132/143) dos isolados produtores, o que confirma a importância destes genes na formação de biofilme. Em um total de 37 *S. aureus* a produção de biofilme ocorreu em 81,1% (30/37) dos isolados, sendo que entre os MRSA a taxa foi de 88,9% e entre os MSSA de 78,6%. Os genes *icaA* e *icaD* estavam presentes em 25/30 das amostras formadoras de biofilme. Nos demais *Staphylococcus* spp. coagulase negativos não *epidermidis* foi observada uma taxa de produção de biofilme de 35,6% (6/19). Os isolados formadores de biofilme foram classificados em três categorias: forte, moderado e fraco. Entre os isolados forte e moderadamente produtores de biofilme foram observados uma maior razão CMEB / CIM (> 32) frente à vancomicina. Entre isolados biofilme negativos, não encontramos diferenças nos valores de CMEB e CIM. Embora a forma de crescimento em biofilme no processo infeccioso já tenha sido bem comprovada, os laboratórios de microbiologia clínica realizam testes de suscetibilidade em isolados na forma

planctônica. Desta forma, os resultados obtidos neste estudo, indicam que a CIM pode não ser o parâmetro mais adequado para guiar a terapêutica. Sendo assim, é extremamente importante avaliar a suscetibilidade à vancomicina, em casos de infecções relacionadas à CVC, na forma de biofilme bacteriano (CMEB).

**Palavras-chave:** Biofilme, cateter venoso central; resistência bacteriana, *icaA*, *icaD*, *atlE*, *aap*, vancomicina, *Staphylococcus* spp.

## ABSTRACT

Evaluation of the biofilm in *Staphylococcus* spp. from Central Venous Catheter.

*Staphylococcus* is closely related to hospital infections, where the presence of medical implants exists, here represented by central venous catheter (CVC). In these infections, the ability to form biofilm is considered an important virulence factor among *Staphylococcus*. Biofilms are structured communities of microbial species involved by an extracellular polymeric matrix, which protects against the immunologic system and antimicrobial actions, making it harder to treat those infections related to medical implants. The goals of this study were: (i) to evaluate the biofilm formation in 222 isolates of *Staphylococcus* spp. of CVC through both phenotypic methods [agar Congo Red (ACR) and microtiter plates] and establish possible genetic markers of biofilm formation, through the research of the *icaA*, *icaD*, *aap* and *atlE* genes, by PCR, (ii) establish susceptibility in biofilm, through of the microdilution test to evaluate the minimal inhibitory concentration of vancomycin to eradicate the biofilm formed - Minimal Biofilm Eradication Concentration (MBEC) and to compare these results with the values found to the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) in growth planctonic. From the 222 analyzed samples, we found 64.5% (143/222) of isolates biofilm producers. The detection of the biofilm formation in the *S. epidermidis* was 64.5% and 54% by the microtiter plate and ACR methods, respectively, using microtiter plates as gold standard. We found *icaA* and *icaD* genes in most (92%) of the biofilm producing isolates, which confirms that those genes are essential for this kind of formation. In a total of 37 *S. aureus*, the biofilm production was observed in 81.1% (30/37) of the isolates. Concerning the MRSA we found 88.9% and among MSSA were observed 78.6% of biofilm-producing. The *icaA* and *icaD* genes were present in 25/30 of the samples biofilm producers. On the other *Staphylococcus* spp. coagulase negatives non-*epidermidis*, it was observed a number of 35.6% (6/19). The biofilm producing isolates were classified in three categories: strong, moderate and weak. Among the strong and moderate biofilm producing isolates, we could observe a higher ratio MBEC/MIC (>32) in relation to the vancomycin. Among negative biofilm isolates we found matching values for MBEC and MIC. Although the form of growth in biofilm among the infection process has already been well proven, the clinical microbiology laboratories perform susceptibility testing on isolates in the

planktonic form. Thus, the results of this study indicate that the MIC cannot be the most appropriate parameter to guide therapy. It is therefore extremely important to evaluate the susceptibility to vancomycin in cases of infection related to CVC, in the form of bacterial biofilms (MBEC).

Keywords: Biofilm, central venous catheter, microbial resistance, *icaA*, *icaD*, *atlE*, *aap*, vancomycin, *Staphylococcus* spp.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**Aae** - *Autolysin/adhesin from Staphylococcus epidermidis* - (Autolisina do *Staphylococcus epidermidis*)

**aae** - Gene que codifica a autolisina Aae

**AAP** - *Accumulation-Associated Protein*

**aap** - gene que codifica a proteína associada à acumulação

**ACR** – Agar de Congo red

**ATCC** - *American Type Culture Collection*

**AtIE** - *Autolysin E* - (Autolisina do *Staphylococcus epidermidis*)

**atIE** - Gene que codifica a autolisina atIE

**Bap** - *Biofilm associated protein* - (Proteína associada a biofilme)

**Bap** - Gene que codifica a proteína associada a biofilme

**Bhp** - *Bap-homologous protein* - (Proteína homóloga a Bap)

**Bhp** - Gene que codifica a proteína homóloga a Bap

**CA-MRSA**–*Community-acquired-Methicillin-resistant-Staphylococcus aureus*

**CCIH** – Comissão de Controle de Infecção Hospitalar

**CDC** – *Centers for Disease Control and Prevention*

**CVC** – *Central Venous Catheter* (Cateter Venoso Central)

**CVCs** - Cateteres Venosos Centrais

**CIM** – Concentração Inibitória Mínima

**CMEB** – Concentração Mínima para Erradicar Biofilme

**CLSI** - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

**CRA** – Congo red agar

**Embp** - *Extracellular matrix binding protein* - (Proteína de ligação a fibronectina)

**Embp** - Gene que codifica a proteína de ligação a fibronectina

**EPS** – Extracelular Polissacarídica

**HCPA** – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**HICC** - *Hospital Infection Control Commission*

**ica** - *Intercellular Adhesion* - (gene que codifica a síntese de PIA)

**IS** - *Insertion Sequence* - (sequência de inserção)

**MIC – *Minimum Inhibitory Concentration***  
**MBEC - *Minimum Biofilm Eradication Concentration***  
**MRSA – *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus***  
**MRSE - *Methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis***  
**NNIS - *National Nosocomial Infections Surveillance System***  
**PBP2a – *Penicilin Binding Protein* (Proteína ligadora de Penicilina)  
**PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)  
**PIA - *Polysaccharide Intercellular Adhesin*  
**PNSG - *Poly-N-Succinylglucosamine*  
**PVL - Panton-Valentine Leucodin  
**sarA - *Staphylococcal accessory regulator*  
**SCC – *Staphylococcal cassette chromosome*  
**SCCmec – *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*  
**SCN – *Staphylococcus* sp. coagulase negativo  
**UTI - Unidade de Terapia Intensiva  
**VISA – *Staphylococcus aureus* com resistência intermediária à vancomicina**********************



## SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
II.1. Aspectos Gerais do Gênero <i>Staphylococcus</i> .....	7
II.2. Epidemiologia .....	7
II.3. Importância Clínica dos <i>Staphylococcus</i> spp. e Patogenicidade.....	10
II.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	10
II.3.2. <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos .....	12
II.3.3. Formação de biofilme em <i>Staphylococcus</i> spp. ....	14
II.3.4. Resistência aos antimicrobianos .....	20
II.3.5. Implicações do uso de Cateter Venoso Central .....	29
III. OBJETIVOS .....	33
III.1. OBJETIVO GERAL .....	35
III.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
IV. ARTIGOS CIENTÍFICOS .....	37
IV.1. MANUSCRITO 1 - Genetic markers of biofilm production among <i>Staphylococcus epidermidis</i> from central venous catheter: comparison with phenotypic methods.....	39
IV.2. MANUSCRITO 2 - Application of a Feasible Method for Determination of Biofilm Antimicrobial Susceptibility in Staphylococci.....	53
IV.3. MANUSCRITO 3 - High vancomycin resistance among biofilms produced by <i>Staphylococcus</i> species isolates from central venous catheter.....	61
IV.4. MANUSCRITO 4 - Is there a reliable genetic marker to evaluate the ability to form biofilm in <i>Staphylococcus aureus</i> causing catheter-related infections?.....	69

IV.5. MANUSCRITO 5 - Prevalence of <i>ica</i> genes among biofilm produced by Coagulase-negative <i>Staphylococcus</i> spp. non- <i>epidermidis</i> species isolated from central venous catheter.....	79
V. DISCUSSÃO GERAL.....	89
VI. CONCLUSÕES GERAIS.....	95
VII. REFERÊNCIAS.....	99
VIII. ANEXOS .....	131
VIII.1. Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA .....	133
VIII.2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	135
VIII.3. Ficha de Avaliação de Infecção relacionada à CVC.....	137





Infecção nosocomial é a maior causa de morbi-mortalidade principalmente em pacientes imunocomprometidos (QIAN *et al.*, 2001; SKOV *et al.*, 2005; VADYVALOO e OTTO, 2005; OTTO, 2009). Estima-se que aproximadamente 30% de todas as infecções nosocomiais e 50% das bacteremias estão relacionadas ao gênero *Staphylococcus* (SKOV *et al.*, 2005). *Staphylococcus* spp. são encontrados na pele e em mucosas do homem mantendo uma relação simbiótica com seu hospedeiro. Para expressar sua patogenicidade, passando de habitantes normais da pele a protagonista de infecção, é necessária uma predisposição do hospedeiro, tais como: quebra da barreira cutânea, imunossupressão, idade (idosos e recém-nascidos de baixo peso) e doença de base associada (VADYVALOO e OTTO, 2005).

*Staphylococcus aureus* é o mais comum agente causador de infecções no mundo (CHANG *et al.*, 2003; SADER *et al.*, 2003; VADYVALOO e OTTO, 2005), no entanto *Staphylococcus* spp. coagulase negativos (SCN) são os mais comumente isolados em infecções de corrente circulatória e àquelas associadas a implantes: cateteres, válvulas e próteses (BANNERMAN, 2003). O histórico das infecções hospitalares, sua relação com o desenvolvimento de resistência aos antibióticos, infecções recorrentes e períodos de internação prolongados, têm suscitado interesse na busca de outros mecanismos de patogenicidade que justifiquem seu sucesso. Infecções relacionadas a biofilme estão intimamente associadas a cateter venoso central (CVC). A hipótese dos microrganismos associados em biofilme organizarem estratégias de ataque ao hospedeiro, e a grande possibilidade de interação do *Staphylococcus* spp. com outros microrganismos pode ser um dos fatores que aumentam sua virulência. Essa interação pode ocorrer de distintas maneiras, podendo outros microrganismos iniciar o processo de adesão na superfície do CVC que posteriormente será reconhecido pelo *Staphylococcus* spp. ou a transferência horizontal de genes de virulência e de resistência a antimicrobianos que ocorre com maior frequência quando microrganismos estão estreitamente associados (ROHDE *et al.*, 2007).

Os agregados celulares são compostos por micro-colônias de células e são permeados por canais de água e áreas intersticiais vazias. A permanência do biomaterial pode levar ao desenvolvimento de biofilme, funcionando como fonte de

infecção duradoura e também como proteção frente aos antimicrobianos (RAAD *et al.*, 1998; RICE, 2006).

Nesse contexto, vários aspectos devem ser considerados: (i) bactérias patogênicas estão se tornando cada vez mais resistentes a antimicrobianos; (ii) comunidades bacterianas em biofilme são menos suscetíveis a tratamentos com antimicrobianos e mantêm um elevado nível de virulência para o hospedeiro; (iii) a maioria das infecções e uma variedade de enfermidades envolvem biofilmes bacterianos; (iv) a utilização de antimicrobianos ineficazes quando na presença de biofilme aumenta o tempo de internação, a morbi-mortalidade, onera o sistema de saúde, e eleva as taxas de resistência aos antimicrobianos, o que auxilia a disseminação de bactérias resistentes (O'GARA e HUMPHREYS, 2002; BEEKMANN *et al.*, 2003; FITZPATRICK *et al.*, 2005; RICE, 2006; CREMNITER *et al.*, 2010).

Ainda que estudos tenham demonstrado que microrganismos vivendo em comunidade expressam outros genes, e dentre estes, um maior número de genes de virulência e resistência, usualmente identificamos apenas o isolado prevalente e os testes de suscetibilidade são realizados em bactérias planctônicas (KOZITSKAYA *et al.*, 2005; RICE *et al.*, 2007). Este procedimento parece inadequado, uma vez que estudos têm mostrado que muitas bactérias, se não todas, têm preferência por adesão às superfícies, como característica fundamental de sobrevivência. Assim, é ambíguo o fato da suscetibilidade de microrganismos ainda ser testada em crescimento planctônico (DUNNE, 2002; LINARES *et al.*, 2006). Existem evidências da associação de distintos microrganismos em biofilme em dispositivos médicos, o que é corroborado pelo fato de que microrganismos podem atuar conjuntamente para benefício mútuo e organização de estratégias de virulência (DAVEY e O'TOOLE, 2000; GU *et al.*, 2005). O estabelecimento da terapia antimicrobiana adequada depende dos agentes envolvidos na infecção, o que enfatiza a importância da determinação de todos os microrganismos presentes. Além disso, todas ou quase todas as bactérias podem produzir biofilme em condições de estresse e, portanto responder de maneira diferente aos antimicrobianos.

---

## II. REVISÃO DA LITERATURA





## II.1. Aspectos Gerais do Gênero *Staphylococcus*

*Staphylococcus* spp. são bactérias Gram-positivas, catalase positivas, da família Micrococcaceae. O gênero *Staphylococcus* na atualidade é composto por aproximadamente 40 espécies, 17 das quais podem ser isoladas de amostras biológicas humanas (MONSEN *et al.*, 1998; BANNERMAN, 2003). *Staphylococcus* são amplamente distribuídos na natureza, podendo ser encontrados no homem colonizando pele e mucosas, possuindo uma relação de reciprocidade ou benigna com o seu hospedeiro. Entretanto, os microrganismos podem desenvolver potencial patogênico quando ocorre acesso aos tecidos do hospedeiro, através de traumas na barreira cutânea, inoculação por agulhas ou implantação de dispositivos médicos (BANNERMAN, 2003).

O gênero *Staphylococcus* é constituído por importantes patógenos humanos, causando um amplo espectro de doenças sistêmicas relevantes. As espécies mais comumente associadas são o *Staphylococcus aureus* (membro mais virulento e mais conhecido do gênero), *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus simulans* e *Staphylococcus warneri*. Esses microrganismos apresentam elevado risco potencial de bacteremia nosocomial entre pacientes imunocomprometidos (MURRAY *et al.*, 2006; SIVADON *et al.*, 2005).

## II.2. Epidemiologia

*Staphylococcus* spp. são reconhecidamente uma importante causa de infecções humanas nosocomiais e adquiridas na comunidade (ROHDE *et al.*, 2007; OTTO 2009). Dentre as espécies de estafilococos, *Staphylococcus aureus* é considerado o microrganismo patogênico mais importante. As demais espécies do gênero estão incluídas no grupo *Staphylococcus* spp. coagulase negativos (SCN), apresentando crescente interesse clínico devido à formação de biofilme (SIVADON *et al.*, 2005; VADYVALOO e OTTO, 2005; BANNERMAN e PEACOCK, 2007; HARRISON *et al.*, 2007).

Infecção nosocomial é a maior causa de morbi-mortalidade em todo o mundo, principalmente em pacientes imunocomprometidos (ROHDE *et al.*, 2007; SCHOENFELDER *et al.*, 2010). Estima-se que aproximadamente 30% de todas as infecções nosocomiais e 50% das bacteremias estão relacionadas ao gênero *Staphylococcus* (SKOV *et al.*, 2005; OTTO, 2009). Além disso, o ambiente hospitalar propicia aos microrganismos a aquisição de resistência aos antibióticos complicando o tratamento das infecções, elevando a permanência do paciente no hospital bem como os custos com a internação (FITZPATRICK *et al.*, 2005). Em estudo do SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, envolvendo o Brasil e a América Latina, no período de 1997 a 2001, foi detectada uma prevalência de 21,3% de *S. aureus* e 13,9 % de SCN em hemocultura (SADER *et al.*, 2003). Os SCN possuem a habilidade de sobreviver em UTIs, na superfície de dispositivos médico-hospitalares e equipamentos médicos durante semanas ou até meses (NEELY e MALEY, 2000). A importância e a incidência de infecções causadas por SCN têm crescido substancialmente (HUSSAIN *et al.*, 1998; ROHDE *et al.*, 2006; RODRIGUEZ-MARTINEZ *et al.*, 2007). Esta mudança no panorama epidemiológico deve-se, entre outros fatores, às condições de higiene de cada paciente, pois pacientes submetidos a quimioterápicos, imunossupressores e dispositivos médicos apresentam situações de risco para o acometimento de infecções (WEISSER *et al.*, 2010). Na América do Norte, nas últimas três décadas houve um aumento nas infecções causadas por estes microrganismos, paralelamente ao aumento da resistência à meticilina nestes isolados (JONES, 2003; HUSSAIN *et al.*, 2002; FITZPATRICK *et al.*, 2005; VADYVALOO e OTTO, 2005).

O histórico das infecções hospitalares, sua relação com o desenvolvimento de resistência aos antibióticos, infecções recorrentes e períodos de internação prolongados, têm suscitado interesse na busca por outros mecanismos de patogenicidade. Uma hipótese, é que microrganismos associados em biofilme organizem estratégias de ataque ao hospedeiro, e aumentem a interação dos *Staphylococcus spp.* com outros microrganismos (CREMNITER *et al.*, 2010).

Embora desde a década de 50 já houvesse relatos de SCN causando infecções, somente nos anos 80 a comunidade científica começou a elucidar melhor

a patogenicidade destes microrganismos. *Staphylococcus* spp. coagulase negativos foram considerados não patogênicos e seu isolamento no laboratório clínico era atribuído à contaminação pela microbiota cutânea normal. Nos últimos anos, são a principal causa de infecções no sistema circulatório em pacientes hospitalizados, responsáveis por uma elevada morbidade e mortalidade (QIAN *et al.*, 2001; FERREIRA *et al.*, 2003; GALES *et al.*, 2009; OTTO, 2009). A frequência com que *S. epidermidis* é encontrado varia de 43% a 92% dependendo da região geográfica pesquisada (VUONG e OTTO, 2002; DE PAULIS *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 2003; CAIERÃO *et al.*, 2006; ANTUNES *et al.*, 2007).

Estudo multicêntrico realizado pelo SENTRY “Antimicrobial Surveillance Program” (JONES, 2003), reportou o aumento da resistência em SCN no período de 1997 a 2001, em diferentes regiões do mundo, sendo que as taxas encontradas foram: 22,4 a 38,7% na América do Norte; 22,1 a 30,4% na Europa e 29,2 a 36,0% na América Latina.

BIEDENBACH e colaboradores (2004) demonstraram que SCN foram os microrganismos mais isolados em bacteremias de neonatos e crianças até um ano de idade. Em outro estudo realizado por SADER e colaboradores (2004), avaliando questões de resistência na América Latina, incluindo o Brasil, foi observada uma diminuição nos níveis de suscetibilidade a teicoplanina entre SCN, sendo que no Brasil, o perfil de suscetibilidade frente às cefalosporinas e meticilina também vem se modificando, mostrando uma suscetibilidade de apenas 17,7%. Dados nacionais mostram uma resistência de 80% a oxacilina em isolados de hemocultura, isto já havia sido reportado por SADER e colegas (2001). Em outro estudo brasileiro, FERREIRA e colaboradores (2003) encontraram uma frequência de resistência de SCN à oxacilina de 64%, em isolados de diferentes sítios clínicos. Na Ásia, a prevalência de *S. epidermidis* meticilina resistente (MRSE) foi de 60 a 66% em bacteremia (JEONG *et al.*, 2002).

No período de 2005 a 2008, outro estudo realizado pelo SENTRY, relatou aumento das taxas de resistência em SCN para a maioria dos antimicrobianos utilizados nos hospitais brasileiros. Neste estudo os índices reportados de

resistência à meticilina foram de 78,7% em SCN e 31,0% em *S. aureus*. Sendo que entre os SCN também foi encontrado valores elevados de resistência à eritromicina de 70%, de 50% para sulfametoxazol-trimetoprima e 45% para o levofloxacino (GALES *et al.*, 2009).

A rápida emergência e disseminação de multiresistência entre as bactérias têm aumentado a necessidade de controlar estes patógenos em hospitais. A caracterização de clones dentro de um grupo fenotipicamente resistente tem um impacto direto no método de intervenção corretiva. Em uma escala mais ampla, a identificação de clones de microrganismos resistentes com um grande alcance geográfico, pode fornecer uma visão da patogenicidade e virulência das espécies; podendo também resultar em intervenções de saúde públicas mais amplas, como vacinação e restrições antimicrobianas, objetivando a limitação da proliferação de patógenos resistentes (JONES, 2001).

### **II.3. Importância Clínica dos *Staphylococcus* spp. e Patogenicidade**

#### **II.3.1. *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus* spp. são, reconhecidamente, uma importante causa de infecções humanas nosocomiais e adquiridas na comunidade (CHAMBERS, 2001; FOSTER, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2005), sendo *Staphylococcus aureus* bem descrito como um patógeno humano oportunista (BANNERMAN, 2003). A porção nasal anterior é o mais freqüente sítio de colonização humana, embora a pele (especialmente quando danificada), vagina, axila, períneo e orofaringe podem, também, estar colonizadas. Aproximadamente 25 a 50% das pessoas saudáveis podem ser colonizadas persistente ou transitoriamente com *S. aureus* (KLOOS e BANNERMAN, 1994). A colonização é alta entre diabéticos insulino-dependentes, imunocomprometidos, pacientes submetidos à hemodiálise e indivíduos com lesões de pele. Os sítios de infecções servem como reservatórios de microrganismos de *S. aureus* que poderão causar futuras infecções nestes indivíduos. Além disso, *S. aureus* é a causa mais comum de infecções cirúrgicas e o segundo, atrás apenas de SCN, causando bacteremia primária (JELJASZEWICZ, 1998; WALSH, 2002). Cada vez mais, os isolados nosocomiais de *S. aureus* são resistentes a múltiplos

antimicrobianos. Por outro lado, diversos relatos têm descrito infecções adquiridas na comunidade causadas por Community-acquired-Methicillin-resistant-*Staphylococcus aureus* (CA-MRSA), sendo que estes indivíduos não tiveram exposição prévia a antimicrobianos (LAYTON *et al.*, 1995; HEROLD *et al.*, 1998; JONES *et al.*, 2002; SALMENLINNA *et al.*, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2005). Na comunidade, este patógeno permanece como uma importante causa de infecções de pele e tecidos, infecções respiratórias e endocardites infecciosas.

Muitos indivíduos que desenvolvem infecções por *S. aureus* o fazem devido ao seu próprio isolado colonizante, mostrando-se como fonte endógena de infecção, ou também adquirido de outras pessoas ou de fontes ambientais (BANNERMAN, 2003). A transmissão mais freqüente resulta da colonização transitória das mãos de pessoas que trabalham em hospitais, as quais transferem isolados de *S. aureus* de um paciente para outro.

*Staphylococcus aureus* é um patógeno piogênico que apresenta a capacidade de induzir a formação de abscessos em sítios locais ou ainda em infecções metastáticas (BANNERMAN, 2003). Esta clássica resposta patológica ao *S. aureus* define o segmento no qual progride a doença. A bactéria induz uma resposta inflamatória caracterizada por uma intensa resposta inicial de leucócitos polimorfonucleares e a subsequente infiltração de macrófagos e fibroblastos. Em qualquer uma das respostas da célula hospedeira (incluindo a deposição de fibrina e colágeno) está a infecção, ou infecção disseminada a tecidos adjacentes ou a corrente circulatória (KLOOS e BANNERMAN, 1994). Nas doenças estafilocócicas devido a toxinas, a infecção clínica não está, invariavelmente, presente. *Staphylococcus aureus* produz diferentes tipos de toxinas: citotoxinas, toxinas pirogênicas (superantígenos) e toxinas exfoliativas (KLOOS e BANNERMAN, 1994; BANNERMAN, 2003). Outro fator de virulência bastante estudado entre estes microrganismos está relacionado à formação de biofilme quando na presença de biomateriais (RAAD *et al.*, 1998, DONLAN e COSTERTON, 2002; DONLAN, 2002; FLEMMING *et al.*, 2007, HOUSTON *et al.*, 2011).

### II.3.2. *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos

*Staphylococcus* spp. coagulase negativos estão entre os microrganismos mais relacionados com infecções hospitalares, especialmente em pacientes com fatores predisponentes tais como implantes protéticos, uso de cateteres e imunossupressão (EIFF *et al.*, 2002; OTTO, 2009; SCHOENFELDER *et al.*, 2010, GOMES *et al.*, 2011). Estes microrganismos são habitantes normais da pele e mucosas e, por isso, um dos maiores desafios no laboratório de microbiologia clínica é distinguir cepas clinicamente significativas das contaminantes (EIFF *et al.*, 2002; OTTO, 2009). Dados do National Nosocomial Infections Surveillance System (NNIS, 1999) de janeiro de 1990 a até maio de 1999 mostraram que SCN estão entre os patógenos mais freqüentemente isolados (37,3%, comparados com 12,6% para *S. aureus*) de infecções da corrente circulatória em pacientes internados na unidade de terapia intensiva (UTI). Estes são microrganismos ubiqüitários, comensais humanos, incluindo flora bucal e traqueal, e também com certas espécies habitando nichos bem característicos. O tratamento destas infecções também é difícil porque muitos SCN carregam resistência múltipla aos antimicrobianos, incluindo eventualmente, resistência à classe dos glicopeptídeos (DIEKEMA *et al.*, 2001; MUSTA *et al.*, 2009; SADER *et al.*, 2009).

As manifestações clínicas das infecções devido aos SCN diferem marcadamente das infecções ocasionadas por *S. aureus*. Normalmente, o quadro clínico é discreto e não específico, e o curso clínico mais subagudo ou até crônico, sem sinais marcantes de infecção (EIFF *et al.*, 2002). Entretanto, síndromes sépticas e fatais podem ocorrer, principalmente, em pacientes imunocomprometidos e/ou se uma das espécies mais virulentas, como *Staphylococcus lugdunensis*, estiver envolvido (EIFF *et al.*, 2002; FRANK *et al.*, 2007).

A importância de SCN como patógenos nosocomiais tem incitado maior interesse em sua detalhada caracterização taxonômica. Pesquisas sobre estes microrganismos vêm sendo realizadas, incluindo o desenvolvimento de métodos mais acurados para identificação das espécies, para distinção entre isolados infectantes e contaminantes, tipagem epidemiológica das espécies e detecção da resistência a metilina e possíveis fatores de virulência (ROWE *et al.*, 2002;

FERREIRA *et al.*, 2003; CAIERÃO *et al.*, 2004; PALAZZO e DARINI, 2006). Além disso, nas últimas décadas, um dos fatores de virulência envolvidos na patogênese das infecções por SCN, está associado à habilidade destas espécies em colonizarem a superfície de polímeros através da formação de multicamadas densas denominadas biofilme (OTTO, 2008).

Entre os SCN, *S. epidermidis* é a espécie mais comumente isolada em bacteremia e *S. haemolyticus* é a segunda, ambos são associados com endocardite, infecção de corrente sanguínea, peritonite, infecções do trato urinário, infecções de ferida operatória e infecções em articulações. Por outro lado, *S. lugdunensis* apresenta características muito semelhantes ao *S. aureus*, devido à natureza rápida e agressiva de sua infecção, e têm sido relacionados a infecções de sítio cirúrgico, abscessos, peritonite, osteomielite e endocardite (KLOOS e BANNERMAN, 1994; HELLBACHER *et al.*, 2006; FRANK *et al.*, 2007). A mortalidade atribuída a infecções no sistema circulatório causadas por *S. epidermidis* varia de 10 a 34%, com aumento dos custos e acréscimo de 7 a 19 dias na duração da internação (FITZPATRICK *et al.*, 2005; OTTO, 2009; ROHDE *et al.*, 2010).

*Staphylococcus epidermidis* tem emergido como o mais importante patógeno hospitalar responsável por infecções associadas à implantação de dispositivos médicos como prótese articular, válvula cardíaca, marca passo, cateter de diálise peritoneal, lente intraocular (WIESER e BUSSE, 2000; De PAULIS *et al.*, 2003; HEIKENS *et al.*, 2005; OTTO, 2009; ROHDE *et al.*, 2010). Seu sucesso como patógeno, deve-se ao fato de se aderir à superfície destes dispositivos médicos (VUONG *et al.*, 2003; VUONG *et al.*, 2004; OTTO, 2008; OTTO, 2009; et GOMES *et al.*, 2011). Até mesmo instrumentos esterilizados podem ser contaminados com membros da microbiota normal durante sua inserção no local de interesse. As infecções causadas pelo *S. epidermidis* são freqüentemente persistentes e recidivantes, funcionando como fonte de infecção duradoura (RAAD *et al.*, 1998; OTTO, 2009; ROHDE *et al.*, 2010).

### II.3.3 Formação de biofilme em *Staphylococcus* spp.

O mecanismo pelo qual *Staphylococcus* formam o biofilme é um processo complexo e de múltiplos passos, onde a relevância de cada componente ainda requer maiores investigações (COSTERTON, 1999; DONLAN e COSTERTON, 2002; SILVA *et al.*, 2002). Esta estrutura é composta por densos agregados de células microbianas embebidas em uma matriz viscosa que se adere a uma superfície abiótica. Os agregados celulares são compostos por inúmeras micro-colônias de células e são permeados por canais de água e áreas intersticiais vazias. O fluxo de água através dos canais intersticiais aumenta a oferta de nutrientes para as células internas do biofilme (RAAD *et al.*, 1998; DONLAN e COSTERTON, 2002; DONLAN, 2002; PATEL, 2005; FLEMMING *et al.*, 2007). As bactérias por si mesmas representam uma fração variável (normalmente, 5-35%) do total do volume do biofilme, o restante do volume é de matriz extracelular (POZO e PATEL, 2007). Em biofilme, os microrganismos se desenvolvem em comunidades com estrutura e função heterogeneamente organizadas, similares a organismos multicelulares (COSTERTON *et al.*, 1995; PATEL, 2005; OTTO, 2009; ROHDE *et al.*, 2010).

A formação do biofilme inclui uma substância extracelular que circunda o aglomerado de células composto por produtos da bactéria e das células do hospedeiro com composição química diversa, embora seu principal componente seja o ácido teicóico. Plasma e proteínas do tecido conectivo como fibronectina, fibrinogênio, vitronectina, trombospondina, laminina, colágeno e o fator Von Willebrand estão envolvidos nesse processo (EIFF *et al.*, 2002). A sua formação ocorre pela adesão inicial das células a uma superfície e sua subsequente agregação (OTTO, 2009). Alguns autores denominam esta substância extracelular de “slime” (ZIEBUHR *et al.*, 1997; EIFF *et al.*, 2002; VUONG *et al.*, 2003; ARCIOLA *et al.*, 2002), mas este termo talvez não seja apropriado para adesão de bactérias a polissacarídeos não covalentes (HUSSAIN *et al.*, 1997; MACK *et al.*, 2006). Assim, o processo de formação do biofilme ocorre em dois estágios:

1º Adesão primária – onde ocorre a rápida adesão da bactéria ao material abiótico ou ao material protéico do hospedeiro já aderido ao plástico, e a posterior formação da multicamada de células (VACHEETHASANEE *et al.*, 1998;



VACHEETHASANEE e MARCHANT, 2000). Alguns pesquisadores demonstram a existência de moléculas bacterianas específicas para esse tipo de interação hidrofóbica com a superfície abiótica, como a autolisina AtlE (HEILMANN *et al.*, 1996; ZIEBUHR *et al.*, 1997; VUONG *et al.*, 2003).

2º Adesão intercelular - a formação de aglomerados celulares no topo da monocamada de células aderidas ao plástico ou as células do hospedeiro são o segundo estágio da formação do biofilme. Muitas moléculas já foram propostas como sendo responsáveis pela adesão célula a célula, principalmente a PIA (*polysaccharide intercellular adhesin*); AAP (*accumulation-associated protein*) e a PNSG (*poly-N-succinylglucosamine*). A PIA e a PNSG podem ser a mesma molécula, pois são codificadas pelo operon *ica* que contem os genes *icaADBC* (HEILMANN *et al.*, 1996; HUSSAIN *et al.*, 1997; RACHID *et al.*, 2000; ROHDE *et al.*, 2010). Esta adesina é o componente funcional mais importante no processo de adesão intercelular e também na acumulação das multicamadas (MACK *et al.*, 2006).

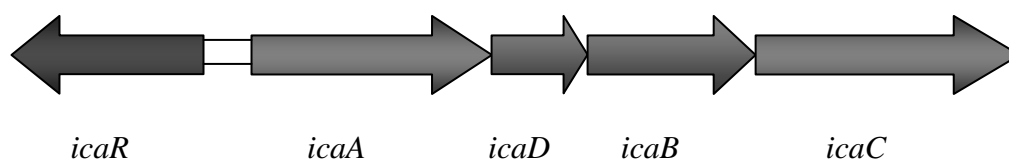


Figura 1. Operon *icaRADBC*

O locus *icaADBC* codifica enzimas responsáveis pela síntese de PIA. Este locus foi bem caracterizado em *S. epidermidis*, *S. aureus* e *S. caprae* e seqüências homólogas foram detectadas em outras espécies de SCN, embora em *S. haemolyticus* e *S. saprophyticus* não tenha sido observada estas mesmas seqüências homólogas (MACK *et al.*, 2006). A PIA é codificada especificamente pelo gene *icaA*, mas sua expressão é reforçada quando ocorre uma co-expressão do *icaA* com o *icaD*, aumentando assim significativamente sua atividade e expressão fenotípica (ARCIOLA *et al.*, 2003; STOODLEY *et al.*, 2004; ROHDE *et al.*, 2010). Mutações nesses genes comprometem a formação do biofilme por romper a agregação e acumulação celular, no entanto, isolados PIA-independentes apresentam outro mecanismo de adesão e acumulação, esta hipótese é sustentada

pela presença da proteína associada de acumulação (AAP) (ROHDE *et al.*, 2005; MACK *et al.*, 2006). Também foi reportado que PIA e *ica* podem também falhar na formação de biofilme se tiverem uma aderência inicial prejudicada (STOODLEY *et al.*, 2004).

Em *S. epidermidis* foi observado uma sofisticada rede regulatória que rapidamente se adapta às trocas ambientais externas, através de uma comunicação interna para escapar da resposta imune do hospedeiro. Análises genômicas demonstraram a presença de numerosos elementos genéticos móveis de inserção, incluindo methicillin resistance-mediating *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCC*mec*) e seqüências de inserção (IS), sendo estas extremamente flexíveis e são o gatilho para expressão de alguns genes (SCHOENFELDER *et al.*, 2010). Estudos mostram que também em *S. aureus* existe uma região de grande instabilidade, onde o gen *mecA* se integra ao cromossoma. A presença destes elementos móveis, sua frequência e o número de vezes que ocorrem estas inserções são variável e ainda pouco conhecido, mas com certeza a transferência do gen *mecA* é relativamente frequente (PETRELLI *et al.*, 2008; SCHOENFELDER *et al.*, 2010).

A formação de biofilme envolve regulação gênica, assim sendo as características fenotípicas de uma bactéria formadora de biofilme são determinadas pelo seu genótipo e por condições ambientais. Alterações nestas condições requerem pronta adaptação para assegurar a sobrevivência das mesmas. A produção de PIA é uma adaptação fisiológica e envolve a síntese de enzimas especificamente requeridas para o momento, e envolve genes específicos, o que por sua vez, requer a existência de mecanismos de regulação gênica. A pergunta chave que antecede qualquer sistema de regulação da expressão gênica é: como os genes são ligados ou desligados, ou como são induzidos ou reprimidos? No caso específico do gene *ica* ocorre uma repressão da expressão gênica (KNOBLOCH *et al.*, 2004).

Diversos estudos sobre *S. epidermidis* e *S. aureus* mostram que o estágio de adesão por si só é multifatorial, uma vez que depende das propriedades físico-químicas do biomaterial e da natureza da superfície da célula bacteriana (DONLAN

e COSTERTON, 2002; STOODLEY *et al.*, 2004; MACK *et al.*, 2004; PATEL, 2005). A formação de biofilme depende do sinergismo de uma variedade de genes e uma alta variabilidade de estímulos ambientais, indicando uma clara rede regulatória (CHRISTENSEN *et al.*, 1982; RACHID *et al.*, 2000; ROHDE *et al.*, 2004). Apesar da elevada homologia entre o operon *icaADBC* de *S. epidermidis* e *S. aureus* neste último ela é mais intrincada e parece ser levemente diferente (ARCIOLA, 2009). Em ambas as espécies, na posição anterior ao códon de iniciação *icaA* encontra-se o *icaR* regulador, que controla a transcrição do operon *icaADBC* (MACK *et al.*, 2006). Como foi dito anteriormente, a hidrofobicidade e a carga eletrostática do material estão entre as propriedades que podem influenciar as interações entre o polímero e a superfície celular bacteriana (STOODLEY *et al.*, 2004; VADYVALOO e OTTO, 2005; MACK *et al.*, 2006). Estudos demonstram também que os microrganismos se aderem mais rapidamente a superfícies hidrofóbicas e apolares, como o Teflon e outros plásticos, do que a materiais hidrofílicos, como vidro e metais. Em geral, a aderência ocorre mais facilmente em superfícies que são ásperas e que sejam revestidas por substâncias que condicionem a formação de biofilme (DONLAN, 2002). Os CVCs, por exemplo, por estarem em contato direto com a corrente sanguínea, ficam com a superfície revestida de plaquetas, plasma e proteínas teciduais, que agem como condicionadores da formação de biofilme (DONLAN e COSTERTON, 2002).

Da mesma forma que o sangue, outros materiais produzidos pelo hospedeiro como lágrimas, urina, saliva, fluido intervascular e secreções respiratórias influenciam na aderência das bactérias aos biomateriais. As proteínas da superfície bacteriana contribuem significativamente para a adesão aos polímeros e diversas delas têm sido identificadas como importantes coadjuvantes na formação de biofilme em estafilococos. A aderência do *S. epidermidis* ao poliestireno é mediada pela AtlE, sua principal autolisina. Essa proteína tem duplo papel, pois também promove a ligação com a vitronectina, um componente da matriz extracelular do hospedeiro. Outras proteínas de superfície, incluindo a proteína associada ao biofilme (Bap) e a proteína associada à acumulação (AAP) são igualmente importantes na formação de biofilme (VANDECASTEELE *et al.*, 2003; STOODLEY *et al.*, 2004; VADYVALOO e OTTO 2005; POTTER *et al.*, 2009). Sendo assim, o hospedeiro pode contribuir

significativamente com a adesão das bactérias nas infecções relacionadas a dispositivos médicos, particularmente em estafilococos. Múltiplos receptores da superfície celular bacteriana (adesinas) ligam-se a moléculas de células do hospedeiro. Algumas dessas proteínas pertencem à mesma família dos componentes da superfície microbiana que, desta forma, reconhecem as moléculas adesivas da matriz e assim proporcionam a adesão a vários tipos de células do hospedeiro, bem como revestem a superfície polimérica com suas proteínas plasmáticas. Muitas bactérias possuem adesinas para se ligarem a fibronectina, que é uma proteína do hospedeiro freqüentemente associada à aderência bacteriana nas superfícies, seguida pelo fibrinogênio, fibrina, colágeno, laminina e vitronectina (STOODLEY *et al.*, 2004; MACK *et al.*, 2006).

Fenotipicamente, a quantidade de biofilme produzida por cepas individuais de *Staphylococcus* é altamente variável e influenciada pelas mudanças das condições ambientais, que incluem: crescimento médio, suplementação de carboidratos, oxigênio e dióxido de carbono contidos na atmosfera, concentração de ferro, concentrações sub-inibitórias de alguns antimicrobianos, alta osmolaridade ou exposição a etanol, reforçando que a expressão de PIA e formação de biofilme é fortemente regulada (MACK *et al.*, 2006; ROHDE *et al.*, 2010).

Evidências epidemiológicas mostram que existe correlação entre patogenicidade e presença dos genes *ica* nas cepas virulentas do *S.epidermidis* (GALDBART *et al.*, 2000; ZIEBUHR *et al.*, 2006; MACK *et al.*, 2006; OTTO, 2009). Por outro lado, VOGEL e colaboradores (2000) não encontraram uma clara associação entre produção de biofilme e virulência.

*Staphylococcus epidermidis* causa menor produção de proteínas inflamatórias que *S. aureus*, e conseqüentemente, uma menor resposta inflamatória, incluindo a inibição de linfócitos T e monócitos periféricos por indução da produção de prostaglandina E2. A substância extracelular também está envolvida de modo prejudicial à opsonização e a fagocitose, inibindo a quimiotaxia dos leucócitos polimorfonucleares (VUONG e OTTO, 2002; VUONG *et al.*, 2004).

Alguns métodos têm possibilitado avaliar a aderência dos microrganismos, como: técnicas de microscopia (laser confocal, epifluorescência, transmissão eletrônica e microscopia eletrônica) ou de quantificação de bactérias sésseis após a aderência a superfície por sonicação, vórtex e contas marcadas (CHAVANT *et al.*, 2007). Uma das técnicas mais convenientes para avaliar a formação de biofilme em laboratório de microbiologia é um método semiquantitativo e colorimétrico com cristal violeta, proposta por CHRISTENSEN e colaboradores (1982) e que nos últimos anos tem sofrido algumas modificações que a tornaram mais simples e reproduzível. A técnica consiste na mensuração da densidade óptica de um biofilme bacteriano corado, através de determinação espectrofotométrica (CHRISTENSEN *et al.*, 1982; CHRISTENSEN *et al.*, 1985, ZIEBUHR *et al.*, 1997; STEPANOVIC *et al.*, 2007). É uma técnica com múltiplos passos de lavagem, fixação e coloração, que apresenta pequena variação entre os ensaios que são sempre realizados em quadruplicata. Por outro lado, temos também outro importante método fenotípico descrito por FREEMAN e colegas (1989) através da utilização de Agar Congo Red (ACR) e modificado por ARCIOLA e colaboradores (2002). Esta técnica é baseada na análise direta das colônias crescidas em ACR. É realizada uma avaliação cromática subjetiva que permite a identificação de amostras produtoras de PIA, com colônias pretas e amostras não produtoras de PIA que apresentam colônias de cor vermelha. Este ensaio é qualitativo, visto que se baseia em parâmetros visuais. Nesta técnica, uma suspensão bacteriana é semeada com replicador de Steers em placas de “Brain Heart Infusion agar” com corante “congo red” e sacarose. Após incubação por 24h e 48h a leitura segue uma escala de cores segundo ARCIOLA e colaboradores. (2002). Tanto o teste de microplacas como ACR podem ser comparados com a pesquisa dos genes *icaA* e *icaD* nos isolados, numa tentativa de buscar marcadores genéticos para este fator de virulência. Em um estudo recente, IORIO e colaboradores (2011) relataram que a combinação do método semiquantitativo/colorimétrico com cristal violeta com o método ACR demonstraram uma excelente acurácia com relação à presença do gene *ica* em *S. aureus* e *S. epidermidis*, contribuindo assim para a determinação da relevância clínica destes em culturas de sangue (IORIO *et al.*, 2011).

Por outro lado, alguns estudos apresentam uma vasta lista de genes que parecem estar associados com a formação do biofilme além do operon *ica*, tais como *sarA*, *atlE*, *aap*, *bap*, *empb*, *aae* entre outros (CUCARELLA *et al.*, 2001; VANDECASTEELE *et al.*, 2003; VADYVALOO *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2005; ARCIOLA *et al.*, 2006; DE ARAUJO *et al.*, 2006; NININ *et al.*, 2006; ROHDE *et al.*, 2007, , YARWOOD *et al.*, 2007).

Além da produção de biofilme, outros fatores de virulência estão envolvidos com a capacidade infecciosa dos SCN, principalmente na evasão do sistema imune do hospedeiro e produção de algumas exotoxinas. Estas bacteriocinas e/ou antimicrobianos peptídeos produzidas por *S. epidermidis* (lantibióticos), estão associadas à colonização efetiva da pele, uma vez que interferem no processo de exclusão competitiva dos microrganismos que são sensíveis a suas atividades bactericidas (EIFF *et al.*, 2002). Também, a capacidade de proliferação do microrganismo e conseqüente infecção, estão associadas à habilidade destes microrganismos em adquirir elementos essenciais das células hospedeiras para seu crescimento e sobrevivência, através da captura do íon ferro de transferrinas e lactoferrinas do hospedeiro (EIFF *et al.*, 2002).

#### **II.3.4. Resistência aos antimicrobianos**

As infecções estafilocócicas são, principalmente, de natureza hospitalar e os isolados apresentam índices elevados de resistência (SKOV *et al.*, 2005; CASEY *et al.*, 2007), embora infecções ocasionadas por *S. aureus* resistentes a meticilina adquiridos na comunidade (CA-MRSA) seja uma realidade em nosso meio. Estes normalmente causam infecções na pele e tecidos moles, furunculoses e abscessos, mas também podem causar pneumonias necrotizantes (RIBEIRO *et al.*, 2005; HUIJSDENS *et al.*, 2006; MCCLURE *et al.*, 2006). Muitos destes CA-MRSA portam genes responsáveis pela produção de toxinas tais como a Panton-Valentine Leucodin (PVL) e contêm o cassete cromossômico staphylococcal *mec* (SCC*mec*) tipo IV ou V (RIBEIRO *et al.*, 2005; HUIJSDENS *et al.*, 2006). Em contraste aos MRSA adquiridos no hospital, os isolados comunitários têm apresentado uma maior suscetibilidade aos antimicrobianos não  $\beta$ -lactâmicos (HEROLD *et al.*, 1998; SALMENLINNA *et al.*, 2002). Esta patogenicidade pode ser atribuída à presença de

diferentes genes produtores de toxinas, bem como o uso de agentes  $\beta$ -lactâmicos para tratamento empírico dos pacientes infectados (RIBEIRO *et al.*, 2005; HUIJSDENS *et al.*, 2006). O aumento das infecções causadas por CA-MRSA levou à utilização de clindamicina como tratamento empírico, entretanto a expressão de resistência induzida pode limitar a efetividade deste antimicrobiano (PATEL *et al.*, 2006).

*Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA) tem emergido como importante patógeno em saúde pública. Numerosos clones têm sido identificados no mundo e embora um destes clones tenha se originado no Brasil, a epidemiologia molecular destes MRSA ainda é pouco utilizada na América Latina. Os clones de MRSA descendem de um ancestral comum, mas através de mutações, recombinações, aquisição e deleção de elementos móveis passaram a apresentar uma grande diversidade genotípica e fenotípica (RODRÍGUEZ-NORIEGA *et al.*, 2010).

Desde longa data, a multiresistência aos antimicrobianos é uma das principais características observadas entre os isolados hospitalares de SCN e têm incluído resistência a eritromicina, clindamicina, tetraciclina, cloranfenicol,  $\beta$ -lactâmicos, trimetoprim/sulfametoxazol, aminoglicosídeos, e eventualmente, quinolonas (SANTOS *et al.*, 1997). Para cada classe de antimicrobianos, são observados mecanismos de resistência específicos, com envolvimento de genes plasmidiais, ou transposons que codificam elementos inativadores do antimicrobiano ou diminuem a afinidade de ligação, modificando o sítio alvo. A capacidade dos SCN, em especial *S. epidermidis*, em albergar vários marcadores de resistência mostra sua importância como reservatório de genes de resistência que podem ser transmitidos para outras espécies e gêneros de microrganismos (ARCHER *et al.*, 1994; SCHOENFELDER *et al.*, 2010).

Com a crescente caracterização de infecções por SCN, o interesse em estudar sua suscetibilidade também tem aumentado consideravelmente (KLOOS e BANNERMAN, 1994; JONES, 1996; BRODIE *et al.*, 2000; SOHN *et al.*, 2001; CENTER *et al.*, 2003; SIVADON *et al.*, 2005; CASEY *et al.*, 2007; CREMNITER *et*

al., 2010). Segundo estes mesmos autores, há uma associação entre o aumento da frequência percentual dos SCN na etiologia de bacteremia nosocomial e a resistência desses microrganismos aos agentes antimicrobianos. Particularmente *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, apresentam com frequência resistência a meticilina maior que 75%. O aumento da resistência a meticilina, e conseqüentemente a toda classe de  $\beta$ -lactâmicos incluindo cefalosporinas e carbapenêmicos, tem sido motivo de estudos em todo o mundo, e também tem levado a um aumento do uso dos glicopeptídeos em terapias empíricas e até mesmo profiláticas.

A emergência de resistência a teicoplanina, antes do surgimento de resistência a vancomicina, indica a possibilidade de que a teicoplanina possa contribuir para a seleção de isolados resistentes a vancomicina em um momento posterior (OLIVEIRA *et al.*, 2001; GOLDSTEIN *et al.*, 2004; NUNES *et al.*, 2006). A redução da suscetibilidade à teicoplanina já havia sido relatada por BANNERMAN e colaboradores (1991) em isolados de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, no qual 7% dos *S. epidermidis* e 21% dos *S. haemolyticus* apresentaram suscetibilidade moderada a teicoplanina, enquanto que 11% dos *S. haemolyticus* foram resistentes (BANNERMAN *et al.*, 1991). Outro estudo posterior observou uma resistência a teicoplanina de aproximadamente 3% nos isolados de *S. epidermidis* e resistência plena entre os isolados de *S. hominis* (DAL'ALAMO *et al.*, 1999). Aparentemente essa resistência não é transmissível entre estas espécies, não obstante, pressões seletivas possam ter influenciado no desenvolvimento de resistência entre os isolados de um paciente infectado em ambiente hospitalar (CUNHA e LOPES, 2002).

Outros autores também reportam que entre as espécies de SCN, a taxa de resistência aos antimicrobianos varia de forma significativa. Foram encontradas taxas elevadas de resistência em *S. haemolyticus*: 76 – 96% oxacilina resistentes, 80 – 90% eritromicina resistentes e 26 – 29% dos isolados apresentaram não suscetibilidade à teicoplanina (DEL'ALAMO *et al.*, 1999; CHAUDHURY e KUMAR, 2007; GATERMANN *et al.*, 2007). Os níveis de resistência à oxacilina também são elevados em *S. hominis* (próximo a 80%) e em *S. epidermidis* (38 – 81%) (GILL *et al.*, 1983; DEL'ALAMO *et al.*, 1999; GATERMANN *et al.*, 2007).



*Staphylococcus lugdunensis* tem apresentado suscetibilidade a maioria dos antimicrobianos testados “in vitro”, incluindo penicilinas, cefalosporinas e macrolídeos (POUTANEN e BARON, 2001; GATERMANN *et al.*, 2007).

O mecanismo de resistência à meticilina no *S. epidermidis* é homólogo ao apresentado pelo *S. aureus*, ou seja, envolve o gene *mecA*, que confere resistência a todos os  $\beta$ -lactâmicos, por codificar a produção de uma proteína de ligação alterada, com baixa afinidade por estes fármacos (VANNUFFEL *et al.*, 1998; FOSTER, 2004; BANNERMAN e PEACOCK, 2007). Esta proteína é codificada pelo gene *mecA*, que é carregado por um elemento genético móvel denominado *SCCmec* (HIRAMATSU *et al.*, 2004). Este locus também contém um cassete cromossômico recombinase (*ccr*), e uma zona especial conhecida como região “J”, que pode conter vários genes de resistência a outros antibióticos (PETRELLI *et al.*, 2008). A detecção laboratorial desta resistência é realizada através do teste de disco difusão com disco de cefoxitina, segundo os critérios do “Clinical Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2009) e sua confirmação, quando necessária pela pesquisa do gen *mecA* por PCR.

Considerando o crescente aumento de infecções por *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina, a vancomicina é uma das principais alternativas no tratamento destas bacteremias, e apresenta como mecanismo de ação a inibição da síntese da peptidoglicana da parede celular (OLIVEIRA *et al.*, 2001; JONES, 2006; BASTOS, 2007). Recentemente têm sido reportados alguns casos de reduzida suscetibilidade aos glicopeptídeos em isolados de *S. warneri*, sendo que o primeiro relato de heteroresistência aos glicopeptídeos em um isolado de *S. warneri* foi registrado por NUNES e colaboradores (2006). A resistência dos SCN aos glicopeptídeos, pode entretanto ser um importante problema quando diante de próteses e outros biomateriais, por isto é imprescindível conhecer os níveis de resistências à vancomicina entre estes isolados (CREMNITER *et al.*, 2010). Este agente antimicrobiano vem sendo utilizado por aproximadamente 40 anos, entretanto, as concentrações de vancomicina necessárias para inibir o crescimento dos estafilococos estão aumentando progressivamente; isto tem sido visualizado pela crescente elevação dos valores de concentrações inibitórias mínimas (CIMs) necessárias para combater o microrganismo (TACCONELLI *et al.*, 2001; CENTER *et*

*al.*, 2003; LODISE *et al.*, 2008a). Em vista disso, em 2006, o CLSI reduziu o ponto de corte de suscetibilidade do *S. aureus* frente à vancomicina de 4 µg/ml para 2 µg/ml, pois este antimicrobiano estava apresentando eficácia reduzida frente a isolados com CIM = 4 µg/ml. Contudo, ainda neste documento, o CLSI manteve o ponto de corte de suscetibilidade ≤ 4 µg/ml para SCN (CLSI, 2006). Em um segundo momento, alguns estudos relataram o aparecimento de isolados de MRSA com valores de CIM ≤ 2 µg/ml, e resposta clínica diminuída à vancomicina (SAKOULAS *et al.*, 2004; HIDAYAT *et al.*, 2006; MACLAYTON *et al.*, 2006; SORIANO *et al.*, 2008), houve então uma nova alteração nos critérios do CLSI quanto à determinação da CIM de vancomicina. Assim, em 2009, este comitê passou a recomendar a utilização do ensaio de determinação da CIM de vancomicina através da técnica de microdiluição em caldo para todos os isolados de estafilococos (CLSI 2009). Esta alteração foi motivada pelo fato do teste de disco difusão não estar diferenciando adequadamente os isolados de *S. aureus* e SCN vancomicina-suscetíveis da vancomicina-intermediários (CLSI, 2009). Além destas mudanças recentes nas padronizações do CLSI, dados da literatura sugerem que pacientes com bacteremia por MRSA, que apresentem valores de CIM de vancomicina entre 1,5 µg/ml e 2 µg/ml, respondem pobremente ao tratamento (LODISE *et al.*, 2008a; LODISE *et al.*, 2008b; WELSH *et al.*, 2010). Entretanto, em relação aos SCN resistentes a meticilina existem poucos estudos, sobretudo com avaliação da distribuição dos valores de CIM e sua influência no desfecho clínico de pacientes com bacteremia, mas em um estudo recente foi observado valores de CIM superestimados quando foi utilizado fitas de Etest (Paiva *et al.*, 2010). Em um estudo multicêntrico de monitoramento da resistência antimicrobiana realizado pelo SENTRY, no período de 2005 a 2008, foram verificadas altas taxas de resistência dos SCN para a maioria dos antimicrobianos nos hospitais brasileiros. Aproximadamente 80% desses isolados foram resistentes à oxacilina, 70% à eritromicina, 50% à sulfametoxazol-trimetoprima e 45% resistentes à levofloxacina (GALES *et al.*, 2009). Anos antes, outro estudo epidemiológico também divulgou dados semelhantes sobre o aumento da incidência de resistência dos SCoN aos antimicrobianos (SADER *et al.*, 2004).

Em se tratando de isolados formadores de biofilme, o efeito bactericida “*in vitro*” de antimicrobianos tem sido realizado comparativamente em isolados clínicos

de *Staphylococcus* spp. produtores e não produtores de biofilme (AMORENA *et al.*, 1999; MONZÓN *et al.*, 2001, FRANK *et al.*, 2007). De acordo com estes autores, eritromicina, rifampicina e tetraciclina apresentam maior efeito que a vancomicina, clindamicina, cefalotina, teicoplanina e ofloxacino, em isolados clínicos com *S. epidermidis* produtores de biofilme. Estes estudos salientam a relevância do teste de suscetibilidade na presença de biofilme e o potencial dano do uso indiscriminado da monoterapia com vancomicina, inadequada frente às infecções envolvendo microrganismos produtores de biofilme. Outros estudos também têm mostrado um aumento de resistência aos antimicrobianos quando os isolados estão em biofilme (FRANK e PATEL 2007; CARGILL; UPTON, 2009; CAFISO *et al.*, 2010).

Segundo SHOENFELDER *et al.* (2010), a grande adaptabilidade e flexibilidade do genoma dos *S. epidermidis* indicam que o gene *ica* e o *SCCmec* estão localizados em uma região de alta recombinação na oriC do cromossoma, sugerindo assim, uma junção genética para estas características - virulência e resistência à meticilina. Este estudo relata que em função de não se conhecer como desarmar o mecanismo de formação de biofilme e também como evitar a deleção espontânea do *SSCmec* durante o processo infeccioso, o paciente foi a óbito. Estes dados levam a especular que a geração de variantes fenotípicas e genotípicas pode determinar de modo crítico o progresso e desfecho da doença (SHOENFELDER *et al.*, 2010). Em um estudo com *S. aureus* PETRELLI *et al.*, (2008) também observou esta mesma combinação de genes de resistência e virulência (PETRELLI *et al.*, 2008).

Atualmente, os laboratórios de microbiologia clínica não realizam teste de suscetibilidade aos antimicrobianos em bactérias em crescimento de biofilme, o que se mostra totalmente inadequado, uma vez que estudos têm mostrado que muitas bactérias, tem preferência por adesão às superfícies, como característica fundamental de sobrevivência (RICE, 2006). Os microrganismos em biofilme, em comparação com seus homólogos de vida livre, mostram uma menor suscetibilidade aos antimicrobianos testados, sem que se possa identificar alguma mutação adicional nos genes envolvidos. Assim, é ambíguo o fato da suscetibilidade de microrganismos ainda ser testada em crescimento planctônico (DUNNE, 2002;

LINARES *et al.*, 2006; TENOVER, 2006). Estudos recentes indicam que isolados de *S. aureus* fortes produtores de biofilme podem ser mais resistentes ao efeito da vancomicina, pois a bactéria que está em fase estacionária, além de exibir um espessamento da parede celular, reduz a atividade da vancomicina “in vitro”, supostamente, devido à falta de células em crescimento ativo (RICE, 2006; TENOVER, 2006; LAPLANTE e MERMEL, 2007; MUSTA *et al.*, 2009; ROSE e POPPENS, 2009).

A concentração de antimicrobiano necessária para eliminar bactérias produtoras de biofilme é de 100-1000 vezes maior que a necessária para as mesmas espécies em suspensão (DAVEY e O'TOOLE, 2000; FRANK e PATEL, 2007; CARGILL e UPTON, 2009; CAFISO *et al.*, 2010). Devido ao aumento de isolados resistentes à meticilina, estratégias profiláticas recentes incluíram pré-cobertura dos implantes com glicopeptídeos, mas o surgimento recente de amostras de *S. epidermidis* com suscetibilidade reduzida à vancomicina e teicoplanina criou a necessidade de estratégias alternativas, dificultando ainda mais o tratamento das infecções onde há presença de biomateriais (VILLARI *et al.*, 2000; FRANK e PATEL, 2007; CARGILL e UPTON, 2009). Isto devido ao fato de que antibióticos administrados aos pacientes, em muitos casos, não atingem as células do interior do biofilme, que estão protegidas pela matriz EPS, preservando assim a fonte de re-infecção (STOODLEY *et al.*, 2004). Esta matriz também protege as células do interior do biofilme contra a ação dos anticorpos produzidos pelo sistema imune e contra os radicais livres e outros compostos reativos produzidos na explosão de fagócitos recrutados para o combate do biofilme (COSTERTON *et al.*, 1999).

As substâncias poliméricas extracelulares que constituem a matriz do biofilme apresentam-se como uma barreira na difusão das moléculas antimicrobianas e influenciam tanto o ritmo de transporte da molécula para o interior do biofilme quanto na reação do antimicrobiano com o material da matriz (DONLAN e COSTERTON, 2002). Os agentes antimicrobianos podem ser capturados na matriz do biofilme e quelados por enzimas inativadoras, porém, a difusão limitada não parece por si só desempenhar um papel único na resistência (POZO e PATEL, 2007).

A ação antimicrobiana no interior do biofilme também pode ser comprometida pelo aumento da densidade bacteriana, que resulta da acumulação de resíduos e de uma alteração do microambiente como: baixo pH, baixa  $pO_2$ , alta  $pCO_2$ , baixa concentração de cátions divalentes e de pirimidina, baixo nível de hidratação (POZO e PATEL, 2007). Além do que, as células associadas em biofilme crescem mais lentamente do que as células planctônicas, isto é devido à diminuição de nutrientes, oxigênio e acúmulo de produtos residuais que podem motivar algumas bactérias a entrarem em um estado estacionário de crescimento (DONLAN e COSTERTON, 2002; CAFISO *et al.*, 2010). Assim estas bactérias ficam menos suscetíveis aos antimicrobianos, pois a ação do antimicrobiano depende do crescimento exponencial bacteriano para agir (LEWIS, 2005; PATEL, 2005). Estas células têm sido referidas como “persisters” e podem estar presentes em números relativamente elevados no interior do biofilme. O tratamento antimicrobiano pode conduzir a erradicação da maioria da população suscetível, mas esta fração de células persistentes pode sobreviver ao ataque e reconstituir o biofilme após a descontinuação terapêutica (LEWIS, 2005; POZO e PATEL, 2007; LEWIS, 2010). Para dificultar ainda mais esta situação, os biofilmes podem facilitar a disseminação de resistência por promover transferência horizontal de genes (POZO e PATEL, 2007), uma vez que os plasmídeos podem codificar a resistência para múltiplos agentes antimicrobianos e a associação em biofilme fornece um mecanismo de seleção e assim, proporciona a disseminação de bactérias resistentes (DONLAN, 2002). Outro fato importante observado é que concentrações sub-inibitórias de antimicrobiano podem ocasionar o aumento da formação de biofilme. Este fenômeno pode ser explicado pela regulação gênica da resposta das bactérias em biofilme, que alteram seus fenótipos, tornando-se mais resistentes em consequência à exposição a ambiente de estresse (POZO e PATEL, 2007; CARGILL e UPTON, 2009).

Estudos prévios de RACHID e colaboradores (2000) e FRANK e colegas (2007) já mostraram que concentrações sub-inibitórias de vancomicina tem pouco ou nenhum efeito em biofilme. Também, CARGILL e UPTON (2009) demonstraram que este fenômeno pode acontecer em alguns isolados em *S. epidermidis*. Concentrações de vancomicina abaixo da concentração inibitória mínima têm sido mostradas como tendo um efeito variável na aderência de SCN em borrachas de

silicone e superfícies de poliestireno, reduzindo a produção de biofilme por células fixadas em superfícies de Teflon (CARGILL e UPTON, 2009). Outro ponto importante é que, em relação à eficácia bactericida, nenhum antimicrobiano, inclusive a vancomicina, tem sido capaz de reduzir o crescimento bacteriano ou extingui-lo totalmente nos isolados fortemente formadores de biofilme (FRANK *et al.*, 2007; PRESTERL *et al.*, 2009).

As quinolonas e  $\beta$ -lactâmicos apresentam uma boa capacidade de transpor o biofilme, mas os aminoglicosídeos não difundem bem através do mesmo, provavelmente por serem antimicrobianos polares (com carga positiva) e a matriz do biofilme constituída por polissacarídeos (com carga negativa). RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ e colaboradores (2007) mostraram a elevada penetração da linezolida, por apresentar boa atividade frente a bactérias com baixa atividade metabólica e demonstram que a difusão diminuída da vancomicina parece estar relacionada ao seu elevado peso molecular. Assim como a linezolida, a rifampicina tem um bom desempenho no período de baixa atividade metabólica, mas apresentou resistência em isolados de MRSA quando os mesmos foram expostos por um período de tempo prolongado. Neste sentido, novos compostos como a daptomicina e tigeciclina têm demonstrado uma boa atividade “in vitro” em biofilmes de MRSA intraluminais (RAAD *et al.* 2007; SMITH *et al.*, 2009; CREMNITER *et al.*, 2010).

Em um estudo recente, CAFISO *et al.* (2010) observaram que a tigeciclina, daptomicina e rifampicina são bastante promissoras para erradicar o biofilme em infecções causadas por *S. aureus*. A concentração requerida para erradicação deste biofilme foi 3 a 5x maior que a concentração requerida para inibição da adesão celular (CAFISO *et al.*, 2010).

Ainda que estudos tenham demonstrado que microrganismos vivendo em comunidade expressam outros genes, usualmente são realizados apenas teste de suscetibilidade em bactérias planctônicas (KOZITSKAYA *et al.*, 2005; RICE *et al.*, 2007); mesmo que todas ou quase todas as bactérias possam produzir biofilme em condições de estresse e, portanto responder de maneira diferente aos antimicrobianos (COSTERTON, 2005).

A diversidade dessas infecções está aumentando ao longo do tempo, sugerindo que, em ambientes de cuidados de saúde, os biofilmes estejam presentes em mais de 65% de todas as infecções bacterianas (POZO e PATEL, 2007). Aparentemente, fatores importantes para o estabelecimento de infecções relacionadas a cateteres, como o *icaADBC* e a resistência à meticilina, resultam em uma elevada prevalência de cepas virulentas de *S. epidermidis* em ambientes hospitalares (MACK *et al.*, 2006; CREMNITER *et al.*, 2010; SHOENFELDER *et al.*, 2010).

Freqüentemente, o único tratamento seguro para infecções em implantes de dispositivos médicos é a sua remoção. No entanto, este procedimento pode estar associado com o aumento de morbidade e mortalidade, prolongando a hospitalização e elevando os custos para o sistema de saúde. Estima-se que o gasto para tratar essas infecções pode ser maior do que a sua não retirada. Em muitos casos, nos quais o dispositivo infectado não pode ser removido, os pacientes enfrentarão uma supressiva terapia antimicrobiana para a prevenção de infecções sistêmicas recorrentes (SCHINABECK e GHANNOUM, 2006; ROHDE *et al.*, 2010).

Torna-se, portanto, essencial a ampliação do conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na resistência antimicrobiana em biofilme para o desenvolvimento de novas e efetivas estratégias de tratamento para essas infecções (POZO e PATEL, 2007; ROHDE *et al.*, 2010).

### **II.3.5. Implicações do uso de Cateter Venoso Central**

Cateter venoso central é indispensável nos dias atuais para realização das práticas médicas, particularmente em unidades de tratamento intensivo (SCHOENFELDER *et al.*, 2010). Embora a relação risco/benefício da implantação de cateter seja, na maioria das vezes, satisfatória, seu uso coloca pacientes em risco de infecção local ou complicações sistêmicas, tromboflebite séptica, endocardites, abscessos, osteomielite, endoftalmite. A maioria das infecções graves está relacionada à CVC, sendo fatores críticos o tempo de permanência, a colonização dos pacientes, e o número de vezes em que o cateter é manipulado para

administração de fluidos, medicamentos e produtos hemodinâmicos. Além disto, muitas vezes sua inserção ocorre em situações de emergência, durante a qual não são observadas atentamente as normas de assepsia (MERMEL, 2000).

O diagnóstico da infecção da corrente sanguínea relacionada ao CVC é muitas vezes difícil e em muitos casos este diagnóstico é superestimado, resultando na remoção desnecessária do cateter e no uso abusivo de antimicrobianos. Para caracterizar infecção associada ao cateter, é necessário evidências de um quadro sistêmico no qual o acesso é implicado como possível fonte (CDCP, 2002).

Somente nos Estados Unidos, estima-se que cerca de 180 milhões de cateteres vasculares periféricos e 7 milhões de cateteres venosos centrais sejam utilizados todos os anos (HANNA e RAAD 2005; ROGERS *et al.*, 2009). Já na Alemanha estes números estão próximos a 2,5 milhões de implantes médicos por ano (MACK *et al.*, 2006). Embora infecções por *S. epidermidis* raramente evoluam para doenças graves, infecções relacionadas a cateter permanecem sendo uma constante causa de infecção hospitalar, associadas a altos índices de morbidade e mortalidade, ao aumento na permanência hospitalar e nos custos (FITZPATRICK *et al.*, 2005; ROHDE *et al.*, 2010). Bacteremia ocorre em pelo menos 5 de cada 1000 inserções de cateteres realizadas em pacientes nas UTIs, sendo que pelo menos 22% destas infecções são causadas por *S. epidermidis* (O'GRADY *et al.*, 2002; OTTO, 2009).

A origem das infecções associadas a implantes médicos é complexa e pode ser influenciada por uma série de variáveis como o tipo de dispositivo médico, a região anatômica de sua inserção e a surtos hospitalares concomitante com cirurgias (CAMPOCCIA *et al.*, 2009). Os esforços feitos para manter a esterilidade e assepsia, visando minimizar as possibilidades de contaminação durante a implantação do dispositivo e para evitar infecções nos pacientes através de protocolos adequados de profilaxia, provaram ser eficazes, mas incapazes de controlar completamente a ocorrência de infecções (MONTANARO *et al.*, 2007). Válvulas cardíacas, próteses de articulações, cateteres intravenosos, cateteres peritoniais de diálise, marca-passos, entre outros dispositivos, salvam milhares de



vidas, porém possuem um risco intrínseco de infecções associadas às suas superfícies. Biofilmes relacionados com dispositivos médicos foram observados pela primeira vez no início dos anos 80 por microscopia eletrônica, esta técnica revelou bactérias depositadas na superfície de cateteres intravenosos e marca-passos (STOODLEY *et al.*, 2004). Os mecanismos patogênicos em infecções associadas a implantes são investigados e fatores importantes, como a expressão de adesinas, a produção de toxinas e a resistência aos antibióticos, estão sendo gradualmente reconhecidas. Estes fatores são determinantes na virulência de um microrganismo e na sua capacidade de colonizar a superfície de biomateriais (COSTERTON *et al.*, 2009).

Assim sendo, biofilme é o ambiente ideal para ocorrer troca de material genético, devido ao livre acesso a um “pool” de genes, e facilidade de transferência horizontal pela proximidade celular quando comparada com as populações planctônicas. A vida em comunidade altera o fenótipo da bactéria com relação à taxa de crescimento bacteriano e transcrição de genes (LEWIS, 2005; DONLAN e COSTERTON, 2002; DONLAN, 2002; FLEMMING *et al.*, 2007; MACK *et al.*, 2007).

Existem evidências da associação de distintos microrganismos em biofilme em implantes artificiais, o que é corroborado pelo fato de que microrganismos podem atuar conjuntamente para benefício mútuo e organização de estratégias de virulência (DAVEY e O'TOOLE, 2000; GU *et al.*, 2005; SCHOENFELDER *et al.*, 2010).



---

### III. OBJETIVOS



### III.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a formação de biofilme presente em cateter venoso central de pacientes hospitalizados no HCPA, analisando a resistência de *Staphylococcus* spp. aos antimicrobianos através de testes “in vitro”.

#### III.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avaliar a formação de biofilme através de métodos fenotípicos (crescimento em microplaca e Agar Congo Red) e relacionar com métodos moleculares (genes *icaA*, *icaD*, *atlE* e *aap*) nos isolados de *Staphylococcus epidermidis*;

b) Estabelecer a metodologia de teste de suscetibilidade aos antimicrobianos em bactérias em biofilme, visando à erradicação do mesmo;

c) Comparar os perfis de suscetibilidade de isolados de *Staphylococcus* spp. em crescimento planctônico e em crescimento de biofilme;

d) Avaliar a relação dos genes de resistência (gene *mecA*) e de virulência (gene *icaA* e *icaD*) em isolados de *S. aureus* como possíveis marcadores genéticos de infecção relacionada a cateter;

e) Avaliar a importância de “primers” específicos para detecção de gene *icaA* e *icaD* em *Staphylococcus* spp. coagulase negativos não *epidermidis*.



---

#### IV. ARTIGOS CIENTÍFICOS





**IV.1 Manuscrito 1** - Ana Lúcia Souza Antunes, Cyntia Lazzarotto, Jaqueline Becker Pinto, Jéssica Weiss Bonfanti, Leandro Reus Rodrigues Perez, Camille Cattani Ferreira Pinto, Ana Lúcia Peixoto de Freitas, Alexandre José Macedo, Afonso Luis Barth. - **Genetic markers of biofilm production among *Staphylococcus epidermidis* from central venous catheter: comparison with phenotypic methods**

**Manuscrito a ser submetido ao periódico *FEMS Microbiology Letters***



**Genetic markers of biofilm production among *Staphylococcus epidermidis* from catheter venous central: comparison with phenotypic methods**

Ana Lúcia Souza Antunes<sup>1/\*</sup>, Cyntia Lazzarotto<sup>2</sup>, Jaqueline Becker Pinto<sup>1</sup>, Jéssica Weiss Bonfanti<sup>1</sup>, Leandro Reus Rodrigues Perez<sup>1</sup>, Camille Cattani Ferreira Pinto<sup>1</sup>, Ana Lúcia Peixoto de Freitas<sup>1</sup>, Alexandre José Macedo<sup>1, 3</sup> & Afonso Luis Barth<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup>Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup>Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

\* corresponding author: + 55 51 3308 5412; E-mail: [analucia2112@gmail.com](mailto:analucia2112@gmail.com) (ALSA)

**ABSTRACT**

*Staphylococcus epidermidis* is the most frequent organism obtained from central venous catheter (CVC) infections due to its ability to form biofilm on medical devices. The mechanism of polysaccharide adhesion by *S. epidermidis* is encoded by the *ica* operon which is a genetic determinant of key importance in generating biofilm although other genes also play a role in adherence and biofilm formation. The aim of the present study was to compare two different phenotypic methods (the microtiter plate and the Congo Red Agar - CRA) with the presence of genetic markers (*icaA*, *icaD*, *atlE* and *aap* genes) among the biofilm producers and non-producers. The microtiter plate and the CRA methods were positive for 107 (64.5%) and 90 (54%) of isolates, respectively. The presence of *icaA* and *icaD* genes was detected in 97% (104/107) of the biofilm-positive isolates by microtiter assay. The *aap* and *atlE* genes were present in 77% and in 92% of the 107 biofilm-producing isolates, respectively. We also found 3 *ica*-independent biofilm-producing *S. epidermidis*, i.e., isolates which are negative for the presence of *icaA* and *icaD*. We found *icaA* and *icaD* genes in the vast majority of biofilm-producing *S. epidermidis* which confirms that these genes are of key importance for biofilm formation. However, almost 30% of non biofilm-forming isolates also presented these genes. The detection of other genes (*aap* and *atlE*) presented lower specificity. Our findings confirm that *S. epidermidis* biofilm formation is a multi-factorial process which is influenced by genetic traits and by the environment and/or site of infection.

Keywords: biofilm detection, Congo red agar, microtiter plate, *ica* operon, *aap*, *atlE*.



**IV.2 Manuscrito 2** - Ana Lúcia Souza Antunes, Danielle Silva Trentin, Jéssica Weis Bonfanti, Camille Cattani Ferreira Pinto, Leandro Reus Rodrigues Perez, Alexandre José Macedo, Afonso Luis Barth - **Application of a Feasible Method for Determination of Biofilm Antimicrobial Susceptibility in Staphylococci**

**Manuscrito publicado no periódico *APMIS. Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 118 : 873-877, 2010.**



## Application of a feasible method for determination of biofilm antimicrobial susceptibility in staphylococci

Ana LúciaSouza Antunes, <sup>1</sup>Danielle Silva Trentin,<sup>1,2</sup> Jéssica Weis Bonfonti,<sup>1</sup> Camille Cattani Ferreira Pinto,<sup>1</sup> Leandro Reus Rodrigues Perez,<sup>1</sup> Alexandre José Macedo <sup>1,2</sup>and Afonso Luis Barth <sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre;

<sup>2</sup>Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre;

<sup>3</sup>Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

### Abstract

The aim of this study was to use a practical method to determine the minimal biofilm eradication concentration (MBEC) of vancomycin and to compare the MBEC with minimal inhibitory concentration (MIC) for biofilm-producing and non-biofilm-producing isolates of staphylococci. Forty *Staphylococcus* spp. isolates from central venous catheter, from distinct patients, were selected for this study. The vast majority (28 / 30) of isolates which were biofilm-producing, presented high MBEC values ( $\geq 8$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and could be considered as non-susceptible to vancomycin. All non-biofilm-producing isolates presented low MBEC ( $\leq 2$   $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) and were susceptible to vancomycin, according to CLSI breakpoints. While the MBEC and MIC values for biofilm-producing isolates differ significantly, the MBEC and MIC values for non-biofilm producers were the same. The method we have used proved to be a feasible and rapid technique to measure MBEC of *Staphylococcus* spp. biofilms. The method presented herein might be an alternative tool to evaluate the antibiotic susceptibility in the biofilm mode of growth; the MBEC may be a more appropriate approach to correlate the susceptibility in vitro with clinical outcome resulting from the treatment of *Staphylococcus* spp. infection.

Key words: Staphylococcal biofilms; biofilm eradication; vancomycin; biofilm antimicrobial susceptibility method, staphylococcal infections.

**APMIS, Vol. 118 (11): 873–877, November, 2010.**





**IV.3 Manuscrito 3** – Ana Lúcia Souza Antunes, Jéssica Weis Bonfanti, Leandro Reus Rodrigues Perez, Camille Cattani Ferreira Pinto, Ana Lúcia Peixoto de Freitas, Alexandre José Macedo, Afonso Luis Barth. - **High vancomycin resistance among biofilms produced by *Staphylococcus* species isolates from central venous catheter.**

**Manuscrito publicado no periódico *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106: 51-55, 2011.**



## **High vancomycin resistance among biofilms produced by *Staphylococcus* species isolated from central venous catheters**

Ana Lúcia Souza Antunes <sup>1/+</sup>, Jéssica Weis Bonfanti<sup>1</sup>, Leandro Reus Rodrigues Perez<sup>1</sup>, Camille Cattani Ferreira Pinto<sup>1</sup>, Ana Lúcia Peixoto de Freitas<sup>1</sup>, Alexandre José Macedo<sup>1,2</sup>, Afonso Luis Barth<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

<sup>2</sup>Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

<sup>3</sup>Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

### **Abstract**

Biofilm production is an important mechanism that allows microbes to escape host defences and antimicrobial therapy. Vancomycin has been used largely for the treatment of methicillin-resistant staphylococcal infections. Here, we determined the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal biofilm eradication concentration (MBEC) for 82 *Staphylococcus* species isolated from central venous catheters (CVC). Our results showed that the 41 strong and moderate-biofilm-producing isolates presented a higher MBEC/MIC ratio for vancomycin than the 24 weak-biofilm-producing isolates, illustrating the importance of biofilm production ability and the difficulty in treating biofilm-related infections. The MBEC was significantly higher in moderate-biofilm-producing isolates than in weak-biofilm-producing isolates ( $p < 0.001$ ) and in strong-biofilm-producing isolates than in weak-biofilm-producing isolates ( $p = 0.001$ ). The correlation between the MIC and the MBEC was poor. Based on our results, we recommend that bacterial biofilms be suspected in all cases of CVC infection.

Key words: biofilm - vancomycin – *Staphylococcus* spp.

**Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Vol. 106(1): 51-55, February, 2011.**



**IV.4 Manuscrito 4** – Ana Lúcia Souza Antunes, Jaqueline Becker Pinto, Leandro Reus Rodrigues Perez, Jéssica Weis Bonfanti, Ana Lúcia Peixoto de Freitas, Alexandre José Macedo, Afonso Luis Barth. – **Is there a reliable genetic marker to evaluate the ability to form biofilm in *Staphylococcus aureus* causing catheter-related infections?**

**Manuscrito a ser submetido ao periódico *Journal Medical Microbiology* na forma de short communication.**



## **Is there a reliable genetic marker to evaluate the ability to form biofilm in *Staphylococcus aureus* causing catheter-related infections?**

running title: *Staphylococcus aureus* from catheter infections

Ana Lúcia Souza Antunes<sup>1</sup>\*, Jaqueline Becker Pinto<sup>1</sup>, Leandro Reus Rodrigues Perez<sup>1</sup>, Jéssica Weiss Bonfanti<sup>1</sup>, Ana Lúcia Peixoto de Freitas<sup>1</sup>, Alexandre José Macedo<sup>1, 3</sup> & Afonso Luis Barth<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup>Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup>Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

\* corresponding author: + 55 51 3308 5412; fax: + 55 51 3308 5437

E-mail address: analucia2112@gmail.com (Ana Lúcia Souza Antunes).

### **ABSTRACT**

Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* are capable to form biofilm in catheter-related infections. The aim of this study was to evaluate the presence of *icaA* and *icaD* genes among 37 isolates of *S. aureus* from central venous catheter. We have compared MRSA and MSSA as well as the biofilm positive and negative isolates. The phenotypic tests used to evaluate biofilm formation included the microtiter plate method and the Congo red agar (CRA). PCR with primers specific for *ica* genes was used as molecular tools. We observed that 81.1% of all isolates were capable to form biofilm. When compared microtiter plates or CRA with *ica* genes, we observed a discrepancy of 16.2% (6/37). However between microtiter and CRA test we observed 5.4% (2/37) of discrepancy. Considering the phenotypic methods as gold standards for biofilm formation, the *ica* genes did not prove to be reliable markers of biofilm. These results confirm that the biofilm formation is a complex process which depends on the gene presence as well as its expression.

Keyword: *Staphylococcus aureus*, biofilm, MRSA, MSSA, catheter-related infections, *icaA* gene, *icaD* gene.





**IV.5 Manuscrito 5** – Ana Lúcia Souza Antunes, Jaqueline Becker Pinto, Diogo André Pilger, Jéssica Weis Bonfanti, Leandro Reus Rodrigues Perez, Ana Lúcia Peixoto de Freitas, Alexandre José Macedo, Afonso Luis Barth. – **Prevalence of *ica* genes among biofilm produced by Coagulase-negative *Staphylococcus* spp. non-*epidermidis* species isolated from central venous catheters.**

**Manuscrito a ser submetido ao periódico *Brazilian Journal of Microbiology* na forma de short communication.**



**Prevalence of *ica* genes among biofilm produced by Coagulase-negative *Staphylococcus spp. non-epidermidis* species isolated from central venous catheters**

Ana Lúcia Souza Antunes<sup>1/\*</sup>, Jaqueline Becker Pinto<sup>1</sup>, Diogo André Pilger<sup>1</sup>, Jéssica Weiss Bonfanti<sup>1</sup>, Leandro Reus Rodrigues Perez, Ana Lúcia Peixoto de Freitas<sup>1</sup>, Alexandre José Macedo<sup>1,3</sup> and Afonso Luis Barth<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup>Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup>Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

\* corresponding author: + 55 51 3308 5412; fax: + 55 51 3308 5437

E-mail address: [analucia2112@gmail.com](mailto:analucia2112@gmail.com) (ALS Antunes).

**ABSTRACT**

Nosocomial staphylococcal foreign-body infections related to biofilm formation are a serious threat. The adherence is an important step in the formation of biofilm. The aim of this study was to evaluate the ability of biofilm formation by microtiter plate test and the presence of adherence genes *icaA* and *icaD*, among 19 Coagulase-negative *Staphylococcus spp. non-epidermidis* from catheter venous central. In addition, we evaluated the genetic identity of *icaA* and *icaD* genes among this species of *Staphylococcus spp.* compared to *S. epidermidis*. We found 6/19 isolates able to form biofilm according to the microtiter plate test. However, the *icaA* and *icaD* gene were found in 7/19 and 8/19 isolates, respectively. There was agreement between the results of the microtiter plate and the presence of genes *icaA* and *icaD* in 63.2% (12/19) of the isolates. We consider that the discrepancy between phenotypic and genotypic results may be due to the lack of specific primers for the different staphylococci species. The genetic background for biofilm formation in Coagulase-negative *Staphylococcus spp. non-epidermidis* is clearly different from what is commonly found in *S. epidermidis*.

Keywords: Coagulase-negative *Staphylococcus spp. non-epidermidis*; biofilm; *icaA* gene; *icaD* gene







O longo histórico das infecções hospitalares, sua relação com o desenvolvimento de resistência bacteriana aos antibióticos, infecções recorrentes e períodos de internação prolongados, têm suscitado interesse na busca de mecanismos de patogenicidade que expliquem o sucesso dos microrganismos envolvidos nestas infecções. Os estafilocos são as bactérias mais prevalentes em infecções hospitalares sendo que a forma de crescimento em biofilme, principalmente em infecções associadas ao uso de implantes médicos (como cateteres), talvez seja uma das principais estratégias de ataque, bem como de defesa, em relação ao hospedeiro. Além disso, a possibilidade de interação de *Staphylococcus* spp. com outros microrganismos pode ser um dos fatores que os tornam tão virulentos. Essa interação pode ocorrer de distintas maneiras, muitas vezes cabendo aos outros microrganismos iniciar o processo de adesão na superfície do cateter que posteriormente será reconhecido pelo *Staphylococcus* spp. A transferência horizontal de genes de resistência que ocorre com maior frequência quando microrganismos estão intimamente associados também é um fator relevante neste consórcio (biofilme).

O biofilme confere proteção contra os mecanismos de defesa do hospedeiro e ação dos antimicrobianos, fazendo com que os microrganismos organizados e agregados constituam um reservatório de genes de resistência e virulência. O efeito bactericida de antimicrobianos “in vitro” tem sido comparado em isolados clínicos produtores e não produtores de biofilme, revelando diferença nos padrões de suscetibilidade quando existe a formação de biofilme. Nosso estudo salienta a relevância do teste de suscetibilidade na presença de biofilme e o dano potencial do uso indiscriminado de monoterapia com vancomicina frente às infecções envolvendo microrganismos produtores de biofilme.

Evidências epidemiológicas mostram relação entre patogenicidade e presença dos genes *ica*, que codifica a síntese da adesina polissacarídica intercelular (PIA) em *Staphylococcus* spp. A produção de biofilme é um processo complexo que envolve dois passos importantes: a aderência e a acumulação. Alguns métodos têm possibilitado avaliar a aderência dos microrganismos. O método semi-

quantitativo em microplacas coradas com cristal violeta é uma das técnicas mais utilizada para avaliar a formação de biofilme em laboratório de microbiologia, e considerada por muitos autores o “padrão ouro” para avaliação da capacidade de formação de biofilme. Neste trabalho encontramos uma prevalência de 64,5% de *S. epidermidis* formadores de biofilme pelo método de microplacas e assim, procuramos relacionar com a presença dos genes *icaA* e *icaD*, tendo sido observadas uma grande concordância (97%) entre o método fenotípico (microplaca) e genotípico (pesquisa de genes) para esta espécie. Assim, pode-se inferir que estes genes funcionariam como biomarcadores de infecções relacionadas à presença de dispositivos médicos. Também observamos uma alta prevalência do gene *atlE*, que pode ser explicada pelo fato que todos os isolados foram obtidos de CVC, sendo a proteína Atle um fator chave para a adesão às superfícies plásticas. No entanto, a presença apenas do gene *atlE* não garante a formação de biofilme visto que o mesmo estava ausente em *S. epidermidis* biofilme-positivas. Por outro lado, a presença do *atlE* simultaneamente com os outros dois genes (*icaA* e *icaD*) foi encontrada em todos os isolados fortemente produtores de biofilme. É também preciso considerar que existe uma relação complexa e ainda não muito bem esclarecida do envolvimento de outros genes com a formação de biofilme em *S. epidermidis*. Na questão metodológica é importante mencionar que a detecção de genes pelo método de PCR, que apresentou 84% de sensibilidade, pode não ser uma ferramenta totalmente confiável para detecção de biofilme, ainda mais considerando que a expressão destes genes é regulada por condições ambientais muito particulares. Por outro lado, o teste fenotípico do Agar Congo Red foi capaz de detectar a maioria (84%) dos isolados produtores de biofilme, e apresentou alta especificidade (100%), sendo, portanto uma técnica útil especialmente para confirmação fenotípica da formação de biofilme em estafilococos.

Em contraste com o *S. epidermidis*, a base molecular das espécies de *Staphylococcus* spp. não-*epidermidis* em geral é pouco conhecida - a presença do operon *ica* tem sido relatada, mas até os dias atuais, sua contribuição para a formação de biofilme ainda é incerta. A detecção dos genes *ica* em SCN tem sido realizada com “primers” não específicos para as diferentes espécies. Neste trabalho, assim como em outros, os “primers” utilizados foram baseados na seqüência do



operon de *S. epidermidis* ATCC 35984. Sendo assim, fica claro que o desenvolvimento de um “primer” que reconheça uma região específica, e anele em regiões de similaridade é importante para assegurar adequação dos resultados negativos. Como em nosso estudo foram utilizados “primers” desenhados para a sequência do gene de *S. epidermidis*, e como não há homologia total entre as espécies, falha dos “primers” no reconhecimento das sequências do DNA dos *Staphylococcus* spp. coagulase negativos não-*epidermidis* pode ter ocorrido.

Em se tratando de *S. aureus*, os resultados da presença dos genes *ica* na literatura são contraditórios. Embora atualmente se saiba que a formação de biofilme é um importante fator de virulência entre *S. aureus* isolados de pacientes com cateter venoso central. Em nosso estudo, a formação de biofilme ocorreu em 81,1% dos *S. aureus*, sendo que entre os MRSA as taxas foram superiores (88,9%).

Atualmente, os laboratórios de microbiologia clínica não realizam teste de suscetibilidade aos antimicrobianos em bactérias em estado de biofilme, embora esteja bem estabelecido que muitas bactérias, se não todas, aderem às superfícies (e formam biofilme), como característica fundamental de sobrevivência. Assim, é questionável a utilização dos resultados do teste de suscetibilidade em crescimento planctônico como guia para a terapêutica, sendo importante a avaliação da sensibilidade em condições de biofilme.

Neste estudo, para validar e avaliar a concentração de vancomicina capaz de erradicar o biofilme (CMEB) foram escolhidos isolados de diferentes espécies de *Staphylococcus*. O método por nós validado mostrou excelente desempenho, apresentando coeficientes de correlação linear( $r$ ) entre 0,863 e 0,969 em ensaios inter e intra-dia. Tendo em vista se tratar de ensaios microbiológicos estes resultados foram considerados muito bons, com uma boa reprodutibilidade e uma boa precisão, preenchendo os padrões internacionais de validação. Outro aspecto positivo foi a observação dos mesmos valores de CMEB e CIM em amostras não formadoras de biofilme, conforme esperado.

Conforme o esperado, a resistência à vancomicina foi maior no modo de crescimento de biofilme. Entre os isolados forte e moderadamente produtores de biofilme ocorreram uma maior razão CMEB/CIM (>32). Já entre os fracos produtores de biofilme, a razão CMEB/CIM foi menor sendo que em apenas um caso esta razão alcançou o valor de 16. Isso reforça o conceito de que o biofilme é um importante fator de resistência provavelmente devido ao fato de funcionar como uma barreira para a difusão de antimicrobianos.

Enfim, infecções associadas a biofilmes são um desafio na rotina clínica, especialmente porque a terapêutica muitas vezes não é capaz de eliminar totalmente os microrganismos patogênicos. Conforme demonstrado neste estudo, os resultados dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos convencionais são inadequados para serem aplicados em infecções onde existe a associação com biofilme.

A necessidade de desenvolver métodos para avaliar a formação de biofilme em CVC e propor um teste de suscetibilidade em biofilme tem ganhado um espaço precioso devido a sua importância clínica. Os resultados dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos convencionais são difíceis de serem aplicados em infecções onde existe a associação com biofilme. O ensaio descrito neste trabalho se mostrou simples e reprodutivo podendo ser implementado na rotina de um laboratório clínico.

---

## VI. CONCLUSÕES GERAIS



- A maioria dos isolados 64,5% (143/222) produziu biofilme, sendo que *S. aureus* (81,1%) e *S. epidermidis* (64,5%) sugerindo que a formação de biofilme tem uma expressiva importância em infecções relacionadas a cateter em ambas as espécies.

- Encontramos os genes *icaA* e *icaD* na grande maioria (92% - 132/143) de todos os isolados produtores de biofilme pelo método da microplaca, o que confirma a importância destes genes na formação de biofilme.

- A detecção de outros genes, como *aap* e *atlE*, indica que a formação de biofilme é multifatorial, sendo influenciada diretamente por determinantes genéticos e ambientais.

- A homologia variável entre os “primers” utilizados e SCN não *epidermidis* indica a necessidade de utilização de “primers” específicos para determinar o papel dos genes *ica*.

- A falha terapêutica pode ser explicada pelo crescimento em biofilme, uma vez que foi observada maior resistência à vancomicina, quando o teste foi realizado em biofilme.

- A padronização do método de microplaca para determinação da CMEB “in vitro”, com validação por critérios internacionais, é importante para permitir sua utilização em laboratórios de microbiologia clínica.

- Os testes de suscetibilidade em crescimento planctônico apresentaram valores inferiores quando testados em crescimento em biofilme CMEB >32.

- Nosso estudo alerta para o fato de que a correlação entre CIM e CMEB é baixa. Enquanto métodos de detecção não são aplicados de rotina, é extremamente importante suspeitar do aumento da resistência à vancomicina, em casos de infecções relacionadas à CVC, onde ocorre a produção de biofilme bacteriano.



---

## VII. REFERÊNCIAS





AMORENA, B.; GRACIA, E.; MONZÓN, M.; OTEIZA, C.; PÉREZ, M.; ALABART, J.L.; HERNÁNDEZ-YAGO, J. Antibiotic susceptibility assay for *S. aureus* in biofilms developed *in vitro*. *J Antimicrob Chemother*, v. 44, p. 43-55, 1999.

ANTUNES, A.L.S.; SECCHI, C.; REITER, K.C.; PEREZ, L.R.R.; FREITAS, A.L.P.; D'AZEVEDO, P.A. Evaluation of oxacillin and cefoxitin disks for detection of resistance in coagulase negative staphylococci. *Mem Inst Osw Cruz*, v. 102, p. 719-23, 2007.

ARCHER, G.L.; NIEMEYER, D.M.; THANASSI, J.A.; PUCCI, M.J. Dissemination among staphylococci of DNA sequences associated with methicillin resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 38, p. 447 - 454, 1994.

ARCIOLA, C.R.; CAMPOCCIA, D.; GAMBERINI, S.; CERVELLATI, M.; DONATI, M.E.; MONTANARO, L. Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test on a colorimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus. *Biomaterials*, v.23, p. 4233-39, 2002.

ARCIOLA, C.R.; CAMPOCCIA, D.; GAMBERINI, S.; DONATI, M.E.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. Occurrence of *ica* genes for slime synthesis in a collection of *Staphylococcus epidermidis* strains from orthopedic prostheses infections. *Acta Orthop. Scand*, v. 74, p. 617-21, 2003.

ARCIOLA, C.R.; CAMPOCCIA, D.; BALDASSARRI, L.; DONATI, M. E.; PIRINI, V.; GAMBERINI, S.; MONTANARO, L. 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. *J Biomed Mater Res A*, v.76 (2), p. 425-30, 2006.

ARCIOLA, C.R. New concepts and new weapons in implant infections. *Int J Artif Organs*, v. 32(9), 533-536, 2009.

BANNERMAN, T.L.; WADIAC, D.L.; KLOOS, W.E. Susceptibility of *Staphylococcus* species and subspecies to teicoplanin. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 25, p. 1919-1922, 1991.

BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus, Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In PR Murray, E.J., Jorgensen, M.A., Jolken (eds). *Manual of Clinical Microbiology*, ASM, Washington, p. 384-404, 2003.

BANNERMAN, T.L.; PEACOCK, S.J. *Staphylococcus, micrococcus*, and other catalase-positive cocci, p. 390-411. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, J. H. Jorgensen, and M. L. Landry (ed.), *Manual of clinical microbiology*. 9th ed. ASM Press, Washington, D.C., 2007.

BASTOS, M.C.F. Mecanismos de Ação dos Quimoterápicos. In: Bacteriologia Geral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 9, p. 503-540, 2007.

BIEDENBACH, D.J.; MOET, G.J.; JONES, R.N. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the

SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002). *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 50, p. 59-69, 2004.

BRODIE, S.B.; SANDS, K.E.; GRAY, J.E. ; PARKER, R.A.; GOLDMANN, D.A.; DAVIS, R.B.; RICHARDSON, D.K. Occurrence of nosocomial bloodstream infections in six neonatal intensive care units. *Pediat Infect Dis J*, v. 19, p. 56-62, 2000.

CAFISO, V.; BERTUCCIO, T.; SPINA, D.; PURRELLO, S.; STEFANI, S. Tigecycline inhibition of a mature biofilm in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*: comparison with other drugs. *FEMS Immunol Med Microbiol*, v. 59, p. 466-469, 2010.

CAIERÃO, J.; MUSSKOPF, M.; SUPERTI, S.; ROESCH, E.; DIAS, C.G.; D'AZEVEDO, P.A. Evaluation of phenotypic methods for methicillin resistance characterization in coagulase-negative staphylococci (CNS). *J Med Microbiol*, v. 53, p.1195-1199, 2004.

CAMPOCCIA, D.; MONTANARO, L.; ARCIOLA, C. R. Current methods for molecular epidemiology studies of implant infections. *Int J Artif Organs*, v. 32(9), p. 642-54, 2009.

CARGILL, J.S.; UPTON, M. Low concentrations of vancomycin stimulates biofilm formation in some clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Pathol*, published online 28 Jul 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDCP). Guidelines for the Prevention of Intravascular Catheter-Related Infections. *MMWR*, v. 51, n° RR-10, p. 1-32, 2002.

CENTER, K.J., REBOLI, A.C.; HUBLER, R.; RODGERS, G.L.; LONG, S.S. Decreased vancomycin susceptibility of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: evidence of spread of *Staphylococcus warneri*. *J Clin Microbiol*. v. 41, p. 4660-4665, 2003.

CHAMBERS, H.F. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg Infect Dis*, v. 7, p. 178-82, 2001.

CHAUDHURY, A.; KUMAR, A. G. In vitro activity of antimicrobial agents against oxacillin resistant staphylococci with special reference to *Staphylococcus haemolyticus*. *Indian J Med Microbiol*, v. 25, p. 50-52, 2007.

CHAVANT, P.; GAILLARD-MARTINIE, B.; TALON, R.; HÉBRAUD, M.; BERNARDI, T. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J Microbiolog Methods*, v. 68, p. 605-12, 2007.

CHRISTENSEN GD, SIMPSON WA, BISNO AL & BEACHEY EH. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immunity*, v. 37, p. 318-326, 1982.

CHRISTENSEN, G.D., SIMPSON, W.A., YOUNGER, J.J., BADDOUR, L.M., BARRETT, F.F., MELTON, D.M. AND BEACHEY, E.H. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol*, v. 22(6), p. 996-1006, 1985.

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing – Informational supplement. Approved document M2-A8 and M7-A6. 16. ed., Wayne, Pennsylvania, 2006.

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing – Informational supplement. Approved document M2-A8 and M7-A6. 19. ed., Wayne, Pennsylvania, 2009.

COSTERTON, J. W. Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents*, v. 11(3-4), p. 217-21, discussion 237-9, 1999.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*, v. 49, p. 711-45, 1995.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, v. 284(5418), p. 1318-22, 1999.

COSTERTON, J.W. Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections. *Clin Orthop Rel Res*, v. 437, p. 7-11, 2005.

COSTERTON, W. J.; MONTANARO, L.; BALABAN, N.; ARCIOLA, C. R. Prospecting gene therapy of implant infections. *Int J Artif Organs*, v. 32(9), p. 689-95. 2009.

CREMNITER J, SLASSI A, QUINCAMPOIX JC, SIVADON-TARDY V, BAUER T, PORCHER R, LORTAT-JACOB A, PIRIOU P, JUDET T, HERRMANN JL, GAILLARD JL, ROTTMAN M. Decreased susceptibility to teicoplanin and vancomycin in coagulase-negative Staphylococci isolated from orthopedic-device-associated infections. *J Clin Microbiol*, v. 48, p. 1428-1431, 2010.

CUCARELLA, C.; SOLANO, C.; VALLE, J.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADES, J. R. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol*, v. 183(9), p. 2888-96, 2001.

CUNHA, M.L.R.S.; LOPES, C.A.M. Estudo da produção de  $\beta$ -lactamase e sensibilidade às drogas em linhagens de estafilococos coagulase-negativos isolados de recém-nascidos. *J Bras Patol Med Labor*, v. 38, p. 281-290, 2002.

DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G.A. Microbial Biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Molec Biol Rev*, v. 64, p. 846-867, 2000.

DE ARAUJO, G.L.; COELHO, L.R.; DE CARVALHO, C.B.; MACIEL, R.M.; CORONADO, A.Z.; ROZENBAUM, R.; FERREIRA-CARVALHO, B.T.; FIGUEIREDO, A.M.; TEIXEIRA, L.A. Commensal isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* are also well equipped to produce biofilm on polystyrene surfaces. *J Antimicrob Chemother*, v. 57(5), p. 855-64, 2006.

DE PAULIS A.N.; PREDARI S.C.; CHAZARRETA C.D.; SANTOIANNI, J.E. Five-test simple scheme for species-level identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol*, v. 41, p. 1219-1224, 2003.

DEL'ALAMO, L.; R. F. CEREDA, I.; TOSIN, E. A.; MIRANDA, ; H. S. SADER. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci and characterization of isolates with reduced susceptibility to glycopeptides. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 34, p. 185-191, 1999.

DIEKEMA, D.J.; PFALLER, M.A.; SCHMITZ, F.J. 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 surveillance program, 1997-1999. *Clin Infect Dis*, v. 32 (suppl 2), p. 114-32, 2001.

DONLAN, R.M. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*, v.8, n.9, p.881-889, 2002.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Reviews*, v.15, n.2, p.167-193, 2002.

DUNNE JR, W.M. 2002. Bacterial Adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol. Reviews*, v. 15, p. 155-166.

EIFF, PETERS.; HEILMANN, C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *The Lancet*, v. 2, p. 677-685, 2002.

FERREIRA, R.B.R.; IORIO, N.L.P.; MALVAR, K.L.; NUNES, A.P.F.; FONSECA, L.S.; BASTOS, C.C.R.; SANTOS, K.R.N. Coagulase-Negative Staphylococci: Comparison of Phenotypic and Genotypic Oxacillin Susceptibility Tests and Evaluation of the Agar Screening Test by Using Different Concentrations of Oxacillin. *J Clin Microbiol*, v. 41, p. 3609-3614, 2003.

FITZPATRICK, F.; HUMPHREYS, H.; O'GARA, J.P. The genetics of staphylococcal biofilm formation--will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection? *Clin Microbiol Infect*, v. 11(12), p. 967-73, 2005.

FLEMMING, H-C.; NEU, T.R.; WOZNIAK, D. The EPS matrix: The house of biofilm cells. *J Bacteriol*, v.189, p. 7945-47, 2007.

FOSTER , T.J. The *Staphylococcus aureus* "superbug". *J Clin Investigat*, v.114, p. 1693-1696, 2004.



FRANK, K.L.; REICHERT, E.J.; PIPER, K. E.; PATEL, R. In vitro effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 51, p. 888-895, 2007

FRANK, K.L.; PATEL, R. Activity of sodium metabisulfite against planktonic and biofilm *Staphylococcus* species. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 57, p. 355-59, 2007.

FREEMAN, D.J.; FALKINER, F.R.; KEANE, C.T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol*, v. 42(8), p. 872-4, 1989.

GALDBART, J.O.; ALLIGNET, J.; TUNG, H-S.; RYDÈN, C.; EL SOLH, N. Screening for *Staphylococcus epidermidis* markers discriminating between skin-flora strains and those responsible for infections of joint prostheses. *J Infect Dis*, v. 182, p. 351-355, 2000.

GALES, A.C.; SADER, H.S.; RIBEIRO, J.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; PIGNATARI, A.C. Antimicrobial susceptibility of Gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY program (2005-2008). *Braz J Infect Dis*, v. 13, p. 90-98, 2009.

GATERMANN, S.G.; KOSCHINSKI, T.; FRIEDRICH, S. Distribution and expression of macrolide resistance genes in coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Infect*, v. 13, p. 777-781, 2007.

GOLDSTEIN, F.W.; ATOUI R, BEN ALI A. ; NGUYEN, J.C.; LY A.; KITZIS M.D. False synergy between vancomycin and  $\beta$ -lactams against glycopeptides-intermediate *Staphylococcus aureus* (GISA) caused by inappropriate testing methods. *Clin Microbiol Infec*, v. 10, p. 332-348, 2004.

GOMES, F.; TEIXEIRA, P.; CERCA, N.; CERI, H.; OLIVEIRA, R. Virulence gene expression by *Staphylococcus epidermidis* biofilm exposed to antibiotics. *Microbial drug Resistance*, v. 00, p. 1-6, 2011.

GU, F.; LUX, R.; DU-THUMM, L.; STOKES, I. ; KRETH, J. ; ANDERSON, M.H. ; WONG, D.T. ; WOLINSKY, L. ; SULLIVAN, R.; SHI, W. In situ non-invasive detection of specific bacterial species in oral biofilms using fluorescently labeled monoclonal antibodies. *J Microbiol Methods*, v. 62, p. 145-60, 2005.

HANNA, R.; RAAD, II. Diagnosis of catheter-related bloodstream infection. *Curr Infect Dis Rep*, v. 7(6), p. 413-9, 2005.

HEIKENS, E.; FLEER, A.; FLORIJN, A.; FLUIT A.C. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species identification of clinical isolates of coagulase negative staphylococci. *J Clin Microbiol*, v. 43, p. 2286-90, 2005.

HEILMANN, C.; SCHWEITZER, O.; GERKE, C.; VANITTANAKOM, N.; MACK, D.; GÖTZ, F. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol*, v. 20, p. 1083-1091, 1996.

HELLBACHER, C.; TORNQVIST, E.; SODERQUIST, B. *Staphylococcus lugdunensis*: clinical spectrum, antibiotic susceptibility, phenotypic and genotypic patterns of 39 isolates. *Clin Microbiol Infect*, v.12, p. 43-49, 2006.

HEROLD, B.C.; IMMERGLUCK, L.C.; MARANAN, M.C.; LAUDERDALE, D.S.; GASKIN, R.E.; BOYLE-VAVRA, S.; LEITCH, C.D.; DAUM, R.S. Community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. *JAMA*, v. 279, p. 593–598, 1998.

HIDAYAT, L. K.; HSU DI, QUIST R.; SHRINER, K.A.; WONG-BERINGER, A. High-dose vancomycin therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: efficacy and toxicity. *Archiv Internal Medicine*, v. 166, p. 2138-2144, 2006.

HOUSTON, P.; ROWE, S.E.; POZZI, C.; WATER, E.M.; O’GARA, J.P. Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype. *Infect Immunity*, v. 79, p. 1153-1165, 2011.

HUIJSDENS X.W.; VAN SANTEN-VERHEUVEL, M.G.; SPALBURG, E.; HECK, O.C.; PLUISTER, G.N.; EIJKELKAMP, B.A.; DE NEELING, A.J. ; WANNET, W. J. B. Multiple cases of familial transmission of Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, v. 44, p. 2994-2996, 2006.

HUSSAIN, M.; HERRMANN, M.; VON EIFF, C.; PERDREAU-REMGTON, F.; PETERS, G. A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect Immun*, v. 65(2), p. 519-24, 1997.

HIRAMATSU, K.; WATANABE, S.; TAKEUCHI, F.; ITO, T.; BABA, T. Genetic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Vaccine*, v. 22, Suppl 1, p. S5-S8, 2004.

IORIO, N.L.P.; LOPES, A.P.C.N.; SHUENCK, R.P.; BARCELLOS, A.G.; OLENDZKI, A.N.; LOPEZ, G.L.; SANTOS, K.R.N. A combination of methods to evaluate biofilm production may help to determine the clinical relevance of *Staphylococcus* in blood cultures. *Microbiol Immunol*, v. 55, p. 28-33, 2011.

JELJASZEWICZ, J.; MLYNARCZYK, G.; MLYNARCZYK, A. Current threats of antibiotic resistance in bacteria. *Blok Operacyjny*, v.3-4, p. 49-55, 1998.

JEONG, J.; CHANG, C.L.; PARK, T.S.; LEE, S.H.; KIM, S.R.; JEONG, S.H. Early Screening of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* from Blood Culture. *J. Korean Med. Science*, v. 17, p. 168-172, 2002.

JONES, R.N. Impact of changing pathogens and antimicrobial susceptibility patterns in the treatment of serious infections in hospitalized patients. *American J Medicine*, v. 100, p. 1-12, 1996.

JONES, R.N. Global aspects of antimicrobial resistance among key bacterial pathogens. Results from the 1997-1999 SENTRY Antimicrobial Program. *Clin Infect Dis*, v. 32, p. S81-S156, 2001.

JONES, T.F.; KELLUM, M.E.; PORTER, S.S.; BELL, M.; SCHAFFNER, W. An outbreak of community-acquired foodborne illness caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis*, v. 8, p. 82–84, 2002.

JONES, R.N. Global epidemiology of antimicrobial resistance among community-acquired and nosocomial pathogens: A five-year summary from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *Semin Respir Crit Care Med*, v. 24, p. 121-133, 2003.

KLOOS, W.E.; BANNERMAN, T.L. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Reviews*, v.7, p. 117-140, 1994.

KNOBLOCH, J.K.; JAGER, S.; HORSTKOTTE, M.A.; ROHDE, H.; MACK, D. RsbU-dependent regulation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation is mediated via the alternative sigma factor sigma $\beta$  by repression of the negative regulator gene *icaR*. *Infect Immun*, v. 72, p. 3838-3848, 2004.

KOZITSKAYA, S.; OLSON, M.E.; FEY, P.D.; WITTE, W.; OHLSEN, K.; ZIEBUHR, W. Clonal analysis of *Staphylococcus epidermidis* isolates carrying or lacking biofilm-mediating genes by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol*, v. 43, p. 4751-4757, 2005.

LAPLANTE, K.L.; MERMEL, L.A. In vitro activity of daptomycin and vancomycin lock solutions on staphylococcal biofilms in a central venous catheter model. *Nephrol Dialysis Transplantat*, v. 22, p.2239-2246, 2007.

LEWIS, K. Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Mosc)*, v. 70(2), p. 267-74, 2005.

LEWIS, K. Persister Cells. *Annu Rev Microbiol*, v. 64, p. 357-372, 2010.

LAYTON, M.C.; HIERHOLZER, J.R.; PATTERSON, J.E. The evolving epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a university hospital. *Infect Contr Hosp Epidemiol*, v. 16, p. 12–17, 1995.

LI, H.; XU, L.; WANG, J.; WEN, Y. ; VUONG, C.; OTTO, M.; GAO, Q. Conversion of *Staphylococcus epidermidis* strains from commensal to invasive by expression of the *ica* locus encoding production of biofilm exopolysaccharide. *Infect Immunity*, v.73, p. 3188-3191, 2005.

LINARES, J.F.; GUSTAFSSON, I.; BAQUERO, F.; MARTINEZ, J.L. Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *PNAS*, v. 103, p. 19484-19489, 2006.

LODISE, T.P.; MILLER, C.D.; GRAVES, J.; EVANS, A.; GRAFFUNDER, E.; HELMECKE, M.; STELLRECHT, K. Predictors of high vancomycin MIC values among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *J Antimicrob Chemother*, v. 62, p.1138-1141, 2008a.

LODISE, T.P.; GRAVES, J.; EVANS, A.; GRAFFUNDER, E.; HELMECKE, M.; LOMAESTRO, B.M.; STELLRECHT K. Relationship between vancomycin MIC and failure among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia treated with vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 52, n. 9, p.3315-3320, 2008b.

MACLAYTON, D.O.; SUDA, K.J.; COVAL, K.A.; YORK, C.B.; GAREY, K.W. Case-control study of the relationship between MRSA bacteremia with a vancomycin MIC of 2 µg/mL and risk factors, costs, and outcomes in patients undergoing hemodialysis. *Clin Ther*, v. 28, p. 1208-1216, 2006.

MAKI, D.G.; WEISE, C.E.; SARAFIN, H.W. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *New Engl. J. Medicine*, v. 296, p. 1305-09, 1977.

MACK, D.; BECKER, P.; CHATTERJEE, I.; DOBINSKY, S.; KNOBLOCH, J. K.; PETERS, G.; ROHDE, H.; HERRMANN, M. Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. *Int J Med Microbiol*, v. 294(2-3), p. 203-12. 2004.

MACK, D.; ROHDE, H.; HARRIS, L.G.; DAVIES, A.P.; HORSTKOTTE, M.A.; KNOBLOCH, J. K. Biofilm formation in medical device-related infection. *Int J Artif Organs*, v. 29(4), p. 343-59, 2006.

MACK, D.; DAVIES, A.P.; HARRIS, L.G.; ROHDE, H.; HORSTKOTTE, M.A.; KNOBLOCH, J. K. Microbial interactions in *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Anal Bioanal Chem*, v. 387(2), p. 399-408, 2007.

MCCLURE, J-A.; CONLY, J.M.; LAU, V.; ELSAYED, S.; LOUIE, T.; HUTCHINS, W.; ZHANG, D. Novel multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker Panton-Valentine Leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin-susceptible from resistant staphylococci. *J Clin Microbiol.* v. 44, p. 1141-1144, 2006.

MERMEL, L.A. Correction: catheter related bloodstream-infections. *Ann Intern Med*, p. 133: 395, 2000.

MONTANARO, L.; CAMPOCCIA, D.; ARCIOLA, C.R. Advancements in molecular epidemiology of implant infections and future perspectives. *Biomaterials*, v. 28(34), p. 5155-68, 2007.

MONSEN, T.; RÖNNMARK, M.; OLOFSSON, C.; WISTRÖM, J. An inexpensive and reliable method for routine identification of staphylococcal species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v. 17, p. 327-335, 1998.



MONZÓN, M.; OTEIZA, C.; LEIVA, J.; AMORENA, B. Synergy of different antibiotic combinations in biofilms of *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother*, v. 48, p. 793-801, 2001.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. *Staphylococcus e* Microrganismos Relacionados. In: *Microbiología Médica*, 5. ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, v. 1, cap. 22, p. 215-230, 2006.

MUSTA, A.C.; RIEDERER, K.; SHEMES, S.; CHASE, P.; JOSE, J.; JOHNSON, L. B.; KHATIB, R. Vancomycin MIC plus heteroresistance and outcome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: Trends over 11 years. *J Clin Microbiol*, v. 47, n.6, p.1640-1644, 2009.

NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIOUS SURVEILLANCE (NNIS) System report: data summary from January 1990-May 1999, issued June 1999. *American J Infect Control*, v. 27, p. 520-32, 1999.

NEELY, A.N.; MALEY, M.P. Survival of enterococci and staphylococci on hospital fabrics and plastics. *J Clin Microbiol*, v. 38, p. 724 –726, 2000.

NININ, E.; CAROFF, N.; ESPAZE, E.; MARAILLAC, J.; LEPELLETIER, D.; MILPIED, N.; RICHEL, H. Assessment of ica operon carriage and biofilm production in *Staphylococcus epidermidis* isolates causing bacteraemia in bone marrow transplant recipients. *Clin Microbiol Infec*, v. 12, p. 446-452, 2006.

NUNES, A.P.F.; TEIXEIRA, L.M.; IORIO, N.L.P.; BASTOS, C.C.R.; FONSECA, L.S.; SOUTO-PADRÓN, T.; SANTOS, K.R.N. Heterogeneous resistance to vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus warneri* clinical strains: characterization of glycopeptide susceptibility profiles and cell wall thickening. *Intern. J. Antimicrobiol. Agents*, v. 27, p. 307-15, 2006.

O'GARA, J.P.; HUMPHREYS, H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *J Med Microbiol*, v. 50, p. 582-587, 2002.

O'GRADY, N.P.; ALEXANDER, M.; DELLINGER, E.P.; GERBERDING, J.L.; HEARD, S.O.; MAKI, D.G., MASUR, H.; MCCORMICK, R.D.; MERMEL, L.A.; PEARSON, M.L.; RAAD, I.I.; RANDOLPH, A.; WEINSTEIN, R.A. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep*, v. 51(RR-10), p. 1-29, 2002.

OLIVEIRA, G.A.; DELL'AQUILA, A.M.; MASIERO, R.L.; LEVY, C.E.; GOMES M.S., CUI L. Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. *Infect Control Hospital Epidemiol*, v. 22(7), p. 443-448, 2001.

OTTO, M. Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*, v. 322, p. 207-28, 2008.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* – the 'accidental' pathogen. *Nature Reviews*, v.7, p.555-567, 2009.

PAIVA, R.M.; PINHEIRO MACHADO, A.B.M.; ZAVASCKI, A.P.; BARTH, A.L. Vancomycin MIC for Methicillin-Resistant coagulase-negative *Staphylococcus* isolates: evaluation of the broth microdilution and etest methods. *J Clin Microbiol*, v. 48, p. 4652-4654, 2010.

PALAZZO, I.C.V.; DARINI, A.L.C. Evaluation of methods for detecting oxacillin resistance in coagulase-negative Staphylococci including cefoxitin disc diffusion. *FEMS*, v. 257, p. 299-305, 2006.

PATEL, R. Biofilms and antimicrobial resistance. *Clin Orthop Relat Research*, v.437, p.41-47, 2005.

PATEL, M.; WAITES, K.B.; STEPHEN, A.; MOSER, S.A.; CLOUD, G.A.; HOESLEY, C.J. Prevalence of inducible clindamycin resistance among Community and Hospital-Associated *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol*, v. 44, p. 2481-2484., 2006.

PETRELLI, D.; REPETTO, A.; D'ERCOLE, S.; ROMBINI, S.; RIPA, S.; PRENNA, M.; VITALI, L. A. Analysis of methicillin-susceptible and methicillin-resistant biofilm-forming *Staphylococcus aureus* from cateter infections isolated in a large Italian hospital. *J Med Microbiol*, v. 57, p. 364-372, 2008.

POTTER, A.; CEOTTO, H.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M.; SANTOS, K.R.N.; NES, I.F.; BASTOS, M.C.F. The gene *bap*, involved in biofilm production, is present in *Staphylococcus* spp. strains from nosocomial infections. *J. Microbiol*, v. 47, p. 319-326, 2009.

POUTANEN, S. M.; BARON, E. J. *Staphylococcus lugdunensis*: a notably distinct coagulase-negative staphylococcus. *Clin Microbiol Newsletter*, v. 23, p. 147-150, 2001.

POZO, J.L.; PATEL, R. The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. *Clin Pharmacol Therapeut*, v. 82, p. 204-09, 2007.

PRESTERL, E.; HADJU, S.; LASSNIGG, A. M.; HIRSCHL A. M.; HOLINKA, J.; GRANINGER, W. Effects of azitromycin in combination with vancomycin, daptomycin, fosfomicin, tigecycline, and ceftriaxone on *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, v.53 (8), p.3205-3210, 2009.

RAAD, I.; ALRAHWAN, A.; ROLSTON, K. *Staphylococcus epidermidis*: emerging resistance and need for alternative agents. *Clin Infect Dis*, v. 26, p. 1182-1187, 1998.

RAAD, I.; HANNA, H.; JIANG, Y.; DVORAK, T.; REITZEL, R.; CHAIBAN, G.; SHERERTZ, R.; HACHEM, R. Comparative activities of daptomycin, linezolid, and tigecycline against catheter-related methicillin-resistant *Staphylococcus* bacteremic isolates embedded in biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother*, v. 51, p. 1656-1660, 2007.

RACHID, S.; OHLSEN, K.; WITTE, W.; HACKER, J.; ZIEBUHR, W. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 44 (12), p. 3357-3363, 2000.

RIBEIRO, A.; DIAS, C.; CARVALHO, M.C.S.; BERQUÓ, L.; FERREIRA, F.A.; SANTOS, R.N.S.; CARVALHO, B.T.F.; FIGUEIREDO, A.M. First report of infection with Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in South America. *J Clin Microbiol*, v. 43, p. 1985-1988, 2005.

RICE, L.B. Antimicrobial Resistance in Gram-Positive Bacteria. *The American Journal of Medicine*, v.119; p.S11-S19, 2006.

RICE, K.C.; MANN, E.E.; ENDRES, J.L.; WEISS, E.C.; CASSAT, J.E.; SMELTZER, M.S.; BAYLES, K.W. The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *PNAS*, v. 104, p. 8113-18, 2007.

RODRÍGUEZ-MARTINEZ, J.M.; BALLESTA, S.; GARCIA, I.; CONEJO, C.; PASCUAL, A. Actividad y permeabilidad de linezolid y vancomicina en biocapas de *Staphylococcus epidermidis*. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin*, v. 25, p. 425-28, 2007.

RODRÍGUEZ-NORIEGA, E.; SEAS, C.; GUZMÁN-BLANCO, MEJIA, C.; ALVAREZ, C.; BAVESTRELLO, L.; ZURITA, J.; LABARCA, J.; LUNA, C.M.; SALLES, M.J.C.; GOTUZZO, E. Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America. *Int J Infect Dis*, v. 14, p. e560-e566, 2010.

ROGERS, K.L.; FEY, P.D.; RUPP, M.E. Coagulase-negative staphylococcal infections. *Infect Dis Clin North Am*, v. 23(1), p. 73-98, 2009.

ROHDE, H.; KALITZKY, M.; KROGER, N.; SCHERPE, S.; HORSTKOTTE, M. A.; KNOBLOCH, J. K.; ZANDER, A. R.; MACK, D. Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. *J Clin Microbiol*, v. 42(12), p. 5614-9, 2004.

ROHDE, H.; BURDELSKI, C.; BARTSCHT, K.; HUSSAIN, M.; BUCK, F.; HORSTKOTTE, M. A.; KNOBLOCH, J. K.; HEILMANN, C.; HERRMANN, M.; MACK, D. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol Microbiol*, v. 55(6), p. 1883-95, 2005.

ROHDE, H.; MACK, D.; CHRISTNER, M.; BURDELSKI, C.; FRANKE, G.C.; KNOBLOCH, J.K. Pathogenesis of staphylococcal device-related infections: from basic science to new diagnostic, therapeutic and prophylactic approaches. *Reviews in medical microbiology*, v. 17, p. 45-54, 2006.

ROHDE, H.; BURANDT, E.C.; SIEMSEN, N.; FROMMELT, L.; BURDELSKI, C.; WURSTER, S.; SCHERPE, S.; DAVIES, A.P.; HARRIS, L.G.; HORSTKOTTE, M.A.; KNOBLOCH, J.K.; RAGUNATH, C.; KAPLAN, J.B.; MACK, D. 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(9), p. 1711-20, 2007.

ROHDE, H.; FRANKENBERGER, S.; ZHRINGER, U.; MACK, D. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. *Eur J Cell Biol*, v. 89(1), p. 103-11, 2010.

ROSE, W.E.; POPPENS, P. T. Impact of biofilm on the *in vitro* activity of vancomycin alone and in combination with tigecycline and rifampicin against *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*, v. 63, p. 485-488, 2009.

ROWE, F.; SUPERTI, S.V.; SCHEIBE, R.M.; DIAS, C.G. Agar diffusion, agar dilution, Etest and agar screening test in the detection of methicillin resistance in staphylococci. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 43, p. 45-48, 2002.

SADER, H.S; GALLES, A.C.; PFALLER, M.A.; MENDES, R.E.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; JONES, R.N. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Braz. J. Infect. Dis*, v. 5, p. 200-214, 2001.

SADER, H.S.; JONES, R.N.; ANDRADE-BAIOCCHI, S.; BIEDENBACH, D.J. The SENTRY participants Group (Latin America). Four-year evaluation of frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from bloodstream infections in Latin American medical centers. *Diagn Microbiol Infect. Dis*, v. 44, p. 273-280, 2003.

SADER, H.S.; JONES, R.N.; GALES, A.C.; SILVA, J.B.; PIGNATARI, A.C. SENTRY Antimicrobial Surveillance program Report: Latin American and Brazilian Results for 1997 through 2001. *Braz. J. Infect. Dis*, v. 8 (1), p. 25-79, 2004.

SADER, H.S.; RHOMBERG P.R.; JONES, R.N. Nine-hospital study comparing broth microdilution and Etest method results for vancomycin and daptomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 53, p.3162-3165, 2009.

SAGINUR, R.; STDENIS, M.; FERRIS, W.; AARON, S.A.; CHAN, F.; LEE, C.; RAMOTAR, K. Multiple combination bactericidal testing of Staphylococcal biofilms from implant-associated infections. *Antimicrob Agents Chemother*, 50: 55-61, 2006.

SAKOULAS, G.; MOISE-BRODER, J.; SCHENTAG, A.; FORREST, R.C.; MOELLERING, J.R.; ELIOPOULOS, G.M. Relationship of MIC and bactericidal activity to efficacy of vancomycin for treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J Clin Microbiol*, v. 42, p.2398-2402, 2004.



SALMENLINNA, S.; LYYTIKAINEN, O.; VUOPIO-VARKILA, J. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Finland. *Emerg Infect Dis*, v. 8, p. 602–607, 2002.

SANTOS, K.R.N.; FONSECA, L.S.; BRAVO NETO, G.P.; GONTIJO FILHO, P.P. Surgical site infection: rates, etiology and resistance patterns to antimicrobials among strains isolated at Rio de Janeiro University Hospital. *Infection*, v. 25, p. 217-220, 1997.

SCHINABECK, M.K.; GHANNOUM, M.A. Biofilm-related indwelling medical device infections. in: PACE, J.L.; RUPP, M.; FINCH, R.G. *Biofilms, infection, and antimicrobial therapy*. U.S.A., CRC Press Taylor & Francis Group, p.39-48, 2006.

SCHOENFELDER, S.M.; LANGE, C.; ECKART, M.; HENNIG, S.; KOZYTSKA, S.; ZIEBUHR, W. Success through diversity - How *Staphylococcus epidermidis* establishes as a nosocomial pathogen. *Int J Med Microbiol*, v. 300(6), p. 380-386, 2010.

SKOV, R.; SMYTH, R.; LARSEN, A.R.; N.; KAHLMETER, G. Evaluation of cefoxitin 5 and 10µg discs for the detection of methicillin resistance in Staphylococci. *J Antimicrob Chemother*, v. 55, p. 157-161, 2005.

SILVA, G.D.; KANTZANO, M.; JUSTICE, A.; MASSEY, R.C.; WILKINSON, A.R.; DAY, N.P.; PEACOCK, S.J. The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative Staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol*, v. 40(2), p. 382-388, 2002.

SIVADON, V.; ROTTMAN, M.; CHAVEROT, S.; QUINCAMPOIX, J.C.; AVETTAND, V.; MANZACOURT, P.; BERNARD, L.; TRIEU-CUOT, P.; FÉRON, J.M.; LORTAT-JACOB, A.; PIRIOU, P.; JUDET, T.; GAILLARD, J.L. Use of genotypic identification by *sodA* sequencing in a prospective study to examine the distribution of Coagulase-Negative *Staphylococcus* specie among strains recovered during septic orthopedic surgery and evaluate their significance. *J Clin. Microbiol*, v. 43, p. 2952-2954, 2005.

SMITH, K.; PEREZ, A.; RAMAGE, G.; GEMMEL, C.G.; LANG, S. Comparison of biofilm-associated cell survival following in vitro exposure of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms to the antibiotics clindamycin, daptomycin, linezolid, tigecycline and vancomycin. *Int J Antimicrob Agents*, v. 33, p. 374-378, 2009.

SOHN, A.H.; GARRETT, D.O.; SINKOWITZ-COCHRAN, R.L.; GROHSKOPF, L.A.; LEVINE, G.L.; STOVER, B.H.; SIEGEL, J.D.; JARVIS, W.R. Prevalence of nosocomial infections in neonatal intensive care unit patients: results from the first national point-prevalence survey. *J Pediatrics*, v. 136, p. 821-827, 2001.

SORIANO, A.F.; MARCO, J.A.; MARTINEZ, E.; PISOS, M.; ALMELA, V.P.; DIMOVA, D.; ALAMO, M.; ORTEGA, J.; MENSA J. Influence of vancomycin minimum inhibitory concentration on the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis*, v. 46, p.193-200, 2008.

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; HOLA, V.; BONAVENTURA, G.; DJUKIĆ, S.; ĆIRKOVIĆ, I.; RUZICKA, F. Quantification of Biofilm in Microtiter Plates: Overview of testing Conditions and Practical Recommendations for Assessment of Biofilm Production by staphylococci. *APMIS*, v. 115, p.891-899, 2007.

STOODLEY, L. H.; COSTERTON, J.W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews*, v.2, p.95-108, 2004.

TACCONELLI, E.; TUMBARELLO, M.; DONATI, K.G.; BETTIO, M.; SPANU, T.; LEONE, F.; SECHI, L.A.; ZANETTI, S.; FADDA, G.; CAUDA, R. Glycopeptide resistance among coagulase-negative staphylococci that cause bacteremia: epidemiological and clinical findings from a case-control study. *Clin Infect Dis*. v. 33, p. 1628-1635, 2001.

TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine*, v.119; p.S3-S10, 2006.

VACHEETHASANEE, K.; TEMENOFF, J.S.; HIGASHI, J.M.; GARY, A.; ANDERSON, J.M.; BAYSTON, R.; MARCHANT, R.E. Bacterial surface properties of clinically isolated *Staphylococcus epidermidis* strains determine adhesion on polyethylene. *J Biomed Mater Res*, v. 42(3), p. 425-32, 1998.

VACHEETHASANEE, K.; MARCHANT, R.E. Surfactant polymers designed to suppress bacterial (*Staphylococcus epidermidis*) adhesion on biomaterials. *J Biomed Mater Res*, v. 50, p. 302-312, 2000.

VADYVALOO, V.; OTTO, M. Molecular genetics of *Staphylococcus epidermidis* biofilms on indwelling medical devices. *Int J Artif Organs*, v. 28(11), p. 1069-78, 2005.

VANDECASTEELE, S.J.; PEETERMANS, W.E.; RIJNDERS, B.J.; VAN ELDERE, J. 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." *Clin Microbiol Infect*, v. 9(2), p. 114-9, 2003.

VANNUFFEL, P.; EZZEDINE, H.; VANDERCAM, B.; DELMME, M.; WANTERS, G.; GALA, J.L. Specific detection of methicilin resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, v. 33, p. 2864-2867, 1998.

VOGEL, L.; JACOBUS, H.S.; SPAARGAREN, J.; SUIKER, I.; DIJKSHOORN, L. Biofilm production by *Staphylococcus epidermidis* isolates associated with catheter related bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 36, p. 139-141, 2000.

VUONG, C.; OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes Infect*, v. 4, p. 481- 489, 2002.

VUONG, C.; GERKE, C.; SOMERVILLE, G.A.; FISCHER, E.R.; OTTO, M. Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Infec. Dis*, v. 188, p. 706-18, 2003.

VUONG, C., KOCIANOVA, S., VOYICH, J. M., YAO, Y., FISCHER, E. R., DELEO, F. R. AND OTTO, M. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem*, v. 279(52), p. 54881-6. 2004.

WALSH, T.R.; HOWE, R.A. The prevalence and mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annal Review in Microbiology*, v. 56, p. 657–675, 2002.

WEISSER, M.; SCHOENFELDER, M.K.; ORASCH, C.; ARBER, C.; GRATWOHL, F.; ECKART, M.; FLÜCKIGER, J.; ZIEBUHR, W. Hypervariability of biofilm formation and oxacillin resistance in *Staphylococcus epidermidis* strains causing persistent severe infection in an immunocompromised patient. *J Clin Microbiol*, v.48, p. 2407-2412, 2010.

WELSH, K.J.; ABBOTT, A.N.; LEWIS, E.M., GARDINER, J.M.; KRUZEL, M.C.; LEWIS, C.T.; MOHR, J.F.; WAGNER, A.; ARMITIGE, L.Y. Clinical characteristics, outcomes, and microbiologic features associated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia in pediatric patients treated with vancomycin. *J Clin Microbiol*, v. 48, p. 894-899, 2010.

WIESER, M.; BUSSE, H.-J. Rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* v. 50, p. 1087-1093, 2000.

YARWOOD, J.M.; PAQUETTE, K.M.; TIKH, I.B.; VOLPER, E.M.; GREENBERG, E.P. Generation of virulence factor variants in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J. Bacteriol*, v. 189, p. 7961-67, 2007.

ZIEBUHR, W.; HEILMANN, C.; GÖTZ, F.; MEYER, P.; WILMS, K.; STRAUBE, E.; HACKER, J. Detection of the Intercellular Adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect. Immunity*, v. 65, p. 890-896, 1997.

ZIEBUHR, W., HENNIG, S., ECKART, M., KRÄNZLER, H., BATZILLA, C., KOZITSKAYA, S. Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. *Antimicrobial Agents*, v. 285, p. 514-520, 2006.









**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**  
**Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação**  
**COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE**

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

**Projeto:** 07-485

**Versão do Projeto:** 25/10/2007

**Versão do TCLE:** 25/10/2007

**Pesquisadores:**

AFONSO LUIS BARTH  
ANA LUCIA PEIXOTO DE FREITAS  
ANA LUCIA SOUZA ANTUNES  
ALEXANDRE JOSE MACEDO  
LEANDRO REUS RODRIGUES PEREZ  
NADIA MORA KUPPLICH  
RODRIGO PIRES DOS SANTOS  
LARISSA LUTZ  
MARIA IZOLETE VIEIRA  
KELI CRISTINE REITER  
KATIA RUSCHEL PILGER DE OLIVEIRA

**Título:** FORMAÇÃO DE BIOFILME E TESTES DE SUSCETIBILIDADE AOS  
ANTIMICROBIANOS EM STAPHYLOCOCCUS SPP. ISOLADO DE CATETER VENOSO  
CENTRAL

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, inclusive quanto ao seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA. Somente poderão ser utilizados os Termos de Consentimento onde conste a aprovação do GPPG/HCPA.

Porto Alegre, 31 de outubro de 2007.

  
Profª Nadine Clausell  
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA



## VIII.2

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Estamos lhe convidando para participar de um estudo sobre análise das bactérias que causam infecção através de cateter. Sua participação não incluirá nenhum procedimento adicional aos que seu médico faria, serão apenas utilizados dados laboratoriais e de seu prontuário.

As informações serão obtidas de forma a ser respeitada a sua privacidade, ou seja, o nome dos participantes não constará na divulgação dos resultados.

A recusa não implicará em prejuízo de atendimento pela equipe de saúde desta instituição.

Ciente,

---

Paciente ou responsável

Porto Alegre, \_\_\_\_\_.

Pesquisador responsável: Dr. Afonso Luis Barth

Telefone para contato: (51) 3359-8607



### VIII.3

#### Ficha de Avaliação de Infecção Relacionada a Cateter Venoso Central

Solicitação: \_\_\_\_\_ Prontuário: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Sexo: ( ) masc. ( ) fem.

Unidade de internação (leito) na coleta: \_\_\_\_\_

Data última internação: \_\_\_\_\_

1. Doença principal (CID-10): \_\_\_\_\_

2. Doenças associadas: ( ) DM ( ) TABAGISMO ( ) HAS ( ) CI ( ) DPOC ( ) ICC  
( ) ASMA ( ) DVP ( ) IRC ( ) OBESIDADE ( ) CIRROSE ( ) NEOPLASIA ( ) AVC  
( ) COLAGENOSE ( ) ALCOOLISMO ( ) INFECÇÃO EM OUTRO SÍTIO

3. Imunodeficiência: ( ) HIV ( ) corticoterapia ( ) quimioterapia ( ) outra: \_\_\_\_\_

4. Dias de permanência do cateter: \_\_\_\_\_

5. Tipo de cateter: ( ) curta permanência ( ) longa permanência ( ) hemodiálise  
( ) swan ganz ( ) umbilical

6. Local da introdução: ( ) jugular ( ) subclávia ( ) femoral ( ) umbilical ( ) outro

7. Uso de ATB prévio (>48hs): ( ) Não ( ) Sim Qual(is): \_\_\_\_\_

8. Desfecho: ( ) alta ( ) óbito: *causa mortis* (CID-10): \_\_\_\_\_

9. Data desfecho: \_\_\_\_\_

10. Diagnóstico (CCIH): Infecção relacionada ( ) x Colonização ( )

11. Microrganismo prevalente na ponta do cateter – cultura convencional: \_\_\_\_\_

12. Outros microrganismos na ponta do cateter – cultura convencional: \_\_\_\_\_

13. Microrganismo isolado na hemocultura: \_\_\_\_\_

14. Microrganismos encontrados no cateter – SSCP \_\_\_\_\_

#### TESTES DE SUSCETIBILIDADE PARA *Staphylococcus spp.*

	Vancomicina	Azitromicina	Eritromicina	Rifampicina
Crescimento planctônico (CIM)				
Biofilme (CMEB)				

#### ANTIBIOGRAMA POR DISCO-DIFUSÃO:

Clindamicina	
Cloranfenicol	
Doxiciclina	
Eritromicina	
Gentamicina	
Levofloxacina	
Oxacilina	
Rifampicina	
Sulfametoxazol-Trimetoprim	
Vancomicina	