

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**Formação de biofilme de *Staphylococcus epidermidis*
isolado de cateter venoso central através de métodos
fenotípicos e genotípicos**

Cyntia Lazzarotto

Orientador: Prof. Dr. Afonso Luís Barth

Dissertação de Mestrado

2010

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**Formação de biofilme de *Staphylococcus epidermidis*
isolado de cateter venoso central através de métodos
fenotípicos e genotípicos**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina:
Ciências Médicas da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul como
requisito para obtenção do título de
mestre

Cyntia Lazzarotto

Orientador: Prof. Dr. Afonso Luís Barth

Dissertação de Mestrado

2010

L432f **Lazzarotto, Cyntia**

Formação de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* isolado de cateter venoso central através de métodos fenotípicos e genotípicos / Cyntia Lazzarotto ; orient. Afonso Luís Barth. – 2010.

75 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

1. Infecções relacionadas a cateter 2. *Staphylococcus epidermidis*
3. Biofilmes 4. Marcadores biológicos 5. Técnicas de diagnóstico e procedimentos I. Barth, Afonso Luís II. Título.

NLM: WC 250

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que colaboraram para a realização desta dissertação, em especial:

Ao Fábio, meu marido, companheiro, amigo, pela paciência, força e suporte fundamental. Obrigada por entenderes minhas ausências.

Aos meus pais, Ercy e Vera; irmãos, Fabio e Natércia; sogros, Edison e Gessi, por terem acreditado em mim, permitindo a realização deste trabalho e pelas constantes palavras de apoio e estímulo.

Ao Prof. Dr. Afonso Luis Barth, orientador, pela confiança em mim depositada, contribuindo para meu crescimento pessoal e profissional e pela ajuda fundamental na conclusão desta dissertação.

À Profa. Dra. Ana Lúcia Peixoto de Freitas, co-orientadora, por todo o incentivo, carinho, amizade, conforto e ajuda imprescindível para a realização desta dissertação.

À Ms. Ana Lúcia Souza Antunes, pelo desprendimento de partilhar parte de seu doutorado, por toda a sua amizade, companheirismo e ensinamentos sempre oportunos.

Às bolsistas de iniciação científica, Camille, Jaqueline e Jéssica pela dedicação e eficiência. Considero que fui privilegiada em tê-las comigo no andamento deste projeto.

Às amigas sempre presentes, Gisele, Sandrine, Vanessa, Larissa, Dirce, Débora, Alessandra, pelo carinho, paciência e apoio incondicionais.

Às colegas do curso de pós-graduação Keli e Ana Paula, pelos ensinamentos e apoio imprescindíveis neste período.

Aos Bioquímicos do Setor de Microbiologia do HCPA pela ajuda na coleta das amostras e pelo incentivo nestes anos de convivência.

À Alice e Fernanda, do Setor de Biologia Molecular do HCPA, pela ajuda incansável e indispensável na padronização de algumas técnicas desta dissertação.

Às funcionárias do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFRGS, pela paciência e contribuição fundamentais.

Ao curso de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas 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.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE ABREVIATURAS	10
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	12
INTRODUÇÃO	13
REVISÃO DA LITERATURA	16
1. <i>Staphylococcus</i> spp.....	16
2. Infecções relacionadas a cateter.....	18
3. Biofilme Bacteriano	21
3.1 Formação do biofilme.....	21
3.1.1 Adesão bacteriana.....	22
3.1.1.1 Adesão primária ao material não revestido.....	23
3.1.1.2 Adesão primária ao material revestido com proteínas extracelulares do hospedeiro.....	24
3.1.2 Acúmulo bacteriano.....	25
3.1.3 Maturação do biofilme bacteriano.....	29
3.2 Desprendimento do biofilme bacteriano.....	29
3.3 Regulação da formação de biofilme em <i>Staphylococcus epidermidis</i>	30
3.4 Resistência em biofilme.....	33
4. Deteção laboratorial de biofilme	35
4.1 Caracterização fenotípica.....	35
4.2 Caracterização genotípica.....	36

OBJETIVOS	38
1. Geral.....	38
2. Específicos.....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
ARTIGO CIENTÍFICO “Genetic markers of biofilm production among <i>Staphylococcus epidermidis</i> from central venous catheter: comparison with phenotypic methods”.....	51
CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
ANEXOS	68
1. Protocolo microplaca corada com cristal violeta.....	69
2. Protocolo ágar Congo Red.....	70
3. Resultados métodos fenotípicos e genotípicos.....	71
4. Termo de compromisso para utilização de dados.....	74
5. Aprovação Comissão Científica e Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde.....	75

RESUMO

Apesar de ser principalmente um colonizador da pele e mucosas, *Staphylococcus epidermidis*, juntamente com outros estafilococos coagulase negativos, tornou-se um importante patógeno oportunista, responsável por infecções nosocomiais associadas ao uso de dispositivos implantáveis. O fator mais importante na patogênese de infecções estafilocócicas associadas a estes dispositivos é a habilidade do patógeno de formar um biofilme bacteriano, sendo que a presença dos genes *ica*, *aap* e *atlE* é considerada importante para a sua formação. Este estudo compara diferentes métodos para a detecção de formação de biofilme em *S. epidermidis* isolado de cateter venoso central (CVC). Dois métodos fenotípicos foram realizados: o teste da microplaca, considerado o padrão ouro e o teste com ágar Congo Red (ACR). No método genotípico, através da técnica de PCR, foi verificada a presença dos genes *icaA*, *icaD*, *aap* e *atlE*. Das 166 amostras analisadas, 107(64%) produziram biofilme pelo teste da microplaca, sendo 17 fortes, 23 moderadas e 67 fracas produtoras, enquanto 90(54%) produziram biofilme pelo teste com ACR. Foi verificada a presença dos genes *icaA* e *icaD* em 97% (104/107) das amostras produtoras de biofilme pela microplaca; em 77% foi identificado o gene *aap* e em 92% o gene *atlE*. Os genes *icaA* e *icaD* foram considerados os marcadores mais confiáveis na identificação molecular de biofilme porque apresentaram maior sensibilidade (97%) quando comparados com os demais genes. A ausência de genes *icaA* e *icaD* em três isolados produtores de biofilme através do teste da microplaca, chamados de “*ica*-independente”, sugerem a presença de um mecanismo alternativo de formação de biofilme, como a proteína Aap, que pode substituir funcionalmente PIA como uma adesina intercelular. A alta prevalência do gene *atlE* entre os isolados deste estudo pode ser explicada pelo fato de a proteína AtlE ser um importante fator para a aderência em superfícies plásticas como CVC. Porém a sua presença nem sempre implica em formação de biofilme. Este estudo confirma a importância do operon *ica* na formação do biofilme e nas infecções relacionadas a cateter, uma vez que a maioria das amostras produtoras de biofilme isoladas de CVC carregavam tal gene.

ABSTRACT

Although *Staphylococcus epidermidis* is essentially a colonizer of skin and mucous membranes, it has become an important opportunistic pathogen among other coagulase-negative staphylococci, and it is responsible for nosocomial infections associated to indwelling medical devices. The most important factor in the pathogenesis of staphylococcal device-related infections is the pathogen ability to produce a biofilm, and it has been demonstrated that *ica*, *aap* and *atlE* genes are important to its production. The present study compares different detection methods of biofilm formation in isolates of *S. epidermidis* from central venous catheter (CVC). Two phenotypic methods were performed: the microtiter plate test, considered a golden standard, and Congo red agar test. Through a genotypic method, using the PCR technique, it was verified the presence of *icaA*, *icaD*, *aap* and *atlE* genes. Using the microtiter plate assay, biofilm formation was observed in 107 of 166 analyzed samples (64%, including 17 strong, 23 moderate and 67 weak producers) while the Congo Red agar (CRA) plate assay revealed 90 (54%) biofilm producers. The presence of *icaA* and *icaD* genes was verified in 104 of the 107 biofilm producers samples identified through the microtiter assay (97%), while 77% presented *aap* gene and 92% presented *atlE* gene. Compared to other genes, *icaA* and *icaD* presented the higher sensibility (97%) and were considered the most reliable markers for molecular identification of biofilm producers. The absence of *icaA* and *icaD* genes in three biofilm-producing isolates identified through the microtiter assay (the “*ica*-independent”) suggests the existence of an alternative mechanism for biofilm formation, such as the Aap protein, that can be a functionally substitute for PIA as an intercellular adhesin. The high occurrence of *atlE* gene among the isolates in this study may be due to AtlE protein being an important factor for adherence to plastic surfaces, such as CVC, but the presence of this gene does not always results in biofilm formation. The present study corroborate the importance of *ica* operon in biofilm formation and in catheter-related infections, since most of the biofilm-producing sample isolates from CVC presented these genes.

LISTA DE ABREVIATURAS

Aae	<i>Autolysin/adhesin from Staphylococcus epidermidis</i> - (Autolisina do <i>Staphylococcus epidermidis</i>)
<i>aae</i>	Gene que codifica a autolisina Aae
Aap	<i>Accumulation-associated protein</i> - (Proteína associada à acumulação)
<i>aap</i>	gene que codifica a proteína associada à acumulação
ACR	Ágar Congo Red
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
<i>agr</i>	<i>Accessory gene regulator</i> - (Gene acessório de regulação)
AtIE	<i>Autolysin E</i> - (Autolisina do <i>Staphylococcus epidermidis</i>)
<i>atIE</i>	Gene que codifica a autolisina atIE
Bap	<i>Biofilm associated protein</i> - (Proteína associada a biofilme)
<i>bap</i>	Gene que codifica a proteína associada a biofilme
Bhp	<i>Bap-homologous protein</i> - (Proteína homóloga a Bap)
<i>bhp</i>	Gene que codifica a proteína homóloga a Bap
CVCs	Cateteres Venosos Centrais
CRA	Congo Red ágar
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> - (Ácido desoxirribonucléico)
DNase I	<i>Deoxyribonuclease I</i> - (Enzima desoxirribonuclease I)
DO	Densidade Ótica
ECTA	<i>Extracellular teichoic acids</i> - (Ácidos teicóicos extracelulares)
eDNA	<i>Extracellular deoxyribonucleic acid</i> - (Ácido desoxirribonucléico extracelular)
Embp	<i>Extracellular matrix binding protein</i> - (Proteína de ligação a fibronectina)
<i>embp</i>	Gene que codifica a proteína de ligação a fibronectina

Fbe	<i>Fibrinogen-binding protein</i> - (Proteína de ligação ao fibrinogênio)
<i>fbe</i>	Gene que codifica a proteína de ligação ao fibrinogênio
GehD	<i>Collagen-binding protein</i> - (Lipase de ligação ao colágeno)
<i>ica</i>	<i>Intercellular Adhesion</i> - (gene que codifica a síntese de PIA)
IS256	<i>Insertion Sequence</i> - (sequência de inserção)
<i>luxS</i>	<i>Quorum-sensing system luxS</i> - (gene de regulação)
MSCRAMMs	<i>Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules</i> - (Componentes da superfície microbiana reconhecedoras de moléculas adesivas)
NISS	<i>The Nosocomial Infections Surveillance System</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - (Reação em Cadeia da Polimerase)
PIA	<i>Polysaccharide Intercellular Adhesin</i> - (Adesina Polissacarídica Intercelular)
PNAs	<i>Peptide nucleic acid</i> - (Ácidos Nucleicos Peptídicos)
PSM	<i>Phenol-soluble modulins</i> - (Modulina Fenol Solúvel)
SCN	<i>Staphylococcus</i> spp. coagulase negativo
SdrG	<i>Surface-associated fibrinogen binding protein</i> - (Proteína de ligação ao fibrinogênio associada à superfície)
SSP	<i>Staphylococcal Surface Protein</i> - (Proteína de superfície estafilocócica)
<i>sarA</i>	<i>Staphylococcal accessory regulator</i> - (Gene responsável pela regulação)
<i>rsbU</i>	<i>Positive regulator of the activity of sigma beta</i> - (gene regulador do operon σ^B)
<i>rsbV</i>	<i>Positive regulators of sigma beta</i> - (gene regulador do operon σ^B)
<i>rsbW</i>	<i>Anti-sigma factor</i> - (gene regulador do operon σ^B)
σ^B	<i>Alternative sigma factor sigmaB</i> - (Fator alternativo sigma beta)
UTIs	Unidades de Terapia Intensiva

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figuras:

Figura 1. Modelo da formação de biofilme de *S. epidermidis* na superfície de cateter

Figura 2. Operon *icaRADBC*

Tabelas:

Tabela 1. Função dos fatores envolvidos nas distintas fases da formação do biofilme

INTRODUÇÃO

Durante muito tempo *S. epidermidis* foi considerada uma bactéria comensal inócua da pele e mucosas do corpo humano. No entanto, atualmente é reconhecida como um importante patógeno em infecções nosocomiais associadas a cateteres venosos centrais (CVCs) e outros dispositivos implantáveis (Gu et al. 2005). O uso de CVCs tornou-se um procedimento essencial na medicina moderna, pois facilita o manuseio dos pacientes. É utilizado na terapia intravenosa prolongada para administração de medicamentos, hemoderivados, nutrição parenteral, para acompanhar a condição hemodinâmica do paciente e como acesso vascular para hemodiálise (Oncu et al. 2004). Porém, o uso desses dispositivos está associado à significativa morbidade e mortalidade de pacientes (Arciola et al. 2002). Assim, seu uso deve avaliar o equilíbrio entre a segurança do paciente e o custo-benefício e medidas que visam minimizar o risco de infecção associada à terapia intravascular são fundamentais (O'Grady et al. 2002).

O fator mais importante na patogênese de infecções associadas a corpos estranhos é a capacidade da bactéria em colonizar a superfície polimérica de tais dispositivos e formar um biofilme bacteriano. Biofilme é definido como uma comunidade microbiana sésil rodeada por uma matriz polimérica extracelular produzida pela própria bactéria (Costerton 1999), que se forma através de um processo ordenado. Este processo começa com a adesão primária e rápida da célula bacteriana na superfície do corpo estranho seguido do revestimento destas células por proteínas da matriz extracelular do hospedeiro. Em uma segunda etapa, as bactérias proliferam e se acumulam para formar várias camadas de agregados de células que são incorporados na matriz extracelular (Speziale et al. 2008). Um componente importante no acúmulo de biofilme de *S. epidermidis* é a Adesina Polissacarídica Intercelular (PIA) (Mack

et al. 1996), que é produzida através do locus *icaRADBC*, um operon de quatro genes de biossíntese (*icaADBC*) e um gene de regulação (*icaR*) (Mack et al. 1996; Conlon et al. 2002).

No entanto, amostras PIA-negativas são regularmente encontradas em biofilme, sugerindo a existência de outras adesinas intercelulares (Kogan et al. 2006; Hennig et al. 2007; Qin et al. 2007; Rohde et al. 2007). A proteína associada à acumulação (Aap) pode substituir funcionalmente PIA como uma adesina intercelular (Rohde et al. 2005). Após a adesão e crescimento bacteriano, ocorrem as etapas de amadurecimento do biofilme e posterior desprendimento celular, para a disseminação e colonização dos microorganismos em outros sítios (Otto 2008).

Bactérias regulam a expressão dos genes em resposta a mudanças nas condições ambientais, sendo que a densidade da população bacteriana tem um forte impacto nestas mudanças. Reguladores globais que controlam a expressão em resposta a densidade celular são chamados sistemas “quorum sensing“. Muitos patógenos empregam este sistema na regulação de seus fatores de virulência (Bassler 2002).

A formação de biofilme é considerada um importante fator de virulência de bactérias e as mesmas têm demonstrado a habilidade de persistir em concentração de antibióticos superiores se comparadas às mesmas bactérias em estado plantônico. Bactérias em biofilme também apresentam maior resistência contra as defesas inatas e adaptativas do hospedeiro (Stewart and Costerton 2001; Wolcott and Ehrlich 2008). Com isso, a formação de biofilmes bacterianos geralmente dificulta o tratamento de infecções relacionadas a dispositivos implantáveis (Mah and O'Toole 2001).

Diversos estudos têm ressaltado a importância clínica das infecções relacionadas a dispositivos implantáveis como os CVCs. É possível estabelecer que a forma ideal de tratar estas infecções envolveria a remoção do dispositivo uma vez que os mesmos se constituem em uma fonte de formação de biofilme. A retirada do dispositivo, no entanto, pode ser um

procedimento difícil em pacientes instáveis e, em particular, que se encontram em Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs). Assim, se torna importante desenvolver métodos (fenotípicos ou genotípicos) de avaliação da capacidade de formação de biofilme.

REVISÃO DA LITERATURA

1. *Staphylococcus* spp.

Staphylococcus spp. pertencem à família Staphylococcaceae. São bactérias Gram positivas de forma cocóide, anaeróbias facultativas, imóveis, produtoras da enzima catalase. As principais espécies deste gênero bacteriano são: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus simulans*, entre outras (Huebner and Goldmann 1999).

A diferenciação taxonômica se baseia principalmente na morfologia colonial, em reações bioquímicas convencionais e análises moleculares. A habilidade de produzir a enzima coagulase divide os estafilococos em dois grupos principais: estafilococos coagulase positivos, cujo principal representante é o *S. aureus* e estafilococos coagulase negativos (SCN) (Ziebuhr 2001). Dentre os *Staphylococcus* spp. coagulase negativos, o *S. epidermidis* é a espécie mais prevalente (65% a 90%) encontrada na pele e mucosa humana (Vadyvaloo and Otto 2005).

Staphylococcus epidermidis foi considerado por muito tempo como relativamente inócuo (Vuong and Otto 2002). Foi proposto que o mesmo poderia ter uma função probiótica, impedindo a colonização do hospedeiro por patógenos mais importantes, como *S. aureus*, embora não haja comprovação (Otto 2009). Entretanto, nas últimas décadas, *S. epidermidis* emergiu como um problema de saúde em ambientes hospitalares (Vandecasteele et al. 2003; Hennig et al. 2007), causando infecções nosocomiais em pacientes imunocomprometidos

(submetidos a terapia imunossupressora, pacientes com AIDS e recém-nascidos prematuros), hospitalizados durante um longo período e em estado crítico (Ziebuhr 2001). É considerado o patógeno mais importante envolvido em bacteremia, endocardite, infecções cutâneas e osteomielite. (Vuong and Otto 2002).

Ao contrário de *S. aureus*, *S. epidermidis* geralmente não causa infecções piogênicas em pacientes saudáveis, com exceção da endocardite de válvula natural. Isto se deve ao seu potencial nitidamente reduzido de toxinas em relação ao *S. aureus* (Vuong and Otto 2002). Aparentemente apenas uma toxina, a δ -toxina, é produzida pelo *S. epidermidis*. Esta toxina é uma hemolisina localizada no locus *agr* (Otto et al. 1998) e atua através da formação de poros na membrana levando à lise de eritrócitos e outras células de mamíferos, sendo que a mesma não causa danos severos aos tecidos. Por isso, as infecções por *S. epidermidis* são geralmente subagudas ou crônicas (Vuong and Otto 2002).

O NISS (The Nosocomial Infections Surveillance System) reconhece *S. aureus* e SCN como os mais frequentes patógenos nosocomiais isolados de pacientes internados em UTIs (von Eiff et al. 2002), que causam infecções associadas principalmente ao uso de dispositivos implantáveis. No entanto, devido ao fato de *S. epidermidis* ser uma bactéria comensal, muitas vezes é difícil definir se um isolado representa o agente causador de uma infecção ou se representa uma contaminação. Conhecer os genes que determinam o sucesso de *S. epidermidis* como um patógeno oportunista é uma etapa decisiva para o planejamento de intervenções terapêuticas direcionadas para controlar infecções causadas por este microrganismo (Yao et al. 2005). Estudos recentes na investigação do genoma e na epidemiologia e fisiologia molecular têm auxiliado na definição da capacidade patogênica dos SCN (Ziebuhr et al. 2006).

2. Infecções relacionadas a cateter

Infecções associadas a dispositivos implantáveis são um grande problema na medicina moderna que utiliza cada vez mais procedimentos invasivos, tais como cateteres e próteses, proporcionando ao patógeno um novo habitat a ser colonizado (Schoenfelder et al. 2010). Somente nos Estados Unidos, estima-se que cerca de 180 milhões de cateteres vasculares periféricos e 7 milhões de cateteres venosos centrais (CVC) sejam utilizados anualmente (Hanna and Raad 2005; Rogers et al. 2009). Embora infecções por *S. epidermidis* raramente evoluam para doenças graves, infecções relacionadas a cateter permanecem sendo uma constante causa de infecção hospitalar, associada a elevados índices de morbidade e mortalidade, ao aumento na permanência hospitalar e nos custos. 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).

A etiologia das infecções associadas a materiais implantáveis é complexa e pode ser influenciada por uma série de variáveis como o tipo de dispositivo médico, a região anatômica da inserção, se é uma inserção totalmente interna ou percutânea e episódios de surtos hospitalares concomitante com cirurgias (Campoccia et al. 2009). Agentes como *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis* estão listados entre os principais patógenos causadores de infecção em dispositivos implantáveis (Arciola et al. 2005).

Staphylococcus spp. coagulase negativos, principalmente *S. epidermidis* representam a fonte mais comum de infecções em dispositivos médicos implantáveis, como CVCs, próteses ortopédicas, válvulas cardíacas, marcapassos e cateter para drenagem de fluido cefalorraquidiano (Mack et al. 2004; Mack et al. 2006). Entre os dispositivos intravenosos, o uso de CVC é frequentemente seguido por complicações locais e sistêmicas, incluindo tromboflebite

séptica, endocardite, infecções metastáticas e bacteremias. Estima-se que mais de 80% de todas as infecções da corrente sanguínea relacionada a cateter são associadas com CVCs. Estas infecções geralmente iniciam com a introdução da bactéria através da epiderme e mucosa do paciente durante a inserção do dispositivo, de modo que o seu aumento pode ser relacionado com a maior utilização de tais dispositivos (O'Grady et al. 2002; Otto 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). Além disso, comumente os cateteres são inseridos em situações de emergência, durante as quais as normas de assepsia nem sempre podem ser observadas atentamente (O'Grady et al. 2002). Muitas vezes, a remoção e reinserção do dispositivo tornam-se necessária (Vuong and Otto 2002), expondo o paciente a alto risco de recidiva (Montanaro et al. 2007).

Algumas das condições que têm sido apontadas como fatores de risco para o desenvolvimento de infecções relacionadas a dispositivos implantáveis são: 1) colonização da superfície externa no sítio da inserção por microorganismos que podem evoluir gradualmente ao redor do cateter - a colonização da pele é um forte preditor de infecções relacionadas a cateter; 2) colonização da superfície intraluminal do cateter durante sua utilização; 3) semeadura hematogênica do cateter durante uma bacteremia e 4) contaminação de fluidos ou drogas administrados por via intravenosa – sendo que os dois primeiros são os fatores de risco mais comumente identificados em infecções relacionadas a cateter (Eggimann et al. 2004). Apesar disso, na maioria das situações clínicas os benefícios do uso de dispositivos implantáveis são claros.

As taxas de colonização do cateter e de infecções da corrente sanguínea por microorganismos relacionados à inserção de cateteres podem variar de 5,8% a 71,4% e de

0,3% a 11,0%, respectivamente. Esta variação pode estar relacionada à metodologia adotada para realização da cultura bacteriológica bem como a diferentes grupos de pacientes (Eggimann et al. 2004).

Os mecanismos patogénicos em infecções associadas a implantes foram investigados e fatores importantes, como a expressão de adesinas, a produção de toxinas e a resistência aos antibióticos, estão sendo gradualmente reconhecidos. Estes fatores determinam a virulência de um microorganismo e a sua capacidade de colonizar a superfície de biomateriais, permitindo escapar da resposta imune e, eventualmente, resistir ao tratamento com antibióticos (Costerton et al. 2009).

3. Biofilme Bacteriano

Para que uma infecção se estabeleça, o patógeno deve apresentar alguns fatores de virulência contra as defesas do hospedeiro. Os mecanismos de defesa da pele humana são limitados, porém, após a penetração na barreira epitelial, uma bactéria como o *S. epidermidis* tem que enfrentar vários outros mecanismos adicionais. Uma das formas de defesa do microrganismo causando infecções em dispositivos implantáveis é principalmente sua habilidade de aderência a superfícies abióticas e formação de um biofilme bacteriano (Saginur et al. 2006).

Biofilmes são comunidades microbianas “sésseis” caracterizadas por células que são irreversivelmente ligadas a um substrato ou interface ou umas as outras, que são incorporadas em uma matriz polimérica chamada “slime”. As bactérias em biofilme exibem um fenótipo alterado no que diz respeito à taxa de crescimento e transcrição de genes (Donlan and Costerton 2002). Os biofilmes são estruturas altamente hidratadas que contém canais que permitem a difusão interna de nutrientes e oxigênio e também conferem proteção contra os mecanismos de defesa do hospedeiro e entrada de antimicrobianos, dificultando a difusão do fármaco nos tecidos (Donlan 2002).

3.1 Formação do biofilme

Com base em observações obtidas em experimentos utilizando diferentes espécies bacterianas, foi proposto um modelo de formação do biofilme em quatro etapas: adesão da superfície a ser colonizada, acúmulo subsequente em múltiplas camadas de células bacterianas, amadurecimento da arquitetura do biofilme e, finalmente, desprendimento de

células, que podem então iniciar um novo ciclo de formação de biofilme em outro lugar (Figura 1) (Costerton 1999; Rohde et al. 2010).

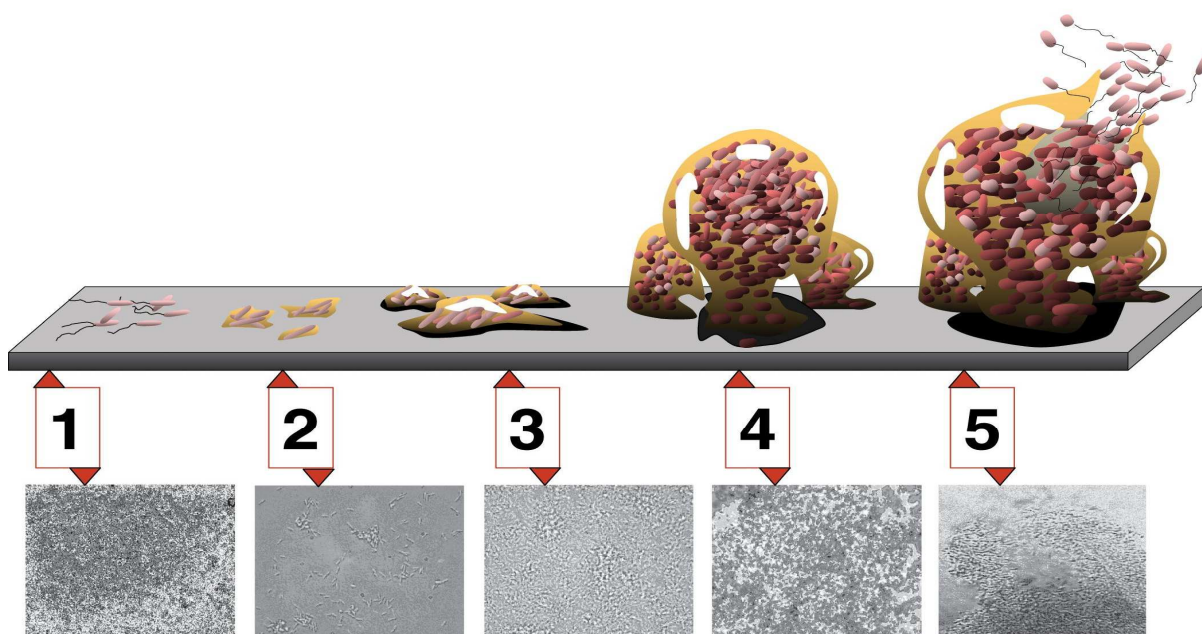


Figura 1. Modelo da formação de biofilme na superfície de cateter. Formação em quatro etapas: (1 e 2) adesão inicial, (3) acúmulo, (4) maturação e (5) desprendimento. * Adaptado de Monroe, 2007.

3.1.1 Adesão bacteriana

A adesão de estafilococos a dispositivos implantáveis é um processo complexo envolvendo uma variedade de fatores específicos e não específicos (Mack et al. 2006) entre o corpo estranho, o hospedeiro e os microorganismos (Vuong and Otto 2002) e representa o primeiro passo fundamental no desenvolvimento de infecções associadas a implantes (Arciola et al. 2002). A adesão regula processos essenciais e fornece sinais que afetam a morfologia, motilidade, expressão gênica e sobrevivência das células (Bustanji et al. 2003).

A etapa inicial da colonização ocorre após a colocação de um dispositivo implantável, sendo que a superfície polimérica do mesmo pode ser diretamente aderida pelo

microorganismo ou ser previamente recoberta com proteínas da matriz extracelular do hospedeiro (Vuong and Otto 2002). Estas proteínas extracelulares depositadas na superfície dos materiais implantados podem servir como receptores específicos para colonização de bactérias (Heilmann et al. 2003).

3.1.1.1 Adesão primária ao material não revestido

A adesão de *S. epidermidis* depende de propriedades físico-químicas da superfície polimérica e da superfície bacteriana. Como as superfícies plásticas são hidrofóbicas, e o principal parâmetro que determina a adesão é a hidrofobicidade da superfície bacteriana, a adesão primária de *S. epidermidis* tem sido similar em muitos biomateriais investigados (Vacheethasane et al. 1998).

Fatores envolvidos na fixação inicial na superfície do polímero incluem ligações não-específicas como interações eletrostáticas e hidrofóbicas, bem como adesinas específicas, incluindo duas fímbrias SSP-1 e SSP-2 (Veenstra et al. 1996), além das proteínas AtlE e Aae (Heilmann et al. 1997; Heilmann et al. 2003).

Proteínas fímbria da parede celular bacteriana, SSP-1 e SSP-2 medeiam a adesão de *S. epidermidis* ao poliestireno (Veenstra et al. 1996).

A principal adesina de *S. epidermidis*, a autolisina AtlE, é codificada pelo gene cromossômico *atlE* e tem alta similaridade com a principal autolisina de *S. aureus*. AtlE tem capacidade de se ligar diretamente à superfície polimérica e também de se ligar à vitronectina, sugerindo não somente uma função no início da adesão, mas também uma contribuição em estágios posteriores de aderência, envolvendo interações específicas com proteínas plasmáticas depositadas na superfície do polímero (Heilmann et al. 1997). Ainda não foi completamente elucidado como AtlE é capaz de se ligar especificamente a superfícies inertes. Estudos utilizando uma cepa com gene *atlE* mutante mostraram uma menor adesão ao

poliestireno, reduzindo “in vitro” a sua ligação a vitronectina e a hidrofobicidade. Além disso, este mutante não foi capaz de produzir biofilme (Heilmann et al. 1997), indicando um importante papel da AtlE na patogenicidade de *S. epidermidis* (Vadyvaloo and Otto 2005).

Recentemente, outra autolisina com propriedade bacteriolítica e adesiva, a Aae, foi identificada e caracterizada, sendo que a mesma tem capacidade de ligação à vitronectina e tem afinidade também à fibronectina e ao fibrinogênio (Heilmann et al. 2003).

Embora a adesão primária direta de *S. epidermidis* ao material plástico seja foco de investigação, ainda não está claro o significado deste mecanismo na formação de biofilme em dispositivos implantáveis, pois se sabe que o material plástico torna-se rapidamente revestido por proteínas do hospedeiro (Francois et al. 1998; Vuong and Otto 2002).

3.1.1.2 Adesão primária ao material revestido com proteínas extracelulares do hospedeiro

Um dispositivo implantável é prontamente revestido com proteínas do hospedeiro e a provável ligação de estafilococos a estas moléculas ocorre através de adesinas da superfície bacteriana, como SdrG (também conhecida como Fbe), GehD, EmbP e AtlE, que se ligam ao fibrinogênio, colágeno, fibronectina e vitronectina, respectivamente. Estas adesinas, produzidas por *S. epidermidis*, conhecidas como MSCRAMMs (“microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules”), são proteínas da superfície bacteriana que se ligam especificamente a proteínas da matriz extracelular do hospedeiro e compartilham uma estrutura de domínio semelhante, com atividade de ligação localizada no domínio N-terminal A, promovendo assim a fixação primária durante uma infecção (Sellman et al. 2008).

O MSCRAMMs mais estudado é o SdrG, uma proteína que facilita a interação de *S. epidermidis* ao fibrinogênio (Bowden et al. 2005). A expressão de SdrG aumenta “in vivo”

e anticorpos contra SdrG estão presentes no sangue humano, ressaltando a sua importância nas infecções por *S. epidermidis* (Sellman et al. 2008).

A proteína bacteriana Embp atua na ligação à fibronectina e é necessária para a fixação primária e subsequente acúmulo de biofilme em superfícies recobertas com fibronectina que, de outra maneira, não teriam suporte para a adesão. Dados recentes mostram que, além de sua propriedade de ligação às proteínas da matriz extracelular do hospedeiro, Embp também atua na adesão intercelular, sendo suficiente para a formação de biofilme em amostras *icaADBC* e *aap* negativas. Como a SdrG, a proteína Embp também é amplamente distribuída em isolados clínicos (Christner et al. 2010). Há evidências sugerindo que uma enzima metabólica secretada por *S. epidermidis*, a lipase GehD, atua na superfície celular como uma proteína de ligação e medeia a adesão do *S. epidermidis* ao colágeno (Bowden et al. 2002).

Também foi demonstrado que amostras produtoras de biofilme, dependendo das condições de crescimento, contêm consideráveis quantidades de ácidos teicóicos extracelulares (ECTA) (Sadovskaya et al. 2005), que aumentam a adesão a superfícies revestidas com fibronectina, sugerindo um provável papel na virulência de *S. epidermidis* (Hussain et al. 2001).

3.1.2 Acúmulo bacteriano

Após a adesão inicial, as bactérias se multiplicam e se acumulam como aglomerados de células em várias camadas (von Eiff et al. 2002). Nesta fase, a maioria dos estafilococos não tem contato direto com a superfície, mas permanece no biofilme pela expressão de mecanismos de adesão intercelular. (Rohde et al. 2007). Em estafilococos, a principal

molécula responsável pela agregação intercelular é um polissacarídeo mucóide e amorfo chamado Adesina Polissacarídica Intercelular (PIA). PIA é codificada pelo operon *ica* que contém os genes *icaADBC* (biossíntese) e *icaR* (regulação) (Heilmann et al. 1996; Gotz 2002). O locus *icaADBC* codifica as enzimas responsáveis pela síntese e desacetilação de PIA (Figura 2) (Heilmann et al. 1996; Vuong et al. 2004b). Alguns estudos indicam que o locus *ica* pode ser um marcador útil para diferenciar entre isolados contaminantes e infectantes. Por outro lado, outros estudos relataram uma alta incidência do gene *ica* entre *S. epidermidis* comensais, não conseguindo correlacioná-lo como uma marcador de infectividade (Frebouret et al. 2000; Vandercasteele et al. 2003; Rohde et al. 2004; Li et al. 2005; Cotter et al. 2009).

Quimicamente, PIA é um homopolímero linear composto de aproximadamente 130 resíduos de N-acetilglicosamina unidos por ligações β -1,6, das quais 15 a 20% são desacetiladas, contendo éster ligado a succinato e resíduos de fosfato, introduzindo simultaneamente cargas negativas e positivas ao polissacarídeo (Mack et al. 1996). A ocorrência conjunta de cargas negativas e positivas pode explicar a sua função na ligação estável de diferentes células em um biofilme (Rohde et al. 2006).

Foi proposto um modelo de biossíntese de PIA, combinando pesquisas prévias sobre o papel de *icaA*, *icaD* e *icaB*. Este modelo descreve a biossíntese de PIA em três passos: (1) adição de N-acetilglicosamina à cadeia de PIA em formação, pela ação combinada de *icaA* e *icaD*, (2) exportação a cadeia nascente de PIA, função principal do *icaC* e (3) desacetilação do PIA pelo *icaB* (Vuong et al. 2004).

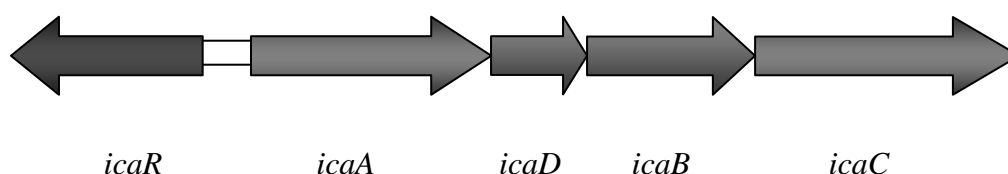


Figura 2. Operon *icaRADBC*

A produção de PIA e a sua desacetilação têm sido reconhecidas como fatores chave na virulência de *S. epidermidis* (Vuong et al. 2004; Fluckiger et al. 2005) e são os mecanismos predominantes no acúmulo em biofilme (Frank et al. 2004; Rohde et al. 2004). Porém, mais recentemente foi demonstrado que a produção de PIA não é essencial para a formação de biofilme em todas as amostras de *S. epidermidis* (Kogan et al. 2006). Além disso, algumas amostras isoladas de infecções associadas a biofilme não possuem os genes *ica* (Arciola et al. 2006). Sabe-se que a formação de biofilme por *S. epidermidis* está sujeita a variações ambientais, como concentrações sub-inibitórias de antimicrobianos, elevação da temperatura, anaerobiose, osmolaridade, entre outras, levando a uma mudança entre fenótipo positivo e negativo de biofilme (Cafiso et al. 2004). Isto pode, em amostras produtoras de PIA, estar geneticamente relacionado com a inativação reversível ou irreversível de *icaADBC* (Ziebuhr et al. 1999; Conlon et al. 2004). Ainda, deve-se ressaltar que os mecanismos envolvidos na formação de biofilme *icaADBC*-independente, podem estar inativos em culturas “in vitro” (Rohde et al. 2005). Por isso, um fenótipo negativo para biofilme apresentado nestas condições, não reflete necessariamente a incapacidade de uma amostra de *S. epidermidis* de formar um biofilme bacteriano (Christner et al. 2010).

Além de PIA, duas outras proteínas também parecem estar envolvidas na formação de biofilme. Uma é a proteína associada à acumulação – Aap (do inglês: accumulation-associated protein) (Hussain et al. 1997; Rohde et al. 2005) e a outra é a proteína associada a biofilme – Bap (do inglês: biofilm-associated protein) (Tormo et al. 2005).

No caso da formação de biofilme independente de PIA, proteínas adesivas muito provavelmente substituem o polissacarídeo, sendo que a mais importante proteína envolvida nesta formação parece ser Aap (Hussain et al. 1997; Rohde et al. 2005). Em estudos recentes, 27% das espécies isoladas de infecções de próteses ortopédicas, formavam biofilme independentemente de PIA, sendo que na maioria dos casos a formação de biofilme parecia

ser mediada por Aap (Rohde et al. 2007). Aap é uma proteína de 220KD que precisa ser proteoliticamente clivada em uma proteína menor de 140KD para poder induzir a formação de biofilme (Rohde et al. 2005). Como Aap é amplamente difundida entre isolados clínicos e a formação de biofilme *aap*-dependente pode ser demonstrada diretamente em amostras clínicas, supõe-se que a adesão intercelular mediada por Aap tenha grande relevância para a patogênese de infecções por *S. epidermidis* (Rohde et al. 2004; Rohde et al. 2005). As funções dos fatores envolvidos nas distintas fases da formação do biofilme estão resumidas na tabela 1.

Em *S. aureus* e SCN isolados de animais, uma proteína de superfície ligada à parede celular chamada Bap, está envolvida na aderência à superfície polimérica, adesão intercelular e formação de biofilme. Também foi sugerido que a expressão de Bap leva à formação de biofilme, mesmo na ausência do operon *icaADBC*, ressaltando a importância dessa proteína no estabelecimento de biofilmes. Um gene homólogo de *bap*, chamado *bhp*, ocorre em *S. epidermidis* de origem humana. A similaridade na sequência sugere que este gene está envolvido na formação de biofilmes em isolados humanos de *S. epidermidis* de uma maneira similar a *bap* em isolados de animais. No entanto, o mecanismo pelo qual Bap e, eventualmente, Bhp contribuem para a formação de biofilme ainda não está totalmente estabelecido (Cucarella et al. 2001; Tormo et al. 2005; Vadyvaloo and Otto 2005).

Estudos moleculares mostram novos aspectos sobre fatores de virulência de bactérias responsáveis por infecções em implantes. Recentemente, foi descoberto na matriz do biofilme uma série de importantes componentes estruturais, incluindo DNA extracelular (eDNA), além de polissacarídeos e proteínas. Essa constatação tem estimulado o interesse em substâncias como a dispersina B, uma enzima que degrada PNAG e DNase I, sendo a mesma capaz de destruir biofilmes atacando tanto PIA quanto DNA extracelular (eDNA) (Arciola 2009).

Tabela 1. Função dos fatores envolvidos nas distintas fases da formação do biofilme

Fase da formação biofilme	Gene	Função do produto do gene
Adesão Primária	<i>fbe/sdrG</i> <i>embp</i> <i>atle</i> <i>aae</i> <i>gehD</i>	*Adesão ao fibrinogênio *Adesão a fibronectina *Promoção da ligação à superfície do polímero; adesão a vitronectina *Promoção da ligação à superfície do polímero *Adesão ao colágeno
Acúmulo bacteriano	<i>icaADBC</i> <i>aap</i>	*Adesão intercelular dependente de PIA *Adesão intercelular PIA-independente

* Adaptado de Rohde et al.; 2006

3.1.3 Maturação do biofilme bacteriano

Em contraste com a agregação intercelular, a maturação do biofilme e o desprendimento de microorganismos plantônicos estão menos explicados em *S. epidermidis* (Otto 2009). Sabe-se que o biofilme maduro tem uma estrutura tridimensional chamada “torre” ou “cogumelo” (Costerton et al. 1995), por onde circulam nutrientes para as células nas camadas mais profundas do biofilme. Os mecanismos que levam a formação destes canais e a estruturação do biofilme não estão bem compreendidos em estafilococos, sendo que a expressão de PIA também pode contribuir para o amadurecimento do biofilme (Otto 2008).

3.2 Desprendimento do biofilme bacteriano

O desprendimento das células bacterianas do biofilme é fundamental para a disseminação e colonização de outros sítios. Vários fatores podem contribuir para o descolamento bacteriano: 1) forças mecânicas, como o fluxo sanguíneo; 2) interrupção da

produção de substâncias essenciais para o biofilme, como exopolissacarídeos; 3) fatores de desprendimento, como enzimas que destroem a matriz ou surfactantes. Entende-se que as enzimas que destroem o biofilme podem ser as mesmas relacionadas à sua estruturação. Estas enzimas quando produzidas em taxas elevadas, irão causar o descolamento, especialmente na superfície do biofilme. O descolamento mantém a espessura do biofilme e controla a taxa de disseminação bacteriana através de moléculas sinalizadoras do “quorum-sensing” (Otto 2008).

3.3 Regulação da formação de biofilme em *S. epidermidis*

Para que uma infecção se estabeleça a bactéria tem que regular a expressão de um grupo de moléculas que determinam a patogenicidade, conhecidas como fatores de virulência. A coordenação desses fatores, normalmente espécie-específica, é crucial para a sobrevivência do patógeno e da bem-sucedida invasão ao hospedeiro. Assim, os patógenos desenvolveram sofisticados sistemas de regulação para adaptar a expressão do gene de virulência à mudança das condições ambientais durante a infecção (Kong et al. 2006).

A formação de biofilme depende da sinergia de uma variedade de genes e é influenciada por variações ambientais, incluindo as condições de crescimento, suplementação de carboidratos, teor de dióxido de carbono e oxigênio, concentração de ferro, concentração sub-inibitória de antimicrobianos, osmolaridade e exposição ao etanol, indicando que a expressão de PIA e a formação de biofilme são um sistema fortemente regulado (Dobinsky et al. 2003; Mack et al. 2006; Mack et al. 2007). Esta regulação é frequentemente realizada por um sistema de intercomunicação bacteriana, que atua como um sensor de densidade populacional (“quorum sensing”) (Xu et al. 2006). Dependendo da fase da colonização, a

expressão coordenada dos genes sob o controle do sistema “quorum sensing” permitem: (1) tropismo do microorganismo por determinados sítios anatômicos; (2) acúmulo de células bacterianas em estruturas organizadas protegidas por polissacarídeos; e (3) o rompimento do biofilme após as células alcançarem sua densidade máxima e propagação da infecção através da dispersão de células plantônicas a colonização de novos sítios (Jefferson 2004). Muitas bactérias patogênicas empregam este sistema na regulação de seus fatores de virulência (Bassler 2002). Dois sistemas “quorum sensing” foram descritos em *Staphylococcus* spp. e ambos parecem ter influência na formação de biofilme. O mais conhecido é o gene regulador acessório ou *agr* “quorum sensing”, e o segundo sistema conhecido é o *luxS* (Novick 2003).

Em *S. epidermidis*, o gene *agr* controla a formação de biofilme, a atividade pró-inflamatória, incluindo a atividade quimiotática sobre neutrófilos humanos e a virulência nas infecções relacionadas a dispositivos através da secreção de peptídeos modificados chamados Modulina Fenol Solúvel — PSM (do inglês Phenol Soluble Modulin) (Vuong et al. 2003; Vuong et al. 2004a; Vuong et al. 2004c). A não funcionalidade do sistema *agr* facilita a fixação primária do patógeno à superfície, provavelmente devido ao aumento da regulação da adesão pela expressão de *atlE* e a diminuição na regulação do desprendimento de células plantônicas (Vuong et al. 2000). Recentemente, foi demonstrado que *agr* regula positivamente fatores de virulência necessários para lidar com mecanismos da defesa imune inata. (Mack et al. 2006). Ainda, *agr* parece não influenciar a expressão de PIA (Vuong et al. 2000; Mack et al. 2007).

O outro sistema “quorum sensing” encontrado em *Staphylococcus* spp. é o *luxS*. Dados mostraram que *luxS* tem um impacto significativo na formação de biofilme em *S. epidermidis*, pois a supressão do mesmo levou a um aumento na regulação da transcrição de *icaADBC*, resultando em um aumento na síntese de PIA (Mack et al. 2006; Xu et al. 2006). O gene *luxS* em *S. epidermidis* é funcional - a regulação dos genes *luxS*-dependentes inibem a formação de

biofilme “in vitro” e portanto diminuem o sucesso do patógeno em infecções associadas a biofilme (Xu et al. 2006).

Mais dois locus reguladores, o fator sigma alternativo σ^B e o regulador global *sarA* influenciam a formação de biofilme em *S. epidermidis*. A regulação e a função do fator σ^B na virulência de *S. aureus* e *S. epidermidis* estão bem caracterizadas sendo que o operon σ^B é constituído por quatro genes, *rsbU*, *rsbV*, *rsbW* e *sigB*. Mutantes de *S. epidermidis* *rsbU* apresentam um fenótipo de biofilme negativo, indicando que *rsbU* é um regulador positivo de fator σ^B e o mesmo tem um papel crucial na patogênese *S. epidermidis* (Knobloch et al. 2001; Knobloch et al. 2004). Em *S. epidermidis* o fator σ^B regula a formação de biofilme, enquanto que em *S. aureus*, o fator alternativo σ^B desempenha um papel menor e *sarA* é um regulador essencial (Cotter et al. 2009; Jager et al. 2009).

O regulador global *sarA* é uma proteína dimérica ligada ao DNA, que regula vários fatores de virulência e atua como um agente de transcrição. Ensaios demonstraram que *sarA* foi capaz de se ligar com alta afinidade à região promotora *ica*, indicando uma regulação direta na expressão de PIA (Vadyvaloo and Otto 2005). O gene *sarA* afeta a transcrição de *icaADBC* independentemente de *icaR* (Conlon et al. 2004; Tormo et al. 2005).

A regulação da expressão do operon *ica* é controlada pelo operon regulador R (Conlon et al. 2002). O gene *icaR* está ligado ao *icaADBC* e não é essencial para a expressão de PIA, mas atua como regulador negativo da transcrição de *icaADBC* (Gotz 2002; Jefferson et al. 2003). Em *S. epidermidis*, a expressão do *icaR* é reprimida indiretamente pelo fator alternativo σ^B (Knobloch et al. 2004). As condições ambientais que ativam σ^B resultam na repressão do gene *icaR* (Conlon et al. 2002; Fitzpatrick et al. 2005; Cotter et al. 2009).

A expressão de *icaA*, *icaD* e *icaC* são absolutamente necessárias para a síntese de PIA, mas têm sido encontrados *S. epidermidis* biofilme-negativos e *ica*-positivos, em que genes *icaA* e *icaC* são inativados pela inserção de uma sequência IS256 (Ziebuhr et al. 1997;

Ziebuhr et al. 1999). A inserção IS256 pode se associar com os genes *ica*, abolindo assim a produção de PIA (Ziebuhr et al. 1999; Conlon et al. 2004). Amostras com IS256 integradas aos genes *ica* e *agr* tem sido isoladas de infecção (Kozitskaya et al. 2004; Vuong et al. 2004). Ainda, a presença de IS256 parece estar correlacionada com amostras de *S. epidermidis* invasivas (Kozitskaya et al. 2004; Gu et al. 2005). No entanto, embora IS256 possa ter um papel na adaptação da população bacteriana, permitindo assim uma versatilidade bacteriana, provavelmente não se pode chamá-lo de um verdadeiro regulador.

Apesar de elementos como IS256, adesinas, toxinas e o locus *ica* serem encontrados predominantemente em isolados clínicos, torna-se cada vez mais claro que o potencial de virulência de uma cepa não depende exclusivamente de um único fator. Nesta visão, a virulência parece ser um fenômeno complexo dependente de um painel de características de virulência, assim como da ação dos genes que regulam e coordenam a sua expressão (Montanaro et al. 2007).

3.4 Resistência em biofilme

Infecções representam uma das complicações importantes relacionadas a dispositivos implantáveis. Atualmente, a terapia convencional baseada no uso de antibióticos ainda representa a principal estratégia para prevenir e tratar estas infecções.

Nos últimos anos, amostras resistentes à meticilina, um antibiótico de primeira escolha contra estafilococos, tem aumentado. Cerca de 80% de *S. epidermidis* isolados de infecções hospitalares são resistentes à meticilina (Vuong and Otto 2002).

Após o estabelecimento de uma infecção e a formação de um biofilme organizado na superfície do implante, terapias com antibióticos são menos eficazes e muitas vezes a

remoção do implante e sua substituição são as únicas maneiras de erradicar o problema (Montanaro et al. 2007; Costerton et al. 2009).

Comparado com as respectivas populações plantônicas, o modo de crescimento sésil está associado a um importante aumento na resistência aos antimicrobianos (Costerton et al. 1999; Lewis 2005). A concentração de antimicrobiano necessária para eliminar bactérias produtoras de biofilme é de 100 a 1000 vezes maior que a necessária para eliminar as mesmas espécies em estado plantônico (Stewart and Costerton 2001; Frank and Patel 2007). Isto provavelmente advém da dificuldade de alguns antimicrobianos difundirem através da camada polissacarídica ou porque células dentro de biofilme diferem fisiologicamente de células plantônicas. A proximidade dos microorganismos dentro de um biofilme também facilita a disseminação dos vários determinantes de resistência antimicrobiana, através da transferência horizontal de genes. Este processo parece ser uma importante causa de resistência, pois uma célula bacteriana pode transferir rapidamente os genes de resistência a muitas outras espécies através do crescimento de uma subpopulação de bactérias, conhecidas como células “persisters”, em locais mais profundos do biofilme (Donlan 2001; Trautner and Darouiche 2004). Estas células desempenham um papel fundamental na falha terapêutica de infecções associadas a biofilme (Lewis 2005).

A emergência da resistência aos antibióticos e a dificuldade na identificação de novas classes de agentes antimicrobianos têm impulsionado a investigação de novas estratégias terapêuticas, como o uso de moléculas capazes de silenciar genes de virulência e terapia gênica em infecções. A interferência na regulação dos fatores de virulência como o *agr* também parece ser uma abordagem terapêutica promissora (Costerton et al. 2009).

4. Detecção Laboratorial de Biofilme

A formação de biofilme em *S. epidermidis* obtidos de CVC tem sido extensivamente documentada nas últimas décadas (Arciola et al. 2006). Isto determina a importância da realização de métodos diagnósticos capazes de identificar corretamente a produção de biofilme em isolados clínicos de *S. epidermidis*.

4.1 Caracterização Fenotípica

Uma série de métodos fenotípicos foram desenvolvidos para o cultivo e quantificação de biofilme: teste em tubo, teste em microplaca com cristal violeta, radiomarcção, microscopia (Deighton et al. 2001; Stepanovic et al. 2007) e teste em ágar Congo Red (ACR) (Arciola et al. 2002). No entanto, o teste em microplaca de poliestireno e o teste em ACR permanecem sendo os mais utilizados na investigação fenotípica da formação de biofilme.

O teste em microplaca de poliestireno com cristal violeta foi desenvolvido por Christensen et al. (1985) e modificado por Stepanovic et al. (2000). Este método utiliza uma microplaca de 96 poços que permite determinar semiquantitativamente a formação de biofilme através da leitura da densidade ótica (D.O.) (Arciola et al. 2006). O biofilme formado é corado com cristal violeta a 0,5%. Deste modo, é possível fazer uma estimativa direta da presença macroscópica do biofilme bacteriano aderido ao fundo da placa de poliestireno. Em 2007, Stepanovic et al. propuseram modificações importantes sobre a quantificação na formação de biofilme em estafilococos, fornecendo detalhes de todas as etapas envolvidas na formação que frequentemente faltam na literatura e identificando os problemas mais importantes ocorridos na realização do ensaio. (Anexo 1)

O teste em ACR foi descrito por Freeman et al. (1989) para a detecção da produção de PIA. Esta técnica é baseada na análise direta das colônias crescidas em meio de cultura com Congo Red suplementado com sacarose. É realizada uma avaliação cromática a qual permite a identificação de amostras produtoras de PIA, que aparecem como colônias pretas e amostras não produtoras de PIA que apresentam colônias de cor vermelha. Este ensaio não é quantitativo, visto que se baseia em parâmetros visuais, portanto subjetivos (Arciola et al. 2006). (Anexo 2)

4.2 Caracterização Genotípica

Técnicas moleculares têm sido utilizadas para a detecção dos genes envolvidos no processo de formação de biofilme. Estudos epidemiológicos utilizando análises moleculares têm fornecido novos avanços para a compreensão da origem, disseminação e evolução de bactérias patogênicas. Diversos métodos envolvendo análise do DNA bacteriano, baseadas em análises de elementos genéticos cromossômicos ou extracromossômicos, têm sido utilizados no estudo de biofilmes (Levy 2000).

O estudo de uma região específica do genoma de determinado organismo permite identificar os genes de virulência através do uso da Reação de Cadeia da Polimerase — PCR (do inglês, Polymerase Chain Reaction). Esta ferramenta molecular é capaz de amplificar exponencialmente a região genômica de interesse, seja através da amplificação de um único gene específico ou através do método multiplex, em que amplifica vários genes ao mesmo tempo.

As reações de PCR são extremamente versáteis e com baixo custo para investigar e realizar triagem de isolados quanto à presença de determinadas características genotípicas. Esta técnica utiliza iniciadores (primers) específicos para os genes a serem pesquisados, sendo

a escolha correta destes primers fundamental para obter os melhores níveis de sensibilidade e especificidade (Campoccia et al. 2009).

PCR é largamente utilizado na investigação dos genes responsáveis pela formação do biofilme, como *atle*, *embp*, *fbe*, *ica*, *aap*, entre outros (Heilmann et al. 1996; Vuong et al. 2004; de Araujo et al. 2006; Rohde et al. 2007). Não é possível assegurar a pesquisa de todos os genes envolvidos na formação de biofilme, seja pela dificuldade técnica ou pelo fato de não ser completamente elucidada a função de cada gene. A detecção dos genes *icaA* e *icaD* pelo método individual e dos genes *aap* e *atle* através de multiplex PCR permite uma boa avaliação da formação de biofilme.

OBJETIVOS

Geral

Avaliar a produção de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* isolados de cateter venoso central de pacientes internados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), através de métodos fenotípicos e genotípicos.

Específicos

Determinar a produção fenotípica de biofilme através da técnica de adesão em microplaca e do crescimento em meio de cultura ágar Congo Red.

Identificar a produção de Adesina Polissacarídica Intercelular (PIA) através da detecção molecular dos genes *icaA* e *icaD* pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Determinar a presença dos genes *atlE* e *aap* através da técnica de PCR

Comparar o desempenho dos métodos fenotípicos e genotípicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arciola, C. R. (2009). "New concepts and new weapons in implant infections." *Int J Artif Organs* 32(9): 533-6.
- Arciola, C. R., An, Y. H., Campoccia, D., Donati, M. E. and Montanaro, L. (2005). "Etiology of implant orthopedic infections: a survey on 1027 clinical isolates." *Int J Artif Organs* 28(11): 1091-100.
- Arciola, C. R., Baldassarri, L. and Montanaro, L. (2002). "In catheter infections by *Staphylococcus epidermidis* the intercellular adhesion (ica) locus is a molecular marker of the virulent slime-producing strains." *J Biomed Mater Res* 59(3): 557-62.
- Arciola, C. R., Campoccia, D., Baldassarri, L., Donati, M. E., Pirini, V., Gamberini, S. and Montanaro, L. (2006). "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* 76(2): 425-30.
- Arciola, C. R., Campoccia, D., Gamberini, S., Cervellati, M., Donati, E. and Montanaro, L. (2002). "Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for ica locus." *Biomaterials* 23(21): 4233-9.
- Bassler, B. L. (2002). "Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria." *Cell* 109(4): 421-4.
- Bowden, M. G., Chen, W., Singvall, J., Xu, Y., Peacock, S. J., Valtulina, V., Speziale, P. and Hook, M. (2005). "Identification and preliminary characterization of cell-wall-anchored proteins of *Staphylococcus epidermidis*." *Microbiology* 151(Pt 5): 1453-64.
- Bowden, M. G., Visai, L., Longshaw, C. M., Holland, K. T., Speziale, P. and Hook, M. (2002). "Is the GehD lipase from *Staphylococcus epidermidis* a collagen binding adhesin?" *J Biol Chem* 277(45): 43017-23.
- Bustanji, Y., Arciola, C. R., Conti, M., Mandello, E., Montanaro, L. and Samori, B. (2003). "Dynamics of the interaction between a fibronectin molecule and a living bacterium under mechanical force." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(23): 13292-7.

- Cafiso, V., Bertuccio, T., Santagati, M., Campanile, F., Amicosante, G., Perilli, M. G., Selan, L., Artini, M., Nicoletti, G. and Stefani, S. (2004). "Presence of the ica operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production." *Clin Microbiol Infect* 10(12): 1081-8.
- Campoccia, D., Montanaro, L. and Arciola, C. R. (2009). "Current methods for molecular epidemiology studies of implant infections." *Int J Artif Organs* 32(9): 642-54.
- Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M. and Beachey, E. H. (1985). "Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices." *J Clin Microbiol* 22(6): 996-1006.
- Christner, M., Franke, G. C., Schommer, N. N., Wendt, U., Wegert, K., Pehle, P., Kroll, G., Schulze, C., Buck, F., Mack, D., Aepfelbacher, M. and Rohde, H. (2010). "The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin." *Mol Microbiol* 75(1): 187-207.
- Conlon, K. M., Humphreys, H. and O'Gara, J. P. (2002). "icaR encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of ica operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*." *J Bacteriol* 184(16): 4400-8.
- Conlon, K. M., Humphreys, H. and O'Gara, J. P. (2002). "Regulation of icaR gene expression in *Staphylococcus epidermidis*." *FEMS Microbiol Lett* 216(2): 171-7.
- Conlon, K. M., Humphreys, H. and O'Gara, J. P. (2004). "Inactivations of rsbU and sarA by IS256 represent novel mechanisms of biofilm phenotypic variation in *Staphylococcus epidermidis*." *J Bacteriol* 186(18): 6208-19.
- Costerton, J. W. (1999). "Introduction to biofilm." *Int J Antimicrob Agents* 11(3-4): 217-21; discussion 237-9.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. and Lappin-Scott, H. M. (1995). "Microbial biofilms." *Annu Rev Microbiol* 49: 711-45.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. and Greenberg, E. P. (1999). "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections." *Science* 284(5418): 1318-22.

- Costerton, W. J., Montanaro, L., Balaban, N. and Arciola, C. R. (2009). "Prospecting gene therapy of implant infections." *Int J Artif Organs* 32(9): 689-95.
- Cotter, J. J., O'Gara, J. P., Mack, D. and Casey, E. (2009). "Oxygen-mediated regulation of biofilm development is controlled by the alternative sigma factor sigma(B) in *Staphylococcus epidermidis*." *Appl Environ Microbiol* 75(1): 261-4.
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I. and Penades, J. R. (2001). "Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation." *J Bacteriol* 183(9): 2888-96.
- 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. and Teixeira, L. A. (2006). "Commensal isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* are also well equipped to produce biofilm on polystyrene surfaces." *J Antimicrob Chemother* 57(5): 855-64.
- Deighton, M. A., Capstick, J., Domalewski, E. and van Nguyen, T. (2001). "Methods for studying biofilms produced by *Staphylococcus epidermidis*." *Methods Enzymol* 336: 177-95.
- Dobinsky, S., Kiel, K., Rohde, H., Bartscht, K., Knobloch, J. K., Horstkotte, M. A. and Mack, D. (2003). "Glucose-related dissociation between icaADBC transcription and biofilm expression by *Staphylococcus epidermidis*: evidence for an additional factor required for polysaccharide intercellular adhesin synthesis." *J Bacteriol* 185(9): 2879-86.
- Donlan, R. M. (2001). "Biofilms and device-associated infections." *Emerg Infect Dis* 7(2): 277-81.
- Donlan, R. M. (2002). "Biofilms: microbial life on surfaces." *Emerg Infect Dis* 8(9): 881-90.
- Donlan, R. M. and Costerton, J. W. (2002). "Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms." *Clin Microbiol Rev* 15(2): 167-93.
- Eggimann, P., Sax, H. and Pittet, D. (2004). "Catheter-related infections." *Microbes Infect* 6(11): 1033-42.

- Fitzpatrick, F., Humphreys, H. and O'Gara, J. P. (2005). "The genetics of staphylococcal biofilm formation--will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection?" *Clin Microbiol Infect* 11(12): 967-73.
- Fluckiger, U., Ulrich, M., Steinhuber, A., Doring, G., Mack, D., Landmann, R., Goerke, C. and Wolz, C. (2005). "Biofilm formation, icaADBC transcription, and polysaccharide intercellular adhesin synthesis by staphylococci in a device-related infection model." *Infect Immun* 73(3): 1811-9.
- Francois, P., Vaudaux, P. and Lew, P. D. (1998). "Role of plasma and extracellular matrix proteins in the physiopathology of foreign body infections." *Ann Vasc Surg* 12(1): 34-40.
- Frank, K. L., Hanssen, A. D. and Patel, R. (2004). "icaA is not a useful diagnostic marker for prosthetic joint infection." *J Clin Microbiol* 42(10): 4846-9.
- Frank, K. L. and Patel, R. (2007). "Activity of sodium metabisulfite against planktonic and biofilm *Staphylococcus* species." *Diagn Microbiol Infect Dis* 57(4): 355-9.
- Frebourg, N. B., Lefebvre, S., Baert, S. and Lemeland, J. F. (2000). "PCR-Based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains." *J Clin Microbiol* 38(2): 877-80.
- Freeman, D. J., Falkiner, F. R. and Keane, C. T. (1989). "New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci." *J Clin Pathol* 42(8): 872-4.
- Gotz, F. (2002). "*Staphylococcus* and biofilms." *Mol Microbiol* 43(6): 1367-78.
- Gu, J., Li, H., Li, M., Vuong, C., Otto, M., Wen, Y. and Gao, Q. (2005). "Bacterial insertion sequence IS256 as a potential molecular marker to discriminate invasive strains from commensal strains of *Staphylococcus epidermidis*." *J Hosp Infect* 61(4): 342-8.
- Hanna, R. and Raad, II (2005). "Diagnosis of catheter-related bloodstream infection." *Curr Infect Dis Rep* 7(6): 413-9.
- Heilmann, C., Hussain, M., Peters, G. and Gotz, F. (1997). "Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface." *Mol Microbiol* 24(5): 1013-24.

- Heilmann, C., Schweitzer, O., Gerke, C., Vanittanakom, N., Mack, D. and Gotz, F. (1996). "Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*." *Mol Microbiol* 20(5): 1083-91.
- Heilmann, C., Thumm, G., Chhatwal, G. S., Hartleib, J., Uekotter, A. and Peters, G. (2003). "Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*." *Microbiology* 149(Pt 10): 2769-78.
- Hennig, S., Nyunt Wai, S. and Ziebuhr, W. (2007). "Spontaneous switch to PIA-independent biofilm formation in an ica-positive *Staphylococcus epidermidis* isolate." *Int J Med Microbiol* 297(2): 117-22.
- Huebner, J. and Goldmann, D. A. (1999). "Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens." *Annu Rev Med* 50: 223-36.
- Hussain, M., Heilmann, C., Peters, G. and Herrmann, M. (2001). "Teichoic acid enhances adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to immobilized fibronectin." *Microb Pathog* 31(6): 261-70.
- Hussain, M., Herrmann, M., von Eiff, C., Perdreau-Remington, F. and Peters, G. (1997). "A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces." *Infect Immun* 65(2): 519-24.
- Jager, S., Jonas, B., Pfanzelt, D., Horstkotte, M. A., Rohde, H., Mack, D. and Knobloch, J. K. (2009). "Regulation of biofilm formation by sigma B is a common mechanism in *Staphylococcus epidermidis* and is not mediated by transcriptional regulation of sarA." *Int J Artif Organs* 32(9): 584-91.
- Jefferson, K. K. (2004). "What drives bacteria to produce a biofilm?" *FEMS Microbiol Lett* 236(2): 163-73.
- Jefferson, K. K., Cramton, S. E., Gotz, F. and Pier, G. B. (2003). "Identification of a 5-nucleotide sequence that controls expression of the ica locus in *Staphylococcus aureus* and characterization of the DNA-binding properties of IcaR." *Mol Microbiol* 48(4): 889-99.
- Knobloch, J. K., Bartscht, K., Sabottke, A., Rohde, H., Feucht, H. H. and Mack, D. (2001). "Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator

- of the sigB operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress." *J Bacteriol* 183(8): 2624-33.
- Knobloch, J. K., Jager, S., Horstkotte, M. A., Rohde, H. and Mack, D. (2004). "RsbU-dependent regulation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation is mediated via the alternative sigma factor sigmaB by repression of the negative regulator gene icaR." *Infect Immun* 72(7): 3838-48.
- Kogan, G., Sadovskaya, I., Chaignon, P., Chokr, A. and Jabbouri, S. (2006). "Biofilms of clinical strains of *Staphylococcus* that do not contain polysaccharide intercellular adhesin." *FEMS Microbiol Lett* 255(1): 11-6.
- Kong, K. F., Vuong, C. and Otto, M. (2006). "*Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection." *Int J Med Microbiol* 296(2-3): 133-9.
- Kozitskaya, S., Cho, S. H., Dietrich, K., Marre, R., Naber, K. and Ziebuhr, W. (2004). "The bacterial insertion sequence element IS256 occurs preferentially in nosocomial *Staphylococcus epidermidis* isolates: association with biofilm formation and resistance to aminoglycosides." *Infect Immun* 72(2): 1210-5.
- Levy, C.E. Métodos Clássicos e de Biologia Molecular Aplicados ao Controle de Infecções Hospitalares. In: Fernandes AT, Fernandes MOV, Ribeiro Filho N, editores. Infecção Hospitalar e suas Interfaces na Área daSaúde. São Paulo: Atheneu; 2000: 1600-9
- Lewis, K. (2005). "Persister cells and the riddle of biofilm survival." *Biochemistry (Mosc)* 70(2): 267-74.
- Li, H., Xu, L., Wang, J., Wen, Y., Vuong, C., Otto, M. and Gao, Q. (2005). "Conversion of *Staphylococcus epidermidis* strains from commensal to invasive by expression of the ica locus encoding production of biofilm exopolysaccharide." *Infect Immun* 73(5): 3188-91.
- Mack, D., Becker, P., Chatterjee, I., Dobinsky, S., Knobloch, J. K., Peters, G., Rohde, H. and Herrmann, M. (2004). "Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses." *Int J Med Microbiol* 294(2-3): 203-12.

- Mack, D., Davies, A. P., Harris, L. G., Rohde, H., Horstkotte, M. A. and Knobloch, J. K. (2007). "Microbial interactions in *Staphylococcus epidermidis* biofilms." *Anal Bioanal Chem* 387(2): 399-408.
- Mack, D., Fischer, W., Krokotsch, A., Leopold, K., Hartmann, R., Egge, H. and Laufs, R. (1996). "The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis." *J Bacteriol* 178(1): 175-83.
- Mack, D., Rohde, H., Harris, L. G., Davies, A. P., Horstkotte, M. A. and Knobloch, J. K. (2006). "Biofilm formation in medical device-related infection." *Int J Artif Organs* 29(4): 343-59.
- Mah, T. F. and O'Toole, G. A. (2001). "Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents." *Trends Microbiol* 9(1): 34-9.
- Monroe, D. (2007). "Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms." *PLoS Biol* 5(11): e307.
- Montanaro, L., Campoccia, D. and Arciola, C. R. (2007). "Advancements in molecular epidemiology of implant infections and future perspectives." *Biomaterials* 28(34): 5155-68.
- Novick, R. P. (2003). "Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence." *Mol Microbiol* 48(6): 1429-49.
- 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, II, Randolph, A. and Weinstein, R. A. (2002). "Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. Centers for Disease Control and Prevention." *MMWR Recomm Rep* 51(RR-10): 1-29.
- Oncu, S., Ozturk, B., Kurt, I. and Sakarya, S. (2004). "Elimination of intraluminal colonization by antibiotic lock in catheters." *Tohoku J Exp Med* 203(1): 1-8.
- Otto, M. (2008). "Staphylococcal biofilms." *Curr Top Microbiol Immunol* 322: 207-28.
- Otto, M. (2009). "*Staphylococcus epidermidis* - the 'accidental' pathogen." *Nat Rev Microbiol* 7(8): 555-67.

- Otto, M., Sussmuth, R., Jung, G. and Gotz, F. (1998). "Structure of the pheromone peptide of the *Staphylococcus epidermidis agr* system." *FEBS Lett* 424(1-2): 89-94.
- Qin, Z., Yang, X., Yang, L., Jiang, J., Ou, Y., Molin, S. and Qu, D. (2007). "Formation and properties of in vitro biofilms of ica-negative *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates." *J Med Microbiol* 56(Pt 1): 83-93.
- Rogers, K. L., Fey, P. D. and Rupp, M. E. (2009). "Coagulase-negative staphylococcal infections." *Infect Dis Clin North Am* 23(1): 73-98.
- Rohde, H., Burandt, E. C., Siemssen, N., Frommelt, L., Burdelski, C., Wurster, S., Scherpe, S., Davies, A. P., Harris, L. G., Horstkotte, M. A., Knobloch, J. K., Rangunath, C., Kaplan, J. B. and Mack, D. (2007). "Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections." *Biomaterials* 28(9): 1711-20.
- Rohde, H., Burdelski, C., Bartscht, K., Hussain, M., Buck, F., Horstkotte, M. A., Knobloch, J. K., Heilmann, C., Herrmann, M. and Mack, D. (2005). "Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases." *Mol Microbiol* 55(6): 1883-95.
- Rohde, H., Frankenberger, S., Zahringer, U. and Mack, D. (2010). "Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections." *Eur J Cell Biol* 89(1): 103-11.
- Rohde, H., Kalitzky, M., Kroger, N., Scherpe, S., Horstkotte, M. A., Knobloch, J. K., Zander, A. R. and Mack, D. (2004). "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* 42(12): 5614-9.
- Rohde, H., Mack, D., Christner, M., Burdelski, C., Franke, G. C. and Knobloch, J. K. (2006). "Pathogenesis of staphylococcal device-related infections: from basic science to new diagnostic, therapeutic and prophylactic approaches." *Reviews in medical microbiology* 17: 45-54.

- Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Flahaut, S., Kogan, G. and Jabbouri, S. (2005). "Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A." *Infect Immun* 73(5): 3007-17.
- Saginur, R., Stdenis, M., Ferris, W., Aaron, S. D., Chan, F., Lee, C. and Ramotar, K. (2006). "Multiple combination bactericidal testing of staphylococcal biofilms from implant-associated infections." *Antimicrob Agents Chemother* 50(1): 55-61.
- Schoenfelder, S. M., Lange, C., Eckart, M., Hennig, S., Kozytska, S. and Ziebuhr, W. (2010). "Success through diversity - How *Staphylococcus epidermidis* establishes as a nosocomial pathogen." *Int J Med Microbiol.*, doi: 10.1016/j.ijmm.2010.04.011
- Sellman, B. R., Timofeyeva, Y., Nanra, J., Scott, A., Fulginiti, J. P., Matsuka, Y. V. and Baker, S. M. (2008). "Expression of *Staphylococcus epidermidis* SdrG increases following exposure to an in vivo environment." *Infect Immun* 76(7): 2950-7.
- Speziale, P., Visai, L., Rindi, S., Pietrocola, G., Provenza, G. and Provenzano, M. (2008). "Prevention and treatment of *Staphylococcus* biofilms." *Curr Med Chem* 15(30): 3185-95.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B. and Svabic-Vlahovic, M. (2000). "A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation." *J Microbiol Methods* 40(2): 175-9.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukic, S., Cirkovic, I. and Ruzicka, F. (2007). "Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci." *Apmis* 115(8): 891-9.
- Stewart, P. S. and Costerton, J. W. (2001). "Antibiotic resistance of bacteria in biofilms." *Lancet* 358(9276): 135-8.
- Tormo, M. A., Knecht, E., Gotz, F., Lasa, I. and Penades, J. R. (2005). "Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer?" *Microbiology* 151(Pt 7): 2465-75.

- Tormo, M. A., Marti, M., Valle, J., Manna, A. C., Cheung, A. L., Lasa, I. and Penades, J. R. (2005). "SarA is an essential positive regulator of *Staphylococcus epidermidis* biofilm development." *J Bacteriol* 187(7): 2348-56.
- Trautner, B. W. and Darouiche, R. O. (2004). "Catheter-associated infections: pathogenesis affects prevention." *Arch Intern Med* 164(8): 842-50.
- Vacheethasanee, K., Temenoff, J. S., Higashi, J. M., Gary, A., Anderson, J. M., Bayston, R. and Marchant, R. E. (1998). "Bacterial surface properties of clinically isolated *Staphylococcus epidermidis* strains determine adhesion on polyethylene." *J Biomed Mater Res* 42(3): 425-32.
- Vadyvaloo, V. and Otto, M. (2005). "Molecular genetics of *Staphylococcus epidermidis* biofilms on indwelling medical devices." *Int J Artif Organs* 28(11): 1069-78.
- Vandecasteele, S. J., Peetermans, W. E., R, R. M., Rijnders, B. J. and Van Eldere, J. (2003). "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* 9(2): 114-9.
- Veenstra, G. J., Cremers, F. F., van Dijk, H. and Fleer, A. (1996). "Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*." *J Bacteriol* 178(2): 537-41.
- von Eiff, C., Peters, G. and Heilmann, C. (2002). "Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci." *Lancet Infect Dis* 2(11): 677-85.
- Vuong, C., Durr, M., Carmody, A. B., Peschel, A., Klebanoff, S. J. and Otto, M. (2004a). "Regulated expression of pathogen-associated molecular pattern molecules in *Staphylococcus epidermidis*: quorum-sensing determines pro-inflammatory capacity and production of phenol-soluble modulins." *Cell Microbiol* 6(8): 753-9.
- Vuong, C., Gerke, C., Somerville, G. A., Fischer, E. R. and Otto, M. (2003). "Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*." *J Infect Dis* 188(5): 706-18.

- Vuong, C., Kocianova, S., Voyich, J. M., Yao, Y., Fischer, E. R., DeLeo, F. R. and Otto, M. (2004b). "A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence." *J Biol Chem* 279(52): 54881-6.
- Vuong, C., Kocianova, S., Yao, Y., Carmody, A. B. and Otto, M. (2004c). "Increased colonization of indwelling medical devices by quorum-sensing mutants of *Staphylococcus epidermidis* in vivo." *J Infect Dis* 190(8): 1498-505.
- Vuong, C. and Otto, M. (2002). "*Staphylococcus epidermidis* infections." *Microbes Infect* 4(4): 481-9.
- Vuong, C., Saenz, H. L., Gotz, F. and Otto, M. (2000). "Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*." *J Infect Dis* 182(6): 1688-93.
- Wolcott, R. D. and Ehrlich, G. D. (2008). "Biofilms and chronic infections." *Jama* 299(22): 2682-4.
- Xu, L., Li, H., Vuong, C., Vadyvaloo, V., Wang, J., Yao, Y., Otto, M. and Gao, Q. (2006). "Role of the luxS quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*." *Infect Immun* 74(1): 488-96.
- Yao, Y., Sturdevant, D. E., Villaruz, A., Xu, L., Gao, Q. and Otto, M. (2005). "Factors characterizing *Staphylococcus epidermidis* invasiveness determined by comparative genomics." *Infect Immun* 73(3): 1856-60.
- Ziebuhr, W. (2001). "*Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*: emerging pathogens in nosocomial infections." *Contrib Microbiol* 8: 102-7.
- Ziebuhr, W., Heilmann, C., Gotz, F., Meyer, P., Wilms, K., Straube, E. and Hacker, J. (1997). "Detection of the intercellular adhesion gene cluster (ica) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates." *Infect Immun* 65(3): 890-6.
- Ziebuhr, W., Hennig, S., Eckart, M., Kranzler, H., Batzilla, C. and Kozitskaya, S. (2006). "Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen." *Int J Antimicrob Agents* 28 Suppl 1: S14-20.

Ziebuhr, W., Krimmer, V., Rachid, S., Lossner, I., Gotz, F. and Hacker, J. (1999). "A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256." *Mol Microbiol* 32(2): 345-56.

ARTIGO

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

Cyntia Lazzarotto, Ana Lúcia S. Antunes, Jaqueline B. Pinto, Jéssica W. Bonfanti, Leandro R. R. Perez, Camille C. F. Pinto , Ana Lúcia P. Freitas, Alexandre J. Macedo, Afonso L. Barth

(Artigo será submetido ao Journal of Microbiological Methods)

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

Cyntia Lazzarotto^{a/*}, Ana Lúcia S. Antunes^b, Jaqueline B. Pinto^b, Jéssica W. Bonfanti^b, Leandro R. R. Perez^b, Camille C. F. Pinto^b, Ana Lúcia P. Freitas^b, Alexandre J. Macedo^{b,c}, Afonso L. Barth^{a,b}

^aHospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

^bFaculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^cCentro 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: cyntialazzarotto@hotmail.com

ABSTRACT

Staphylococcus epidermidis is the most frequently isolated organism from central venous catheter (CVC) and this is mostly due to its ability to form biofilm in 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 evaluate two different phenotypic methods (the microtiter plate and the Congo Red Agar - CRA) for detection of biofilm in 166 *S. epidermidis* obtained from CVC. In addition, we established the presence of genetic markers (*icaA*, *icaD*, *atlE* and *aap* genes) among the biofilm producers and non-producers. The microtiter plate method was positive for 107 (64%) and the CRA for 90 (54%) isolates. The presence of *icaA* and *icaD* genes was detected in 97% (104/107) of the biofilm-positive isolates. The *aap* and *atlE* genes were present in 77% and in

92% of the 107 biofilm-producing isolates, respectively. We also found 3 biofilm-producing isolates which are negative for the presence of *icaA* and *icaD*, i.e., “*ica*-independent”. 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 sensitivity and specificity. The above findings confirm that *S. epidermidis* biofilm formation is a multi-factorial process which is influenced by genetic traits and by the environment on the site of infection.

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

1. Introduction

Staphylococcus epidermidis is part of the normal flora on human skin and mucous membranes but has emerged as an important pathogen in indwelling medical device-related infections. Moreover, this bacterium has acquired multiple drug resistance which has drastically increased its clinical importance (Rohde et al., 2005; Vadyvaloo and Otto 2005; de Araujo et al., 2006). There are only a few well known virulence factors of *S. epidermidis*, but its ability to form biofilm has long been recognized as a key virulence determinant of this specie in central venous catheter (CVC) infection (Rohde et al., 2007). Transition from planktonic cells to biofilm is regulated by a variety of environmental and physiological cues, such as bacterial cell density, nutrient availability, and cellular stress. Biofilm and planktonic cells differ significantly in their physiology, gene expression pattern, and even morphology (Costerton et al., 1999; Rohde et al., 2007). Biofilm formation is a complex two-step process in which the staphylococci first adhere to the surface to be colonized and then accumulates

into biofilm architecture (Costerton et al., 1999; de Araujo et al., 2006; Mack et al., 2006; Montanaro et al., 2007; Rohde et al., 2010). Biofilm formation depends on the production of polysaccharide intercellular adhesion (PIA) encoded by *icaADBC* operon (de Araujo et al., 2006; Rohde et al., 2010). Some studies have reported that several genes are directly or indirectly involved in the molecular mechanisms of biofilm formation in *S. epidermidis*, including *fbe*, *atlE*, *aap*, and *ica* locus (Heilmann et al., 1996; Vuong et al., 2004; de Araujo et al., 2006; Rohde et al., 2007). It is possible that PIA and Aap act cooperatively in *S. epidermidis* biofilm formation. Also other specific factors have been implicated as autolysin AtlE, this is presumably involved in initial staphylococcal adhesion, leading to specific interaction with plasmatic proteins of the polymer (Rohde et al., 2007). In addition, AtlE is thought to play a role in the pathogenesis of biofilm-mediated infection “in vivo”, as *atlE* mutants are significantly less virulent than wild-type strains in animals models of intravenous catheter infection (Fitzpatrick et al., 2005).

On the other hand, currently a number of different phenotypic methods are used to evaluate the biofilm-forming ability of staphylococci. These include a tube test, a microtiter plate test, microscopy, and Congo red agar (CRA) plate test. Nevertheless, the microtiter plate test remains among the most frequently used assays for investigation of biofilm (Stepanovic et al., 2007).

The aim of the present study was to evaluate two different phenotypic methods (the microtiter plate and the CRA plate) for detection of biofilm in 166 *S. epidermidis* obtained from CVC. In addition, we established the presence of genetic markers (*icaA*, *icaD*, *atlE* and *aap* genes) among the biofilm producers and non-producers.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial isolates

The *S. epidermidis* isolates were obtained from a CVC of distinct patients attending Hospital de Clínicas de Porto Alegre, a tertiary care university hospital located at South Brazil, during January 2008 until May 2009. Catheter cultures were processed according to Maki et al. (1977).

2.2. Identification of the isolates

The isolates were cultured in agar supplemented with 5% sheep blood (Tryptic Soy Agar- Oxoid, Basingstoke, England) for 24 h at 35 °C, where colony morphology, hemolysis production were evaluated. Subsequently coagulase and catalase tests were performed. The staphylococcal species with coagulase test negative were identified according to Antunes et al. (2008) and confirmed by the WalkAway[®] automated system (Siemens, USA). Isolates were evaluated for susceptibility to oxacillin (1ug) by the disc-diffusion method according to CLSI 2009.

2.3. Phenotypic tests for to evaluate biofilm formation

2.3.1. Microtiter plate test

The ability of *S. epidermidis* isolates to establish a biofilm on polymeric surfaces was tested in a semiquantitative microtiter plate as described by Stepanovic et al. (2007). A volume of 20µl of bacterial suspensions (0.5 McFarland) was added to each well of a sterile 96-well polystyrene flat-bottom microtiter plate (COSTAR 3599, Corning, NY, USA) and filled with 180µl TSB medium (Oxoid; Basingstoke, UK) supplemented with glucose 0.25%. The plates were incubated during 18 h at 35°C. To remove the non-adherent cells the wells were rinse three times with 200 µl of sterile saline. The attached bacteria was fixed with 150

µl of methanol (volume used to exclude the formed pellicles at the liquid-air interface) for 20 min and dried for 30 min at room temperature. Crystal violet 0.5% was used to stain the bacteria for 15 min. The biofilm was eluted with ethanol for 30 min without shaking. Absorbance was measured at 450 nm in a microtiter plate reader (Behring EL 311-HOECHST, Akasaka, Japan). For spectrophotometric blank the test were made using only TSB, and the mean values and standard deviations were calculated. The isolates were classified as strong, moderate, weak or non-biofilm-forming in accordance with Stepanovic et al. (2007). All biofilm experiments were performed in quadruplicate and tests were repeated three times to minimize the variability in optical density (OD) measurements.

2.3.2. Congo red agar plate test

This method was performed according to Arciola et al. (2002). The media was prepared adding 0.8 g of Congo Red and 36.0 g of saccharose (both from Sigma, Missouri, USA) to 1L of Brain Heart Infusion agar (Oxoid, Basingstoke, UK). After the inoculation the plates were incubated for 24 at 35°C, and then overnight at room temperature. A four-color scale ranging from black to red was used. In some isolates, when pink sub colonies emerged in the center of the black colonies after 48h, the small pink or black samples were subcultured again for 24h on CRA to observe the characteristic of pure isolates.

Staphylococcus epidermidis ATCC 35984 and *S. epidermidis* ATCC 12228, respectively, were used as positive and negative controls of biofilm formation.

2.4. Genotypic tests for to evaluate biofilm formation

2.4.1. PCR detection of *icaA* e *icaD*

The detection of *icaA* and *icaD* genes was performed by PCR using specific primers (Table 1) as previously described (Arciola et al., 2001). PCR was performed in a DNA

thermal cycler (Applied Biosystems Veriti™, Foster City, CA), and the product was analyzed by agarose gel electrophoresis (1.5% agarose in tris-borate-EDTA [TBE]).

2.4.2. PCR detection of *atlE* and *aap*

The detection of the *atlE* and *aap* gene was made in a multiplex PCR assay with specific primers (Table 1). The volumes and concentrations used were as follow: (a) 25 µl of final volume of the reaction, (b) 0.5 µM of primers concentration, (c) 10 – 25 ng of bacteria DNA, (d) 250 µM of desoxynucleoside triphosphates (dNTPs), and (e) 2 U of super-therm polymerase. Cycling conditions included incubation for 5 min at 94°C, followed by 25 cycles of 30s at 94°C, 60s at 55°C and 60s at 72°C, with a final extension at 72°C for 4 min. The products were analyzed by agarose (2%) gel electrophoresis. The detection of the *atlE* and *aap* gene used specific primers according Vandecasteele et al. (2003).

2.5. Statistical analysis

The 95% confidence interval (CI), sensitivity, specificity was calculated with a contingency table. All confidence interval were calculated with the Fisher Exact test. We defined microtiter plate as the gold standard.

2.6. Ethics

Approval for the study was obtained from ethics committee: CONEP/HCPA and from Brazilian Office for Human Research Protections, with Institutional Review Board.

3. Results

A total of 166 isolates of *S. epidermidis* were evaluated in this study and 143 (86%) were resistant to oxacillin (MRSE). Among the 143 MRSE, 15 (10%), 21 (15%) and 58

(41%) were classified as strong, moderate and weak biofilm producing, respectively. A total of 49 (34%) MRSE were classified as non-biofilm producers. Among the 23 MSSE isolates, 2 (9%) were strong, 2 (9%) moderate and 9 (39%) weak-biofilm-producing and 10 (43%) isolates did not formed biofilm.

The different methods for biofilm evaluation presented the same results for 53% of isolates; 72 biofilm-positive and 16 biofilm-negative isolates. Conversely, 35 biofilm-positive isolates and 43 biofilm-negative by to the microtiter test presented different results according to the other methods (Table 2).

According to the microtiter plate method, the formation of biofilm was positive for 107 (64%) isolates, while using CRA plate we found that only 90 (54%) isolates as biofilm producers. The presence of *icaA* and *icaD* genes were detected in 97% (104/107) positive microtiter isolates while they were found in 29% (17/59) of non biofilm-forming isolates (Fig. 1). The *aap* and *atlE* genes were present in 77% and in 92% of the 107 biofilm-producing isolates, respectively (Fig. 2). All isolates displaying the strong biofilm-producer phenotype carried the three genes (*icaA/icaD* and *atlE*).

Considering the microtiter plate test as the gold standard for biofilm evaluation, the CRA method presented 100% specificity but only 84% sensitivity. The sensitivity of the genes related to biofilm formation was usually higher than the CRA method (table 3). In fact, considering both sensitivity and specificity the detection of *icaA* and *icaD* was the most reliable molecular marker for biofilm identification.

It is of note that 6 isolates presented negative results by the phenotypic method (microtiter plate and CRA) but proved to present all genes related to biofilm formation. Moreover, we also found, but in a very low prevalence, 3 biofilm-producing isolates (by microtiter plate) which were negative for the presence of *icaA* and *icaD*, i.e., “*ica*-independent”.

4. Discussion

The process of biofilm production in *S. epidermidis* has not yet been clarified but it seems to occur in two important steps: adherence to the surface and accumulation. Many bacterial products are implicated in the initial stage of adherence including the AtlE protein, teichoic acid and also staphylococcal adhesions proteins, which play an important role in plasma-coated biomaterial. Biofilm production is an important virulence factor for the pathogenicity of *S. epidermidis* nosocomial isolates and would explain the high prevalence of this specie in medical-device-associated infections. In fact, we have found a prevalence of 64% of biofilm-forming *S. epidermidis* in CVC according to the microtiter plate method.

Infections by *S. epidermidis* may lead to a serious clinical problem, reinforcing the need of a better understanding of all mechanisms of biofilm formation by staphylococci. The *icaADBC* operon, and Aap protein have been recognized as important genetic determinants of biofilm production (Montanaro et al., 2007). The AtlE protein is presumably involved in the initial staphylococcal adhesion, due to its primary adherence to polystyrene (Heilmann et al., 1996). In line with this, we found at least one of the genes coding for PIA, Aap and AtlE among 106 out of 107 biofilm-producers *S. epidermidis*.

In the second stage, bacteria connected to the surface of the polymer produce and accumulate an extracellular, amorphous and mucoid polysaccharide material; the biofilm. The presence of *ica* genes is crucial for this step and, therefore, some studies have suggested that the identification of these genes in clinical isolates may be used as a tool to identify biofilm-forming isolates. In this study, the *icaA* and *icaD* were found in 104 (97%) of the biofilm-producing *S. epidermidis* which warrants a very high sensitivity of these genes as biofilm markers. However, the link between gene marker with biofilm-embedded bacteria and subsequent invasive infection is not completely established. We found, for instance, that 29% (17/59) of non biofilm-forming isolates harbor either the *icaA* or *icaD* genes. On the other

hand, we also found 3 isolates which were positive for biofilm formation by the microtiter plate method but did not present neither *icaA* nor *icaD* (*S. epidermidis* biofilm-producing *ica* independent). This suggests that there is no unique marker for biofilm formation (Montanaro et al., 2007). It is of note that all three *ica* independent isolates produce only a weak biofilm which may suggest that the presence of these genes are important for a full biofilm development.

The high prevalence of *atlE* gene among the isolates of this study may be explained by the fact that all of them were obtained from CVC, as the AtlE protein is a key factor for adhesion to plastic surfaces. Nevertheless, the presence of the *atlE* gene solely does not warrant biofilm formation and we found that 61% of the *S. epidermidis* presented this gene but did not form biofilm by the microtiter plate. Conversely, the presence of *atlE* simultaneously with the other genes (*icaA* and *icaD*) was observed in all strong biofilm-producers (data not shown).

It has also to be considered that there are other genes related to biofilm production which were not evaluated in this study.

The CRA test is easier to perform in routine laboratories when compared to molecular analysis, and therefore could be used as a screening method for biofilm evaluation. It is known that Congo Red can directly interact with certain polysaccharide forming colored complexes (Aricola et al., 2001). However, in this study we found that the CRA method presented only 84% of sensitivity which does not warrant it as a reliable method for biofilm detection. Despite the fact that CRA test was no able to detect all biofilm producing isolates, this method presented high specificity (100%) and therefore can be used as a confirmatory technique as already proposed by Arciola et al. (2002).

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 sensitivity and specificity. The above findings confirm that *S. epidermidis* biofilm formation is a multi-factorial process which is influenced by genetic traits and by the environment on the site of infection.

Acknowledgements

The authors are grateful to the HCPA/FIPE - Brazil for the financial support.

References

Antunes, A. L., Secchi, C., Reiter, K. C., Perez, L. R., de Freitas, A. L. and D'Azevedo, P. A. 2008. Feasible identification of *Staphylococcus epidermidis* using desferrioxamine and fosfomycin disks. *Apmis* 116, 16-20.

Arciola, C. R., Collamati, S., Donati, E. and Montanaro, L. 2001. A rapid PCR method for the detection of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus* in periprostheses infections. *Diagn. Mol. Pathol.* 10, 130-137.

Arciola, C. R., Campoccia, D., Gamberini, S., Cervellati, M., Donati, E. and Montanaro, L. 2002. Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus. *Biomaterials* 23, 4233-4239.

Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement. Wayne, PA, CLSI.

Costerton, J. W., Stewart, P. S., Greenberg, E. P. 1999. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* 284, 1318-1322.

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. and Teixeira, L. A. 2006. Commensal isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* are also well equipped to produce biofilm on polystyrene surfaces. *J. Antimicrob. Chemother.* 57, 855-64.

Fitzpatrick, F., Humphreys, H., O'Gara, J. P. 2005. The genetics of staphylococcal biofilm formation- will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection? *Clin. Microbiol. Infect.* 11, 967-973.

Heilmann, C., Schweitzer, O., Gerke, C., Vanittanakom, N., Mack, D. and Gotz, F. 1996. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol. Microbiol.* 20, 1083-1091.

Mack, D., Rohde, H., Harris, L. G., Davies, A. P., Horstkotte, M. A. and Knobloch, J. K. 2006. Biofilm formation in medical device-related infection. *Int. J. Artif. Organs.* 29, 343-359.

Maki, D. G., Weise, C. E. and Sarafin, H. W. 1977. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *N. Engl. J. Med.* 296, 1305-1309.

Montanaro, L., Campoccia, D. and Arciola, C. R. 2007. Advancements in molecular epidemiology of implant infections and future perspectives. *Biomaterials* 28, 5155-5168.

Rohde, H., Burdelski, C., Bartscht, K., Hussain, M., Buck, F., Horstkotte, M. A., Knobloch, J. K., Heilmann, C., Herrmann, M. and Mack, D. 2005. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol. Microbiol.* 55, 1883-1895.

Rohde, H., Burandt, E. C., Siemssen, N., Frommelt, L., Burdelski, C., Wurster, S., Scherpe, S., Davies, A. P., Harris, L. G., Horstkotte, M. A., Knobloch, J. K., Ragunath, C., Kaplan, J. B. and Mack, D. 2007. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials* 28, 1711-1120.

Rohde, H., Frankenberger, S., Zahringer, U. and Mack, D. 2010. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. *Eur. J. Cell. Biol.* 89, 103-111.

Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukic, S., Cirkovic, I. and Ruzicka, F. 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis* 115, 891-899.

Vadyvaloo, V. and Otto, M. 2005. Molecular genetics of *Staphylococcus epidermidis* biofilms on indwelling medical devices. *Int .J. Artif .Organs.* 28, 1069-1078.

Vandecasteele, S. J., Peetermans, W. E., R, R. M., Rijnders, B. J. and Van Eldere, J. 2003. 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.* 9, 114-119.

Vuong, C., Voyich, J. M., Fischer, E. R., Braughton, K. R., Whitney, A. R., DeLeo, F. R. and Otto, M. 2004. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell. Microbiol.* 6, 269-275.

Table 1. Primers for *icaA*, *icaD*, *aap* and *atlE* used in this study

Gene	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'	Amplicon
<i>icaA</i>	TCTCTTGCAGGAGCAATCAA	TCAGGCACTAACATCCAGCA	188bp
<i>icaD</i>	ATGGTCAAGCCCAGACAGAG	CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA	198bp
<i>aap</i>	ATACAACCTGGTGCAGATGGTTG	GTAGCCGTCCAAGTTTTACCAG	399bp
<i>atlE</i>	CAACTGCTCAACCGAGAACA	CATCGTTTTTCAGCGCTATCA	500bp

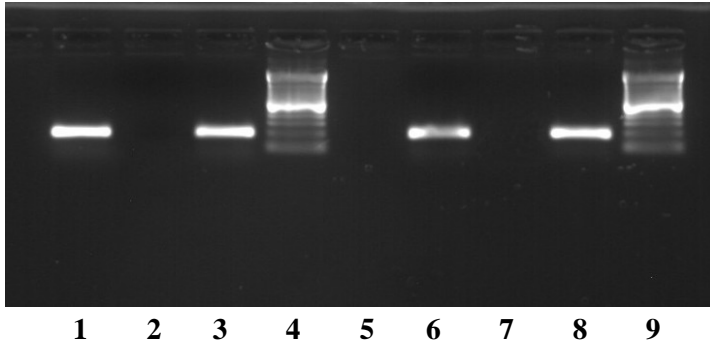


Fig.1. Detection of the genes *icaD* (lanes 1-3) e *icaA* (lanes 5-8) in *S.epidermidis* isolates using PCR. Lanes 4 and 9: molecular size marker. Lane 1: *icaD*+, strong biofilm producer isolate; lane 2: *S. epidermidis* ATCC 12228 negative control; lane 3: *S. epidermidis* ATCC 35984 positive control to *icaD* (198bp) amplicon; lane 5: *icaA*-, biofilm non producer isolate; lane 6: *icaA*+, strong biofilm producer; lane 7: *S. epidermidis* ATCC 12228 negative control; lane 8: *S. epidermidis* ATCC 35984 positive control to *icaA* (188bp) amplicon.

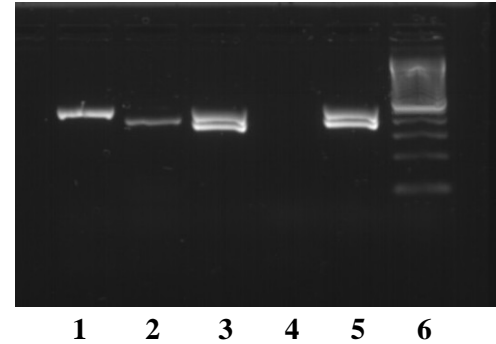


Fig. 2. Detection of the genes *aap* and *atlE* in *S. epidermidis* isolates using multiplex PCR. Lane 1:*atlE*+, strong biofilm producer isolate; lane 2: *aap*+, strong biofilm producer isolate; lane 3: *aap*+ and *atlE*+, strong biofilm producer isolate; lane 4: *S. epidermidis* ATCC 12228 negative control; lane 5: *S. epidermidis* ATCC 35984 positive control to *aap* and *atlE* (198bp) amplicon; lane 6: molecular size marker.

Table 2. Comparison of methods for biofilm detection among *S.epidermidis*

N° of isolates (=166)	Microtiter plate	CRA	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	<i>aap</i>	<i>atlE</i>
72	+	+	+	+	+	+
16	-	-	-	-	-	-
9	+	+	+	+	-	+
8	+	-	+	+	+	+
7	+	+	+	+	-	-
7	+	-	+	+	-	+
1	+	+	-	-	-	-
1	+	-	-	-	+	+
1	+	-	-	-	-	+
1	+	+	+	+	+	-
13	-	-	-	-	+	+
11	-	-	-	-	-	+
6	-	-	+	+	+	+
6	-	-	+	+	-	+
5	-	-	+	+	-	-
2	-	-	-	-	+	-

Congo Red Agar (CRA), *icaA*, *icaD*, *aap* and *atlE* in *S. epidermidis* isolates. (+) = positive (-) = negative

Table 3. Evaluation of the Congo Red Agar (CRA) test and genetic markers for biofilm detection*

Assay	Sensitivity	95% CI (%)	Specificity	95% CI (%)
CRA plate test	84%	76 to 90	100%	94 to 100
<i>icaA</i> and <i>icaD</i> genes	97%	92 to 99	72%	58 to 83
<i>Aap</i> gene	77%	67 to 84	63%	49 to 76
<i>atfE</i> gene	93%	87 to 97	39%	26 to 52

*Microtiter plate as the gold standard

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em nosso estudo, pelo método da microplaca, encontramos formação de biofilme em 64% dos isolados, sendo que a maioria deles carregavam os genes *icaA* e *icaD*. Isto confirma a importância do operon *ica* na expressão do biofilme. No entanto, alguns dos isolados não produtores de biofilme possuíam estes genes, diminuindo assim a sua especificidade.

Em três isolados, foi verificada a presença de biofilme por um processo *ica*-independente, uma vez que tal operon não foi identificado nestas amostras. Neste caso, outras proteínas parecem estar envolvidas na formação do biofilme bacteriano.

A detecção de outros genes como *aap* e *atlE* apresentaram menor sensibilidade e especificidade, sugerindo que eles não são essenciais, mas podem colaborar para a formação de biofilme. Ainda, o teste fenotípico com ágar Congo Red (ACR) apresentou uma especificidade de 100% e uma sensibilidade de 84%, podendo ser utilizado como um método confirmatório.

Os resultados acima confirmam que a formação de biofilme de *S. epidermidis* é um processo multifatorial, que é influenciado por características genéticas e ambientais no local da infecção.

Até o momento, nenhum tratamento eficaz ou diagnóstico precoce de infecções associadas a dispositivos implantáveis foi proposto. A análise microbiológica muitas vezes é negativa, porém não exclui a infecção e quando a cultura colhida é positiva, a infecção já está em estado avançado, sendo que a remoção do dispositivo se torna inevitável. Porém, esta medida nem sempre é adequada, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Por isto, compreender os diferentes mecanismos que contribuem para a formação de biofilme, é de grande importância, pois a partir disto podem-se desenvolver estratégias de prevenção, como a produção de biomateriais resistentes a infecções tais como, cateteres impregnados com

drogas antimicrobianas efetivas, materiais específicos para repelir adesinas bacterianas ou a introdução de novas medidas preventivas ou terapêuticas como, por exemplo, vacinas ou estratégias de silenciamento dos genes de virulência.

Anexos

(1 - 5)

1. PROTOCOLO MICROPLACA CORADA COM CRISTAL VIOLETA

1º dia)

- ✓ Preencher os poços da microplaca com 180µl de caldo Trypticase Soy Broth (TSB) e adicionar 20µl de suspensão bacteriana 0,5 na escala Mc Farland.
- ✓ Cada amostra deve ser semeada oito vezes no sentido vertical da microplaca, sendo a primeira coluna para o controle negativo - *S. epidermidis* ATCC 12228 e a segunda coluna para o controle positivo - *S. epidermidis* ATCC 35984. A terceira coluna deve ficar vazia e as amostras devem ser semeadas a partir da quarta coluna.
- ✓ Cobrir a placa e incubar por 18h a 35°C.

2º dia)

- ✓ Aspirar com pipeta multicanal o caldo TSB com crescimento bacteriano
- ✓ Lavar cuidadosamente 3X com salina estéril (200µl) sem encostar a ponta da ponteira no fundo da placa
- ✓ Inverter a placa e bater levemente sobre papel absorvente
- ✓ Fixar com 150µl de metanol (P.A.) por 20 min.
- ✓ Inverter a placa e deixar secar por 30 min.
- ✓ Corar com 150µl de Cristal Violeta 0,5% por 15 min. à temperatura ambiente
- ✓ Retirar o excesso do corante invertendo a placa e lavar em água corrente até não sair mais cor
- ✓ Secar a temperatura ambiente
- ✓ Ressuspender o botão corado com 150µl de etanol (95%), tampar e repousar por 30 min.
- ✓ Ler a placa em leitora de ELISA com filtro 450nm. (figura 3)

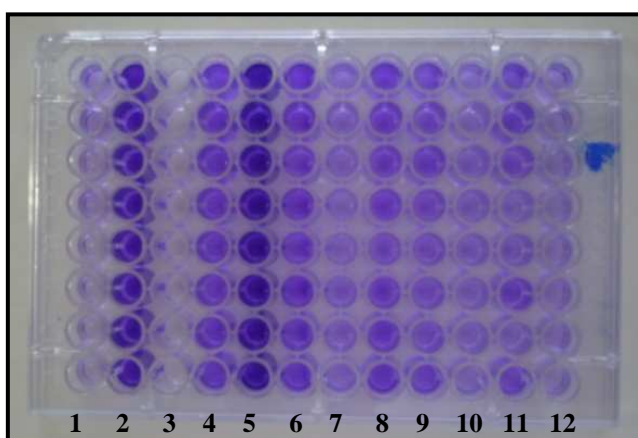


Figura 3. Formação de biofilme pelo método da microplaca com cristal violeta

- 1 - Controle negativo - *S. epidermidis* ATCC 12228
 2 - Controle positivo - *S. epidermidis* ATCC 35984
 3 - Vazio
 4 a 12 - Amostras *S. epidermidis* isoladas de CVC

2. PROTOCOLO ÁGAR CONGO RED

Corante Congo Red..... 0,8gr.
 Sacarose..... 36,0gr.
 Brain Heart Infusion ágar..... 1000ml
 121°C por 15 min.

Caracterização da produção de biofilme: em ágar Congo Red (CRA). Após semeadura, as placas foram incubadas por 24- 48h a 35 °C. Para avaliação da coloração das colônias foi adotada uma escala de quatro cores, com tonalidades que vão do preto ao vermelho (figura 4). Foram consideradas como amostras produtoras de biofilme aquelas com colônias pretas e quase pretas, que foram consideradas como indicativo de uma fraca atividade. Amostras que apresentaram colônias com cores vermelhas a bordô foram consideradas sem a capacidade de produzir esse fator de virulência. Foi utilizada a cepa *S. epidermidis* ATCC 35984 como controle positivo e a cepa *S. epidermidis* ATCC 12228 como controle negativo.

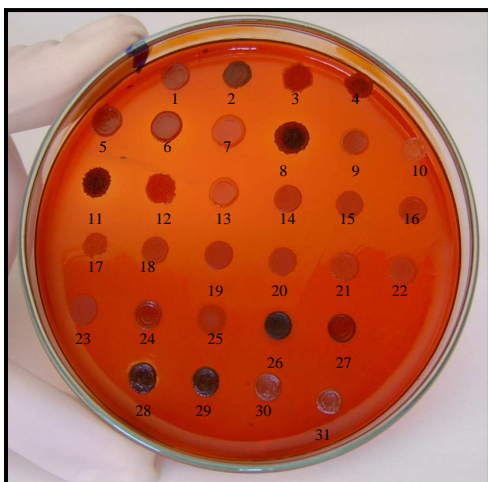


Figura 4. Formação de biofilme pelo método fenotípico com Ágar Congo Red
01 a 27 - Amostras *S. epidermidis* isoladas de CVCs
28 a 29 - Controle positivo - *S. epidermidis* ATCC 35984
30 a 31 - Controle negativo - *S. epidermidis* ATCC 12228

3. RESULTADOS MÉTODOS FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS

Amostra	Result. Micropl.	ACR	icaA	icaD	Aap	AtIE
14	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
16a	não-biofilme	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo
16b	não-biofilme	negativo	positivo	positivo	negativo	positivo
20	fraco	positivo	positivo	positivo	negativo	negativo
22	moderado	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
23a	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
23b	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
25	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
26a	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
26b	fraco	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo
31	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
32	fraco	negativo	positivo	positivo	negativo	positivo
36	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
39	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
44	moderado	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
45	moderado	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
48	fraco	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo
50	forte	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
51b	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
55	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
59	fraco	negativo	positivo	positivo	negativo	positivo
61	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
67	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
68	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
69b	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo
70	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
73	forte	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
74b	moderado	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
80	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
83	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
88	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
91	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
92	forte	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
94	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
98	fraco	positivo	positivo	positivo	negativo	negativo
99	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo
100	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
103a	fraco	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo
103b	não-biofilme	negativo	positivo	positivo	negativo	positivo
104a	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
104b	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo
106	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
107	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
108	moderado	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo
109a	fraco	positivo	positivo	positivo	negativo	negativo
109b	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
111	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
112	moderado	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
113	forte	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
115	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
117	forte	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
121	moderado	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
122	forte	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
123	moderado	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
124a	forte	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
124b	moderado	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
125a	fraco	positivo	positivo	positivo	negativo	negativo
125b	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
127a	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
128	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
132	moderado	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
134a	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo
134b	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
135	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo
136	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo

Amostra	Result. Micropl.	ACR	icaA	icaD	Aap	AtIE
137	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
138a	fraco	positivo	positivo	positivo	negativo	positivo
138b	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo
139b	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
140	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
143	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo
144b	não-biofilme	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo
146	forte	positivo	positivo	positivo	negativo	positivo
147	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo
150a	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
151a	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
151b	não-biofilme	negativo	positivo	positivo	negativo	positivo
152	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
156	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
157	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
159	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
161	moderado	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
162a	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
163	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
167a	moderado	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
167b	forte	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
169	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
170a	moderado	positivo	positivo	positivo	negativo	positivo
170b	fraco	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo
171	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
172	moderado	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
175	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
177	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo
178	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo
180a	fraco	negativo	positivo	positivo	negativo	positivo
180b	fraco	positivo	positivo	positivo	negativo	negativo
181	moderado	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
183a	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo
183b	forte	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
184a	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo
186	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
188	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
190a	não-biofilme	negativo	positivo	positivo	negativo	positivo
190b	fraco	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo
193	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
194	fraco	negativo	positivo	positivo	negativo	positivo
196	forte	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
197	fraco	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
198	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
199	moderado	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
200	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
201	moderado	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
203	fraco	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo
204b	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo
206	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
207	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo
208	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
210	fraco	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo
211	fraco	positivo	positivo	positivo	negativo	positivo
212	fraco	positivo	positivo	positivo	negativo	positivo
213	moderado	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
214	forte	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
215	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
216	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
217	fraco	negativo	positivo	positivo	negativo	positivo
218	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
221	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
223	fraco	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo
224a	fraco	negativo	positivo	positivo	negativo	positivo
224b	fraco	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo
225	fraco	positivo	positivo	positivo	negativo	positivo
226	não-biofilme	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo
227	moderado	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
228	forte	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
229	forte	positivo	positivo	positivo	negativo	positivo

Amostra	Result. Micropl.	ACR	icaA	icaD	Aap	AtIE
230	forte	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
231	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo
232	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
233	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo
234	moderado	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
236b	moderado	positivo	positivo	positivo	negativo	positivo
237a	forte	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
238a	não-biofilme	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo
240	não-biofilme	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo
242	não-biofilme	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo
243	não-biofilme	negativo	positivo	positivo	negativo	positivo
245	não-biofilme	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo
246	moderado	negativo	positivo	positivo	negativo	positivo
248	não-biofilme	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo
249	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
250	não-biofilme	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
251	fraco	positivo	positivo	positivo	negativo	positivo
253	forte	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
254	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
255a	não-biofilme	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo
255b	fraco	positivo	positivo	positivo	negativo	negativo
256	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
257	fraco	positivo	positivo	positivo	negativo	positivo
258	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
260	não-biofilme	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo
261	moderado	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
262	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
263	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
264	não-biofilme	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo
265	não-biofilme	negativo	positivo	positivo	negativo	positivo
266	fraco	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo

4. TERMO DE COMPROMISSO PARA UTILIZAÇÃO DE DADOS

Título do Projeto

“Formação de biofilme de <i>Staphylococcus</i> spp. isolado de cateter venoso central através de métodos fenotípicos e genotípicos”	Cadastro no GPPG 08-224
---	--

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar a privacidade dos pacientes cujos dados serão coletados em prontuários e bases de dados do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima.

Porto Alegre, 08 de maio de 2008.

Nome dos Pesquisadores:

Cyntia Lazzarotto

Ana Lúcia Peixoto de Freitas

Ana Lúcia Souza Antunes

Afonso Luis Barth

5. APROVAÇÃO COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE



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: 08-224

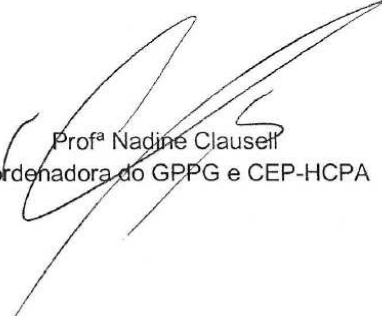
Pesquisadores:

AFONSO LUIS BARTH
CYNTIA LAZZAROTTO

Título: FORMAÇÃO DE BIOFILME DE STAPHYLOCOCCUS SPP. ISOLADO DE CATETER VENOSO CENTRAL ATRAVÉS DE MÉTODOS FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada ao CEP/HCPA. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

Porto Alegre, 16 de junho de 2008.


Profª Nadine Clausell
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA