

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia

Staphylococcus coagulase negativo não *epidermidis* isolados
de cateter venoso central: biofilme e resistência

JAQUELINE BECKER PINTO

PORTO ALEGRE, NOVEMBRO 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia

Staphylococcus coagulase negativo não *epidermidis* isolados
de cateter venoso central: biofilme e resistência

JAQUELINE BECKER PINTO

Trabalho de Conclusão

Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia

Orientadora: Prof^o Dra. Ana Lúcia Peixoto Freitas

Co-orientadora: Msc. Ana Lúcia Souza Antunes

PORTO ALEGRE, NOVEMBRO 2010

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais pelo suporte fornecido permitindo a realização desta etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Usha, minha orientadora, pelos conselhos, dedicação, disponibilidade de tempo e orientação tão sábia e pertinente.

A Aninha, minha co-orientadora, pelo suporte fornecido para realização deste TCC, dedicação, apoio e carinho.

Agradeço as minhas colegas na pesquisa, Jéssica e Camille, pela amizade, companheirismo e auxílio na realização deste trabalho.

A minha amiga, Christine, obrigada pelo auxílio na biologia molecular.

RESUMO

Os *Staphylococcus* coagulase negativo constituem um importante grupo de bactérias patogênicas, causando infecções associadas ao uso de dispositivos implantáveis, como cateteres venosos centrais (CVCs). A formação de biofilme na superfície destes dispositivos tem sido o maior fator de virulência determinante na patogênese destas infecções. Além disso, o tratamento de infecções envolvendo *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) é frequentemente um problema terapêutico, pois muitos isolados clínicos apresentam resistência a múltiplos antibióticos. Embora *Staphylococcus epidermidis* seja principal espécie relacionada à infecção pelo uso de CVC, outros SCN também estão envolvidos. O objetivo deste trabalho foi analisar a capacidade de formação de biofilme, a susceptibilidade aos antimicrobianos entre SCN não *epidermidis* isolados de CVC. Foram analisadas 19 amostras de SCN isolados de CVC de pacientes internados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A formação de biofilme foi avaliada através do teste fenotípico da microplaca e presença dos genes *icaA* e *icaD* do operon *icaADBC* através da técnica de PCR. A susceptibilidade aos antimicrobianos foi detectada através da automação (MicroScan Walkway). Considerando o teste em microplaca como padrão foi observado formação de biofilme em seis isolados 31,58% (6/19). Os genes *icaA* e *icaD* estavam presentes, respectivamente, em 36,84% (7/19) e 42,11% (8/19) dos isolados. Houve concordância entre o resultados da microplaca e a presença dos genes *icaA* e *icaD* apenas em 63,2% (12/19) das amostras. Os níveis de resistência encontrados aos antimicrobianos foram semelhantes aos níveis já reportados na literatura: 89,46% para oxacilina, 84,21% para gentamicina, 78,85% para levofloxacino, 68,42% para eritromicina, 63,16% para clindamicina, 52,63% para sulfametoxazol/trimetoprima e 26,32% para rifampicina. A determinação da capacidade de formação de biofilme e do perfil de resistência envolvidos em infecção relacionada a CVC são fatores cruciais para o estabelecimento do risco de desenvolvimento de infecção relacionada ao cateter.

Palavras-chave: *Staphylococcus* coagulase negativo não *epidermidis*, cateter venoso central, biofilme, resistência.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	10
2.1 Aspectos gerais do gênero <i>Staphylococcus</i>	10
2.2 Importância Clínica e Patogenicidade de <i>Staphylococcus coagulase</i> Negativo.....	11
2.3 Infecções relacionadas a cateter venoso central.....	12
2.4 Formação de biofilme em SCN.....	14
2.5 Resistência aos antimicrobianos.....	18
3 OBJETIVOS.....	22
4 PARTE EXPERIMENTAL.....	23
4.1 Isolados bacterianos e identificação das espécies.....	23
4.2 Resistência bacteriana.....	23
4.3 Detecção da formação de biofilme pelo teste da microplaca.....	23
4.4 Reação em cadeia da polimerase para detecção dos genes <i>icaA</i> , <i>icaD</i> e <i>mecA</i>	24
4.5 Análise da relação de identidade dos genes <i>icaA</i> e <i>icaD</i> entre as espécies SCN não <i>epidermidis</i> comparadas aos genes presentes em <i>S.epidermidis</i>	26
5 RESULTADOS.....	27
6 DISCUSSÃO.....	31
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39
8 REFERÊNCIAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

O grupo *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) corresponde ao maior constituinte da pele e membranas da mucosa humana, mantendo uma relação comensal com seu hospedeiro (VON EIFF *et al.*, 2002; ROGERS *et al.*, 2009; SCHOENFELDER *et al.*, 2010). Para expressar sua patogenicidade, passando de habitantes normais da pele a protagonista de infecção, é necessária predisposição do hospedeiro, como quebra da barreira cutânea, imunossupressão, presença de dispositivos implantáveis (VADYVALOO E OTTO, 2005). O reconhecimento de SCN em infecções nosocomiais tem aumentado nas últimas duas décadas, principalmente pelo aumento de uso de dispositivos médicos (VON EIFF *et al.*, 2002; ROGERS *et al.*, 2009), sobretudo para a espécie *S. epidermidis*. Outras espécies SCN, não *epidermidis*, também tem sido implicadas em infecções relacionadas a dispositivos implantáveis (GATERMANN *et al.*, 2007 e ROHDE *et al.*, 2010).

As superfícies poliméricas dos cateteres constituem superfícies potenciais para a formação de biofilme e a habilidade dos SCN em formar biofilme representa o fator mais importante na patogênese das infecções que envolvem estes microrganismos (LOGAUEROVA, 2006). O biofilme é composto por densos agregados de células microbianas embebidas em uma matriz viscosa que se adere a uma superfície abiótica. O biofilme confere proteção contra os mecanismos de defesa do hospedeiro e ação dos antimicrobianos, fazendo com que os microrganismos tenham importante papel como reservatório de genes de resistência e virulência (STEWART E COSTERTON, 2001; DONLAN E COSTERTON, 2002; CARGILL E UPTON, 2009). Evidências epidemiológicas mostram relação entre patogenicidade e presença dos genes *ica*, que codifica a síntese do polissacarídeo de adesão intercelular (PIA) presente em biofilmes maduros em *Staphylococcus* spp. A formação de biofilme mediada por PIA parece ser o mecanismo predominante em *S. epidermidis* (ZIEBUHR *et al.*, 2006; ROHDE *et al.*, 2010). Entretanto, poucos estudos abordam outros *Staphylococcus* coagulase negativo não *epidermidis*.

Considerando a importância das infecções que envolvem: i) a produção de biofilme, ii) o aumento da resistência a antimicrobianos, iii) que comunidades

bacterianas em biofilme são altamente virulentas e menos susceptíveis ao tratamento com antimicrobianos; a avaliação da formação de biofilme e resistência a antimicrobianos são importantes para tomada de decisões quanto ao tratamento. Neste trabalho foi analisado a capacidade de formação de biofilme “in vitro” entre *Staphylococcus* coagulase negativo não *epidermidis* isolados de cateter venoso central e a ocorrência dos genes *icaA* e *icaD* pertencentes ao operon *icaADBC*, envolvidos na etapa de acumulação do biofilme. Além da determinação do perfil de susceptibilidade destes isolados frente aos antimicrobianos mais utilizados no tratamento clínico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos gerais do gênero *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus* é constituído por bactérias gram-positivas, catalase positivas, da família Micrococcaceae. O gênero compreende dois grandes grupos conforme a capacidade de coagular o plasma sanguíneo: os coagulase positivos, onde *Staphylococcus aureus* é o único reconhecidamente patógeno para o ser humano e o grupo *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) (ROGERS *et al.*, 2009). Este último com cerca de 40 espécies/subespécies identificadas, sendo que aproximadamente 21 espécies atuam como agentes etiológicos em doenças humanas (LONGAUEROVA, 2006).

Entre os SCN, as espécies mais relacionadas ao homem são *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus sacharolyticus*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus xylosus* *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus cohnii*, e *Staphylococcus simulans* (BANNERMAN, 2003). Estas espécies representam o maior grupo constituinte da microflora normal em seres humanos, sendo que em sua maioria correspondem a populações residentes. Contudo algumas espécies, como *S. xylosus* e *S. simulans*, frequentemente adquiridos de animais domésticos, são considerados apenas transitórios na pele humana; assim como *S. sciuri*, comum residente de roedores e animais aquáticos, podendo ser isolado dos seus produtos alimentícios (STEPANOVIC *et al.*, 2001, 2003; 2007; ROGERS *et al.*, 2009).

Algumas espécies são relatadas ocupando nichos ecológicos preferenciais na pele, por exemplo, *S. capitis* subespécie *capitis* que é encontrado mais exclusivamente na cabeça, especificamente no couro cabeludo e testa. *S. capitis* subespécie *ureolyticus*, também é encontrado na cabeça, e nas axilas, enquanto *S. auricularis* é isolado somente a partir do conduto auditivo exterior e *S. lugdunensis* encontrado na região inguinal (ROGERS *et al.*, 2009; FRANK *et*

al.,2007). A espécie *S. saprophyticus* mostra-se como um colonizador em um grande número de mulheres em período reprodutivo (BANNERMAN, 2003).

2.2 Importância Clínica e Patogenicidade de *Staphylococcus* coagulase negativo

Por muito tempo, os SCN foram considerados apenas como comensais, habitando pele e membrana de mucosas em indivíduos saudáveis. Frequentemente na prática clínica foram considerados contaminantes encontrados em meios de cultura microbiológica (VON EIFF *et al.*, 2002; ROGERS *et al.*, 2009; SCHOENFELDER *et al.*, 2010). Contudo, seu reconhecimento como um grupo de bactérias com impacto em infecções nosocomiais vem aumentando, principalmente pelo uso de dispositivos médicos implantáveis, como cateter venoso central e periférico, válvulas e próteses (VON EIFF *et al.*, 2002; ROGERS *et al.*, 2009). Pacientes que fazem uso destes dispositivos médicos correspondem ao grupo mais susceptível às infecções por SCN, especialmente os que se encontram em quadros de imunossupressão e ou recém nascidos prematuros (HEIKENS *et al.*, 2005). Outros fatores predisponentes para infecção são o uso prévio de antibióticos, o grau de enfermidade do paciente (oncológicos, queimados e maternidades de alto risco), bem como a estadia em unidades de tratamento intensivo e a não aderência a práticas do controle de infecção hospitalar (KOKSAL *et al.*, 2009).

O papel dos SCN nas infecções nosocomiais tem sido reconhecido nas últimas duas décadas. Sobretudo para a espécie *S. epidermidis* que corresponde a um dos cinco mais importantes patógenos hospitalar sendo o mais frequente microorganismo isolado de infecções relacionadas a dispositivos médicos implantáveis (BANNERMAN, 2003; ROHDE *et al.*, 2010). Estima-se que 30% a 40% das infecções nosocomiais, na corrente circulatória, devem-se as espécies SCN (ROGERS *et al.*, 2009), sendo o segundo maior isolado em hospitais brasileiros entre 2005-2008, atrás apenas do *S. aureus* (GALES *et al.*, 2009). A alta incidência ocorre pelo fato da bactéria colonizar permanentemente a pele, o que acaba resultando em alta probabilidade de contaminação durante a inserção dos dispositivos (UÇKAY *et al.*, 2009).

Outras espécies SCN, não *epidermidis*, tem sido relacionadas a determinadas infecções, *S. saprophyticus* é um importante patógeno oportunista do trato urinário em mulheres sexualmente ativas; o *S. haemolyticus* é o segundo mais prevalente entre os SCN, sendo implicado em endocardite da válvula nativa, bacteremia, peritonite, infecções do trato urinário, feridas, ossos e articulações (BANNERMAN, 2003; KOKSAL *et al.*, 2009, FREDHEIM *et al.*, 2009). *Staphylococcus lugdunensis*, dentre as espécies do grupo coagulase negativo, é a única cuja severidade se assemelha às infecções atribuídas a *S. aureus*. É responsável acima de 44% dos casos de endocardite de válvula cardíaca, além de infecções de cateter, próteses articulares, bacteremia e infecção urinária (BANNERMAN, 2003; ROGERS *et al.*, 2009).

Algumas espécies de SCN têm sido apenas ocasionalmente implicadas em doenças humanas, sendo geralmente menos virulentas que *S. epidermidis* e não identificadas no laboratório clínico (ROGERS *et al.*, 2009). Tem sido relatadas infecções por *S. capitis*, *S. simulans*, *S. warneri* em endocardites e bacteremias; *S. warneri* e *S. simulans* em osteomielite; *S. capitis*, *S. warneri* em infecções de cateter; *S. sciuri* tem sido isolado de feridas e infecções de tecido mole. A maioria das infecções causadas por SCN é relacionada a pacientes que apresentam doenças subjacentes que comprometem o sistema imune, ou sofreram processos cirúrgicos, ou manipulação intravascular (BANNERMAN, 2003).

2.3 Infecções relacionadas a cateter venoso central

A utilização de dispositivos médicos, como cateter venoso central (CVC) é amplamente difundida na prática médica no mundo inteiro. Somente nos EUA, 180 milhões de cateteres intravasculares periféricos e 7 milhões de CVC são utilizados anualmente (ROGERS *et al.*, 2009). A inserção do CVC ocorre nas veias centrais, tais como subclávia, jugular interna ou femoral. Apesar de o cateter venoso periférico ser mais frequentemente requerido para o acesso vascular, apresenta uma taxa baixa de infecções relacionadas, tanto locais ou de corrente sanguínea (O'GRADY *et al.*, 2002).

A maioria das infecções relacionadas a cateteres está associada com CVC, especialmente quando inseridos em unidades de tratamento intensivo (UTI); o longo período de tempo que o paciente fica dependente do acesso vascular central e seu frequente manuseio facilita a colonização microbiana (O'GRADY *et al.*, 2002). Nas infecções relacionadas a dispositivos médicos invasivos, o CVC confere maior risco de infecção que qualquer outro (DONLAN E COSTERTON, 2002). As infecções de corrente circulatória, relacionadas a cateter intravascular resultam em maior mortalidade, além disso, em maiores custos hospitalares com um aumento no tempo de internação (TEMPLETON *et al.*, 2008; ROGER *et al.*, 2009). As infecções se desenvolvem quando a integridade da barreira cutânea é rompida, como no momento da implantação, onde as bactérias utilizam os dispositivos médicos implantáveis, exemplo o CVC, como veículos para penetrar no organismo hospedeiro (VON EIFF *et al.*, 2002). Uma vez que o CVC está em contato direto com a corrente circulatória, a superfície do material polimérico torna-se rapidamente revestida com plaquetas, plasma e proteínas do tecido como a albumina, fibrinogênio, fibronectina e laminina. Este depósito forma um filme que dá condições a aderência das bactérias. A interação e adesão das bactérias à superfície do cateter são possíveis através da ação de adesinas presentes em SCN (DONLAN E COSTERTON, 2002; ROGERS *et al.*, 2009). Ensaio com microscopia eletrônica de varredura e de transmissão mostraram a aderência bacteriana na forma de biofilme, estando presente tanto na superfície externa quanto no intralúmen do CVC (DONLAN E COSTERTON, 2002).

O tratamento utilizado na prática clínica para infecções relacionadas à CVC faz uso de antimicrobianos apropriados para SCN, mas muitas vezes, principalmente no caso de espécies resistentes a metilina, é necessária a remoção do cateter. Também deve ser considerado que a utilização destes dispositivos ocorre, na maioria das vezes, em pacientes críticos que necessitam de monitoração hemodinâmica, administração de líquidos, produtos sanguíneos, medicações e nutrição parenteral total (TEMPLETON *et al.*, 2008). Desta forma, considerando que muitas vezes um novo cateter terá que ser recolocado, a retirada do cateter pode não ser a melhor opção.

2.4 Formação de biofilme em SCN

A habilidade dos SCN em formar biofilme representa o fator mais importante na patogênese das infecções que envolvem estes organismos (LOGAUEROVA, 2006). Biofilmes são, por definição, comunidades de microorganismos que aderem uns aos outros e/ou a uma superfície (COSTERTON *et al.*, 1999). Sua estrutura é composta de uma matriz extracelular, contendo polissacarídeos e proteínas. (ZIEBUHR *et al.*, 2006). O biofilme é composto de células bacterianas (15%) e de uma matriz extracelular amplamente hidratada (85%), apresentando canais de água que possibilitam a passagem de nutrientes para camadas mais internas do biofilme (COSTERTON, *et al.*, 1999; DONLAN e COSTERTON, 2002). As bactérias vivendo em biofilme assemelham-se a modelos de organismos multicelulares, comunicando-se entre si e apresentando variados níveis metabólicos nas diversas camadas de biofilme (SCHOENFELDER *et al.*, 2010). Além disso, é sabido que células em diferentes regiões do biofilme podem exibir diferentes expressões gênicas (COSTERTON, 1999).

O biofilme é capaz de ludibriar a resposta imunogênica do hospedeiro fazendo com que os anticorpos produzidos não consigam agir eficazmente nas células dentro do biofilme. Sendo assim, raríssimas infecções são resolvidas apenas com os mecanismos de defesa do hospedeiro. Além disso, a terapia antibiótica geralmente age apenas nas células planctônicas liberadas do biofilme, tornando assim recorrentes os sintomas infecciosos até que a comunidade sésil seja retirada do organismo (COSTERTON, 1999).

A produção de biofilme por bactérias patogênicas acarreta significativas implicações na prática clínica; é conhecido que bactérias em biofilme são muito mais resistentes do que suas formas planctônicas (STEWART E COSTERTON, 2001). A resistência aos antimicrobianos da bactéria em biofilme pode chegar ser de 100 a 1000 vezes maior do que em células planctônicas (DONLAN E COSTERTON, 2002; CARGILL E UPTON, 2009). A maior resistência é, em parte, explicada pela diferença de atividade metabólica entre as células no biofilme, onde subpopulações celulares são menos ativas e, portanto acabam sendo alvos mais difíceis para

drogas que agem nas fases de crescimento bacteriano. Além disso, o impedimento para ação da droga muitas vezes pode ser físico onde, a matriz extracelular torna-se uma barreira de difusão, não permitindo a penetração da droga (SCHOENFELDER *et al.*, 2010). Estudos têm demonstrado que bactérias em biofilme apresentam uma alta proporção de cepas bacterianas hipermutáveis, já que o ambiente em biofilme favorece a troca genética (PETRELLI *et al.*, 2008).

A formação de biofilme é multifatorial, envolvendo, além da regulação de genes envolvidos na formação do biofilme, condições ambientais. O estresse ambiental como a alta osmolaridade, exposição ao etanol, meio de crescimento, suplementação de carboidratos, oxigênio e dióxido de carbono contidos na atmosfera, concentração de ferro e concentrações sub-inibitórias de alguns antimicrobianos tem sido responsabilizados por influenciar fenotipicamente a formação de biofilme (CONLON *et al.*, 2002; MACK *et al.*, 2006).

O biofilme é uma estrutura altamente dinâmica e a formação do biofilme ocorre em duas etapas fundamentais (Figura 1). A primeira etapa corresponde à fase de adesão, onde a bactéria pode se aderir à superfície através de fatores inespecíficos como hidrofobicidade e alterações eletrostáticas (ZIEBUHR *et al.*, 2006; SCHOENFELDER *et al.*, 2010). Estas interações são possíveis devido à característica hidrofóbica da superfície da célula estafilocócica que permite sua ligação às superfícies hidrofóbicas de polímeros de dispositivos médicos implantáveis (ZIEHBUR *et al.*, 2006; ROHDE *et al.*, 2010). A adesão à superfície pode ocorrer também envolvendo proteínas da matriz extracelular do hospedeiro (ECM), como o colágeno, fibronectina, fibrinogênio e vitronectina. O depósito destas proteínas ocorre prontamente após a implantação de dispositivos médicos, envolvendo interações diretas da superfície da bactéria com os polímeros. Estas interações ocorrem através dos ácidos teicóicos presentes na membrana bacteriana e de proteínas, como por exemplo, autolisinas e adesinas, respectivamente Atl e Aae (ROHDE *et al.*, 2010).

Posteriormente, ocorre a fase de acumulação do biofilme, que é caracterizada pela acumulação de fatores que medeiam o contato bacteriano célula - célula. Nesta

fase ocorre a produção de uma matriz extracelular na qual as bactérias ficam envolvidas. Dentre os componentes produzidos nesta etapa, está o polissacarídeo de adesão intercelular (PIA), que corresponde ao maior componente do biofilme em *S. epidermidis*. Além de PIA, outras proteínas têm sido relacionadas como mediadoras da formação de biofilme também exercendo papel nesta etapa de acumulação, como a proteína associada à acumulação, Aap e a proteína associada a biofilme Bap/Bhp (ZIEBUHR *et al.*,2006; SCHOENFELDER *et al.*,2010).

Em *Staphylococcus* spp. PIA é codificada pelo operon *icaADBC*, que consiste de quatro genes estruturais *icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC*, além de um gene regulatório *icaR*, que antecede o *icaA* na sequência do operon e é responsável pela regulação da expressão do *icaADBC*, e influenciando diretamente na produção do biofilme. Para a produção funcional de PIA é requerido a expressão dos quatro genes. O *icaA* codifica para enzima N-acetilglicosamil-transferase que utiliza como substrato UDP-N-acetilglicosamina; esta enzima "in vitro" não é muito ativa, mas a co-expressão do gene *icaD*, que atua como uma chaperona posicionando corretamente o *icaA* na membrana, aumenta sua atividade. O *icaC*, uma proteína transmembrana, supõem-se estar relacionado a externalização e alongação do polissacarídeo, já o *icaB* é responsável pela deacetilação da PIA (GERKE *et al.*,1998; ROHDE *et al.*,2010).

A formação de biofilme mediada por PIA parece ser o mecanismo predominante em *S. epidermidis*, sendo que a sua genética epidemiológica e origens funcionais têm sido intensamente estudadas. Estudos epidemiológicos têm mostrado que isolados *S. epidermidis* nosocomiais obtidas a partir de infecções associadas a dispositivos apresentam o operon *icaADBC* como uma característica típica; o mesmo foi observado em cateter intravascular e bacteremia. Da mesma forma, bactérias fora do ambiente hospitalar raramente apresentaram o operon *icaADBC*. Também existem estudos que relatam a formação de biofilme em cepas *S. epidermidis* independente de PIA, sugerindo a existência de adesinas intercelulares adicionais que poderiam substituir funcionalmente PIA, como a proteína associada a acumulação, Aap (ZIEBUHR *et al.*, 2006 e ROHDE *et al.*, 2010).

Alguns trabalhos tem documentado a presença do operon *icaADBC* para espécies SCN não epidermidis, como *S. caprae*, *S. lugdunensis* e *S. haemolyticus*, demonstrando haver homologia com o operon *icaADBC* de *S. epidermidis*. (MACK *et al.*, 2006; FREDHEIM *et al.*,2009; ROHDE *et al.*, 2010). Justificando assim a importância do estudo do operon *ica* nestas espécies SCN, uma vez que já foi observada formação de biofilme entre elas (MALES *et al.*,1985; STEPANOVIC *et al.*,2001,2003; FRANK *et al.*,2007; FREDHEIM *et al.*,2009).

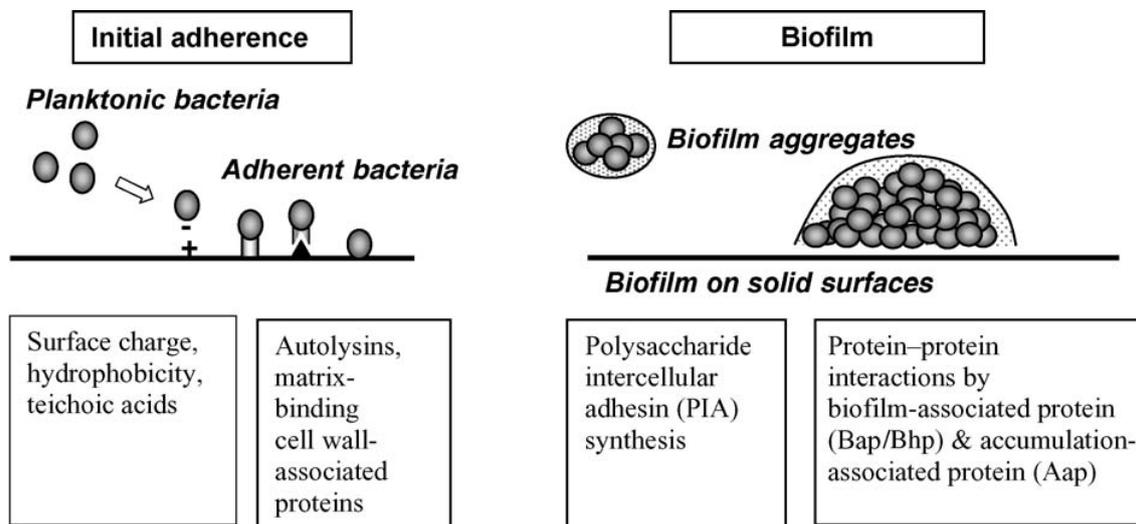


Figura1. Fatores envolvendo a aderência inicial a superfícies e acumulação do biofilme em estafilococos (Extraído de Ziebuhr *et al.*,2006).

2.5 Resistência aos antimicrobianos

O tratamento de infecções envolvendo SCN é frequentemente um problema terapêutico, pois muitos isolados clínicos demonstram resistência a múltiplos antibióticos (DIEKEMA *et al.*, 2001; GALES *et al.*, 2009; SCHOENFELDER *et al.*, 2010). Este grupo de microorganismos tem sido reconhecido, entre as espécies *Staphylococcus*, como o mais resistente a agentes antimicrobianos superando sistematicamente *S. aureus* (GALES *et al.*, 2009). Níveis aumentados de resistência para agentes antimicrobianos, como aminoglicosídeos, glicopeptídeos, quinolonas, tetraciclina, macrolídeos, lincosamidas e sulfametoxazol/trimetoprima utilizados para o tratamento de infecções de *staphylococcus* multiresistentes tem sido reportados (BANNERMAN, 2003).

Além da resistência apresentada por estas espécies dificultar o tratamento antimicrobiano, estes organismos podem agir como reservatórios e transmissores de genes de resistência para outros microorganismos no ambiente hospitalar (MONSEN *et al.*, 1998). Estudos têm mostrado evidências da transferência gênica horizontal de genes de resistência entre espécies estafilocócicas (GALES *et al.*, 2009; SCHOENFELDER *et al.*, 2010). Além disso, a vida em comunidade facilita a passagem de plasmídeos que podem codificar para genes de resistência a múltiplos agentes antimicrobianos (DONLAN, 2002). A multiresistência tem sido notada mais frequentemente em algumas espécies como, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* e *S. hominis* do que em outras espécies deste grupo (BANNERMAN, 2003; GALES *et al.*, 2009; SCHOENFELDER *et al.*, 2010).

A multiresistência aos antimicrobianos é uma das principais características observadas entre amostras hospitalares de SCN, destacando-se principalmente a resistência a metilina (oxacilina) dentre os demais antimicrobianos (DIEKEMA *et al.*, 2001; GALES *et al.*, 2009). Segundo estudo realizado pelo SENTRY, as taxas de resistência para oxacilina observadas no mundo inteiro no período de 1997-1999 (DIEKEMA *et al.*, 2001) foram de 77.3% – 76.9%. Estudo mais recente do SENTRY, avaliando apenas hospitais brasileiros no período de 2005-2008, corroboram estes resultados, encontrando-se uma resistência a oxacilina de 78,7% (GALES *et al.*,

2009). Dentre as espécies de SCN, *S. haemolyticus* (86,4%), *S. hominis* subsp. (80%), *S. epidermidis* (55,9%) e *S. warneri* (55,6%) foram os que apresentaram maiores taxas de resistência a oxacilina. Sendo que neste estudo, nenhuma resistência à oxacilina foi encontrada em *S. lugdunensis*, *S. schleiferi* e *S. saprophyticus* (GATERMANN *et al.*, 2007).

A resistência à oxacilina dá-se devido a produção de uma proteína ligante à penicilina mutante chamada PBP2 que apresenta baixa afinidade de ligação em relação aos β -lactâmicos (HACKBARTH & CHAMBERS, 1989; GIESBRECHT *et al.*, 1998). O gene que codifica para esta proteína é o *mecA*, que é localizado em um único vetor molecular chamado cromossomo cassete staphylococcal (SCCmec). SCCmecs carregam genes móveis e integram-se de modo sítio específico dentro de um locus altamente conservado no DNA cromossomal de *Staphylococcus* (SCHOENFELDER *et al.*, 2010). A transferência de SCCmec, entre espécies estafilocócicas tem sido mostrado para *S.aureus* e *S. epidermidis* (ZIEBUHR *et al.*, 2006).

Isolados resistentes a oxacilina são ainda mais problemáticas devido a potencial existência de resistência cruzada com todos os β -lactâmicos, além de outros antimicrobianos. Além disso, as cepas resistentes a β -lactâmicos têm apresentado heteroresistência, ou seja, subpopulações bacterianas onde apenas algumas conseguem expressar fenotipicamente a resistência enquanto a maioria se apresenta susceptível “in vitro”, o que dificulta a detecção laboratorial desta resistência (BANNERMAN, 2003).

O gene *mecA* apresenta altos níveis de homologia entre as espécies de MRSA (*Staphylococcus aureus* metilina resistente) e de MR-SCN (*Staphylococcus* coagulase negativo resistentes a metilina). Dentre SCN, a espécie *S. sciuri* tem a peculiaridade de apresentar um gene *mecA* nativo homólogo que difere do gene *mecA* encontrado em MRSA e outros MR-SCN, que se mostra susceptível ou com resistência “boderline”. Alguns isolados clínicos de *S. sciuri*, tem sido descrito com ambos os genes, o nativo *mecA* e o *mecA* MRSA (BANNERMAN, 2003). Um fato interessante é que este gene homólogo é ubíquo nesta espécie, mas seu genótipo é

de susceptibilidade. Este e outros dados sustentam a hipótese de que o gene *mecA* é originário de espécies de SCN, possivelmente uma espécie evolucionariamente próxima do *S. sciuri* (CHAMBERS, 1997).

Para outras classes de antimicrobianos, os SCN têm também mostrado avanços na resistência. Em um estudo multicêntrico de monitoramento da resistência antimicrobiana realizado pelo SENTRY, no período de 2005 a 2008, foram verificadas altas taxas de resistência dos SCN para a maioria dos antimicrobianos nos hospitais brasileiros. Além da resistência de cerca de 80% a oxacilina, aproximadamente 70% destes isolados foram resistentes também à eritromicina, 56% a ciprofloxacino, cerca de 50% à sulfametoxazol/trimetoprima e clindamicina e 45% resistentes à levofloxacino (GALES *et al.*, 2009). Estudos anteriores já haviam divulgado dados semelhantes sobre o aumento da incidência de resistência dos SCN aos antimicrobianos (DIEKEMA *et al.*, 2001 e SADER *et al.*, 2004).

Estudo realizado na Alemanha mostrou 62% de resistência a eritromicina entre isolados de hospitais, variando entre espécies estafilocócicas, desde nenhuma resistência em *S. lugdunensis* até cerca de 90% em *S. haemolyticus*. Para *S. epidermidis* e *S. hominis* subespécie *hominis* a resistência foi de 62,5% e 51,4% respectivamente, e não foi detectada resistência nas espécies *S. lugdunensis*, *S. sciuri* e *S. chromogenes*. A resistência a eritromicina (83,5%) foi observada mais frequentemente em isolados resistentes a oxacilina (GATERMANN *et al.*, 2007).

O aumento da resistência a outros antimicrobianos tem contribuído para o uso de glicopeptídeos nas últimas duas décadas. O antimicrobiano de escolha para o tratamento de infecções causadas por MR-SCN é a vancomicina. Embora estudo do SENTRY, no período de 2005-2008 (GALES *et al.*, 2009), não tenha encontrado resistência a vancomicina em hospitais brasileiros entre isolados de SCN, do mesmo modo que foi relatado em estudo mundial no período de 1997-1999 (DIEKEMA *et al.*, 2001), atualmente há relatos de isolados de *S. haemolyticus* com resultados entre susceptível e resistência intermediária (FREDHEIM *et al.*, 2009).

Recentemente, relato de reduzida suscetibilidade aos glicopeptídeos, além de, heteroresistência a vancomicina tem sido descritos (NUNES *et al.*,2006; D'MELLO *et al.*,2008). A resistência dos SCN aos glicopeptídeos pode, entretanto ser um importante problema quando diante de dispositivos médicos, por isto é imprescindível conhecer os níveis de resistência a vancomicina entre estes isolados (CREMNITER *et al.*, 2010). Este agente antimicrobiano tem sido amplamente utilizado nos últimos anos, como alternativa ao tratamento de isolados MR-SCN, contudo, a concentração necessária para inibir o crescimento de estafilococcus vem aumentando progressivamente, podendo-se verificar o aumento na concentração inibitória mínima (MIC) (TACCONELLI *et al.*, 2001; CREMNITER *et al.*, 2010). Em vista disso, em 2006, o CLSI reduziu o ponto de corte de susceptibilidade do *S. aureus* frente à vancomicina de 4 µg/ml para 2 µg/ml, contudo, ainda neste documento, manteve o ponto de corte de susceptibilidade ≤ 4 µg/ml para SCN (CLSI, 2006). Em 2009, este comitê, em vista de estudos relatando o aparecimento de isolados de MRSA com valores de MIC ≤ 2 µg/ml, e resposta clínica diminuída à vancomicina (SORIANO *et al.*, 2008), houve uma nova alteração nos critérios do CLSI quanto à determinação da MIC de vancomicina. Assim, passando a recomendar a utilização do ensaio de determinação da MIC de vancomicina através da técnica de microdiluição em caldo para todos os isolados de estafilococos (CLSI 2009).

A emergência de cepas resistentes à vancomicina aumenta o interesse em novos agentes antimicrobianos como alternativa necessária ao tratamento destas infecções. A atividade “in vitro” de novos agentes como a daptomicina (um ciclolipopeptídeo), linezolida (uma oxazolidinona) e quinupristina-dalfopristina (uma combinação de espreptograminas) frente a espécies SCN tem demonstrado uma atividade satisfatória (DIEKEMA *et al.*, 2001; SADER *et al.*,2006; CHAUDHERY e KUMAR,2007; GALES *et al.*, 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS

Avaliar a formação de biofilme em *Staphylococcus* coagulase negativo não *epidermidis* isolados de cateter venoso central através da técnica da microplaca e da detecção dos genes *icaA* e *icaD*.

Avaliar a resistência aos antimicrobianos pela determinação da Concentração Inibitória Mínima.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Isolados bacterianos e identificação das espécies

Foram estudados 19 isolados de *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) não *epidermidis*, de cateteres venoso central (CVC), coletados no período de janeiro de 2008 a maio de 2009, de pacientes distintos, hospitalizados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, um hospital de atendimento terciário. As amostras foram submetidas ao teste da coagulase e os isolados negativos foram submetidos ao teste de fosfomicina e desferroxamina, para identificação de *S. epidermidis* segundo Antunes e colaboradores (2008). As amostras não *S. epidermidis* foram encaminhadas para identificação da espécie pelo sistema automatizado WalkAway[®] (Siemens, NY, USA).

4.2 Resistência bacteriana

Os testes de susceptibilidade foram realizados pelo sistema automatizado WalkAway[®] (Siemens, NY, USA) para os seguintes antibióticos: clindamicina, eritromicina, gentamicina, levofloxacino, oxacilina, rifampicina, sulfametoxazol/trimetoprima e vancomicina. A resistência a oxacilina foi confirmada pela presença do gene *mecA* através da reação de PCR (VANUFFEL *et al.*, 1998).

4.3 Detecção da formação de biofilme pelo teste da microplaca

A determinação semiquantitativa de produção de biofilme foi desenvolvida usando o ensaio da microplaca como descrito previamente por Stepanovic e colaboradores (2007). Os experimentos foram realizados em oitoplicata. Resumidamente, numa microplaca de poliestireno de fundo chato (COSTAR 3599, Corning, NY, USA), contendo 96 poços (12x8), foi adicionado no primeiro dia, em cada poço 20 µl de suspensão bacteriana (0,5 McFarland) com 180 µl de meio TSB (Tryptone Soya Broth) (Oxoid, Basingstoke, UK). A placa foi encubada durante 18 h a 35°C. Após este período, realizaram-se três lavagens com 200 µl de salina estéril para a remoção das células bacterianas não aderidas a superfície polimérica da placa. As células bacterianas aderidas foram fixadas com 150 µl de metanol por 20

minutos. Após este período a placa foi invertida e submetida à secagem por 30 minutos à temperatura ambiente. Foi adicionado cristal violeta 0,5% durante 15 minutos para corar as células bacterianas aderidas à placa. Depois, as placas foram lavadas em água corrente, e, após sua secagem à temperatura ambiente, o biofilme corado foi eluído com 150 µl de etanol por 30 min. A absorbância foi medida em 450nm em um leitor de ELISA (Behring EL 311- HOECHST, Akasaka, Japan). Cada placa continha *S. epidermidis* ATCC 35984 como controle positivo e como branco foi utilizado apenas meio TSB sem bactéria. Os valores medidos e desvios padrões foram calculados segundo Stepanovic e colaboradores (2007). O valor da DO utilizado foi o valor médio obtido nas oito leituras para cada isolado menos o valor medido para o controle branco; desta forma foi possível excluir os valores mais discrepantes e controlar a variabilidade. Considerou-se produtor de biofilme as amostras, cuja média de leitura DO para cada isolado, subtraída da seguinte fórmula $[B + 3(s)]$ foi maior que zero (STEPANOVIC *et al.*, 2007), onde **B** é a média da leitura do branco e **s** é o desvio padrão das leituras do branco. Os isolados foram classificados como forte produtores de biofilme quando obtido valor > 2 e ≤ 3 , moderado quando > 1 e ≤ 2 , fraco quando obtido valor >0 e ≤ 1 e não produtor de biofilme quando valor obtido for negativo ou igual a zero.

4.4 Reação em cadeia da polimerase para detecção dos genes *icaA*, *icaD* e *mecA*

A extração do DNA das amostras isoladas foi realizada através do método da lise térmica, para isso as bactérias foram primeiramente semeadas em Mueller Hinton (Oxoid, Basingstoke, UK) e incubadas na estufa por 24 horas. Após, preparou-se uma suspensão das bactérias com TE (10mMTris-HCl e 1mMEDTA, pH 8.0). Esta suspensão foi aquecida em banho-maria a 100° C por 10 min e posteriormente submetida a um choque térmico de 24 horas no freezer a - 20°C. No dia seguinte, realizou-se uma centrifugação a 15 RPM por 3 min onde foi utilizado o sobrenadante que continha o material de DNA.

Para a detecção dos genes *icaA* e *icaD* pela técnica de PCR foi utilizado o protocolo da reação (Tabela 1) e os seguintes primers já descritos por Arciola e

colaboradores (2001): *icaA* primer senso 5'-3' : TCTCTTGCAGGAGCAATCAA e primer antisenso 5'-3': TCAGGCACTAACATCCAGCA produzindo um fragmento de 188pb; *icaD* primer senso 5'-3': ATGGTCAAGCCCAGACAGAG e primer antisenso 5'-3': CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA produzindo um fragmento de 198pb. Foram utilizados como controle positivo *S. epidermidis* ATCC 35984 e controle negativo *S.epidermidis* ATCC 12228. As condições de reação foi realizada conforme Arciola e colaboradores (2001) com algumas modificações. As condições incluíram a desnaturação inicial a 94°C por 5min, seguido de 30 ciclos de desnaturação (94°C por 30s), anelamento (55,5°C por 30s), e extensão (72°C por 1min), seguido de uma extensão final de 72°C por 4min. Os produtos amplificados foram visualizados sob a luz ultravioleta, após a eletroforese em gel de agarose a 1,2% corado previamente com brometo de etídio, utilizando um marcador de peso molecular de 100pb.

Tabela 1. Protocolo da PCR para genes *icaA* e *icaD*

Reagente utilizados	Concentração	Volume utilizado	Concentração final (25µl)
Solução de Dntp	25mM	0,1µl	100µM
Solução de Primers	25µM	1µl	1µM
Tampão (10x)	15mM MgCl ₂	4,2µl	2,5mM MgCl ₂
Taq polimerase Super-therm	5U/µl	0,25µl	1U
DNA		5µl	150ng
Água		14,45µl	

A detecção do gene *mecA* gene foi realizada utilizando os seguintes primers: *mecA*¹: 5' TGG CTA TCG TGT CAC AAT CG, *mecA*²: 5' CTG GAA CTT GAG CAG AG (VANUFFEL *et al.*,1998). O protocolo utilizado para a preparação está detalhado na tabela 2. O programa de temperaturas e ciclagens no PCR foi utilizado segundo Vanuffel e colaboradores (1998), as condições incluíram uma desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação (94° C por 1min), anelamento (55° C por 1 min) e extensão (72°C por 1: 30min), seguido de uma extensão final de 72°C por 4 min. O fragmento de DNA amplificado apresentando 310pb foi revelado após a eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio sob luz ultravioleta.

Tabela 2. Protocolo da PCR para o gene *mecA*

Reagentes utilizados	Concentração	Volume utilizado	Concentração final (25µl)
Solução de Dntp	2,5 mM	2µl	200µM
Solução de Primers	25µM	1µl	1µM
Tampão (10x)	15mM MgCl ₂	2,5µl	1,5mM MgCl ₂
Taq polimerase Super-therm	5U/µl	0,25µl	1U
DNA		5µl	150ng
Água		14,25µl	

4.5 Análise da relação de identidade dos genes *icaA* e *icaD* entre as espécies SCN não *epidermidis* comparadas aos genes presentes em *S. epidermidis*

A porcentagem de identidade determinada para os genes *icaA* e *icaD* das espécies SCN não *epidermidis* quando comparado ao gene *icaA* e *icaD* de *S. epidermidis*, foi realizado através do alinhamento das sequências, utilizando o programa Geneious (Basic 5.1.6, Biomatters). Para as espécies no qual o operon *ica* estava apenas parcialmente sequenciado no banco de dados do GenBank, utilizou-se um fragmento de 372 pb do gene *icaA* previamente sequenciado. Os números de acesso do GenBank (Database of the National Center for Biotechnology Information) utilizados para análise das sequências, foram os seguintes: *S. haemolyticus*, FJ472951.2; *S. capitis*, AY146582; *S. caprae*, AF246926.1; *S. lugdunensis*, EF546621.1; *S. cohnii*, AF500268; *S. saprophyticus*, AF500270; *S. condimentii* AF500266; *S. simulans*, AF500263.1; *S. sciuri* AF500259.1; *S. epidermidis* RP62A NC_002976.3.

5 RESULTADOS

Um total de 19 isolados *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) não *epidermidis* foram selecionados de uma amostragem de 224 *Staphylococcus* spp. obtidos de CVC pacientes internados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Entre as amostras estudadas, foram identificadas cinco diferentes espécies, sendo uma delas composta de duas subespécies. A espécie mais frequente foi *S. haemolyticus* (10 isolados), seguido de *S. capitis ureolyticus* (3 isolados), *S. capitis capitis* (2 isolados), *S. simulans* (2 isolados), *S. sciuri* (1 isolado) e *S. warneri* (1 isolado). A grande maioria dos isolados (11/19) foi obtida de pacientes de diferentes UTIs (Tabela 3). A maioria dos casos era relacionada a cateteres de curta permanência (16), dois foram relacionados a procedimentos de hemodiálise e apenas um caracterizado como sendo de longa permanência. Em 12/19 casos foi considerado presença de infecção relacionada ao cateter, conforme os parâmetros do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar do HCPA, sendo os demais isolados (7/19) colonização (Tabela 5).

As maiores taxas de resistência foram encontradas para oxacilina, correspondendo a 89,46%; somente dois isolados foram susceptíveis a oxacilina sendo um *S. warneri* e outro *S. capitis capitis*. As taxas de resistência aos demais agentes antimicrobianos foi de 84,21% para gentamicina, 78,85% para levofloxacino, 68,42% para eritromicina, 63,16% para clindamicina, 52,63% para sulfametoxazol/trimetoprima e 26,32% para rifampicina. O único antibiótico para o qual não foi detectada resistência foi a vancomicina. Embora, dois isolados de *S. haemolyticus* tenham apresentado valores de MIC de 4 µg/ml pelo sistema automatizado, que é o valor de corte entre susceptível e resistência intermediária, a confirmação pelo teste de microdiluição (considerado padrão ouro) apresentou MIC de 2 µg/ml. A multirresistência, aqui considerada como resistência a pelo menos três classes de antibióticos, foi observada em 16 amostras (Tabela 4).

A análise da resistência a oxacilina foi através do teste de susceptibilidade realizado pelo sistema automatizado Walkway® e a detecção do gene *mecA* por PCR revelou concordância em todos os testes, positivos e negativos.

Analisando a formação de biofilme pelo método fenotípico em microplaca, seis (31,58%) isolados foram biofilme positivo (Tabela 5). Nenhum dos isolados apresentou como resultado fenotípico ser fortemente formador de biofilme; duas amostras foram classificadas na categoria moderada e quatro fracas.

A análise genotípica para o operon *ica*, através do PCR para a detecção dos genes *icaA* e *icaD*, mostrou que 36,8%(7/19) das amostras portavam o gene *icaA* e 42,1% (8/19) o gene *icaD*. Contudo, apenas 31,6% (6/19) tiveram ambos os genes presentes. Em 52,6% (10/19) não foi verificada a presença de nenhum dos genes, e para três (15,8%) amostras foi detectado apenas um dos genes (Tabela 5). Dentre os não formadores de biofilme (13/19) pela microplaca, nove amostras não apresentaram nenhum dos genes pesquisados, ou seja, em quatro amostras foi detectado pelo menos um dos genes associados à formação de biofilme. Por outro lado, entre os formadores de biofilme (6/19), apenas três apresentaram ambos os genes (Tabela 5).

Os resultados quanto a similaridade encontrada entre as sequências dos genes *icaA* e *icaD* de SCN não epidermidis com os genes de *S. epidermidis* estão na tabela 6. Para algumas espécies os genes não foram totalmente sequenciados; foi realizada uma estimativa de similaridade pela comparação deste fragmento.

Tabela 3. Distribuição dos isolados de acordo com setores hospitalares.

Divisão hospitalar	Nº de isolados (total=19)
UTI	6
UTI neonatal	2
UTI pediátrica	2
UTI pós cirúrgica cardíaca	1
Internação clínica	4
Internação cirúrgica	2
Internação pediátrica	1
Unidade de ambiente protegido	1

Tabela 4. Perfil de Susceptibilidade Antimicrobiana entre os isolados SCN não *epidermidis*

ISOLADOS	OXA	CLI	ERI	GE	LEVO	RIFA	SULFA/TRIM	VANCO
<i>S. haemolyticus</i>	R	S	S	S	S	S	R	S
<i>S. haemolyticus</i>	R	S	R	R	R	S	R	S
<i>S. haemolyticus</i>	R	R	R	R	R	R	R	S
<i>S. haemolyticus</i>	R	R	R	R	R	S	R	S
<i>S. haemolyticus</i>	R	R	R	R	R	R	R	S
<i>S. haemolyticus</i>	R	R	R	R	R	R	R	S
<i>S. haemolyticus</i>	R	R	R	R	R	S	R	S
<i>S. haemolyticus</i>	R	R	R	R	R	S	S	S
<i>S. haemolyticus</i>	R	R	R	R	R	S	R	S
<i>S. haemolyticus</i>	R	S	R	R	R	R	R	S
<i>S. capitis ureolyticus</i>	R	S	S	R	R	S	S	S
<i>S. capitis ureolyticus</i>	R	S	S	R	R	I	S	S
<i>S. capitis ureolyticus</i>	R	R	R	R	R	S	S	S
<i>S. capitis capitis</i>	R	R	R	R	R	S	S	S
<i>S. capitis capitis</i>	S	S	S	S	S	I	S	S
<i>S. simulans</i>	R	R	R	R	R	R	R	S
<i>S. simulans</i>	R	R	R	R	R	S	S	S
<i>S. warneri</i>	S	S	I	S	S	S	S	S
<i>S. sciuri</i>	R	R	I	R	I	I	S	S

R= resistente; S=susceptível; I=intermediário

OXA= oxacilina; CLI= clindamicina; ERI= eritromicina; GE= gentamicina; LEVO= levofloxacino;

RIFA= rifampicina; SULFA-TRIM= sulfamethoxazol-trimetoprima; VANCO= vancomicina

Tabela 5. Comparação dos resultados de biofilme através do método da microplaca e da detecção dos genes *icaA* e *icaD*

Isolados	Microplaca	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	colonização* x infecção*
<i>S. haemolyticus</i>	fraco	positivo	positivo	Infecção
<i>S. haemolyticus</i>	fraco	negativo	negativo	Infecção
<i>S. haemolyticus</i>	não biofilme	negativo	positivo	Infecção
<i>S. haemolyticus</i>	não biofilme	negativo	negativo	Infecção
<i>S. haemolyticus</i>	não biofilme	negativo	negativo	Infecção
<i>S. haemolyticus</i>	não biofilme	negativo	negativo	Infecção
<i>S. haemolyticus</i>	não biofilme	negativo	negativo	Colonização
<i>S. haemolyticus</i>	não biofilme	negativo	negativo	Colonização
<i>S. haemolyticus</i>	não biofilme	negativo	negativo	Colonização
<i>S. haemolyticus</i>	não biofilme	positivo	positivo	Colonização
<i>S. capitis ureolyticus</i>	moderado	positivo	negativo	Infecção
<i>S. capitis ureolyticus</i>	não biofilme	negativo	negativo	Infecção
<i>S. capitis ureolyticus</i>	não biofilme	negativo	negativo	Infecção
<i>S. capitis capitis</i>	moderado	positivo	positivo	Infecção
<i>S. capitis capitis</i>	não biofilme	negativo	negativo	Infecção
<i>S. simulans</i>	fraco	positivo	positivo	Infecção
<i>S. simulans</i>	não biofilme	positivo	positivo	Colonização
<i>S. warneri</i>	não biofilme	positivo	positivo	Colonização
<i>S. sciuri</i>	fraco	negativo	positivo	Colonização

*infecção relacionada a cateter venoso central(CVC) ou colonização

Tabela 6. Similaridade entre as sequências dos genes *icaA* e *icaD* de SCN não *epidermidis* com os genes de *S. epidermidis*

Espécie	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	parcial <i>icaA</i>
<i>S. haemolyticus</i>	98%	100%	-
<i>S. capitis</i>	80%	76%	-
<i>S. caprae</i>	79%	78%	-
<i>S. lugdunensis</i>	68%	59%	-
<i>S. cohnii</i>	NS	NS	82%
<i>S. saprophyticus</i>	NS	NS	82%
<i>S. condiment</i>	NS	NS	100%
<i>S. simulans</i>	NS	NS	75%
<i>S. sciuri</i>	NS	NS	72%

parcial *icaA* = sequência de 372pb do gene *icaA*

NS= não sequenciado

6 DISCUSSÃO

A utilização de cateteres intravasculares é um procedimento indispensável na prática médica moderna, especialmente em unidades de terapia intensiva (UTIs), onde os cateteres são de extrema importância para o controle do paciente, incluindo o manejo de medicamentos (O'GRADY *et al.*, 2002). Ainda assim estes dispositivos aumentam o potencial de colonização e infecção, principalmente por SCN; de fato observamos que 58% dos cateteres com SCN não *epidermidis* eram de pacientes hospitalizados em UTI.

Infecções sanguíneas são uma complicação frequente do uso de CVC, com taxas de incidência de 2,9-11,3 casos por 1000 CVC dia (O'GRADY *et al.*, 2002). Neste trabalho observamos que a maioria dos casos avaliados (63%), foi relacionada a infecções, conforme critérios do CCIH do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

A maioria dos estudos realizados em isolados de dispositivos médicos se refere apenas com *S.epidermidis* e *S. aureus* (ARCIOLA *et al.*, 2001; CAFISO *et al.*, 2004; ROHDE *et al.*, 2007; PETRELLI *et al.*, 2008), havendo uma lacuna importante de informações quanto as demais espécies. Em nosso estudo, foram identificadas cinco espécies distintas SCN não *epidermidis*, o que correspondeu a 8,5% (19/224) dos isolados de *Staphylococcus* spp de CVC avaliados.

A espécie mais frequente isolada foi *S. haemolyticus*, concordando a prevalência descrita em CVC e hemocultura (GOLDSTEIN *et al.*, 1990; GATERMANN *et al.*, 2007; FRANK *et al.*, 2007). A presença das demais espécies também foi verificada por Gatermann e colaboradores (2007) em isolados de hemocultura e CVC. Diamond-Hernández e colaboradores (2010) em um estudo relacionado a infecções de dispositivos médicos, de sítios que não cateter (hemocultura, fluido cerebrospinal), encontraram *S.haemolyticus*, *S.sciuri* e *S.warneri*, embora, diferentemente de nós não tenham encontrado *S. simulans* e *S. capitis*. Por outro lado, *S. capitis* também foi isolado de pacientes com infecção relacionada a CVC em outros estudos (NABI *et al.*, 2009; RAAD *et al.*, 2009).

A capacidade de formação de biofilme tem sido considerada um marcador crucial de virulência em SCN; em vista disso, tem se relacionado isolados SCN formadores de biofilme com maior incidência de infecções (KOTILAINEN,1990; GALDBART *et al.*,2000; FREBOURG *et al.*,2000; DIEMOND-HERNÁNDEZ *et al.*,2010; YUE QU *et al.*, 2010). Embora neste trabalho não tenha sido possível observar uma correlação significativa entre formação de biofilme e infecção, possivelmente devido ao pequeno número de amostras aqui estudadas, foi possível verificar que na maioria dos casos, os isolados de CVC formadores de biofilme (83,33% ou 5/6) foram relacionados à infecção.

A capacidade de formar biofilme tem sido relatada para as espécies: *S. simulans*, por Males e colaboradores (1985), *S. sciuri* por Stepanovic e colaboradores (2003), *S. haemolyticus* por Foka e colaboradores (2006) e Fredheim e colaboradores (2009), *S. capitis* por QU e colaboradores (2010). Em nosso trabalho, foi possível detectar a formação de biofilme, para as espécies *S. haemolyticus*, *S. capitis ureolyticus*, *S. capitis capitis*, *S. sciuri*, *S. simulans*.

Observamos que apenas 31,6% dos SCN não *epidermidis* foram formadores de biofilme, um valor muito inferior ao descrito para as espécies *S. epidermidis* (69%) e *S. aureus* (100%), reconhecidamente formadores de biofilme, em um estudo em isolados de dispositivos médicos (ROHDE *et al.*,2007). Comparando nossos resultados da espécie mais prevalente, *S. haemolyticus*, foi visto que apenas 20% das amostras formaram biofilme, um número inferior aos 74% relatados por Fredheim e colaboradores (2009) em isolados de hemocultura. Esta discrepância pode ser devida ao menor número de isolados presente neste estudo, assim como pela origem dos isolados.

O método fenotípico reconhecido como o padrão para detecção de biofilme por estafilococos é o teste de quantificação em microplaca. Deste modo os resultados obtidos através deste teste foram aqui considerados categóricos na avaliação da formação de biofilme. A avaliação da produção de biofilme “in vitro” e a otimização da técnica da microplaca tem sido investigada, particularmente para *S. epidermidis* e *S. aureus*, por Stepanovic e colaboradores (2007) que

apresentaram considerações pontuais. A padronização de técnicas e as condições do teste para as outras espécies estafilocócicas permanecem ainda menos elucidadas. Nosso trabalho utilizou as mesmas condições preconizadas por Stepanovic e colaboradores (2007) para *S. epidermidis*.

É importante lembrar que a formação de biofilme é influenciada pelas condições de cultura, em virtude disso certo grau de variabilidade pode ocorrer dependendo do meio de incubação. Assim sendo, bactérias podem não expressar seu fenótipo de formação de biofilme em um meio sem suplementação, enquanto com suplementação adequada de açúcares, sal e etanol podem demonstrar produção de biofilme. A formação de biofilme para as espécies SCN não epidermidis tem sido avaliada em diferentes condições de teste. Fredheim e colaboradores (2009) para *S. haemolyticus*, mostraram que 72% formavam biofilme em condições semelhantes às utilizadas em nosso trabalho (meio TSB suplementado com glicose), contra 31% em condições de crescimento com NaCl. Os autores também relataram a observação visual de biofilme na interface líquido-ar, o que não foi observado por nós, embora tenha sido realizado teste nas mesmas condições (FREDHEIM *et al.*,2009). Em outro estudo onde também foi testada a capacidade de formação de biofilme em diferentes condições, com isolados de cultura de sangue de bebês utilizando CVC, *S. warneri* formou biofilme em meio TSB suplementado com glicose 1% e *S. capitis* em TSB com 4% de NaCl, utilizando método para quantificar conforme Cualtieri *et al.* (2006, 2007), diferente do nosso. A produção de biofilme por *S. capitis* em outro estudo foi induzida por estresse externo como altos níveis de NaCl através da indução da expressão do locus *ica* pela repressão do ciclo do ácido tricarbóxico (QU *et al.*,2010).

A análise molecular dos genes do operon *ica* tem sido utilizada como uma ferramenta na detecção da formação de biofilme, porém devido a vários mecanismos regulatórios envolvendo a expressão deste operon, desde condições ambientais até inserções e excisões de elementos móveis como IS256, a presença destes genes não garante a sua expressão fenotípica (ZIEBUHR *et al.*,1999; KNOBLOCH *et al.*,2001, 2002; CAFISO *et al.*,2004).

Em nosso estudo houve concordância entre os resultados da detecção de genes *ica* e microplaca para 63,2% (12/19) isolados: nas seis amostras formadoras de biofilme pela microplaca, três também portavam ambos os genes *icaA* e *icaD* (50% dos positivos), enquanto em 9/13 amostras não formadoras de biofilme os genes não foram detectados. A ausência dos genes parece fornecer maior probabilidade de não formação de biofilme. No entanto, foi observada discrepância em três isolados que eram biofilme negativos e apresentavam ambos os genes, demonstrando que a formação de biofilme está relacionada a condições multifatoriais.

A formação de biofilme independente da produção de PIA tem sido demonstrada em muitos estudos com *S. epidermidis* (VANDECASTEELE *et al.*,2003; ROHDE *et al.*,2007; QU *et al.*,2010); podendo ocorrer fraca formação de biofilme mediada por proteínas, enquanto a produção de PIA estaria mais relacionada a amostras forte produtoras de biofilmes (WEISSER *et al.*,2010). Em nosso estudo, três isolados formadores de biofilme apresentaram discrepância quanto aos genes: um *S. haemolyticus* não portava nenhum dos genes, um *S. capitis ureolyticus* portava apenas o *icaA*, e um *S. sciuri* tinha apenas o *icaD*. A presença apenas de um dos genes *ica* já tinha sido relatada entre isolados SCN não epidermidis (BRADFORD *et al.*,2006; FOKA *et al.*,2006).

Entre *S. haemolyticus*, tem sido verificada uma baixa prevalência do operon *icaADBC*, cerca de 4% entre isolados formadores de biofilme (*ica* independente). Nesta espécie, a PIA teria supostamente um papel menor na fase de acumulação, onde o DNA extracelular e as proteínas exerceriam o papel mais importante (FREDHREIM *et al.*,2009). A formação de biofilme em *S. capitis* tem sido reportada na ausência do gene *icaD* (QU *et al.*,2010), como ocorreu em nosso trabalho embora tenha sido detectado a presença do *icaA* em nossos isolados. Bradford e colaboradores (2006), utilizando os mesmos primers aqui descritos encontraram o gene *ica* na espécie *S. capitis*, mas não em *S. haemolyticus* e *S. warneri*.

Um isolado *S. warneri* biofilme negativo apresentou ambos os genes, o que não foi observado em outros trabalhos (DA SILVA *et al.*,2002; BRADFORD *et*

al.,2006; QU *et al.*,2010). Em *S.sciuri* foi detectado apenas o *icaD*, enquanto Diamond-Hernández e colaboradores(2010) não detectaram nenhum dos genes nesta espécie.

A detecção dos genes *ica* em SCN tem sido realizada tomando por base estudos com primers não específicos para cada espécie, considerando assim primers universais para todos os *Staphylococcus* (DA SILVA *et al.*,2002; BRADFORD *et al.*,2006; DIAMOND-HERNÁNDEZ *et al.*,2010). Neste trabalho, assim como ocorre na maioria dos estudos na detecção do operon *ica* para espécie estafilocócicas, os primers utilizados foram baseados na seqüência do operon do *S. epidermidis* ATCC 35984 (RP62A) (ARCIOLA *et al.*,2001). A porcentagem de identidade das sequências dos genes *icaA* e *icaD* para as espécies SCN não *epidermidis* disponíveis no Genbank, comparadas ao *S.epidermidis* RP62A, mostrou uma alta homologia para a espécie *S. haemolyticus*, aproximadamente 100%. Este alto grau de similaridade já havia sido relatado por Fredheim e colaboradores (2009). Para *S. capitis* e *S. caprae* os valores ficaram acima de 75%, enquanto para *S. lugdunensis* a média da porcentagem de identidade apresentada para os dois genes foi menor, ficando em torno de 64%. A análise do fragmento de 372pb, sequenciado para algumas espécies, permitiu uma estimativa da porcentagem de similaridade do gene *icaA* com *S. epidermidis*. Baseado neste fragmento, *S. condimentii* apresentou similaridade de 100%, enquanto valores inferiores foram observados para *S. saprophyticus* e *S.cohnii* com aproximadamente 82%, seguido de 75% para *S. simulans*, 72% para *S. sciuri*.

Os resultados discrepantes quanto a detecção dos genes *icaA* e *icaD* para três espécies, *S. haemolyticus*, *S. capitis ureolyticus* e *S.sciuri* pode ser devido as diferenças quanto à similaridade dos genes entre as espécies SCN não *epidermidis*. A análise da região de anelamento dos primers na sequencia dos genes *icaA* e *icaD* para as espécies *S. haemolyticus* e *S. capitis* buscou avaliar o quanto as diferenças apresentadas entre os genes podem comprometer a detecção dos mesmos. No caso de *S. haemolyticus* no qual foi detectado apenas o gene *icaD*, foi possível verificar que os primers utilizados para este gene apresentaram uma complementariedade total com a região de anelamento do gene. Já os primers *icaA* ,

apresentou a troca de um nucleotídeo em cada primer senso e antisenso, causando desencontro no anelamento em duas bases nitrogenadas dentro da sequência do gene *icaA*, com uma similaridade de 95%. A troca de apenas uma base provavelmente não impede o anelamento do primer e, portanto não explica a não detecção do gene.

Já para espécie *S. capitis ureolyticus*, onde foi detectado apenas o gene *icaA*, a análise da região de anelamento mostrou uma similaridade de 82,5% no gene *icaA*, somando 7 desencontros de bases nitrogenadas. Na região referente ao anelamento dos primers *icaD*, 78,26% de similaridade foi encontrado para a sequência senso e antisenso, sendo que o primer senso foi 100% similar e o antisenso apenas 56,52%, apresentando dez bases nitrogenadas desencontradas, o que provavelmente dificultou o reconhecimento da sequência do gene *icaD* através do primer utilizado, comprometendo a amplificação e detecção deste gene. Considerações a respeito da utilização de primers desenhados para *S. epidermidis*, para outras espécies estafilocócicas, já haviam sido feitas por Rohde e colaboradores (2001) em relação ao *S. aureus* e por Fredheim e colaboradores (2009) em relação ao *S. haemolyticus*.

Os primers utilizados neste trabalho também foram testados com o programa DDBJ (DNA Data Bank of Japan). O programa identificou anelamento significativo com regiões reconhecidas dos primers *icaA* apenas para *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, com respectivamente 100% e 95% de identidade. Para os primers *icaD*, o primer senso reconheceu com identidade de 100% as espécies: *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. capitis*, *S. caprae*, e com o antisenso com identidade de 100% *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* e com 78,26% *S. saprophyticus*. Sendo assim, fica claro a necessidade de primers adequados para detecção dos genes pertencentes ao operon *ica* para estas espécies. O desenvolvimento de um primer que reconheça uma região presente em todas as espécies, anelando em regiões de similaridade permitiria maior garantia para resultados negativos.

Como neste trabalho foram utilizados primers desenhados para a sequência do gene de *S. epidermidis* RP62A, e como não há homologia total entre as espécies, não se pode excluir a possibilidade de falha do primer no reconhecimento das sequências do DNA dos SCN não epidermidis. Novos trabalhos são necessários para identificação de primers para o operon *icaADBC* de outras espécies de SCN, bem como o sequenciamento deste operon para as novas espécies SCN ainda não sequenciadas.

A importância dos SCN como bactérias patógenas multi-resistentes tem sido demonstrado amplamente. Neste trabalho foi possível verificar uma alta prevalência de isolados SCN não epidermidis resistentes a classes de antimicrobianos β -lactâmicos, aminoglicosídeos e fluorquinolonas.

Resistência a oxacilina foi encontrada em cerca de 90%, superando os menos de 80% descritos em hospitais brasileiros e mundiais, esta diferença possivelmente é devida à presença de *S. epidermidis* naqueles estudos, a espécie mais prevalente, e que apresenta menores taxas de resistência a oxacilina que as outras espécies de SCN (DIEKEMA *et al.*, 2001; GATERMANN *et al.*, 2007; GALES *et al.*, 2009).

Tem sido verificada maior resistência a outros antimicrobianos entre isolados MR-SCN (DIEKEMA *et al.*, 2001). Neste trabalho, não foi possível fazer uma análise de significância quanto à resistência a outros antimicrobianos em isolados MS-SCN e MR-SCN, devido ao pequeno número de MS-SCN (2/19). Porém verificou-se que os dois isolados suscetíveis a metilina, não apresentaram resistência aos outros sete antimicrobianos testados. Da mesma forma, a média de resistência para MR-SCN foi de quatro classes de antimicrobianos, demonstrando haver um maior índice de resistência entre MR-SCN.

A segunda maior taxa de resistência, 84,21%, foi para gentamicina, superior aos 60% relatado no estudo do SENTRY na América Latina (DIEKEMA *et al.*, 2001), também Mohan e colaboradores (2002) encontraram índices de 46,3% para todo grupo de SCN. Dentre os antimicrobianos testados, um dos maiores níveis de resistência foi para levofloxacino, que surpreendeu devido aos valores anteriormente relatados (GALES *et al.*, 2009) de 45% contra cerca de 79% em nosso estudo.

Os isolados clínicos apresentaram também resistência considerável frente ao antibiótico pertencente ao grupo dos macrolídeos, nossos resultados frente à eritromicina foram similares ao reportado anteriormente em outros estudos (DIEKEMA *et al.*,2001; GATERMANN *et al.*,2007; GALES *et al.*, 2009). Embora pertençam a grupos químicos distintos, a eritromicina e a clindamicina agem pelo mesmo mecanismo de ação, de modo que isolados resistentes a eritromicina tem sido considerados como potencialmente resistentes para clindamicina. A maioria dos 13 isolados resistentes a eritromicina (84,62%) apresentaram também resistência a clindamicina, superior ao reportado por Gatermann e colaboradores (2007) que era de 55%.

A resistência para sulfametoxazol/trimetoprima foi similar a anteriores (DIEKEMA *et al.*,2001; GALES *et al.*, 2009). Também a resistência a rifampicina foi semelhante ao estudo do SENTRY na América Latina (DIEKEMA *et al.*,2001). A importância deste fármaco está relacionada com a capacidade de agir frente estafilococos em biofilme (WEISSER *et al.*,2010 e QU *et al.*,2010), ainda mais considerando a taxa relativamente baixa de resistência detectada, cerca de 26%. Cabe salientar que os testes de determinação de resistência neste trabalho, como usualmente nos laboratório clínicos, não foi feito com crescimento em biofilme.

Embora não tenha havido detecção de resistência plena a vancomicina, dois isolados *S.haemolyticus* apresentaram MICs de 4µg/ml pelo método automatizado Walkway, que é o valor de corte entre susceptível e resistência intermediária (CLSI 2010). Contudo estes valores não se confirmaram, uma vez que na microdiluição em microplaca, considerado padrão-ouro, foi encontrado MIC de 2µg/ml. *Staphylococcus haemolyticus* foi o primeiro dentre os SCN a exibir diminuída susceptibilidade aos glicopeptídeos (ROGERS *et al.*,2009; FREDHEIM *et al.*, 2009).

Houve relativa concordância para a maioria dos antimicrobianos testados quanto aos níveis de resistência relatados anteriormente. Cabe ressaltar que os dados utilizados como comparativo foram originados de estudos com o grupo SCN, que inclui majoritariamente a espécie *S. epidermidis*, não presente neste estudo, e

que apresenta níveis de resistência menores que os demais SCN, o que pode levar a subestimar estes valores.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A identificação dos isolados presentes em CVC, assim como a avaliação da capacidade de formação de biofilme e a determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos são ferramentas que permitem o estabelecimento do risco potencial da presença de certos patógenos nestes dispositivos implantáveis. Embora bem menos frequentes em CVC que *S. epidermidis*, os isolados SCN não *epidermidis*, demonstraram através deste trabalho, ser clinicamente relevantes e envolvidos em infecção relacionada a cateter.

Os isolados SCN não *epidermidis* apresentaram altas taxas de resistência a antimicrobianos, incluindo vários isolados multiresistentes. A capacidade de formação de biofilme em microplaca e a presença dos genes *ica* foram detectadas em menos da metade dos isolados. Assim, ainda são necessários maiores estudos quanto ao mecanismo de virulência destas espécies. Para isso, parece importante a padronização de métodos para detecção de biofilme “in vitro” bem como a utilização de primers adequados para investigar o papel dos genes *ica* que sintetizam a PIA na estrutura destes biofilmes.

8 REFERÊNCIAS

ANTUNES, A.L.S.; SECCHI, C.; REITER, K.C.; PEREZ, L.R.R.; FREITAS, A.L.P.; D'AZEVEDO, P.A. Feasible identification of *Staphylococcus epidermidis* using desferrioxamine and fosfomicin disks. *APMIS*, v.116, n.1, p.16-20, 2008.

ARCIOLA, C.R.; COLLIMATI, S.; DONATI, E.; MONTANARO, L. A rapid PCR method for detection of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* in periprosthetic infections. *Diagn Mol Pathol*, v. 10, p.130-137, 2001.

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

BRADFORD, R.; ABDUL MANAN, R.; DALEY, A.J.; PEARCE, C.; RAMALINGAM, A.; D'MELLO, D.; MUELLER, Y.; UAHWATANASAKUL, W.; QU, Y.; GRANDO, D.; GARLAND, S.; DEIGHTON, M. Coagulase-negative staphylococci in very-low-birth-weight infants: inability of genetic markers to distinguish invasive strains from blood culture contaminants. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, v.25, n.5, p.283-290, 2006.

CAFISO, V.; BERTUCCIO, T.; SANTAGATI, M.; CAMPANILE, F.; AMICOSANTE, G.; PERILLI, M.G.; SELAN, L.; ARTINI, M.; NICOLETTI, G.; STEFANI, S. Presence of the *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. *Clin Microbiol Infect.*, v.10, n.12, p.1081-1088, 2004.

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

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

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing – Informational supplement. Approved document M100 - S20. 20. ed., Wayne, Pennsylvania, 2010.

CONLON, K.M.; HUMPHREYS, H.; O'GARA, J.P. Icar encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of ica operon expression and biofilm formation in staphylococcus epidermidis. *J bacterial*, v.184, n.16, p.4400-4408, 2002.

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

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

DIEKEMA, D.J.; PFALLER, M.A.; SCHMITZ, F.J. Survey of infections due to *staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the western pacific region for the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997-1999. *Clin Infect Dis*, v. 32 (suppl 2), p. 114-32, 2001.

DIEMOND-HERNÁNDEZ, B.; SOLÓRZANO-SANTOS, F.; LEAÑOS-MIRANDA, B.; PEREGRINO-BEJARANO, L.; MIRANDA-NOVALES, G. Production of icaADBC-encoded polysaccharide intercellular adhesin and therapeutic failure in pediatric patients with Staphylococcal device-related infections. *BMC Infect Dis.*, v.10, p.68, 2010.

D'MELLO, D.; DALEY, A.J.; RAHMAN, M.S.; QU, Y.; GARLAND, S.; PEARCE, C.; DEIGHTON, M.A. Vancomycin heteroresistance in bloodstream isolates of *Staphylococcus capitis*. *J Clin Microbiol.*, v.46, n.9, p.3124-3126, 2008.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg infect dis*, v.8, n.9, p.881-889, 2002.

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

DE SILVA, G.D.; KANTZANO, M.; JUSTICE, A.; MASSEY, R.C.; WILKINSON, A.R.; DAY, N.P.; PEACOCK, S.J. The ica operon and biofilm production in coagulase-negative Staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol.*, v.40, n.2, p.383-382, 2002.

FOKA, A.; CHINI, V.; PETINAKI, E.; KOLONITSIOU, F.; ANASTASSIOU, E.D.; DIMITRACOPOULOS, G.; SPILIOPOULOU, I. Clonality of slime-producing methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci disseminated in the neonatal intensive care unit of a university hospital. *Clin Microbiol Infect.*, v.12, n.12, p.1230-1233, 2006.

FRANK, K.L.; REICHERT, E.J.; PIPER, K.E.; PATEL, R. In vitro effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, v.51, n.3, p.888-895, 2007.

FREBOURG, N.B.; LEFEBVRE, S.; BAERT, S.; LEMELAND, J.F. PCR-Based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. *J Clin Microbiol.*, v.38, n.2, p.877-880, 2000.

FREDHEIM, E. G.; KLINGENBERG, C.; ROHDE, H.; FRANKENBERGER, S.; GAUSTAD, P.; FLAEGSTAD, T.; SOLLID, J. E. Biofilm formation by *Staphylococcus haemolyticus*. *J Clin Microbiol*, v.47, n.4, p. 1172-80, 2009.

GALDBART, J.O.; ALLIGNET, J.; TUNG, H.S.; RYDÉN, C.; EL SOLH, N. Screening for *Staphylococcus epidermidis* markers discriminating between skin-flora strains and those responsible for infections of joint prostheses. *J Infect Dis.*, v.182, n.1, p.351-355, 2000.

GALES, A. C.; SADER, H. S.; RIBEIRO, J.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; PIGNATARI, A.C. Antimicrobial susceptibility of Gram-positive bacteria isolated in Brazilian

hospitals participating in the SENTRY program (2005-2008). *Braz J Infect Dis*, v. 13, p. 90-98, 2009.

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

GERKE C, KRAFT A, SÜßMUTH R, SCHWEITZER O, GÖTZ F: Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the staphylococcus epidermidis polysaccharide intercellular adhesin. *J Biol Chem* 1998, 273:18586-18593.

GIESBRECHT, P.; KERSTEN, T.; MAIDHO, H.; WECKE, J. Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiol Mol Biol Rev*, v. 62(4), p. 1371-1414, 1998.

GOLDSTEIN, F.W.; COUTROT, A.; SIEFFER, A.; ACAR, J.F. Percentages and distributions of teicoplanin- and vancomycin-resistant strains among coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.*, v.34, n.5, p. 899-900,1990.

GUALTIERI, M.; BASTIDE, L.; VILLAIN-GUILLOT, P.; MICHAUX-CHARACHON, S.; LATOUCHE, J.; LEONETTI, J.P. In vitro activity of a new antibacterial rhodanine derivative against staphylococcus epidermidis biofilms. *J antimicrob chemother*, v.58, p.778-783, 2006.

HACKBARTH CJ & CHAMBERS HF. Methicillin-resistant staphylococci: genetics and mechanisms of resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 33(7), p. 991-4,1989.

HAMBERS, H. F. Methicilin resistance in Staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 10, p. 781-791, 1997.

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

KNOBLOCH, J.K.; BARTSCHT, K.; SABOTTKE, A.; ROHDE, H.; FEUCHT, H.H.; MACK, D. 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.*, v.183, n.8, p.2624-33, 2001.

KNOBLOCH, J.K.; HORSTKOTTE, M.A.; ROHDE, H.; KAULFERS, P.M.; MACK, D. Alcoholic ingredients in skin disinfectants increase biofilm expression of staphylococcus epidermidis. *J antimicrob chemother.*, v.49, n.4, p.683-687, 2002.

KOKSAL, F.; YASAR, H.; SAMASTI, M. Antibiotic resistance patterns of coagulase-negative staphylococcus strains isolated from blood cultures of septicemic patients in turkey. *Microbiol Res.*, v.164, n.4, p. 404-410, 2009.

KOTILAINEN, P. Association of coagulase-negative staphylococcal slime production and adherence with the development and outcome of adult septicemias. *J clin microbiol.*, v.28, n.12, p.2779-2785, 1990.

LONGAUEROVA, A. Coagulase negative staphylococci and their participation in pathogenesis of human infections. *Bratisl Lek Listy*, v.107, n.11-12, p.448-458, 2006.

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

MALES, B.M.; BARTHOLOMEW, W.R.; AMSTERDAM, D. Staphylococcus simulans septicemia in a patient with chronic osteomyelitis and pyarthrosis. *J Clin Microbiol*, v.21, n.2, p.255-257, 1985.

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

NABI, Z.; ANWAR, S.; BARHAMEIN, M.; AL MUKDAD, H.; EL NASSRI, A. Catheter related infection in hemodialysis patients. *Saudi J Kidney Dis Transpl.*, v.20, n.6, p.1091-1095, 2009.

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

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

PETRELLI, D.; REPETTO, A.; D'ERCOLE, S.; ROMBINI, S.; RIPA, S.; PRENNA, M.; VITALI, LA. Analysis of meticillin-susceptible and meticillin-resistant biofilm-forming *Staphylococcus aureus* from catheter infections isolated in a large Italian hospital. *J Med Microbiol*,v.57, n.3, p.364-72, 2008.

QU, Y.; DALEY, A.J.; ISTIVAN, T.S.; GARLAND, S.M.; DEIGHTON, M.A. Antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from very low birth weight babies: comprehensive comparisons of bacteria at different stages of biofilm formation. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.*, v.9, p.16, 2010.

RAAD, I.; KASSAR, R.; GHANNAM, D.; CHAFTARI, A.M.; HACHEM, R.; JIANG, Y. Management of the catheter in documented catheter-related coagulase-negative staphylococcal bacteremia: remove or retain? *Clin infect dis.*, v.15, n. 49(8), p.1187-1194, 2009.

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

ROHDE, H.; KNOBLOCH, J.K.; HORSTKOTTE, M.A.; MACK, D. Correlation of staphylococcus aureus icaadbc genotype and biofilm expression phenotype. *J clin microbiol.*, v.39, n.12, p.4595-4596, 2001.

ROHDE, H.; BURANDT, E.C.; SIEMSEN, N.; FROMMELT, L.; BURDELSKI, C.; WURSTER, S.; SCHERPE, S.; DAVIES, A.P.; HARRIS, L.G.; HORSTKOTTE, M.A.; KNOBLOCH, J.K.; RAGUNATH, C.; KAPLAN, J.B.; MACK, D. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of staphylococcus epidermidis and staphylococcus aureus isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials*, v. 28(9), p. 1711-20, 2007.

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

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

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

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

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; TRAJKOVIĆ, V.; SAMARDŽIĆ, T.; CUPIĆ, M.; SVABIĆ-VLAHOVIĆ, M. Possible virulence factors of staphylococcus sciuri. *FEMS Microbiol Lett*, v.15, n.1, p.47-53, 2001.

STEPANOVIC, S.; DAKIC, I.; OPAVSKI, N.; JEZĚEK, P.; RANIN, L. Influence of the growth medium composition on biofilm formation by staphylococcus sciuri. *Annals of microbiology*, v.53, p.63-74, 2003.

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

STEWART, P. S.; E COSTERTON, J.W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, v. 358, p.135-138, 2001.

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

TEMPLETON, A.; SCHLEGEL, M.; FLEISCH, F.; RETTENMUND, G.; SCHÖBI, B.; HENZ, S.; EICH, G. Multilumen central venous catheters increase risk for catheter-related bloodstream infection: prospective surveillance study. *Infection*, v.36, n.4, p. 322-327, 2008.

UÇKAY, I.; LÜBBEKE, A.; EMONET, S.; TOVMIRZAEVA, L.; STERN, R.; FERRY, T.; ASSAL, M.; BERNARD, L.; LEW, D.; HOFFMEYER, P. *J Infect*. v.59, n.5 p.337-345, 2009.

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

VANDECASTEELE, S.J.; PEETERMANS, W.E.; RIJNDERS, B.J.; VAN ELDERE, J. Reliability of the ica, aap and atlE genes in the discrimination between invasive,

colonizing and contaminant *Staphylococcus epidermidis* isolates in the diagnosis of catheter-related infections." *Clin Microbiol Infect*, v. 9(2), p. 114-9, 2003.

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

VILLAIN-GUILLOT, P.; GUALTIERI, M.; BASTIDE, L.; LEONETTI, J.P. In vitro activities of different inhibitors of bacterial transcription against staphylococcus epidermidis biofilm. *Antimicrob agents chemother*, v.51, p. 3117-3121, 2007.

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

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

ZIEBUHR, W.; KRIMMER, V.; RACHID, S.; LÖSSNER, I.; GÖTZ, F.; HACKER, J. 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.*, v.32, n.2, p.345-356, 1999.

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