

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**ESTUDO DE AMOSTRAS DE *STAPHYLOCOCCUS* COAGULASE-NEGATIVA
QUANTO A FORMAÇÃO DE BIOFILME**

ADILSON CESAR ABREU BERNARDI

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, câmpus de Araraquara – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do grau Doutor em Análises Clínicas (Área de Microbiologia Clínica).

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Pizzolitto

ARARAQUARA

Estado de São Paulo-Brasil

2005

Candidato: Adilson César Abreu Bernardi
Título da Tese: Estudo de amostras de *Staphylococcus* coagulase negativa quanto a formação de biofilme

A Comissão julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a 13/12/2005, considerou o candidato:

(X) Aprovado

() Reprovado

1) Presidente: Prof. Dr Antonio Carlos Pizzolitto

2) Examinador: Prof^a. Dr^a Isabel Yoko Ito

3) Examinador: Prof. Dr Sérgio Aparecido Torres

4) Examinador: Prf^a Dr^a Maria de Lourdes Ribeiro de Souza

5) Examinador: Prf^a Dr^a Clarice Queico Fujimura Leite

B523e Bernardi, Adilson César Abreu
Estudo de amostras de *Staphylococcus* coagulase negativa quanto a formação de biofilme / Adilson César Abreu Bernardi. – Araraquara, 2005. 144 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas

Orientador: Antonio Carlos Pizzolitto

1.Slime. 2.Operon ica 3.Staphylococcus epidermidis .4.Fatores de virulência. 5.Microbiologia clínica . I. Pizzolitto, Antonio Carlos, orient.

Pesquisa realizada no **NAC - Núcleo de Atendimento à Comunidade, Laboratório “Prof. Antonio Longo” - Setor de Microbiologia Clínica - da Unidade Auxiliar Integrada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas, câmpus de Araraquara, - UNESP, Laboratório de Análises Clínicas João Paulo II, da cidade de Fernandópolis-SP, Laboratório de Microscopia Eletrônica, Instituto de Química, câmpus de Araraquara, - UNESP, Laboratório de Biologia Molecular e Celular de Microrganismos FCF-Câmpus de Araraquara, - UNESP,** com o SUPORTE FINANCEIRO proveniente do NAC.

DEDICATÓRIA



Pietra e Paola

Se a solidão valesse, as leis de Deus não fariam o nascimento de vocês na terra entre duas criaturas (papai e mamãe), convertendo vocês em terceira e quarta pessoa para construirmos um grupo maior.
.....*AMO VOCÊS*



À minha esposa Patrícia, meu eterno reconhecimento e gratidão pelo aceite e compreensão dispensados durante minhas constantes ausências da família, para realização do curso de Doutorado.

.....*TE AMO*



AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Profa. Dra. ELISABETH LOSHCHAGIN PIZZOLITTO, por sua grande inspiração,
presença de espírito, sabedoria e amizade.

Foi uma pena não podido tê-la como co-orientadora.



Ao Prof. Dr. ANTONIO CARLOS PIZZOLITTO, por sua valiosa orientação,
sabedoria, amizade e dedicação.

O Sr. me servirá de exemplo no decorrer de minha carreira.



Aos amigos Beth e Pizzolitto

Será sempre eterno meu agradecimento por tudo que vocês direta

ou indiretamente fizeram por mim.

Vocês são muito importantes na minha vida.





Aos meus pais, Arnaldo e Ignêz

Que me ensinaram a caminhar pelo lado bom da vida.

Aos meus irmãos, Arnaldo, André, Aldo e Adélia que me serviram de exemplo.

À minha madrastra Helena pelo incentivo.

Ao meu sogro Cléo e minha sogra Maria Helena pelo estímulo e apoio.

Aos amigos do invisível que constantemente me orientam e me inspiram nas dificuldades da jornada.

À DEUS e a JESUS por me darem o foco de luz.

Aos *Staphylococcus* sp. por me ajudarem a concluir este trabalho e auxiliar na ciência. Vocês são realmente incríveis!!!!!!





Minha MÃE, meu irmão ALDO, tia CRISTINA e CLÉO: que não há mais nada que nos separe a não ser um véu que os tornem invisíveis aos meus olhos materiais





A funcionária do setor de Microbiologia Clínica do CRD/NAC:
Benedita Reis de Abreu, pela colaboração profissional e pessoal dadas a este
trabalho.

Benê você é uma pessoa muito importante!!

**Sem o seu capricho e amor dedicado à microbiologia este trabalho
não teria graça!!!!**



AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini, vice-diretor desta Faculdade, pela disponibilidade do uso do Laboratório de Biologia Molecular e Celular de Microrganismos.

Ao amigo Prof. Ms. Anísio Storti, pela amizade e companheirismo. Obrigado pela colaboração e por dividir os momentos difíceis.

Ao amigo e companheiro de trabalho Prof. Dr. Wilton Rogério Lustre pela colaboração profissional e incentivo.

Ao amigo e companheiro Prof. Ms. Orivaldo Pereira Ramos, coordenador do curso de Biomedicina do Centro Universitário de Araraquara-UNIARA pelo incentivo, apoio e confiança.

Ao funcionário Sebastião Anésio Dametto, pela colaboração prestada em relação ao Microscópio Eletrônico de Varredura, no Instituto de Química.

A todos meus amigos, colegas, alunos e conhecidos por fazerem parte do meu rol de relacionamento.

Você não encontrará nenhum microbiologista em suas atividades diárias ou mesmo não conhece ninguém que trabalhe como microbiologista. Mas os esforços de milhares destes cientistas para melhor entender os habitantes deste planeta microscópico afeta você de vários modos no seu dia a dia.

autor anônimo.

DADOS CURRICULARES

ADILSON CESAR ABREU BERNARDI

1 – DADOS PESSOAIS

Nascimento: 27.11.68
Nacionalidade: Brasileiro
Naturalidade: Araras – SP
Estado Civil: Casado
Filiação: Arnaldo Bernardi
 Ignez App. de Abreu Bernardi
Profissão: Farmacêutico-Bioquímico
CRF-8 : 16.837
Documento de Identidade: RG 16.872.447-SP
Cadastro de Pessoa Física: 099 025 598-08
Endereço: Avenida Frederico de Marco, 336, Araraquara, SP

2 – FORMAÇÃO ACADÊMICA

Farmacêutico-Bioquímico pela Universidade de Ribeirão Preto-SP
Concluída em 1992

3 – CURSO CONCLUÍDO

Mestrado em Análises Clínicas pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
campus de Araraquara-UNESP.
Início: março de 1997.
Data de Defesa Dissertação: 13.12.2000
Título: Identificação de cocos aeróbicos gram-positivos, catalase-positiva com
implicação em processos infecciosos específicos.
Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Pizzolitto

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1-INTRODUÇÃO.....	26
1.1-Revisão da literatura.....	28
1.1.1-Virulência bacteriana.....	28
1.1.2-Fatores do hospedeiro nas infecções estafilocócicas.....	32
1.1.3-Fatores que comandam a aderência inicial dos <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa as superfícies.....	35
1.1.4-Importância clínica da adesão estafilocócica.....	38
1.1.5-Associação da produção de biofilme com infecções clínicas.....	40
1.1.6-Constituição do <i>slime</i>	43
1.1.7-Prevenção das infecções estafilocócicas relacionadas ao uso de implantes médicos.....	48
2-OBJETIVOS.....	52
3-MATERIAL E MÉTODO.....	53
3.1-Casuística.....	53
3.2-Meios de cultura e reagentes.....	53
3.3-Sistemas comerciais de identificação de cocos Gram-positivos catalase positiva.....	54
3.4-Métodos.....	55
3.4.1-Identificação dos microrganismos.....	55

3.4.2-Identificação dos <i>Staphylococcus</i> sp.....	55
3.4.2.1- <i>Staphylococcus</i> sp.....	55
3.4.2.2-Teste da coagulase livre (prova em tubo).....	55
3.4.2.3-Teste da coagulase conjugada (prova em lâmina).....	56
3.4.2.4-Resistência a bacitracina.....	56
3.4.2.5-Resistência a novobiocina.....	57
3.4.2.6-Resistência a polimixina B.....	57
3.4.2.7-Teste de hidrólise do pyrrolidonyl- β -naphylamide (PYR).....	57
3.4.2.8-Teste da utilização aeróbica dos carboidratos.....	58
3.5-Characterização fenotípica das amostras de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa usando ágar vermelho Congo.....	59
3.5.1-Produção de <i>slime</i>	59
3.6-Aderência de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa em placa de poliestireno.....	60
3.7-Produção de biofilme sobre superfície abiótica.....	61
3.7.1-Preparação da suspensão bacteriana.....	61
3.7.2-Produção <i>in vitro</i> de biofilme em cateter venoso central de poliuretano.....	61
3.8-Detecção de resistência em <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa.....	62
3.8.1-Resistência a oxacilina.....	62
3.9-Métodos moleculares para pesquisa de genes de virulência <i>icaA</i> e <i>icaD</i> em <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa.....	63
3.9.1-Characterização molecular de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa.....	63
3.9.1.1-Extração de DNA genômico.....	63
3.9.1.2-Amplificação de DNA pela reação de polimerase em cadeia (PCR).....	64
4-RESULTADOS	66

4.1-Identificação das amostras de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa.....	66
4.2-Detecção de resistência em <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa.....	67
4.3-Produção de <i>Slime</i>	69
4.4-Aderência de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa em placa e poliestireno.....	72
4.5-Formação do biofilme pelas amostras de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa..	75
4.6-Detecção dos genes <i>icaA</i> e <i>icaD</i> determinada por PCR.....	81
4.7-Perfil de resistência de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa.....	88
5-DISCUSSÃO.....	91
6-CONCLUSÕES.....	106
7-REFERÊNCIAS.....	108
8-APÊNDICE	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -Reação a oxacilina entre as espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa.....	67
Tabela 2 -Freqüência das amostras de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa resistentes a oxacilina.....	68
Tabela 3 -Produção de <i>slime</i> entre as espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa.....	70
Tabela 4 -Freqüência das espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa produtoras e não produtoras de <i>slime</i> detectado em ágar vermelho Congo.....	71
Tabela 5 -Densidade óptica das reações de aderência entre as espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa.....	72
Tabela 6 -Freqüência das espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa forte e fracamente aderentes a placa de poliestireno.....	74
Tabela 7 -Formação do biofilme entre as espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa.....	75
Tabela 8 -Freqüência das espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa formadoras de biofilme.....	76
Tabela 9 -Presença de genes <i>icaA</i> e <i>icaD</i> entre as espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa.....	84
Tabela 10 -Freqüência de expressão dos genes <i>icaA</i> e <i>icaD</i> entre as espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa.....	85
Tabela 11 -Comparação de resultados obtidos após estudo fenotípico e genotípico entre as espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa.....	86

Tabela 12 -Distribuição das espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa nas amostras clínicas.....	87
Tabela 13 -Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das 27 cepas de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa.....	88
Tabela 14 -Distribuição das amostras clínicas em relação aos microrganismos e ao teste de sensibilidade e resistência aos antimicrobianos.....	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Organização genética do grupamento do gene <i>ica</i>	46
Figura 2- Freqüência de amostras de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa.....	66
Figura 3- Colônias negras de amostras produtoras de <i>slime</i> em ágar vermelho Congo.....	69
Figura 4- Colônias vermelhas de amostras não produtoras de <i>slime</i> em ágar vermelho Congo.....	69
Figuras 5A e 5B- Teste de aderência em placa de poliestireno.....	73
Figura 6- Micrografia eletrônica de varredura (X5000) de biofilme de <i>S.epidermidis</i> sobre superfície abiótica (cateter).....	77
Figura 7- Micrografia eletrônica de varredura (X5000) de biofilme de <i>S.haemolyticus</i> sobre superfície abiótica (cateter).....	77
Figura 8- Micrografia eletrônica de varredura (X5000) de biofilme de <i>S.warneri</i> sobre superfície abiótica (cateter).....	78
Figura 9- Micrografia eletrônica de varredura (X7500) de biofilme de <i>S.lugdunensis</i> sobre superfície abiótica (cateter).....	78
Figura 10- Micrografia eletrônica de varredura (X5000) de biofilme de <i>S.xylosus</i> sobre superfície abiótica (cateter).....	79
Figura 11- Micrografia eletrônica de varredura (X5000) de biofilme de <i>S.hominis</i> sobre superfície abiótica (cateter).....	79
Figura 12- Micrografia eletrônica de varredura (X5000) de biofilme de <i>S.schleiferi</i> sobre superfície abiótica (cateter).....	80
Figura 13- Micrografia eletrônica de varredura (X2000) de biofilme de <i>S.saprophyticus</i> sobre superfície abiótica (cateter).....	80

Figura 14A e 14B -Gel analítico PCR para gene <i>icaA</i>	82
Figura 15A e 15B -Gel analítico PCR para gene <i>icaD</i>	83

RESUMO

Os *Staphylococcus* coagulase-negativa, particularmente, os *Staphylococcus epidermidis* são a causa mais freqüente de infecções relacionadas ao cateter por sua habilidade em aderir a uma superfície e entre si (aderência intercelular) formando biofilme em multicamadas sobre superfícies de polímeros. O objetivo do presente estudo foi avaliar cepas hospitalares de *Staphylococcus* coagulase-negativa isoladas de cateteres intravenosos, quanto à resistência a oxacilina, produção de *slime*, aderência ao poliestireno, habilidade de formar biofilme sobre superfícies abióticas (cateter esterilizado) e a presença de genes *icaAD*. Na presente pesquisa, a presença de *icaA* e *icaD* foi determinada pelo método PCR, em uma coleção de 27 amostras *Staphylococcus* coagulase-negativa (10 *Staphylococcus epidermidis*, 4 *S. haemolyticus*, 2 *S. hominis*, 2 *S. lugdunensis*, 1 *S. saprophyticus*, 1 *S. schleiferi*, 2 *S. xylosus* e 4 *S. warneri*). Os genes *icaAD* foram detectados em dez cepas *S. epidermidis*. A habilidade de formar *slime* foi testada em placas contendo ágar vermelho Congo, no qual foram observadas colônias negras em 10 cepas *S. epidermidis*, 4 *S. haemolyticus*, 4 *S. warneri*, 2 *S. xylosus* e 1 *S. chromogenes*. A aderência dos *Staphylococcus* coagulase-negativa ao poliestireno foi observada em 19 cepas, incluindo: 10 *S. epidermidis*, 3 *S. haemolyticus*, 3 *S. warneri*, 2 *S. xylosus*, 1 *S. chromogenes*. A habilidade dos *Staphylococcus* coagulase-negativa de formar biofilme com agrupamento de cocos envoltos em substância amorfa foi observada por microscópio eletrônico de varredura sobre superfície abiótica em 10 *S. epidermidis*, 3 *S. haemolyticus*, 2 *S. hominis*, 2 *S. lugdunensis*, 1 *S. saprophyticus*, 1 *S. schleiferi*, 2 *S. xylosus* e 3 *S. warneri*. O teste de resistência a oxacilina mostrou 9 cepas *S. epidermidis* resistentes a oxacilina, 3 *S. haemolyticus*, 3 *S. warneri*, 1 *S.*

xylosus e 1 *S. chromogenes*. O antibiograma mostrou que 100% *Staphylococcus* coagulase-negativa eram sensíveis a vancomicina e 88,88% resistentes a pencilina. A detecção de *slime*, a habilidade de aderir e formar biofilme foi observada na maioria das amostras *Staphylococcus* coagulase-negativa sugerindo alta incidência de amostras com potencial patogênico em ambiente hospitalar. As mesmas amostras que produziram *slime*, resistência a oxacilina e formaram biofilme eram resistentes a mais de seis antibióticos. A presença dos genes de adesão intercelular (*icaAD*) foi detectada na maioria das amostras *Staphylococcus* coagulase-negativa, exceção para *S. saprophyticus* e *S. scheleiferi*, sugerindo que estas amostras não tem homologia com *S. epidermidis*.

Palavras-chave: *slime*, operon *ica*, *Staphylococcus epidermidis*, fatores de virulência,

ABSTRACT

Coagulase-negative *Staphylococcus*, particularly, *Staphylococcus epidermidis* are frequent cause of infections associated with catheters and is attributed to the attachment ability on a surface and each other (intercellular adhesion) forming a multilayered biofilm on polymeric surfaces. The objective of the present study was to evaluate coagulase-negative *Staphylococcus* strains isolated from intravenous catheters by oxacillin resistance, slime production (qualitative method) and spectrophotometric assay (quantitative method), ability to form biofilm on abiotic surfaces (steriled catheter) and the presence of *icaAD* genes. In the present study *icaA* and *icaD* were determined by PCR method, in a collection of 27 coagulase-negative *Staphylococcus* (10 *Staphylococcus epidermidis*, 4 *S. haemolyticus*, 2 *S. hominis*, 2 *S. lugdunensis*, 1 *S. saprophyticus*, 1 *S. schleiferi*, 2 *S. xylosus* and 4 *S. warneri*). The *icaA* genes were detected in nine *S. epidermidis* and *icaD* in ten. The slime-producing ability was determined by culture on Congo red agar plates in which slime-producing strains formed black colonies in 10 *S. epidermidis*, 4 *S. haemolyticus*, 4 *S. warneri*, 2 *S. xylosus* and 1 *S. chromogenes*, while nonslime-forming ones develop red colonies. The quantitative assay of coagulase-negative *Staphylococcus* was observed in 19 strains, including: 10 *S. epidermidis*, 3 *S. haemolyticus*, 3 *S. warneri*, 2 *S. xylosus*, 1 *S. chromogenes*. The ability of coagulase-negative *Staphylococcus* to form biofilm embedded in an amorphous substance was observed by scanning electronic microscope on abiotic surface in 10 *S. epidermidis*, 3 *S. haemolyticus*, 2 *S. hominis*, 2 *S. lugdunensis*, 1 *S. saprophyticus*, 1 *S. schleiferi*, 2 *S. xylosus* and 3 *S. warneri*. The oxacillin resistance was observed in 9 strains *S. epidermidis*, 3 *S. haemolyticus*, 3 *S. warneri*, 1 *S. xylosus* and 1 *S. chromogenes*. All

strains of staphylococci were susceptible to vancomycin and 88.88% penicillin resistant. The slime detection, the ability to stick and to form biofilm was observed in most of the *Staphylococcus* coagulase-negative strains, which suggests high incidence of strains with pathogenic potential in nosocomial environment. The same strains that produced slime, resistance to oxacillin and formed biofilm were multi drug resistant. The presence of the *icaAD* genes of intercellular adhesion were detected in most of the strains *Staphylococcus* coagulase-negative, exception for *S. saprophyticus* and *S. schleiferi*, suggesting that these strains do not have homology with *S. epidermidis*.

Key words: slime, operon *ica*, *Staphylococcus epidermidis*, virulence factors

1 - INTRODUÇÃO

Os *Staphylococcus* estão distribuídos na natureza, e fazem parte da microbiota normal da mucosa e da pele de mamíferos e aves. O gênero é composto por 40 espécies e 24 sub-espécies. Em geral, os *Staphylococcus* apresenta uma relação benigna ou simbiótica com o hospedeiro; entretanto pode tornar-se patogênico quando ganha acesso aos tecidos por meio de traumatismos da barreira cutânea, inoculação por agulhas, ou implantação direta por próteses médicas (corpos estranhos).

Até 1975, os *Staphylococcus* coagulase-negativa eram agrupados junto com a espécie *Staphylococcus albus* e a espécie *Staphylococcus epidermidis*, distintos da espécie *Staphylococcus aureus* por sua inabilidade em coagular o plasma. Baseado em suas características e sua suposta importância na virulência, os *Staphylococcus* coagulase-negativa foram freqüentemente descritos como avirulentos.

Sua patogenicidade têm sido reconhecida apenas recentemente e fatores específicos envolvidos na sua patogênese estão apenas, agora sendo explorados. O aumento da incidência de infecção causada por esta bactéria pode estar atribuída em sua particular afinidade em materiais implantáveis que estão integradas na medicina moderna.

Atualmente, os *Staphylococcus* coagulase-negativa igualam-se aos *Staphylococcus aureus* e mesmo já o ultrapassou em relatos de doenças infecciosas hospitalares ou como causa primária das infecções das feridas externas.

O aumento no uso de implantes médicos, cateteres intravasculares e outras tecnologias invasivas em pacientes debilitados e imunossuprimidos trazem

consigo os *Staphylococcus* coagulase-negativa como patógeno hospitalar resultando em considerável morbidade e gasto médico para seu tratamento. Ainda mais, os *Staphylococcus* coagulase-negativa tem-se tornado resistentes aos antibióticos, aos mais recentes tratamentos, tornando as cepas com níveis moderados de resistência a vancomicina.

1.1 - REVISÃO DA LITERATURA

1.1.1 – VIRULÊNCIA BACTERIANA

Após o nascimento, um indivíduo adquire certos microrganismos que podem se tornar permanentes ou temporariamente associados a ele; a estes microrganismos chamamos de microbiota normal, muitos dos quais desempenham importante função para o hospedeiro (MURRAY et al., 2004).

Para as bactérias, o corpo humano representa um conjunto de nichos ambientais que lhes fornecem o calor, a umidade e o alimento necessário a seu crescimento.

As bactérias adquiriram traços genéticos que as tornam capazes de penetrar (invadir) no hospedeiro, permanecer em determinado nicho colonizando-o, ter acesso a fontes alimentares (enzimas degradáveis) e escapar do processo de eliminação pelas respostas protetoras imunes e não imunes (MURRAY et al., 2004; SCHAECHTER & EISENSTEIN, 2002).

Muitos dos mecanismos empregados pelas bactérias para manter seu nicho e os subprodutos do crescimento bacteriano são incompatíveis com o sistema do hospedeiro. Muitas destas características genéticas consistem em fatores de virulência que aumentam a capacidade da bactéria de causar doença (SALYERS & WHITT, 1994; ZANON & MARANGONI, 1998).

Tanto a infecção quanto à doença resulta de interações entre estes microrganismos e seus hospedeiros. Algumas vezes, uma infecção produz efeitos não observáveis, mesmo que o hospedeiro tenha seus tecidos invadidos. Com maior frequência quando, uma infecção produz distúrbios observáveis no estado de saúde do hospedeiro, ocorre o que chamamos de doença infecciosa. Quando uma infecção

causa doença, seus efeitos variam de moderados a graves (BLACK, 2002; BROOKS et al., 2000).

Os patógenos possuem diferentes capacidades de alterar o estado de saúde de um indivíduo, isto é, eles mostram diferentes graus de patogenicidade (capacidade de produzir doença). A patogenicidade de um microrganismo consiste na capacidade de penetrar num hospedeiro, se multiplicar em seu interior e evitar ser atingido pelas suas defesas (MURRAY et al, 2004; BLACK, 2002; BROOKS et al., 2000) .

Um importante fator na patogenicidade é o número de organismos que penetra no corpo. Se este número for pequeno, as defesas do hospedeiro podem ser capazes de eliminar os organismos antes que eles possam causar doença. Se ocorrer em grande número, eles podem superar as defesas e causar doença (HARVILL & MILLER, 2000).

Quando nos referimos na intensidade da doença produzida por um patógeno chamamos de virulência (grau de patogenicidade) e esta varia entre as espécies microbianas. A virulência é sempre multifatorial, já que o processo de infecção é invariavelmente complexo. Diversos fatores de virulência (aderência, invasão, subprodutos do crescimento, toxinas, superantígeno, indução de inflamação excessiva, evasão das defesas e resistência aos antibióticos) devem entrar em ação em cada estágio do processo para que um microrganismo patogênico provoque doença e alguns pontos devem ser questionados para um determinado patógeno como: quais os fatores de virulência envolvidos na instalação da doença; como esses fatores estão envolvidos na instalação da doença e se os genes de virulência são regulados, ou seja, se existe, sinais especiais do ambiente que induzem o microrganismo a ativar ou a inibir a expressão dos genes de

virulência (BLACK, 2002; BROOKS et al., 2000; KONEMAN et al., 2001; MURRAY et al., 2004; QUINN, et al., 1997).

Alguns agentes freqüentemente causam doenças quando alcançam um hospedeiro susceptível, outros causam doenças somente em raras ocasiões e normalmente em hospedeiros com as defesas debilitadas. Dentre estes últimos, podemos citar as espécies *Staphylococcus* coagulase-negativa, que fazem parte da microbiota normal da nossa pele vivendo em equilíbrio e representam o maior componente da microbiota cutânea; por muito tempo os pesquisadores os descreveram como protótipo de microrganismo avirulento (MENICHETTI, 2005).

Como possuem baixo poder patogênico, são reconhecidos como oportunistas e já há alguns anos vários estudos mostram os mecanismos pelos quais os *Staphylococcus* coagulase-negativa são capazes de causar infecções graves e irreversíveis associadas aos biomateriais. A produção de um muco (polissacarídeo extracelular) com conseqüente formação do biofilme é o principal fator para a aderência e colonização destes biomateriais. As bactérias nos biofilmes são ligadas dentro da rede de polissacarídeos, substância mucóide, que mantém as células unidas e ligadas à superfície (BADDOUR et al., 1991; BLACK, 2002; BROOKS et al., 2000; MURRAY et al., 2004; NOVICK & MUIR, 1999; SCHAECHTER & EISENSTEIN, 2002).

Apenas na década de 1980, os pesquisadores começaram a dar maior atenção para o isolamento dos *Staphylococcus* coagulase-negativa em sítios estéreis por apresentarem algo mais do que um simples contaminante de cultura (LOWY & HAMMER, 1983; CHRISTENSEN et al., 1993). Os *Staphylococcus* coagulase-negativa podem ser divididos em dois grupos dependendo da sensibilidade ou resistência a novobiocina. Os *Staphylococcus* que são da

microbiota humana sensível a novobiocina incluem os *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus lugdunensis* e os resistentes a novobiocina são as espécies *Staphylococcus saprophyticus* e os *Staphylococcus xylosus* (HEILMANN & PETERS, 2000; von EIFF et al., 2002)

Os *Staphylococcus* coagulase-negativa, são reconhecidos como clinicamente importantes, principalmente quando estão envolvidos em infecções de próteses e equipamentos médicos que geram doenças graves e morte e esta capacidade em causarem doença era inesperada, principalmente por representarem um grupo de microrganismo avirulento (CHRISTENSEN et al., 1982; 1993; CHRISTENSEN et al., 1994).

Dados do “National Nosocomial Infection Surveillance System” mostraram que de janeiro de 1990 a maio de 1999 os *Staphylococcus* coagulase-negativa foram os patógenos mais comuns descritos (37,3% comparando com 12,6% para os *Staphylococcus aureus*) isolados de bacteriemias e em pacientes especiais (COSTA et al., 2004; von EIFF et al., 2002).

CHRISTENSEN et al., 1994, descreveram que, desde 1960 quando Baird-Parker notou a produção de um material mucóide por várias cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativa, iniciava-se o estudo do *slime* (biofilme bacteriano). Vários pesquisadores (HUSSAIN et al., 1993; FOSTER & Mc DEVITT 1994; von EIFF et al., 1998; HEILMANN & PETERS, 2000) observaram que o *slime* é constituído de um material aderente, mucóide, que se deposita nas próteses médicas, importante na patogênese das infecções pelo uso destes materiais

Os *Staphylococcus* coagulase-negativa, particularmente o *Staphylococcus epidermidis*, são os maiores causadores de infecções de próteses médicas do que outros microrganismos; é a causa principal de infecção por

cateteres intravasculares (CHEESBOUGER et al., 1986; JONES et al., 1986; SHERETZ et al., 1983), válvula cerebral (GEORGE et al., 1979; ODIO et al., 1984), válvula cardíaca (DOUGHERTY et al., 1986; GNANN e COBBS, 1985; KARCHMER et al., 1983; MARPLES et al., 1985) aparelhos ortopédicos (FITZGERALD et al., 1985; INMAN et al., 1984; IVEY et al., 1990) marca-passo cardíaco artificial (BADDOUR et al., 1990; CHOO et al., 1981; KLUG et al., 2003; RUITER et al., 1985), cateter de diálise peritoneal (BADDOUR et al., 1986; GOKAL et al., 1987; McALLISTER et al., 1987; WEST et al., 1986) e aparelhos protéticos em geral (BANDYK et al., 1984; GRISTINA et al., 1988).

Ao contrário, quando descrevemos os *Staphylococcus coagulase-positiva* (*S. aureus*), sabemos de sua capacidade de invadir e infectar tecidos, mesmo que façam parte da microbiota normal da pele, sendo assim reconhecido como protótipo de microrganismo virulento (KLOOS & MUSSELWHITE, 1975; LOWY & HAMMER, 1983).

1.1.2 - FATORES DO HOSPEDEIRO ENVOLVIDOS NAS INFECÇÕES ESTAFILOCÓCICAS

Nos dias de hoje, é impossível imaginar a medicina moderna sem os implantes médicos, o seu uso indispensável e as vantagens deste tipo de intervenção médica para o paciente por muitas vezes salvando vidas, mas complicações não poderiam deixar de acontecer. Uma das complicações mais freqüentes e significativas do implante cirúrgico é a manifestação da infecção do tecido ao redor do implante, sendo que, a consequência da infecção para o paciente

resulta no aumento de dias de internação, sepsis e até a morte (DAVEY & O'TOOLE, 2000; PRINTZEN, 1996).

As superfícies de muitas bactérias apresentam uma rede de cargas elétricas negativas e contém componentes lipídicos que confere uma superfície hidrofóbica. Forças eletrostáticas e hidrofóbicas não específicas são importantes para a fixação das bactérias em materiais protéticos (WILKS & SISSONS, 1997). Fatores de aderência, fatores de colonização, adesinas, ou ainda antígenos de aderência são componentes estruturais das células bacterianas que as capacitam colonizar, sobreviver e multiplicar-se em um dado tecido de seus hospedeiros ou superfícies (<http://www.delphianos.com.br>).

Bactérias gram-positivas que colonizam humanos, expressam múltiplas proteínas de superfície com propriedades adesivas. Estas adesinas equipam as bactérias com uma função complementar de ligação que facilita seu crescimento e sobrevivência aos diferentes sítios do hospedeiro de acordo com os receptores disponíveis, competição microbiana e resposta imunológica não só facilitando a colonização como também a invasão (CHHATWAL & JENKINSON, 2002).

É o que acontece com os *Staphylococcus* sp. que expressam na sua superfície receptores específicos que interagem com adesinas específicas do hospedeiro (CHHATWAL & JENKINSON, 2002). Muitas proteínas de parede celular dos *Staphylococcus* são relatadas e recentemente uma fímbria com estrutura protéica com função de ligação dos *Staphylococcus* coagulase-negativa a materiais implantáveis foi descrita (HUEBNER & GOLDMANN, et al., 1999). A adesão é um pré-requisito para os *Staphylococcus* coagulase-negativa causarem doenças invasivas e podem ser mediadas por moléculas adesivas do hospedeiro que se encontram adsorvidas no polímero dos implantes Estas adesinas, compreendem

proteínas e glicoproteínas, componentes do plasma, plaquetas, tecido conjuntivo e membranas basais (HUSSAIN et al., 2001; VAUDAUX et al., 1994; von EIFF et al., 2002). Proteínas de adesão celular regulam processos essenciais e promovem sinais que afetam a morfologia, a motilidade, a expressão gênica e a sobrevivência celular (BUSTANJI et al., 2003)

A maioria das proteínas do hospedeiro que interagem com os *Staphylococcus* e promovem a aderência quando em contato com uma superfície são a fibronectina, fibrinogênio, fibrina, colágeno, laminina, vitronectina, trombospondina, elastina e plasminogênio (ALCARÁZ et al., 2003; BALDASSARI et al., 1997; BUSTANJI et al., 2003; CHRISTENSEN et al., 1994.; DICKINSON et al., 1995; 2000; FALLGREN et al., 2001; HARTFORD et al., 2001; HUSSAIN et al., 2001; PRINTZEN, 1996; VAUDAUX et al., 1994; von EIFF et al., 2002). A fibronectina é uma proteína de matriz extracelular que está distribuída nos tecidos de vertebrados e é um importante mediador de invasão bacteriana e de infecções persistentes dos *Staphylococcus* coagulase-negativa por encontrarem-se aderidos no polímero adsorvido sobre fibronectina (BUSTANJI et al., 2003; CHHATWAL, 2002; FOSTER & McDEVITT, 1994; HARTFORD et al.; 2001 HUSSAIN et al., 2001; PEACOCK et al., 1999; von EIFF et al., 2002). Estudos *in vitro*, mostram que o ácido lipoteicóico, um constituinte essencial da parede celular, auxilia aumentando o processo de aderência por ligarem as células dos *Staphylococcus* a coágulos de fibrina, bem como as plaquetas aderidas na superfície de plástico do material facilitam esta aderência (CHRISTENSEN et al., 1994; HUSSAIN et al., 2001; NILSDOTTER-AUGUSTINSSON et al., 2005).

Uma vez em contato, os fluidos corpóreos imediatamente cobrem toda superfície do material de implante, primeiramente proteínas do soro e plaquetas,

formando uma camada condicionante modificando as propriedades de superfície auxiliando na aderência celular (CÁRLEN et al., 2001; CHRISTENSEN, 1989; CHRISTENSEN et al., 1994; HARTFORD et al., 2001).

Esta habilidade dos *Staphylococcus* em ligarem-se especificamente a estas proteínas é descrita como um fator de virulência (NILSDOTTER-AUGUSTINSSON et al., 2005).

Pesquisadores observaram que antes do implante do material seria necessário realizar um pré-tratamento deste com soro ou plasma para inibir a aderência da maioria das cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativa *in vitro* (CHRISTENSEN et al., 1994).

Um outro aspecto importante na resposta do hospedeiro às infecções estafilocócicas é a migração direta de fagócitos para o foco infeccioso que age como um estímulo. O estabelecimento de um foco inflamatório promove a liberação de mediadores humorais que atrai e modula os componentes da resposta celular (VAUDAUX et al., 1994).

1.1.3 - FATORES QUE COMANDAM A ADERÊNCIA INICIAL DOS *Staphylococcus* COAGULASE-NEGATIVA AS SUPERFÍCIES

A aderência bacteriana é um fator importante na contaminação de materiais de implante e depende das características da superfície da célula bacteriana e da natureza do substrato (material do polímero) (AN & FRIEDMANN, 1997; CORDERO et al., 1996; MERRITT et al., 1999; SCHWANK et al., 1998; von EIFF et al., 2002). Sabe-se que a colonização em superfícies inanimadas, implantadas no hospedeiro ou testadas *in vitro* pelos *Staphylococcus* coagulase-

negativa, requer a passagem por vários estágios (CHRISTENSEN et al., 1994; EGINTON et al., 1995; MERRITT et al., 1997). O primeiro estágio da colonização, a exposição, ou fase de chegada é realmente importante na determinação da infecção por microrganismos e é reversível (CHRISTENSEN et al., 1994; KLOSS & MUSSELWHITE, 1975; MORALES et al., 2004).

Além disso, a suspensão de células microbianas fará com que algumas destas células entrem em contato com o material de implante sob ação de forças do tipo quimiotáticas, gravitacional, do fluxo do fluido na superfície e forças não específicas de características fisicoquímicas da superfície bacteriana e da superfície do material que incluem as forças de van de Waals, forças eletrostáticas, tensão superficial e de hidrofobicidade superficial (CHRISTENSEN et al., 1994; MAKI, 1994).

A aderência inicial é promovida pela presença de sítios únicos existentes na superfície do material e variações na hidrofobicidade, irregularidades superficiais e a presença de proteínas plasmáticas adsorvidas na superfície do material (camada condicionante) e o acúmulo deste material formam camadas dando origem ao biofilme. Uma vez as células bacterianas aderidas à superfície do material de implante, servem de sinal ou de alvo para receptores bacterianos específicos se ligarem (CHRISTENSEN et al., 1994; GELOSIA et al., 2001).

Esta fase de colonização é de fundamental interesse para os pesquisadores, porque muitas destas forças podem ser modificadas na fabricação de novos materiais médicos, minimizando a adesão bacteriana e conseqüentemente à infecção.

O segundo estágio ou fase de imobilização é acompanhado pela multiplicação local dos *Staphylococcus* coagulase-negativa com a formação de um

crescimento superficial aderente protegido por uma camada de polissacarídeo extracelular denominada de *slime* produzido nesta fase (ALCARÁZ et al., 2003; FREEMAN et al., 1989; GELOSIA et al., 2001; HUSSAIN et al., 1992; 2001; KOTILAINE, 1990; MORALES et al., 2004; SHIRO et al., 1994).

As raras células de *Staphylococcus* coagulase-negativa que aderirem a superfície do material a estes sítios únicos irão colonizar com sucesso esta superfície pela produção do *slime*. O *slime* estabiliza as associações células a células e célula na superfície permitindo o acúmulo bacteriano ao material médico finalizando o estágio de colonização a superfície (CHRISTENSEN et al., 1994).

Em virtude das variações das fases ou modulação fenotípica, as células filhas que não estão ligadas a colônia pelo *slime* encontram-se livres e prontas a fixarem-se a novos sítios e repetir o processo de colonização (CHRISTENSEN et al., 1994).

São necessários fatores adicionais para o crescimento acumulativo e formação do biofilme pelos *Staphylococcus* coagulase-negativa e uma proteína extracelular de 140 KDa chamada de proteína associada ao acúmulo (AAP) têm sido descrita como essencial no crescimento acumulativo na superfície dos polímeros e está envolvida no processo de aderência e é o componente chave do desenvolvimento do biofilme em superfícies mas, sua exata função não está ainda bem definida (MORALES et al., 2004).

Todas bactérias produzem múltiplas adesinas e algumas são reguladas a nível transcripcional permitindo que os microrganismos escolham a forma séssil ou plantônica, dependendo das diferenças influencias do meio. O processo da formação do biofilme e seu desprendimento pode ser regulado por comunicação célula a célula e pela densidade da população formada. Dentro do biofilme maduro

há diferenças no crescimento bacteriano, produção metabólica, pH, taxa de crescimento, nível de oxigênio, síntese de polímeros extracelulares entre outras situações que permitem a estabilidade e a persistência do biofilme (MORALES et al., 2004)

1.1.4 - IMPORTÂNCIA CLÍNICA DA ADERÊNCIA DE ESTAFILOCOCOS

Clínicos que tratam infecções bacterianas relacionadas a implantes e outras infecções crônicas tem definido estes casos como uma nova categoria de doenças infecciosas que diferem bastante das síndromes bacterianas agudas predominantes até a metade do último século (COSTERTON et al., 2003; DONLAN, 2001).

Considerando a variedade de materiais usados na construção de próteses médicas e de localizações anatômicas para implantá-los, fica difícil entender por que em particular um grupo de microrganismos avirulentos emergem como causa primária de infecções, ou sobre esta questão, por que a quantidade de próteses médicas infectadas pelos *Staphylococcus* coagulase-negativa é maior do que as infecções causadas por *Staphylococcus aureus* (CHRISTENSEN et al., 1994; von EIFF et al., 2001; VUONG & OTTO, 2002).

Este paradoxo tem sido o objeto de extensivas pesquisas e investigações por mais de uma década. Uma explicação para este tropismo é que cepas patogênicas de *Staphylococcus* coagulase-negativa têm a capacidade, não comum, de aderir e colonizar estas próteses médicas, mais particularmente superfícies lisas, formando um filme aderente conhecido como *slime*. Embora a produção do *slime* é uma das explicações para este tropismo a colonização destas

próteses médicas é complexa e um processo que envolve várias etapas (ALTOPARLAK et al., 2004; FREBOURG et al., 2000; CHRISTENSEN et al., 1994; MERRITT et al., 1997; YASSIEN & KHARDORI, 2001). A importância clínica e a função patogênica dos *Staphylococcus* coagulase-negativa foram primeiro reconhecidas no início de 1960 em infecção de válvula cérebro-espinal. Ainda na década de 60, o taxonomista Baird-Parker notou a produção de um material mucóide por várias cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativa. Bayston & Penny em 1972, observaram que algumas cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativa produziam um exopolissacarídeo mucóide de importância clínica com potencial indicador de virulência (CHRISTENSEN et al., 1994; FREEMAN et al., 1989; HEINZELMANN et al., 1997) Vários outros pesquisadores também observaram a presença deste material mucóide relacionado à patogênese de processos infecciosos (AMMENDOLIA et al., 1999; CHRISTENSEN et al., 1994; FARBER et al., 1990; ISHAK et al., 1985; KOTILAINEN, 1990).

Christensen, et al., 1994, descrevem que o termo *slime* foi descrito por Jones et al, em 1963 que observaram o fenômeno pela primeira vez e evita confusão com o termo material mucóide que sugere tanto material de origem animal ou um material químico específico ou seja, mucopolissacarídeo.

Hoje, o termo *slime*, por alguns autores, é descrito como biofilme, composto por produtos bacterianos e do hospedeiro, de diferentes composição química (ARCIOLA et al., 2001; GELOSIA et al., 2001; GERKE et al., 1998; MCKENNEY et al., 1998).

Visto que os *Staphylococcus* coagulase-negativa residem normalmente na pele, a produção do *slime* e de outros mecanismos de aderência poderiam auxiliar o microrganismo a evitar sua dessecação e auxiliar sua aderência na

superfície do cabelo e da pele. Por outro lado, os mecanismos de aderência a superfícies lisas promovem a transferência das bactérias da pele para implantes e outros objetos, desse modo, promovendo a disseminação bacteriana pela manipulação destes materiais.

Conseqüentemente, a associação de matérias médicas com a produção de *slime* pelos *Staphylococcus* coagulase-negativa, deve ser um acidente natural onde estes microrganismos por engano, trocaram seu hábitat natural pelo microambiente de materiais médicos.

Portanto, a produção de *slime* deve ser uma resposta adaptativa de algumas cepas na presença de corpos estranhos e todo processo que envolve desde a adesão bacteriana até a formação do biofilme é um fator importante na virulência destes microrganismos (VOGEL et al., 1999).

1.1.5 - ASSOCIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME COM INFECÇÕES CLÍNICAS

Na década de 70, mesmo com alguns relatos não foi dada muita atenção ao fato e apenas em 1980, pesquisadores do mundo começaram a reconhecer os *Staphylococcus* coagulase-negativa como patógeno comum, especificamente relacionado a sepse hospitalar pelo uso de cateter e um dos pré-requisitos para infecções crônicas associadas ao uso de polímeros pelos *Staphylococcus* é a aderência à sua superfície (GOTZ, 2002).

Em investigações de sepse relacionada ao uso de cateter, Christensen et al. (1982,1985) observaram que cepas isoladas de casos clínicos, de *Staphylococcus* coagulase-negativa quando inoculadas em tubos de plásticos

contendo caldo de soja tríplica cobriam a parede do tubo por uma espessa camada viscosa observada após coloração, formando um filme residual de bactéria denominada de *slime*. Com o intuito de quantificar esta aderência, o método foi substituído por placas de poliestireno de micro-poços em U e a leitura medida por densidade óptica com um espectrofotômetro automático do filme aderente corado.

Outros métodos de detecção, como técnicas bioquímicas e genéticas usadas para estudar a formação do biofilme nos *Staphylococcus* têm sido revistas, como a de detecção de um fenótipo através da observação de colônias positivas ou negativas para a produção do *slime* pelo método do ágar vermelho Congo descrito por Freeman et al., 1999 (ARCIOLA et al., 2001; HUSSAIN et al., 1992; GOTZ, 2002).

Nos últimos anos vários fatores têm sido identificados por influenciarem ou induzirem a produção do biofilme por condições que são potencialmente tóxicas para a célula bacteriana e observaram a ativação do biofilme por um aumento da osmolaridade, ação de fatores ambientais como o meio, a presença de carboidratos, limitação de ferro, tensão de CO₂, oxigenação, ação de detergentes, de antibióticos, uréia, etanol, *stress* oxidativo, ácido oléico, anaerobiose e altas temperaturas (GRAMTON et al., 2001; GOTZ, 2002; RACHID et al., 2000; SELAHATTIN et al., 2000). Um último passo da infecção por corpos estranhos é fortemente afetada pela reação inflamatória e defesas do hospedeiro (VANDECASTEELE et al., 2003).

Como observado, a produção de biofilme está sujeita a variações, e por não saber sua real composição e função é descrita como um marcador de virulência, mas, dados epidemiológicos e experimentais sugerem que a produção do biofilme contribui com propriedades de virulência do microrganismo em promover a

colonização de materiais médicos (BALDASSARI et al., 1997; CHRISTENSEN et al., 1994; ZIEBUHR et al., 1999).

A infecção é a maior complicação associada com o uso de materiais implantáveis, como os cateteres. Os *Staphylococcus* coagulase-negativa são os patógenos mais importantes nestas infecções e sua patogênese está correlacionada na habilidade de algumas cepas em produzir grandes quantidades de *slime* (BALDASSARI et al., 1997)

A cura de infecção relacionada ao uso de biomateriais pelos *Staphylococcus* coagulase-negativa requer a remoção do biomaterial infectado e completo desbridamento do tecido lesado bem como uma revisão da terapia antibiótica (GOTZ, 2002).

Durante décadas mais recentes, o uso de próteses médicas tem crescido claramente e concomitantemente o risco de infecções associadas tem aumentado drasticamente. Muitas destas próteses são colonizadas por bactérias capazes de desenvolver biofilmes. A maioria dos biofilmes associados à infecção são formados por uma simples espécie bacteriana com exceção nos cateteres urinários e próteses vocais (MORALES et al., 2004; VUONG & OTTO, 2002).

Cepas hospitalares tem um potencial maior em formar biofilme devido à importante presença do gene *ica* e outros determinantes de virulência, desta maneira refletindo a diversidade etiológica das infecções pelos *Staphylococcus* coagulase-negativa (FITZGERALD et al., 2005).

Costerton et al., 2003, descrevem que os biofilmes estão envolvidos na disseminação da doença dentro do corpo de indivíduos infectados e quando se fala em distribuição hematogênica da infecção, deve-se especificar se as unidades infecciosas são células plantônicas ou fragmentos do biofilme por diferenciarem-se

em propriedades de resistência antibiótica e características de aderência. Células plantônicas são desprendidas do biofilme maduro e são geralmente sensíveis aos antibióticos e aderem a certos tecidos e superfícies inertes com considerável avidéz. Por esta razão, faz-se o uso de terapia profilática para prevenir a colonização de implantes médicos recentemente implantados por bactérias plantônicas introduzidas pela corrente sanguínea por procedimentos rotineiros como escovação dos dentes ou mesmo manipulação da cavidade bucal. Por outro lado, a maioria das células que se desprendem do biofilme desenvolvem-se em válvulas cardíacas (ocasionando endocardite) ou cateteres vasculares estão na forma de fragmentos de biofilme embutido em uma matriz e são muito resistentes aos antibióticos, por esta razão, baixas doses de antibiótico não previne a disseminação da bactéria. Nas doenças com biofilme o melhor caminho para prevenir este processo é o tratamento com altas doses de antibiótico e a remoção da prótese vascular (COSTERTON et al, 2003).

1.1.6 - CONSTITUIÇÃO DO *SLIME*

Os polissacarídeos bacterianos têm sido objeto de estudo principalmente por suas propriedades como as de interação parasita-hospedeiro, como determinante imunológico ou por sua capacidade adesiva e representam 65% do material extracelular (CHRISTENSEN, 1989).

Podem ser classificadas de acordo com sua fonte, biossíntese, estruturas, propriedades físicas (características de adsorção, solubilidade, trocas iônicas, viscosidade, formação de gel e interação polímero-polímero) ou biológica. Os componentes extracelulares e de superfície celular mais comum são a glicose,

galactose, manose, fucose, ramnose, glicosamina, galactosamina, ácido glicurônico e galacturônico, proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos (CHRISTENSEN, 1989).

Muitas moléculas têm sido identificadas com o envolvimento direto do processo de adesão célula a célula e é possível colocá-las em dois maiores grupos: carboidratos poliméricos e proteínas poliméricas. A nível bioquímico, a adesina polissacarídica extracelular tem função essencial na aderência inicial e na adesão intercelular (formação do biofilme) (MORALES et al., 2004; ZHANG et al., 1998).

Christensen et al., 1994 relataram que Peters et al., 1987 foram os primeiros pesquisadores que tentaram purificar o *slime* e descobriram que a substância que intervém a adesão dos *Staphylococcus* coagulase-negativa a superfícies lisas em camadas bacterianas é um polissacarídeo extracelular chamada de, “substância extracelular do *slime*” (ESS), que se encontra presente em abundância nos extratos do *slime*.

Há vários outros polissacarídeos que compõe o *slime*, mas um polissacarídeo específico de alto peso molecular que tem a mesma função da cápsula bacteriana e intervém a aderência inicial da bactéria na superfície do polímero é chamado de polissacarídeo capsular/adesina (PS/A) (ARCIOLA et al., 2001; FARBER et al., GOTZ, 2002; 1990; SHIRO et al., 1994) e é descrito como componente da superfície celular e da camada do biofilme protegendo a bactéria das defesas do hospedeiro e da fagocitose e está envolvido no primeiro passo da adesão primária, acompanhada da proliferação das células em grupamentos multicamadas (ARCIOLA et al., 2001; FARBER et al., 1990; GERKE et al., 1998; HANDKE et al., 2004; HUEBNER et al., 1999; McKENNEY et al., 1998). Hoje, o PS/A é conhecido como PNAG (poli-succinil-glicosamina) e estudos o descrevem

como um forte candidato na produção de vacina contra doenças estafilocócicas (BALDASSARI et al., 1996; HANDKE et al., 2004).

Em um segundo passo, há a formação de grandes grupos celulares que são associados com a produção do polissacarídeo intercelular/adesina chamado de PIA que é um homopolímero linear de até 130 resíduos de β -1,6-glicosamina N-acetilado (15% a 20% diacetilados) composto por duas frações polissacarídicas: polissacarídeo I (>80%) e polissacarídeo II (< 20%) estruturalmente relacionado ao polissacarídeo I com baixa quantidade de resíduos não N-acetilados D-glicosamina, fosfato e éster ligado a succinato, sendo aniônico (MORALES et al., 2004). O PIA é localizado na superfície celular mediado por produtos do gene cromossomal *ica* (*intercelular adhesion*) que corresponde a quatro genes de adesão intercelular, *icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC*, e um gene regulador, *icaR* organizados em uma estrutura *operon* (fig.1) envolvidos na produção deste polissacarídeo e codificam quatro proteínas que são necessárias para a síntese do PIA que são, IcaA, IcaD, IcaB e IcaC (ARCIOLA et al., 2001; CAFISO et al., 2004; CONLON et al., 2002; FITZGERALD et al., 2005; JOHANNES et al., 2001; GERKE et al., 1998; GOTZ, 2002; 1998; HUEBNER & GOLDMANN et al., 1999; MACK et al., 1996, 1999, 2000; McKENNEY et al., 1998; MORALES et al., 2004; NILSDOTTER-AUGUSTINSSON et al., 2005; O'GARA & HUMPHREYS, 2001; ZIEBUHR et al., 1999).

Estudos epidemiológicos mostram que a produção do PIA está correlacionado com a infecção originada pelo uso de próteses médicas (VUONG et al., 2004).

Desta maneira a formação do biofilme é dependente da presença e expressão do grupo de genes *icaADBC* (ZIEBUHR et al., 1999, 2000; GERKE et al., 1998).

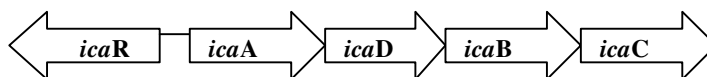


Figura 1 – organização genética do grupamento do gene *ica*

O PIA é envolvido no acúmulo celular dos *Staphylococcus* coagulase-negativa nas superfícies, na hemaglutinação e também age como adesão intercelular em vidro e outras superfícies hidrofílicas e é distinto do PS/A (ARCIOLA et al., 2001; CAFISO et al., 2004; GERKE et al., 1998; HUEBNER & GOLDMANN, 1999; Mc KENNEY et al., 1998).

Também é descrito que o PS/A e o PIA dividem em sua constituição um mesmo arranjo de β -1-6-glicosamina diferindo em um substituinte primário no grupo amino e tamanho molecular, mostrando que ambos são produzidos de proteínas codificadas no *locus ica*. A síntese do polissacarídeo capsular-PS/A é mediada por um operon *ica* que uma vez ativado, um polissacarídeo de adesão intercelular-PIA é sintetizado (ARCIOLA et al., 2001; GERKE et al., 1998; HUBNER & GOLDMANN, 1999; LITRAN et al., 2002; McKENNEY et al., 1998; OTTO & GÖTZ, 2001; von EIFF et al., 2002).

A importância do PIA na patogênese das infecções pelos *Staphylococcus* coagulase-negativa em cateteres intravasculares tem sido confirmado em experimentos realizados em animais (NILSDOTTER-AUGUSTINSSON et al., 2005; RUPP et al., 1999a,b).

GÖTZ, 2002 após estudos com cepas produtoras de PIA, descreve que a produção do *slime* é influenciada por vários parâmetros e que em certas cepas há

uma variação, chamada de variação fenotípica e especula-se que esta variabilidade contribui para a sobrevivência bacteriana em condições adversas.

O'gara & Humphreys, 2001, descrevem que há vários estudos realizados para se saber a real função de cada proteína Ica. Supostamente sabe-se que são proteínas transmembrana, porque são compostas de aminoácidos hidrofóbicos em alta porcentagem formando um potencial de hélice transmembrana e que estão localizadas na membrana celular (DOBINSKY et al., 2002).

IcaA representa atividade catalítica *N*-acetilglicosaminatranferase e que sozinha tem baixa atividade transferase mas, quando é co-expressa com IcaD apresenta atividade total sintetizando resíduos longos de 10-20 oligômeros de β 1,6-*N*-acetil glicosamina (DOBINSKY et al., 2002; GALDBART et al., 2000; GOTZ, 2002). Longos oligômeros de até 130 resíduos são formados na presença de IcaC; IcaB está presente principalmente no sobrenadante das culturas e codifica uma proteína que catalisa reações de diacetilação durante a biossíntese do PIA e é secretado quando da necessidade de IcaC que sintetiza longos oligômeros; Ica C não tem atividade bem definida, mas deve estar envolvida no transporte transmembrana por ser uma proteína integrante da membrana, não tendo atividade essencial para a síntese do PIA (DOBINSKY et al. , 2002; GOTZ, 2002).

Recentemente, pesquisadores identificaram uma substância conhecida como poli-gama-DL-ácido glutâmico ou PGA que protege o patógeno dos mecanismos de defesas naturais do hospedeiro e que está presente nos *Staphylococcus epidermidis* que sobrevivem em implantes médicos. Relata-se ainda que a formação do biofilme não depende do PGA, mas que quando presente à produção do biofilme é maior. O que estes pesquisadores buscam é uma vacina

para inativar o efeito do PGA pois ele é à base do desenvolvimento de doenças estafilocócicas (KOCIANOVA, et al., 2005).

1.1.7 - PREVENÇÃO DAS INFECÇÕES ESTAFILOCÓCICAS RELACIONADAS AO USO DE IMPLANTES MÉDICOS

Nas infecções decorrentes do uso de implantes médicos pelos *Staphylococcus* coagulase-negativa a formação do biofilme é considerada como o principal fator de virulência em razão que os mecanismos de defesa do hospedeiro, bem como a ação quimioterápica antibacteriana tornam-se ineficazes, devido ao biofilme proteger as células estafilocócicas ficando difícil a cura destas infecções (MINTO et al., 1999; von EIFF et al., 1999, 2001).

A natureza da estrutura do biofilme e atributos fisiológicos dos organismos no biofilme confere uma resistência inerente aos agentes antimicrobianos mesmo se estes agentes são antibióticos, desinfetantes ou germicidas contra estes microrganismos no estado planctônico. Desta maneira a concentração de antibiótico necessária para matar a bactéria no biofilme pode ser quatro vezes mais alta (MORALES et al., 2004).

Vários autores descrevem que a produção de biofilme tem implicações terapêuticas, pois observaram uma ligação entre a produção do biofilme e a persistência da infecção e falhas no tratamento antibiótico (STEWART & COSTERTON, 2001; ZIEBUHR et al., 2000). A este respeito, uma vez formado o biofilme, removê-lo por meio de antibióticos tem mostrado ser muito difícil. Por outro lado, isto é devido à falência terapêutica de muitos antibióticos em tratar infecções estafilocócicas crônicas e também ao fato de que a maioria dos isolados hospitalares

de *Staphylococcus* coagulase-negativa serem multirresistentes com um constante aumento desta resistência (MORALES et al., 2004; RACHID et al., 2000).

Os mecanismos responsáveis para a resistência devem estar associado à baixa penetração do agente antimicrobiano através da matrix do biofilme; inativação dos agentes antimicrobianos por enzimas presentes no biofilme; modificação no desenvolvimento dos microrganismos no biofilme; trocas fisiológicas devido ao modo de crescimento e variação da expressão genética sofrida pelos microrganismos presente no biofilme podem comandar a baixa sensibilidade fenotípica contra antimicrobianos (MACK et al., 2002; MORALES et al., 2004; POLONIO et al., 2001; VUONG & OTTO, 2002; von EIFF et al., 1999).

Estudos, analisaram a influencia de concentrações subinibitórias de antibióticos na formação de biofilmes e que a expressão do operon *ica* pode ser fortemente aumentada por uma mistura de estreptogramina com dalfopristin e pela tetraciclina que tem sido eficientes no tratamento infecções sérias causadas por cocos gram-positivos multirresistentes devido aos antibióticos exibirem efeitos na estrutura da célula e na expressão de genes de virulência (GOTZ, 2002; KONCKRO et al., 2000; MORALES et al., 2004; RACHID et al., 2000).

Por outro lado, Yassien & Khardori, 2001 estudaram a interação de quatro fluoroquinolonas diferentes e sua ação nos biofilmes formados e observaram que a erradicação do polissacarídeo extracelular tem mostrado um aumento da penetração do agente antimicrobiano no biofilme.

Devido à maioria das infecções ocasionadas pelos *Staphylococcus* coagulase-negativa serem de natureza hospitalar, não é de se surpreender que se tornem altamente resistentes a múltiplos antibióticos, especialmente a meticilina que exclui a terapia a outros beta-lactâmicos e que freqüentemente também são aos

macrolídeos, lincosaminas, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas. O tratamento de escolha para as infecções causadas por estes microrganismos é freqüentemente a vancomicina. Devido à emergência a resistência a vancomicina aos *Enterococcus* sp e aos *Staphylococcus* sp a recomendação é que o uso desta droga promove o desenvolvimento de cepas resistentes a todos os antibióticos (ALCARÁZ et al., 2003; FERREIRA et al., 2002; PARK et al., 2001, von EIFF et al., 2001).

A experiência clínica com infecção estafilocócicas aos polímeros mostra claramente que os mecanismos de defesas do hospedeiro tão bem como quimioterapia antibacteriana são freqüentemente incapazes de curar esta infecção, apesar do uso de agentes antimicrobianos com comprovada atividade *in vitro*. Trabalhos experimentais mostram que o *slime* extracelular produzido reduz a resposta quimiotática dos polimorfonucleares neutrófilos, reduz a atividade fagocítica de macrófago peritoneal em animal de experimentação e inibe a proliferação de polimorfonucleares neutrófilos humanos após simulação com imunomoduladores policlonais (von EIFF et al., 1999; MORALES et al., 2004).

Pesquisas futuras tem como objetivo o desenvolvimento de estratégia para inibir a adesão e colonização bacteriana em cateteres implantáveis. Uma destas pesquisas é o uso de cateteres embebidos com agentes antimicrobianos sozinho ou em combinação com passagem de uma corrente elétrica alta (O'GARA & HUMPHREYS, 2000; MORALES et al., 2004).

A geração de eletrólitos como os prótons, anions hidroxilados, reativos intermediários do oxigênio, hidrogênio e oxigênio aparecem aumentando a morte bacteriana pelo antibiótico de células bacterianas aderidas à superfície do polímero é conhecida como efeito bioelétrico (COSTERTON et al, 1995; MORALES et al., 2004).

O conhecimento de mecanismos moleculares que determinam a formação do biofilme permitirá o projeto de novas estratégias em bloquear a expressão dos genes diretamente envolvidas na aderência do microrganismo, o desenvolvimento de próteses sintetizadas com novos materiais que permitem o estabelecimento do biofilme e o uso de próteses com sua superfície embebida por agentes antimicrobianos (MORALES et al., 2004).

Todas estas medidas devem ser necessárias para prevenir e tratar infecção relacionada ao uso dos cateteres desde que a eliminação do biofilme bacteriano apenas pelo uso de antibiótico é muito difícil (MORALES et al., 2004).

Lewis, 2001 relata que a habilidade dos antimicrobianos em inibir o crescimento do biofilme indica que eles são capazes de difundirem-se por entre o biofilme e agir normalmente contra seu alvo. Por que estão as células não morrem? Este é o principal problema e enigma que precisa ser resolvido.

2 - OBJETIVOS

Estudar cepas de estafilococos coagulase-negativa isolados de ambiente biótico hospitalar, os fatores correlacionados com a virulência como:

- 1) Produção de polissacarídeo extracelular.
- 2) Formação de biofilme sobre superfície abiótica.
- 3) Associação entre produção de polissacarídeo extracelular, a origem e a identidade das espécies dos estafilococos coagulase-negativa.
- 4) Determinar a sensibilidade a oxacilina e relacionar com a produção de polissacarídeo extracelular.

3 - MATERIAL E MÉTODO

3.1 - CASUÍSTICA

Foram isoladas 27 amostras de *Staphylococcus* coagulase-negativa de cateter venoso central obtidas do estudo: “COLONIZAÇÃO DE CATETERES VENOSOS CENTRAIS POR BIOFILME MICROBIANO” Tese de Doutorado do aluno Anísio Storti do programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, campus de Araraquara-UNESP, (dados não publicados).

Todos os procedimentos laboratoriais foram desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia Clínica do CRD/NAC (Centro de Referência Diagnóstica Integrado ao Núcleo de Atendimento à Comunidade) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara-UNESP, com exceção da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), que foi realizada no Laboratório de Físico-Química do Instituto de Química do Câmpus de Araraquara-UNESP.

3.2 - MEIOS DE CULTURA E REAGENTES

Os meios de cultura desidratados, relacionados a seguir, das marcas comerciais DIFCO (Becton Dickinson; Sparks, USA), MERCK (Darmstadt, Germany), BBL (Becton Dickinson; Cockeysville; USA), OXOID (Hampshire, England) foram preparados de acordo com as especificações dos fabricantes: Ágar Müeller Hinton, Caldo Mueller Hinton, Ágar Base Sangue (TSA Blood Agar Base), Ágar cérebro coração, Caldo de Infusão Cérebro e Coração, Caldo de Soja Tríplica e Ágar Base Vermelho de Fenol. As formulações encontram-se apêndice A.

Sais, ácidos, corantes, açúcares e demais reagentes eram de procedência bioMÉRIEUX (Rio de Janeiro, Brasil), MERCK (Darmstadt, Germany), SIGMA (Sigma-Aldrich Chemical; São Paulo, Brasil) REAGEN (Quimibrás Indústrias Químicas; Rio de Janeiro, Brasil), DIFCO (Becton Dickinson; Sparks, USA), PROBAC (São Paulo, Brasil), Fluka (Chemika; Switzeland).

Os discos de antimicrobianos eram de procedência CECON (São Paulo, Brasil).

As soluções de etanol (v/v) nas concentrações de 15, 30, 50, 70, 95, e 100%, bem como as soluções do tampão fosfato (0,2M; 0,2M(pH7,1); 0,1M (pH7,1) e 0,1M-glutaraldeído 2,5% utilizadas na técnica de microscopia eletrônica de varredura foram preparadas no setor de Microbiologia Clínica do Laboratório de Análises Clínicas “Prof. Antonio Longo” do CRD/NAC Unidade Auxiliar Integrada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, câmpus de Araraquara, São Paulo.

Os tampões e soluções utilizados para extração do DNA genômico e reação PCR foram preparados no Laboratório de Biologia Molecular e Celular de Microrganismos do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, câmpus de Araraquara, São Paulo. As formulações encontram-se apêndice B.

3.3.–SISTEMAS COMERCIAIS DE IDENTIFICAÇÃO DE COCOS GRAM-POSITIVOS CATALASE POSITIVA

Sistema *APIStaph* (bio-Mérieux, La Balme, Les Grottes, França).

3.4.- MÉTODOS

3.4.1 – IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Os cocos Gram-positivos com a característica de agrupamentos irregulares (cachos de uva), sugestivos de *Staphylococcus* sp., foram identificados de acordo com Kloss & Schleifer (1975), modificado por Kloos & Bannerman (1999), adaptado por Bernardi et al. (2001) utilizando as seguintes provas bioquímico-fisiológicas: resistência à bacitracina; novobiocina, polimixina, teste da coagulase livre e ligada, PYR e carboidratos: sacarose, manose, trealose, manitol, celobiose, maltose e xilose (MURRAY et al., 1999, 2003; MacFADDIN et al., 2000) e pelo sistema *APISTaph* (bio-Mérieux-Jacarépagua, Rio de Janeiro, Brasil).

3.4.2 – IDENTIFICAÇÃO DOS *STAPHYLOCOCCUS*

3.4.2.1-*Staphylococcus* sp

Kloos e Scheleifer (1975), modificado por Kloos e Bannerman (1995, 1999); adaptado por Bernardi et al. (2001); Murray et al. (1995, 1999, 2003) e MacFaddin (2000)

3.4.2.2-Teste da coagulase livre (prova em tubo)

MacFaddin (2000)

Foi preparada a suspensão do *Staphylococcus* sp., em tubos de vidro esterilizados (13x100mm) contendo 0,5mL de caldo BHI e adicionado de 0,5mL de plasma citratado. Homogeneizada suavemente sem agitar. Os tubos foram

incubados em banho-maria a 37°C por 4 horas. De modo idêntico, foram realizados controles utilizando-se cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa. A prova foi considerada positiva quando houve a formação de coágulo, de qualquer intensidade.

Como controle positivo foram usadas cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 e como controle negativo *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, conforme as recomendações de MacFaddin (2000).

3.4.2.3-Teste da coagulase ligada (prova em lâmina)

MacFaddin (2000)

Foi colocada sobre uma lâmina de vidro uma gota de solução fisiológica esterilizada e com auxílio de uma alça bacteriológica, suspendeu-se um pouco do crescimento bacteriano a ser testado até obter-se uma suspensão homogênea. A seguir foi adicionada uma gota de plasma citratado e homogeneizado para observar a formação ou não de grumos em período em 5-20 segundos. O teste da coagulase ligada foi considerado negativo quando não foi observada a formação de grumos em 3 a 4 minutos.

3.4.2.4-Resistência à bacitracina

MacFaddin (2000); Murray et al. (1995, 1999, 2003)

Foi semeada com *swab* na superfície do ágar Mueller Hinton, a suspensão bacteriana em estudo, com turbidez equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland. Após a secagem foi colocado um disco de bacitracina (A) de

0,04unidades-U (CECON-São Paulo, Brasil) sobre a sementeira. Foi incubado por 18-24 horas em estufa bacteriológica a 35-37°C. A ausência de um halo de inibição, ou zona de inibição com mais de 10mm de diâmetro ao redor do disco, indica que a prova foi positiva, isto é, o microrganismo era resistente à bacitracina. A prova negativa ou sensibilidade quando a zona de inibição do crescimento bacteriano é maior que 10mm de diâmetro ao redor do disco. Esta prova diferencia o gênero *Micrococcus* do gênero *Staphylococcus*.

3.4.2.5-Resistência à novobiocina

Murray et al. (1995, 1999, 2003)

Foi semeada com *swab* na superfície do ágar Mueller Hinton, uma suspensão bacteriana com turvação semelhante ao tubo 0,5 da escala de McFarland, após a secagem foi colocado um disco contendo 5µg de novobiocina (CECON-São Paulo, Brasil) sobre a sementeira, incubado por 18-24 horas em estufa bacteriológica a 35-37°C. Prova positiva (resistência): halo de 16mm ou menor. Prova negativa (sensibilidade): halo maior do que 16mm.

3.4.2.6-Resistência à polimixina B

Murray et al. (1995, 1999, 2003)

Foi semeado com *swab* na superfície do ágar Mueller Hinton, uma suspensão bacteriana com turvação semelhante ao tubo 0,5 da escala de MacFarland, após a secagem foi colocado um disco padronizado contendo 300µg de Polimixina B (CECON-São Paulo, Brasil) sobre a sementeira, incubado por 18-24

horas em estufa bacteriológica a 35-37°C. Prova positiva (resistência): halo de 10mm ou menor. Prova negativa (sensibilidade): halo maior do que 10mm.

3.4.2.7-Teste de hidrólise pyrrolidonyl- β -naphthylamide (PYR)

MacFaddin (2000) ;Murray et al. (1995, 1999, 2003)

Sobre o crescimento do microrganismo, em ágar Mueller Hinton de 18-24 horas, foi colocado um disco de PYR (PROBAC-São Paulo-Brasil) e a placa reincubada a 35-37°C por 4 horas. Após este período o disco foi retirado e depositado sobre uma lâmina e colocado sobre ele uma gota do reagente PYR. O aparecimento de uma cor vermelho-cereja em um minuto indica que a prova é positiva e a não mudança da cor do reagente indica reação negativa.

3.4.2.8-Teste da utilização aeróbia dos carboidratos

Murray et al. (1995, 1999, 2003)

As cepas de *Staphylococcus* foram caracterizadas segundo a espécie, de acordo com a utilização dos carboidratos sacarose, manose, trealose, manitol, celobiose, maltose e xilose todas de procedência MERK (Darmstadt, Alemanha). Estes testes foram realizados em Ágar-Base Vermelho de Fenol (DIFCO), suplementado com 1% do respectivo carboidrato. Foi inoculado o microrganismo a ser testado no meio suplementado com o carboidrato específico e incubado em estufa bacteriológica a 35-37°C por até 24 horas. Leitura: Prova positiva: crescimento do microrganismo com viragem do pH do meio de cultura (vermelho para amarelo). Prova negativa: crescimento sem alteração de cor.

3.5 - CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS* COAGULASE-NEGATIVA USANDO ÁGAR VERMELHO CONGO

3.5.1. PRODUÇÃO DE *SLIME*

A produção de *slime* foi verificada em placas contendo ágar vermelho Congo (Congo red agar), de acordo com Freeman et al. (1989)

As cepas isoladas de *Staphylococcus* coagulase-negativa foram semeadas por esgotamento com alça bacteriológica em Ágar Vermelho Congo contido em placas (90x15mm) e incubadas em aerobiose a 37°C, em estufa bacteriológica, por 24 horas a temperatura ambiente por 18 horas. Após este período foi realizada a leitura das placas para verificar a produção de *slime*. A presença de colônias negras com consistência cristalina seca indica um resultado positivo, isto é, colônia produtora de *slime*. As colônias não produtoras de *slime*, são vermelhas e indicam resultado negativo para produção de *slime*.

3.6 – ADERÊNCIA DE *STAPHYLOCOCCUS* COAGULASE-NEGATIVA EM PLACAS DE POLIESTIRENO

As medidas de aderência dos estafilococos foi realizada em caldo de soja triptica com glicose 0,25% (TSB), de acordo com Christensen et al. (1985)

As cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativa foram inoculadas em tubos com tampa de rosca (13x100mm–PYREX) contendo 3,0mL de caldo TSB com 0,25% de glicose e incubados a 35-37°C, em estufa bacteriológica, por uma noite. Após este período a cultura em TSB de estafilococos coagulase-negativa foi diluída a 1:100 em um novo TSB. A seguir alíquotas de 200µL de cada cultura diluída foram transferidas para cada um dos poços (*wells*) (96 poços com fundo em U) da placa de poliestireno esterilizada. A seguir estas placas foram incubadas por 18 horas a 37°C. Após este período, o conteúdo de cada poço foi delicadamente aspirado com uma pipeta automática multicanal (FINNPIPETTE-LABSYSTEMS), os poços foram lavados quatro vezes com 200µL de tampão fosfato salina (PBS) (pH 7,2). A secagem da placa foi realizada em estufa a 60°C por 1 hora. A seguir, os poços foram corados com Cristal Violeta de Gram (LABORCLIN) por 1 minuto e lavados com água de torneira. Antes da leitura em cada poço da placa foi adicionada uma solução a 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS).

A densidade óptica (D.O.) dos filmes bacterianos aderidos e corados foi lida com o auxílio de um leitor para ELISA (MULTISKAN ASCENT V1.24 254-00724T–LABSYSTEMS) em filtro de 570nm.

As leituras foram divididas em 3 categorias de acordo com a reação de aderência das bactérias: não aderente (D.O. $\leq 0,120$ nm); fracamente aderente (D.O.

0,120 a 0,240nm) e fortemente aderente (D.O. $\geq 0,240$ nm) segundo Christensen et al., 1985.

3.7. PRODUÇÃO DE BIOFILME SOBRE SUPERFÍCIE ABIÓTICA

A produção *in vitro* de biofilmes de *Staphylococcus* coagulase-negativa foi realizada de acordo com Pizzolitto (1997).

Foram utilizados segmentos de 0,5cm de cateter venoso central de vialon esterilizado (Código 384917, 14GX30cm, i-Cath B-D[®]) e sem uso.

3.7.1 - PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO BACTERIANA

As cepas de estafilococos coagulase negativa foram reativados em 3,0mL de BHI incubados de 18-24 horas em estufa de 35-37°C. Após este período, 100,0µL do crescimento foi repicado para tubo com tampa de rosca (13x100mm – PYREX) com 3,0mL de BHI e incubado em estufa a 35-37° C até a fase log de crescimento (2 a 3 horas).

A seguir as amostras foram centrifugadas e o sedimento lavado por duas vezes com 10,0mL de salina fisiológica esterilizada e as células bacterianas foram ressuspensas em salina fisiológica esterilizada até atingir densidade óptica (D.O.) de 1,0 (10^9 células/mL) a 540nm em espectrofotômetro (600 PLUS-FEMTO).

3.7.2 – PRODUÇÃO *IN VITRO* DE BIOFILME EM CATETER VENOSO CENTRAL DE VIALON

Com uma micropipeta automática de 200,0µL uma suspensão do microrganismo da ordem de 10^9 células/mL foi transferida para tubos cônicos de poliestireno Falcon (CORNING®) esterilizados com capacidade para 50,0mL, contendo 15,0mL de caldo Mueller Hinton e o segmento de cateter (0,5cm). Os tubos foram incubados a 35-37°C sob agitação constante de 100 rpm em agitador orbital (TE-420-TECNAL) e após, 72 horas de incubação, os segmentos, foram retirados e fixados com glutaraldeído 2,5% por 15 minutos, desidratados em séries de solução alcoólica (15-100%), secos, metalizados com ouro e colados em suportes especiais do microscópio eletrônico de varredura. O material foi fotografado com filme Neopan 100.

3.8 – DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA EM *STAPHYLOCOCCUS* coagulase-negativa

3.8.1 - RESISTÊNCIA A OXACILINA

A prova de resistência a oxacilina foi realizada de acordo com o documento do NCCLS-M2-A7 - 2000.

Vinte mililitros do meio de cultura ágar Mueller Hinton esterilizado foram transferidos assepticamente para uma placa descartável (CRAL®) de 90X15mm de diâmetro para se obter uma camada de 4,0mm de espessura

Com auxílio de uma agulha bacteriológica 3 a 4 colônias com a mesma morfologia foram transferidas para 4,0mL de solução fisiológica esterilizada. Após o

ajuste do inóculo para 0,5 da escala de McFarland, semeou-se sobre ágar Mueller Hinton, com swab de algodão, em três direções diferentes de maneira uniforme. A placa inoculada foi mantida à temperatura ambiente de 3 a 5 minutos. Com auxílio de pinça esterilizada, o disco de oxacilina 1mcg-OXA (CECON) foi depositado sobre o meio de cultura com uma leve pressão contra a superfície do meio. As placas foram incubadas a 35°C durante 24 horas.

A leitura foi realizada medindo-se o halo de inibição ao redor do disco com auxílio de uma régua milimetrada considerando-se: sensível ($\geq 18\text{mm}$) e resistente ($\leq 17\text{mm}$).

3.9. MÉTODOS MOLECULARES PARA PESQUISA DE GENES DE VIRULÊNCIA *icaA* e *icaD* EM *STAPHYLOCOCCUS* COAGULASE-NEGATIVA

3.9.1. Caracterização molecular de *Staphylococcus* coagulase-negativa

3.9.1.1. Extração do DNA genômico segundo Goering & Winters 1992 modificado

As cepas bacterianas foram crescidas até saturação em 2 mL de caldo Mueller Hinton a 37 °C por 16-18 horas sob agitação. O volume total da cultura foi transferido para um tubo de microcentrífuga e submetido à centrifugação a 10.000xg por um minuto. O sobrenadante foi descartado e as células suspensas em 200µL de tampão TE pH-8,0 (Tris-HCl pH 8,0 10mM, EDTA 1mM) e então adicionado 25µL de lisozima (10mg/mL estoque) e incubado a 37°C por cinco minutos. Retirou-se o sobrenadante e foi adicionado 200µL de SDS a 1% / NaOH 0,2M e levado a banho

fervente por 45 segundos para a lise celular, esperou-se esfriar a temperatura ambiente. Para a extração foi adicionado 600µL de PCI (Fenol:Clorofórmio:Álcool isoamílico-25:24:1) e agitado em vórtex por 1 minuto e submetido a centrifugação a 13.000xg por 10 minutos. Após este procedimento, a fase aquosa foi transferida para um outro tubo de microcentrífuga a qual foram adicionados 1mL de isopropanolol e incubado a 37°C por cinco minutos para precipitação do DNA. A mistura foi centrifugada por 10 minutos a 13.000gx e o sobrenadante desprezado. A seguir, o tubo foi lavado 3 vezes com 1mL de etanol 75% gelado, homogeneizado por inversão, desprezado o sobrenadante e levado para secar. O precipitado foi suspenso em 50µL de TE pH 8,0 e estocado a -20°C até o momento do uso.

3.9.1.2 - Amplificação de DNA pela reação de polimerase em cadeia (PCR)

Os fragmentos contendo os genes de interesse foram amplificados, a partir de DNA genômico de cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativa isoladas de cateter, por PCR utilizando-se os primers específicos para a amplificação dos genes em estudo (*icaA* e *icaD*). Em um tubo de 200µL foram colocados os pares de primers para a amplificação dos genes de interesse (1µM): *icaA*: 2µL de DNA genômico da cepa em estudo, 0,5µL de tampão Taq, 2µL de MgCl₂, 1µL dNTPs, 1,3µL Forward, 0,8µL Reverse e 37,4µL de água destilada para um volume final de 50µL; *icaD*: 2µL de DNA genômico da cepa em estudo, 0,5µL de tampão Taq, 2µL de MgCl₂, 1µL dNTPs, 1,94µL Forward, 1,5µL Reverse e 36µL de água destilada para um volume final de 50µL.

Foram realizados 30 ciclos de amplificação em termociclador (geneAmp-PCR System 9700) como relatado a seguir:

Desnaturação do DNA – 1 minuto a 94 °C;

Hibridização dos primers – 1 minuto a 50 °C;

Reação de polimerização – 2 minutos a 72 °C;

Após os 30 ciclos, foi realizado mais um ciclo de polimerização de 2 minutos e os produtos da reação foram mantidos a 4 °C . Os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram verificados em gel de agarose 1%.

Primers utilizados nos experimentos deste trabalho:

icaA

Forward: 5'-TCTCTTGCAGGAGCAATCAA-3'

Reverse: 5'-CCCAGTATAACGTTGGATACC-3'

Tamanho do produto: 188 pb

icaD

Forward: 5'-ATGGTCAAGCCCAGACAGAG-3'

Reverse: 5'-CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA-3'

Tamanho do produto: 198 pb

4 – RESULTADOS

4.1. – Identificação das amostras de *Staphylococcus* coagulase-negativa

Foram estudadas 27 amostras de *Staphylococcus* coagulase-negativa, identificadas como: 1 *S. saprophyticus* (3,70%), 2 *S. xylosus* (7,41%), 4 *S. haemolyticus* (14,81%), 10 *S. epidermidis* (37,04%), 4 *S. warneri* (14,81%), 2 *S. lugdunensis* (7,41%), 2 *S. hominis* (7,41%), 1 *S. schleiferi* (3,70%) e 1 *S. chromogenes* (3,70%) como mostra a figura 2.

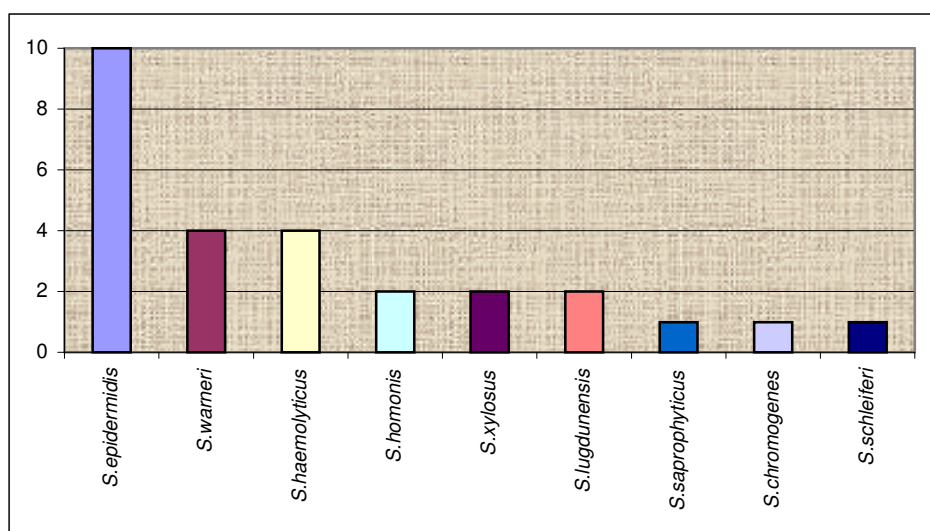


Figura 2 – Frequência de amostras *Staphylococcus* coagulase-negativa

O *S. epidermidis* é considerado o *Staphylococcus* coagulase-negativa mais importante na infecção hospitalar e outras espécies associadas com infecções são: *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis* e *S. schleiferi*.

4.2. Detecção de resistência em *Staphylococcus* coagulase-negativa

O resultado de resistência a oxacilina dos 27 *Staphylococcus* coagulase-negativa, mostra que 19 (70,37%) apresentaram resistência e 8 (29,62%) apresentaram sensibilidade conforme mostra Tabela 1.

Tabela 1 – Reação a oxacilina entre as espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa

Microrganismos	Halo de inibição	
	Sensível (≥ 18 mm)	Resistente (≤ 17 mm)
C ₁ <i>S. chromogenis</i>	-	Resistente
E ₁ <i>S. epidermidis</i>	-	Resistente
E ₂ <i>S. epidermidis</i>	sensível	-
E ₃ <i>S. epidermidis</i>	-	Resistente
E ₄ <i>S. epidermidis</i>	-	Resistente
E ₅ <i>S. epidermidis</i>	-	Resistente
E ₆ <i>S. epidermidis</i>	-	Resistente
E ₇ <i>S. epidermidis</i>	-	Resistente
E ₈ <i>S. epidermidis</i>	-	Resistente
E ₉ <i>S. epidermidis</i>	-	Resistente
E ₁₀ <i>S. epidermidis</i>	-	Resistente
Ha ₁ <i>S. haemolyticus</i>	sensível	-
Ha ₂ <i>S. haemolyticus</i>	-	Resistente
Ha ₃ <i>S. haemolyticus</i>	-	Resistente
Ha ₄ <i>S. haemolyticus</i>	-	Resistente
Ho ₁ <i>S. hominis</i>	sensível	-
Ho ₂ <i>S. hominis</i>	sensível	-
L ₁ <i>S. lugdunensis</i>	sensível	-
L ₂ <i>S. lugdunensis</i>	-	Resistente
Sa ₁ <i>S. saprophyticus</i>	-	Resistente
Sc ₁ <i>S. schleiferi</i>	sensível	-
X ₁ <i>S. xylosus</i>	-	Resistente
X ₂ <i>S. xylosus</i>	sensível	-
W ₁ <i>S. warneri</i>	-	Resistente
W ₂ <i>S. warneri</i>	sensível	-
W ₃ <i>S. warneri</i>	-	Resistente
W ₄ <i>S. warneri</i>	-	Resistente

As 8 amostras sensíveis a oxacilina foram: um *S. epidermidis*, um *S. haemolyticus*, um *S. lugdunensis*, um *S. schleiferi*, um *S. warneri*, um *S. xylosus* e dois *S. hominis*.

A frequência das espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa resistentes a oxacilina está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 - Frequência das espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa resistentes à oxacilina.

Espécies	Resistente	Sensível
<i>S. epidermidis</i>	9 (47,36%)	1 (12,50%)
<i>S. haemolyticus</i>	3 (15,80%)	1 (12,50%)
<i>S. warneri</i>	3 (15,80%)	1 (12,50%)
<i>S. lugdunensis</i>	1 (5,26%)	1 (12,50%)
<i>S. hominis</i>	0 (0,00%)	2 (25,00%)
<i>S. xylosus</i>	1 (5,26%)	1 (12,50%)
<i>S. schleiferi</i>	0 (0,00%)	1 (12,50%)
<i>S. chromogenes</i>	1 (5,26%)	0 (0,00%)
<i>S. saprophyticus</i>	1 (5,26%)	0 (0,00%)
TOTAL	19 (100,00%)	8 (100,00%)

Os *Staphylococcus* coagulase-negativa resistentes a oxacilina, são resistentes a todos agentes beta lactâmicos, inclusive penicilina, cefalosporinas e carbapenens, ou seja, são com frequência resistentes a outros agentes antimicrobianos usados comumente. A vancomicina é freqüentemente a droga de escolha para o tratamento das infecções clinicamente significantes. Uma acurada detecção da resistência à oxacilina é difícil, todas as células em uma cultura carregam a informação genética para a resistência, porém pequeno número pode expressar a resistência *in vitro*. Este fenômeno é chamado heteroresistência e ocorre em estafilococos resistentes a penicilinas penicilinase estáveis, como a oxacilina. A heteroresistência é um problema para o Laboratório Clínico, porque as células expressando resistência podem crescer mais lentamente do que a população sensível. É por isso que o CLSI (NCCLS-2005) recomenda a incubação dos isolados que estão sendo testados contra oxacilina a 35°C durante 24 horas (2).

4.3. Produção de *slime*

O resultado da presença de *slime* investigado em ágar vermelho Congo está apresentado nas Figuras 3-4 e Tabela 3. Das 27 amostras de *Staphylococcus* coagulase-negativa semeadas no ágar vermelho Congo, 21 (77,78%) eram colônias negras (produtoras de *slime*) e 6 (22,22%) vermelhas (não produtoras de *slime*).



Figura 3 - Colônias negras de amostras produtoras de *slime* em ágar vermelho Congo



Figura 4 - Colônias vermelhas amostras não produtoras de *slime* em ágar vermelho Congo.

Tabela 3 – Produção de *slime* entre as espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa

Microrganismos	Variação de cor em ágar vermelho Congo	
	Negra (produção de <i>slime</i>)	Vermelha (não produção de <i>slime</i>)
C ₁ <i>S. chromogenes</i>	negra	-
E ₁ <i>S. epidermidis</i>	negra	-
E ₂ <i>S. epidermidis</i>	negra	-
E ₃ <i>S. epidermidis</i>	negra	-
E ₄ <i>S. epidermidis</i>	negra	-
E ₅ <i>S. epidermidis</i>	negra	-
E ₆ <i>S. epidermidis</i>	negra	-
E ₇ <i>S. epidermidis</i>	negra	-
E ₈ <i>S. epidermidis</i>	negra	-
E ₉ <i>S. epidermidis</i>	negra	-
E ₁₀ <i>S. epidermidis</i>	negra	-
Ha ₁ <i>S. haemolyticus</i>	negra	-
Ha ₂ <i>S. haemolyticus</i>	negra	-
Ha ₃ <i>S. haemolyticus</i>	negra	-
Ha ₄ <i>S. haemolyticus</i>	negra	-
Ho ₁ <i>S. hominis</i>	-	vermelho
Ho ₂ <i>S. hominis</i>	-	vermelho
L ₁ <i>S. lugdunensis</i>	-	vermelho
L ₂ <i>S. lugdunensis</i>	-	vermelho
Sa ₁ <i>S. saprophyticus</i>	-	vermelho
Sc ₁ <i>S. schleiferi</i>	-	vermelho
X ₁ <i>S. xylosus</i>	negra	-
X ₂ <i>S. xylosus</i>	negra	-
W ₁ <i>S. warneri</i>	negra	-
W ₂ <i>S. warneri</i>	negra	-
W ₃ <i>S. warneri</i>	negra	-
W ₄ <i>S. warneri</i>	negra	-

A fenotípica produção de *slime* para todas as amostras em estudo foi avaliada por cultura em ágar vermelho Congo. Como mostrado na Fig. 3 e Tabela 3, as amostras produtoras de *slime* aparecem como colônias negras, e as não produtoras de *slime* vermelhas. O ágar vermelho Congo contém sacarose como fonte de carbono como precursor na formação de *slime* em amostras de *S. epidermidis*.

A frequência das espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa produtoras e não produtoras de *slime* está expressa na Tabela 4.

Tabela 4 - Frequência das espécies *Staphylococcus* coagulase-negativa produtoras e não produtoras de *slime* detectado em ágar vermelho Congo.

Espécies	Produção de <i>slime</i>	Não produção de <i>slime</i>
<i>S. epidermidis</i>	10 (47,62%)	0 (00,00%)
<i>S. haemolyticus</i>	4 (19,05%)	0 (00,00%)
<i>S. warneri</i>	4 (19,05%)	0 (00,00%)
<i>S.lugdunensis</i>	0 (00,00%)	2 (33,33%)
<i>S. hominis</i>	0 (00,00%)	2 (33,33%)
<i>S. xylosus</i>	2 (09,52%)	0 (00,00%)
<i>S. schleiferi</i>	0 (00,00%)	1 (16,67%)
<i>S. chromogenes</i>	1 (04,76%)	0 (00,00%)
<i>S. saprophyticus</i>	0 (00,00%)	1 (16,67%)
TOTAL	21 (100,00%)	6 (100,00%)

Todas as amostras de *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri* eram produtoras de *slime*.

4.4 Aderência de *Staphylococcus* coagulase-negativa em placas de poliestireno.

A avaliação quantitativa da aderência à placa de poliestireno mostrou que dos 27 *Staphylococcus* coagulase-negativa, 22 (81,4%) aderiram fortemente e 5 (18,6%) aderiram fracamente ou seja, todas aderiram. Os resultados das leituras das D.O. do teste estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Densidade óptica das reações de aderência entre as espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa

Microrganismos	D.O. do teste de aderência em placa de poliestireno	
	Fracamente aderente (0,120 a 0,240nm)	Fortemente aderente (≥0,240nm)
C ₁ <i>S. chromogenes</i>	0,000	0,425
E ₁ <i>S. epidermidis</i>	0,000	0,442
E ₂ <i>S. epidermidis</i>	0,000	0,631
E ₃ <i>S. epidermidis</i>	0,000	0,609
E ₄ <i>S. epidermidis</i>	0,000	0,363
E ₅ <i>S. epidermidis</i>	0,000	0,374
E ₆ <i>S. epidermidis</i>	0,000	1,360
E ₇ <i>S. epidermidis</i>	0,000	0,755
E ₈ <i>S. epidermidis</i>	0,000	0,444
E ₉ <i>S. epidermidis</i>	0,000	0,458
E ₁₀ <i>S. epidermidis</i>	0,000	0,397
Ha ₁ <i>S. haemolyticus</i>	0,129	0,000
Ha ₂ <i>S. haemolyticus</i>	0,000	0,399
Ha ₃ <i>S. haemolyticus</i>	0,000	1,070
Ha ₄ <i>S. haemolyticus</i>	0,000	0250
Ho ₁ <i>S. hominis</i>	0,200	0,000
Ho ₂ <i>S. hominis</i>	0,209	0,000
L ₁ <i>S. lugdunensis</i>	0,000	0,425
L ₂ <i>S. lugdunensis</i>	0,000	0,412
Sa ₁ <i>S. saprophyticus</i>	0,000	2,000
Sc ₁ <i>S. schleiferi</i>	0,157	0,000
X ₁ <i>S. xylosus</i>	0,000	1,040
X ₂ <i>S. xylosus</i>	0,000	0,845
W ₁ <i>S. warneri</i>	0,134	0,000
W ₂ <i>S. warneri</i>	0,000	0,511
W ₃ <i>S. warneri</i>	0,000	0,633
W ₄ <i>S. warneri</i>	0,000	0,335

O teste de aderência à placa de poliestireno está ilustrado em Figura 5 (A e B).

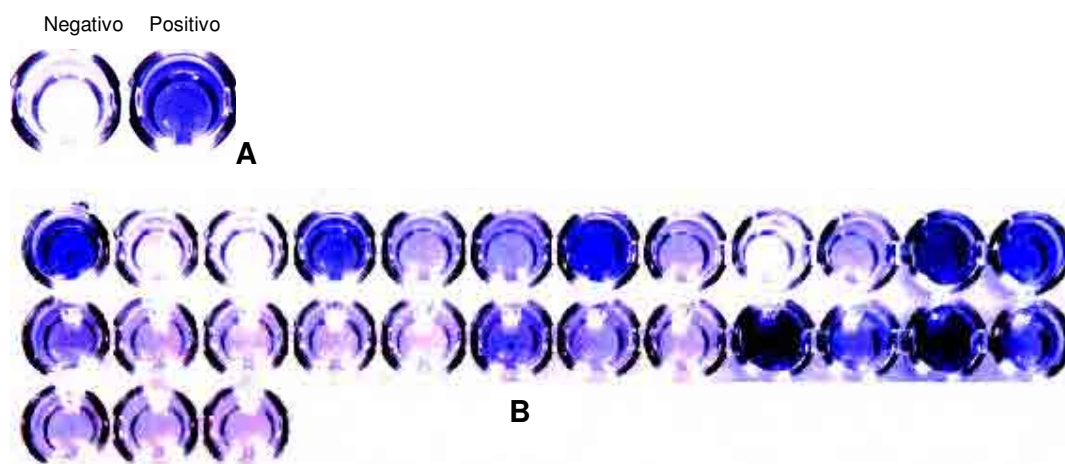


Figura 5 (A e B) – **A**-controle negativo (ATCC 12228 – *S. epidermidis*) e controle positivo (ATCC 35984 - *S.epidermidis*). **B**-Ilustração em placa de poliestireno, fundo em U, da variação da cor azul para as amostras na 1ª fileira: *S. xylosus* (X₁), *S. haemolyticus* (Ha₂), *S. epidermidis* (E₁), *S. xylosus* (X₂), *S. epidermidis* (E₂), *S. warneri* (W₂), *S. haemolyticus* (Ha₃), *S. epidermidis* (E₃-E₇); na 2ª: *S. haemolyticus* (Ha₁), *S. hominis* (Ho₂-Ho₃), *S. warneri* (W₁ e W₃), *S. haemolyticus* (Ha₄), *S. schleiferi* (Sc₁), *S. saprophyticus* (Sa₁), *S. warneri* (W₄), *S. lugdunensis* (L₂), *S. chromogenes* (C₁), *S. epidermidis* (E₈) e na 3ª: *S. epidermidis* (E₁, E₉,E₁₀).

A relação entre as amostras fortemente aderentes e fracamente aderentes está expressa na Tabela 6.

Tabela 6 - Frequência das espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa forte e fracamente aderentes a placa de poliestireno.

Espécies	Forte aderência	Fraca aderência
<i>S. epidermidis</i>	10 (45,45%)	0 (00,00%)
<i>S. haemolyticus</i>	3 (13,64%)	1 (20,00%)
<i>S. warneri</i>	3 (13,63%)	1 (20,00%)
<i>S. lugdunensis</i>	2 (09,10%)	0 (00,00%)
<i>S. hominis</i>	0 (00,00%)	2 (40,00%)
<i>S. xylosus</i>	2 (09,10%)	0 (00,00%)
<i>S. schleiferi</i>	0 (00,00%)	1 (20,00%)
<i>S. chromogenes</i>	1 (04,54%)	0 (00,00%)
<i>S. saprophyticus</i>	1 (04,54%)	0 (00,00%)
TOTAL	22 (100,00%)	5 (100,00%)

4.5 Formação do biofilme pelas amostras de *Staphylococcus* coagulase-negativa sobre superfície abiótica

Das 27 amostras de *Staphylococcus* coagulase-negativa, 24 (88,88%) formaram biofilme e 3 (11,11%) não formaram biofilme. O resultado da formação do biofilme entre as espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa está apresentado na Tabela 7.

Tabela 7 – Formação do biofilme entre as espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa

Microrganismos	Formação de biofilme em segmentos de cateter
C ₁ <i>S. chromogenes</i>	Negativo
E ₁ <i>S. epidermidis</i>	Positivo
E ₂ <i>S. epidermidis</i>	Positivo
E ₃ <i>S. epidermidis</i>	Positivo
E ₄ <i>S. epidermidis</i>	Positivo
E ₅ <i>S. epidermidis</i>	Positivo
E ₆ <i>S. epidermidis</i>	Positivo
E ₇ <i>S. epidermidis</i>	Positivo
E ₈ <i>S. epidermidis</i>	Positivo
E ₉ <i>S. epidermidis</i>	Positivo
E ₁₀ <i>S. epidermidis</i>	Positivo
Ha ₁ <i>S. haemolyticus</i>	Positivo
Ha ₂ <i>S. haemolyticus</i>	Positivo
Ha ₃ <i>S. haemolyticus</i>	Negativo
Ha ₄ <i>S. haemolyticus</i>	Positivo
Ho ₁ <i>S. hominis</i>	Positivo
Ho ₂ <i>S. hominis</i>	Positivo
L ₁ <i>S. lugdunensis</i>	Positivo
L ₂ <i>S. lugdunensis</i>	Positivo
Sa ₁ <i>S. saprophyticus</i>	Positivo
Sc ₁ <i>S. schleiferi</i>	Positivo
X ₁ <i>S. xylosus</i>	Positivo
X ₂ <i>S. xylosus</i>	Positivo
W ₁ <i>S. warneri</i>	Negativo
W ₂ <i>S. warneri</i>	Positivo
W ₃ <i>S. warneri</i>	Positivo
W ₄ <i>S. warneri</i>	Positivo

A frequência das espécies formadoras e não formadoras de biofilme está expressa na Tabela 8.

Tabela 8 - Frequência das espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa formadoras de biofilme.

Espécies	Formação do biofilme	Ausência de biofilme
<i>S. epidermidis</i>	10 (41,67%)	0 (00,00%)
<i>S. haemolyticus</i>	3 (12,50%)	1 (33,34%)
<i>S. warneri</i>	3 (12,50%)	1 (33,33%)
<i>S. lugdunensis</i>	2 (8,33%)	0 (00,00%)
<i>S. hominis</i>	2 (8,33%)	0 (00,00%)
<i>S. xylosus</i>	2 (8,33%)	0 (00,00%)
<i>S. schleiferi</i>	1 (4,17%)	0 (00,00%)
<i>S. chromogenes</i>	0 (0,00%)	1 (33,33%)
<i>S. saprophyticus</i>	1 (4,17%)	0 (00,00%)
TOTAL	24 (100,00%)	3 (100,00%)

As micrografias apresentadas em figuras de número 6-13 referem-se à microscopia eletrônica de varredura.

Pode-se observar o biofilme, formado sobre a superfície abiótica (cateter não usado), após 72 horas de incubação em caldo Mueller Hinton inoculado com as espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa estudadas. O biofilme apresenta o aspecto da matriz de polissacarídeo extracelular em “pseudo” tridimensional.

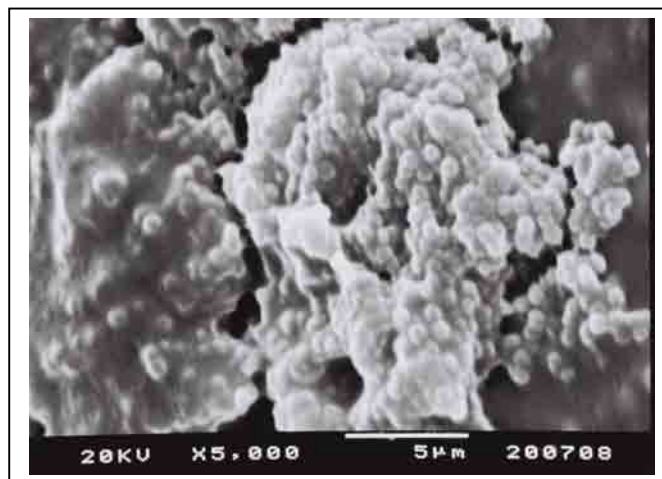


Figura 6 Micrografia eletrônica de varredura (X5000) de biofilme de *S. epidermidis* sobre superfície abiótica (cateter). Notar a presença de massa amorfa envolvendo cocos e formando biofilme (JEOL-JSM, modelo T330A).

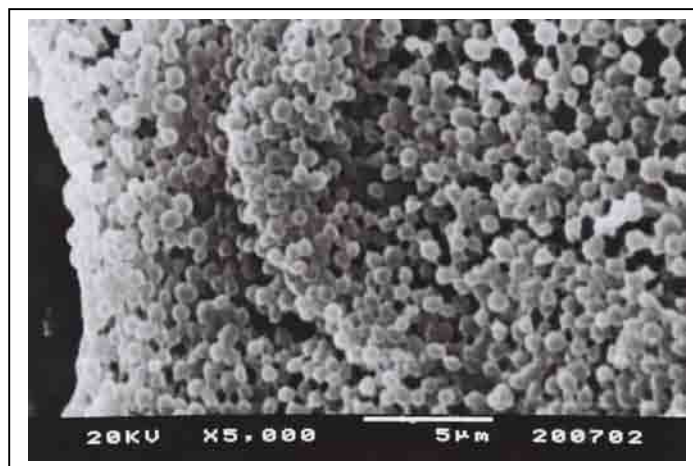


Figura 7 Micrografia eletrônica de varredura (X5000) de biofilme de *S. haemolyticus* sobre superfície abiótica (cateter). Notar a aderência intercelular (JEOL-JSM, modelo T330A).

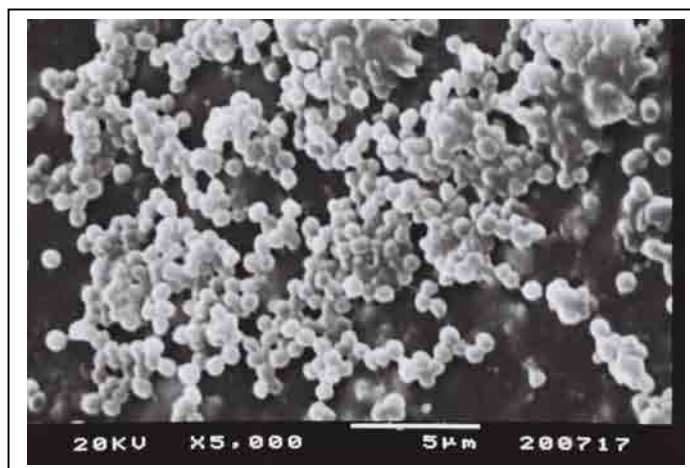


Figura 8 Micrografia eletrônica de varredura (X5000) de biofilme de *S. warneri* sobre superfície abiótica (cateter). Notar aderência intercelular, presença de polissacarídeo extracelular e superfície do cateter (JEOL-JSM, modelo T330A).

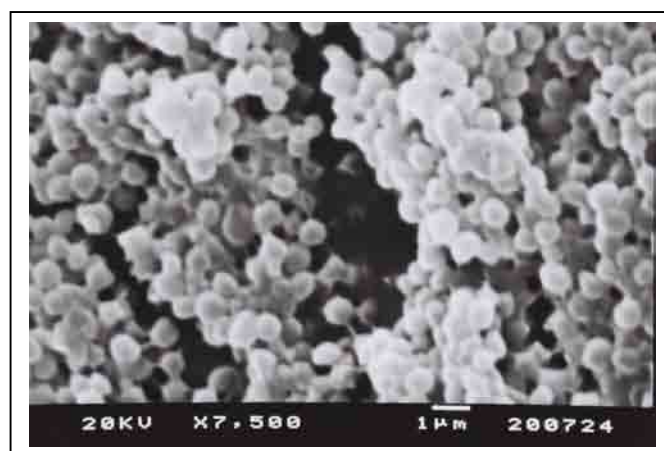


Figura 9 Micrografia eletrônica de varredura (X7500) de biofilme de *S. lugdunensis* sobre superfície abiótica (cateter). Notar aderência intercelular, agrupamento celular e presença de polissacarídeo extracelular (JEOL-JSM, modelo T330A).

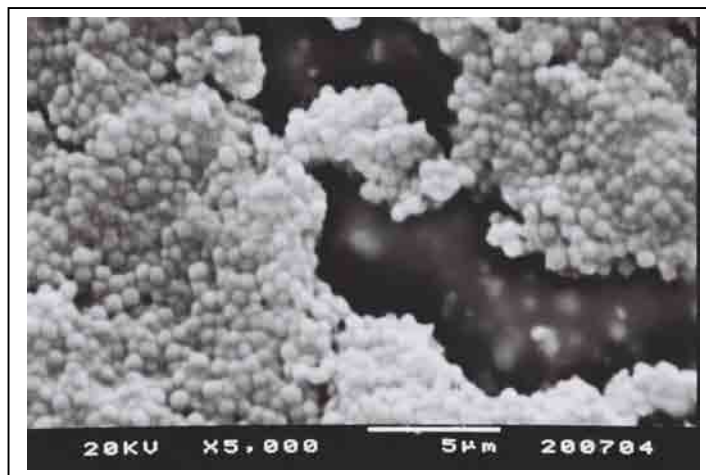


Figura 10 Micrografia eletrônica de varredura (X5000) de biofilme de *S. xylosus* sobre superfície abiótica (cateter). Notar o agrupamento dos cocos envoltos em matriz de polissacarídeo extracelular (JEOL-JSM, modelo T330A).

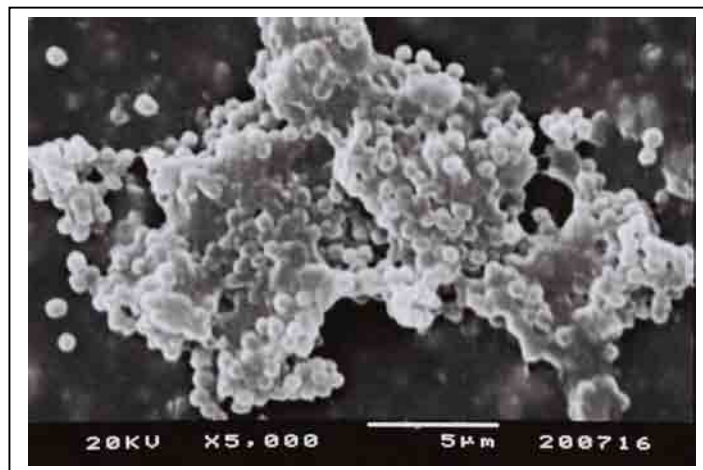


Figura 11 Micrografia eletrônica de varredura (X5000) de biofilme de *S. hominis* sobre superfície abiótica (cateter). Notar a matriz de polissacarídeo extracelular que aparece como substância amorfa (JEOL-JSM, modelo T330A).

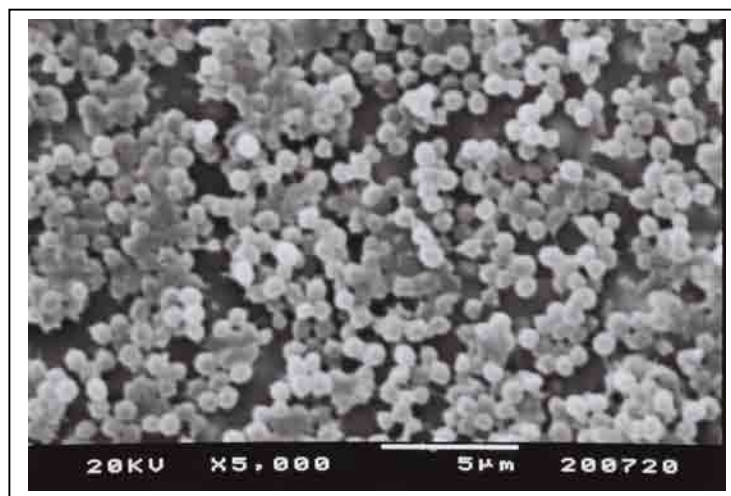


Figura 12 Micrografia eletrônica de varredura (X5000) de biofilme de *S. schleiferi* sobre superfície abiótica (cateter). Notar a aderência intercelular e agrupamentos de cocos inseridos em material amorfo (EOL-JSM, modelo T330A).

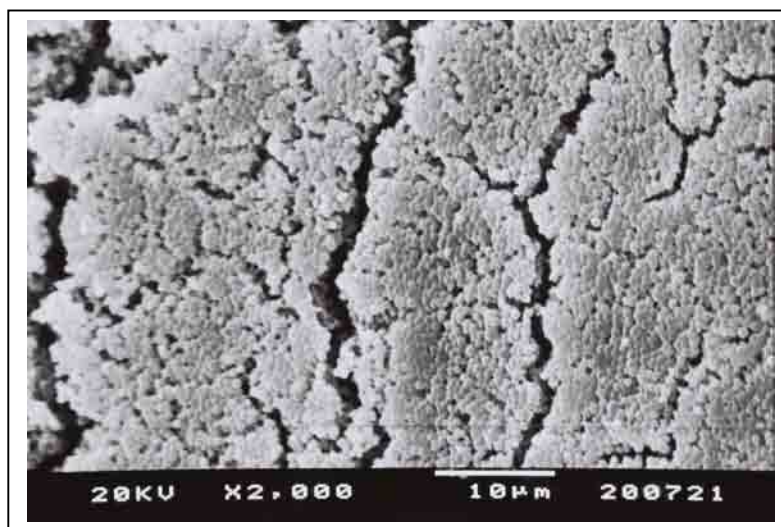


Figura 13 Micrografia eletrônica de varredura (X2000) de biofilme de *S. saprophyticus* sobre superfície abiótica (cateter). Notar o agrupamento de cocos (JEOL-JSM, modelo T330A).

4.6. Detecção dos genes *icaA* e *icaD* determinada por PCR

Os *primers* usados para determinar a presença dos genes *icaA* e *icaD* foram baseados na seqüência do genoma de *S. epidermidis*. Das dez amostras de *S. epidermidis* analisadas, 100% apresentaram os genes *icaA* e *icaD*, Figuras 14-15 (A e B) e Tabelas 9-10. Os mesmos *primers* foram usados para avaliar a amplificação do DNA isolado de outras espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa. Não foram obtidos produtos de amplificação dos genes *icaA* nas amostras de *S. haemolyticus* (amostra Ha₃), *S. saprophyticus* (amostra Sa₁) e *S. schleiferi* (Sc₁). Não foram obtidos os genes *icaD* produtos do PCR para amostras *S. saprophyticus* (amostra Sa₁) e *S. schleiferi* (Sc₁).

A amostra *S. epidermidis* ATCC 35984 (RP62A) produtora de *slime* foi positiva para ambos os genes, fornecendo uma banda de 188-bp para o gene *icaA* e 198-bp para o gene *icaD*. A amostra *S. epidermidis* não produtora de *slime* ATCC 1228 foi negativa para ambos os genes.

Após determinar o tamanho da banda padrão com marcador de peso molecular de 200 pares de base (pb), o sistema de analisar imagens determina os pesos esperados das bandas obtidas por amplificação do DNA extraído de amostras *Staphylococcus* coagulase-negativa. As figuras 14 (A-B) e 15 (A-B) mostram a detecção dos genes *icaA* e *icaD* por PCR.



Figura 14A – Gel analítico PCR para gene *icaA*. Linha 1: marcador de peso molecular de 200pb; Linha 2: DNA de *S.epidermidis* ATCC: 35984 produtor de *slime* banda de 188pb; Linha 3: ausência de banda de amostra de *S.epidermidis* ATCC: 12228 não produtor de *slime* ; Linha 4: banda de 188pb obtido com DNA de amostra de *S.chromogenes* (amostra Ch₁); Linhas 5-14: bandas de 188pb obtido com DNA de amostras de *S.epidermidis* (amostras E₁₋₁₀); Linhas 15-16 banda de 188pb obtido com DNA de amostra de *S.haemolyticus* (amostras Ha₁-Ha₂); Linha 17: ausência de banda de amostra de *S.haemolyticus* (amostra Ha₃); Linha 18: banda de 188pb obtido com DNA de amostra de *S.haemolyticus* (amostra Ha₄).

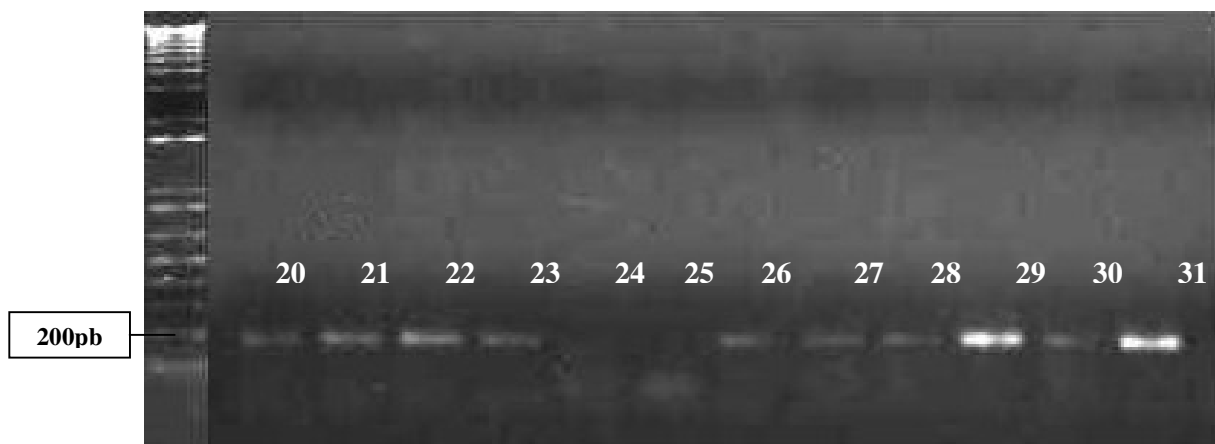


Figura 14B – Gel analítico PCR para gene *icaA*. Linha 19: marcador de peso molecular de 200pb; Linha 20-21: bandas de 188pb obtido com DNA de amostras *S.hominis* (amostras Ho₁ e Ho₂); Linhas 22-23: bandas de 188pb obtido com DNA de amostra de *S.lugdunensis*; Linha 24: ausência de banda de amostra de *S.saprophyticus* (amostra Sa₁); Linha 25: ausência de banda de amostra de *S.schleiferi* (amostra Sc₁); Linhas 26-27: bandas de 188pb obtido com DNA de amostras de *S.xylosum* (amostras X₁-X₂); Linhas 28-31: bandas de 188pb obtido com DNA de amostra de *S.warneri* (amostras W₁-W₄).

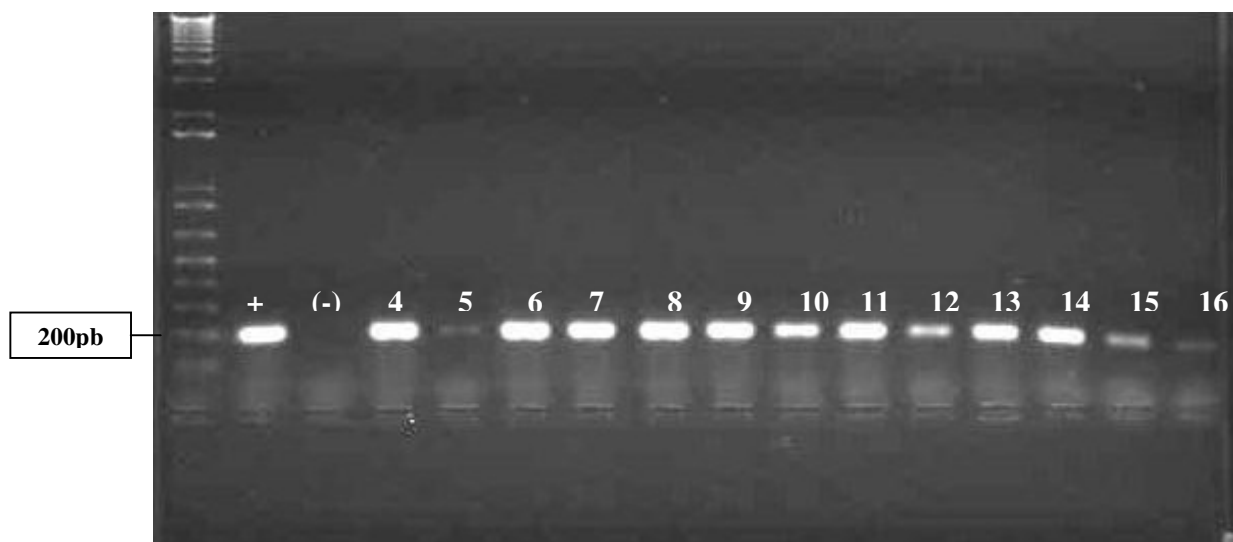


Figura 15A – Gel analítico PCR para gene *icaD*. Linha 1: marcador de peso molecular de 200pb; Linha 2: DNA de *S.epidermidis* ATCC: 35984 produtor de *slime* banda de 198pb; Linha 3: ausência de banda de amostra de *S.epidermidis* ATCC: 12228 não produtor de *slime* ; Linha 4: banda de 198pb obtido com DNA de amostra de *S.chromogenes* (amostra Ch₁); Linha 5-14: bandas de 198pb obtido com DNA de amostra de *S.epidermidis* (amostras E₁-E₁₀); Linhas 15-16 banda de 198pb obtido com DNA de amostra de *S.haemolyticus* (amostras Ha₁-Ha₂).

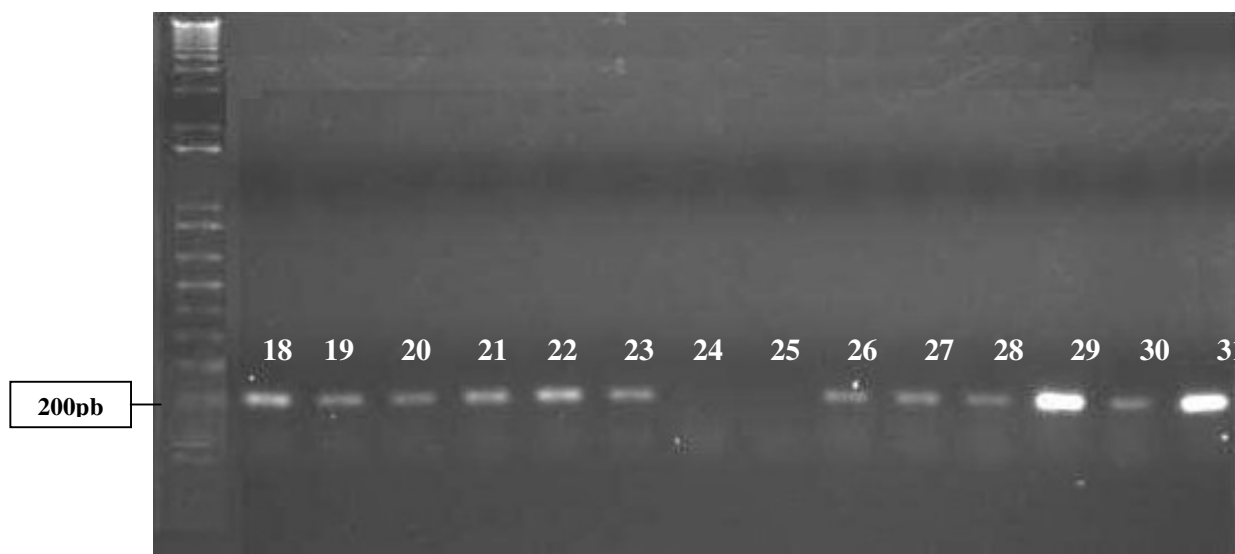


Figura 15B – Gel analítico PCR para gene *icaD*. Linha 17: marcador de peso molecular de 200pb; Linha 18-19: banda de 200pb obtido com DNA de *S.haemolyticus* (amostra Ha₃-Ha₄); Linha 20-21: bandas de 200pb obtido com DNA de *S.hominis* (amostras Ho₁-Ho₂); Linha 22-23: bandas de 200pb obtido com DNA de amostras de *S.lugdunensis* (amostras L₁-L₂); Linha 24: ausência banda de amostra de *S.saprophyticus* (amostra Sa₁); Linha 25: ausência de banda de amostra de *S.schleiferi* (amostra Sc₁); Linhas 26-27: bandas de 200pb obtido com DNA de amostras de *S.xylosus* (amostras X₁-X₂); Linhas 28-31: bandas de 200pb obtido com DNA de amostra de *S.warneri* (amostras W₁-W₄).

Tabela 9 – Presença de genes *icaA* e *icaD* entre as espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa

Microrganismos	Presença dos genes de virulência	
	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>
C ₁ <i>S. chromogenes</i>	Positivo	Positivo
E ₁ <i>S. epidermidis</i>	Positivo	Positivo
E ₂ <i>S. epidermidis</i>	Positivo	Positivo
E ₃ <i>S. epidermidis</i>	Positivo	Positivo
E ₄ <i>S. epidermidis</i>	Positivo	Positivo
E ₅ <i>S. epidermidis</i>	Positivo	Positivo
E ₆ <i>S. epidermidis</i>	Positivo	Positivo
E ₇ <i>S. epidermidis</i>	Positivo	Positivo
E ₈ <i>S. epidermidis</i>	Positivo	Positivo
E ₉ <i>S. epidermidis</i>	Positivo	Positivo
E ₁₀ <i>S. epidermidis</i>	Positivo	Positivo
Ha ₁ <i>S. haemolyticus</i>	Positivo	Positivo
Ha ₂ <i>S. haemolyticus</i>	Positivo	Positivo
Ha ₃ <i>S. haemolyticus</i>	Negativo	Positivo
Ha ₄ <i>S. haemolyticus</i>	Positivo	Positivo
Ho ₁ <i>S. hominis</i>	Positivo	Positivo
Ho ₂ <i>S. hominis</i>	Positivo	Positivo
L ₁ <i>S. lugdunensis</i>	Positivo	Positivo
L ₂ <i>S. lugdunensis</i>	Positivo	Positivo
Sa ₁ <i>S. saprophyticus</i>	Negativo	Negativo
Sc ₁ <i>S. schleiferi</i>	Negativo	Negativo
X ₁ <i>S. xylosus</i>	Positivo	Positivo
X ₂ <i>S. xylosus</i>	Positivo	Positivo
W ₁ <i>S. warneri</i>	Positivo	Positivo
W ₂ <i>S. warneri</i>	Positivo	Positivo
W ₃ <i>S. warneri</i>	Positivo	Positivo
W ₄ <i>S. warneri</i>	Positivo	Positivo

Os produtos de PCR mostram a presença de *icaA* em 24 amostras *Staphylococcus* coagulase-negativa e *icaD* em 25 amostras.

A frequência das espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa que apresentam a presença e não apresentam a presença dos genes *icaA* e *icaD* está mostrada na Tabela 10.

Tabela 10 - Presença dos genes *icaA* e *icaD* entre as espécies *Staphylococcus* coagulase-negativa

Espécies	Presença dos genes	Ausência dos genes
<i>S. epidermidis</i>	10 (50,00%)	0 (00,00%)
<i>S. haemolyticus</i>	3 (15,79%)	1 (25,00%)
<i>S. warneri</i>	4 (21,05%)	0 (00,00%)
<i>S. lugdunensis</i>	0 (00,00%)	0 (00,00%)
<i>S. hominis</i>	0 (00,00%)	0 (00,00%)
<i>S. xylosus</i>	2 (10,53%)	0 (00,00%)
<i>S. schleiferi</i>	0 (00,00%)	1 (25,00%)
<i>S. chromogenes</i>	1 (05,26%)	0 (00,00%)
<i>S. saprophyticus</i>	0 (00,00%)	1 (25,00%)
TOTAL	20 (100,00%)	3 (100,00%)

Comparação entre as provas realizadas Tabela 11

Tabela 11. Comparação de resultados obtidos após estudo fenotípico e genotípico entre as espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa.

Microrganismos	V.Congo	Ader. placa	Biofilme	Oxacilina	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>
C ₁ <i>S. chromogenes</i>	negra	forte	negativo	resistente	positivo	positivo
E ₁ <i>S. epidermidis</i>	negra	forte	positivo	resistente	positivo	positivo
E ₂ <i>S. epidermidis</i>	negra	forte	positivo	sensível	positivo	positivo
E ₃ <i>S. epidermidis</i>	negra	forte	positivo	resistente	positivo	positivo
E ₄ <i>S. epidermidis</i>	negra	forte	positivo	resistente	positivo	positivo
E ₅ <i>S. epidermidis</i>	negra	forte	positivo	resistente	positivo	positivo
E ₆ <i>S. epidermidis</i>	negra	forte	positivo	resistente	positivo	positivo
E7 <i>S. epidermidis</i>	negra	forte	positivo	resistente	positivo	positivo
E8 <i>S. epidermidis</i>	negra	forte	positivo	resistente	positivo	positivo
E9 <i>S. epidermidis</i>	negra	forte	positivo	resistente	positivo	positivo
E10 <i>S. epidermidis</i>	negra	forte	positivo	resistente	positivo	positivo
Ha1 <i>S. haemolyticus</i>	negra	fraco	positivo	sensível	positivo	positivo
Ha2 <i>S. haemolyticus</i>	negra	forte	positivo	resistente	positivo	positivo
Ha3 <i>S. haemolyticus</i>	negra	forte	negativo	resistente	negativo	positivo
Ha4 <i>S. haemolyticus</i>	negra	forte	positivo	resistente	positivo	positivo
Ho1 <i>S. hominis</i>	vermelho	fraco	positivo	sensível	positivo	positivo
Ho2 <i>S. hominis</i>	vermelho	fraco	positivo	sensível	positivo	positivo
L1 <i>S. lugdunensis</i>	vermelho	forte	positivo	sensível	positivo	positivo
L2 <i>S. lugdunensis</i>	vermelho	forte	positivo	resistente	positivo	positivo
Sa1 <i>S. saprophyticus</i>	vermelho	forte	positivo	resistente	negativo	negativo
Sc1 <i>S. schleiferi</i>	vermelho	fraco	positivo	sensível	negativo	negativo
X1 <i>S. xylosus</i>	negra	forte	positivo	resistente	positivo	positivo
X2 <i>S. xylosus</i>	negra	forte	positivo	sensível	positivo	positivo
W1 <i>S. warneri</i>	negra	fraco	negativo	resistente	positivo	positivo
W2 <i>S. warneri</i>	negra	forte	positivo	sensível	positivo	positivo
W3 <i>S. warneri</i>	negra	forte	positivo	resistente	positivo	positivo
W4 <i>S. warneri</i>	negra	forte	positivo	resistente	positivo	positivo

Tabela 12. Distribuição das espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa nas amostras de cateter

Cateter	Espécies isoladas
7	E₁ <i>Staphylococcus epidermidis</i> Ha₂ <i>Staphylococcus haemolyticus</i> X₁ <i>Staphylococcus xylosus</i>
8	X₂ <i>Staphylococcus xylosus</i> E₂ <i>Staphylococcus epidermidis</i>
9	W₂ <i>Staphylococcus warneri</i>
11	Ha₃ <i>Staphylococcus haemolyticus</i>
13	E₃ <i>Staphylococcus epidermidis</i>
14	E₄ <i>Staphylococcus epidermidis</i> E₅ <i>Staphylococcus epidermidis</i> E₆ <i>Staphylococcus epidermidis</i> E₇ <i>Staphylococcus epidermidis</i>
16	L₁ <i>Staphylococcus lugdunensis</i>
19	Ho₁ <i>Staphylococcus hominis</i> Ho₂ <i>Staphylococcus hominis</i>
20	W₁ <i>Staphylococcus warneri</i> W₃ <i>Staphylococcus warneri</i>
22	Ha₄ <i>Staphylococcus haemolyticus</i>
24	Sc₁ <i>Staphylococcus schleiferi</i> Sa₁ <i>Staphylococcus saprophyticus</i>
32	W₄ <i>Staphylococcus warneri</i>
33	L₂ <i>Staphylococcus lugdunensis</i>
40	C₁ <i>Staphylococcus chromogenes</i> E₈ <i>Staphylococcus epidermidis</i>
61	Ha₁ <i>Staphylococcus haemolyticus</i>
64	E₉ <i>Staphylococcus epidermidis</i>
65	E₁₀ <i>Staphylococcus epidermidis</i>

Legenda: C₁ = *Staphylococcus chromogenes*, E₁-E₁₀ *Staphylococcus epidermidis*, Ha₁-Ha₄ *Staphylococcus haemolyticus*, Ho₁-Ho₂ *Staphylococcus hominis*, L₁-L₂ *Staphylococcus lugdunensis*, Sc₁ = *Staphylococcus schleiferi*, Sa₁ = *Staphylococcus saprophyticus*, X₁-X₂ = *Staphylococcus xylosus*, W₁-W₂ = *Staphylococcus warneri*.

4.7. Padrões de resistência dos *Staphylococcus* coagulase-negativa

Os padrões de resistência das espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa a 13 antibióticos mais comumente usados na clínica estão mostrados na Tabela 13.

Tabela 13 - Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das 27 amostras de *Staphylococcus* coagulase-negativa

MICROORGANISMOS	ANTIBIÓTICOS												
	CIP	CLI	CLO	ERI	GEN	LVX	OXA	PEN	RIF	SUT	TEC	TET	VAN
C ₁	R	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	S
E ₁	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S
E ₂	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E ₃	S	R	S	R	R	S	R	R	R	S	S	R	S
E ₄	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
E ₅	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
E ₆	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
E ₇	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
E ₈	R	S	S	R	S	R	R	R	S	R	S	S	S
E ₉	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S
E ₁₀	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S
Ha ₁	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S	R	S
Ha ₂	R	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S
Ha ₃	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
Ha ₄	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S
Ho ₁	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
Ho ₂	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	S
L ₁	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
L ₂	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
Sc ₁	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Sa ₁	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S
X ₁	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S
X ₂	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S
W ₁	S	R	S	R	R	S	R	R	S	R	S	R	S
W ₂	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S
W ₃	S	R	S	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S
W ₄	R	S	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S

Legenda: C₁ = *Staphylococcus chromogenes*, E₁-E₁₀ *Staphylococcus epidermidis*, Ha₁-Ha₄ *Staphylococcus haemolyticus*, Ho₁-Ho₂ *Staphylococcus hominis*, L₁-L₂ *Staphylococcus lugdunensis*, Sc₁ = *Staphylococcus schleiferi*, Sa₁ = *Staphylococcus saprophyticus*, X₁-X₂ = *Staphylococcus xylosus*, W₁-W₂ = *Staphylococcus warneri*; CIP = Ciprofloxacina, CLI = Clindamicina, CLO = Cloranfenicol, ERI = Eritromicina, GEN = Gentamicina, LVX = Levofloxacina, OXA = Oxacilina, PEN = Penicilina, RIF = Rifampicina, SUT = Sulfazotrim, TEC = Teicoplanina, TET = Tetraciclina, VAN = Vancomicina.

Existe uma diferença na sensibilidade das amostras *Staphylococcus* coagulase-negativa. Em 27 amostras analisadas, a frequência de sensibilidade a eritromicina foi verificada em cinco amostras de *Staphylococcus* coagulase-negativa, incluindo: um *S. epidermidis*, dois *S. hominis*, um *S. lugdunensis* e um *S. warneri*; para ciprofloxacina, *S. saprophyticus* e *S. haemolyticus* não demonstraram sensibilidade.

O *S. haemolyticus* apresentou resistência à maioria dos antibióticos estudados, principalmente à penicilina.

Todas as amostras de *Staphylococcus* coagulase-negativa eram sensíveis à vancomicina. A maioria das amostras apresentaram resistência a oxacilina e a múltiplos antibióticos.

Tabela 14 – Distribuição das amostras clínicas em relação aos microrganismos e ao teste de sensibilidade e resistência aos antimicrobianos

Amostras	Microrganismos	Antibióticos												
		CIP	CLI	CLO	ERI	GEN	LVX	OXA	PEN	RIF	SUT	TEC	TET	VAN
7	E ₁	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S
	Ha ₂	R	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S
	X ₁	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S
8	X ₂	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S
	E ₂	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
9	W ₂	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S
11	Ha ₃	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
13	E ₃	S	R	S	R	R	S	R	R	R	S	S	R	S
14	E ₄	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
	E ₅	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
	E ₆	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
	E ₇	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
16	L ₁	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
19	Ho ₁	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
	Ho ₂	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	S
20	W ₁	S	R	S	R	R	S	R	R	S	R	S	R	S
	W ₃	S	R	S	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S
22	Ha ₄	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S
24	Sc ₁	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	Sa ₁	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S
32	W ₄	R	S	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S
33	L ₂	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
40	C ₁	R	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	S
	E ₈	R	S	S	R	S	R	R	R	S	R	S	S	S
61	Ha ₁	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S	R	S
64	E ₉	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S
65	E ₁₀	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S

Legenda: E₁=*S.epidermidis*; Ha₂=*S.haemolyticus*; X₁=*S.xyloso*; X₂=*S.xyloso*; E₂=*S.epidermidis*; W₂=*S.warneri*; Ha₃=*S.haemolyticus*; E₃=*S.epidermidis*; E₄-E₇=*S.epidermidis*; L₁=*S.lugdunensis*; Ho₁-Ho₂=*S.hominis*; W₁,W₃=*S.warneri*; Ha₄=*S.haemolyticus*; Sc₁=*S.schleiferi*; Sa₁=*S.saprophyticus*; W₄=*S.warneri*; L₂=*S.lugdunensis*; C₁=*S.chromogenes*; E₈=*S.epidermidis*; Ha₁=*S.haemolyticus*; E₉=*S.epidermidis*; E₁₀=*S.epidermidis*. CIP=Ciprofloxacina; CLI=Clindamicina; CLO=Cloranfenicol; ERI=Eritromicina; GEN=Gentamicina; LVX=Levofloxacina; OXA=Oxacilina; PEN=Penicilina; RIF=Rifampicina; SUT=Sulfazotrim; TEC=Teicoplanina; TET=Tetraciclina; VAN=Vancomicina.

5. DISCUSSÃO

O hábitat normal dos *Staphylococcus* coagulase-negativa é a pele e mucosas de humanos e animais (Heilmann & Peters, 2000).

Para fins de diagnóstico são separados do *Staphylococcus aureus* pela inabilidade de produzir coagulase livre. Baseados no teste de resistência a novobiocina, os *Staphylococcus* coagulase-negativa foram divididos em dois grupos: novobiocina resistentes: grupo dos *Staphylococcus saprophyticus* (*S. saprophyticus*, *S. conhnii* e *S. xylosus*) e novobiocina sensíveis: grupo dos *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. simulans*, *S. auricularis*, *S. lugdunensis* e *S. schleiferi*). No entanto, a espécie mais isolada de microbiota normal, bem como de amostras clínicas é o *Staphylococcus epidermidis* (Heilmann & Peters, 2000), conforme aconteceu em nosso estudo.

Na presente pesquisa, além do *S. epidermidis* as outras espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa mais isoladas foram: *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. xylosus*, *S. lugdunensis*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. schleiferi* e *S. chromogenes*. Distribuindo as espécies de acordo com a resistência a novobiocina, mostra-se no presente estudo, o seguinte: novobiocina resistentes: *S. saprophyticus* e *S. xylosus*; novobiocina sensíveis: *S. epidermidis*; *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi* e *S. chromogenes*.

A distribuição das espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa isoladas de amostras clínicas (Figura 2), em nosso estudo, foi semelhante ao de outros estudos para *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* (Hussain et al., 2000; Petinaki et al. 2001; Alcaráz et al. 2003). A frequência de isolamento de *S. warneri* de

amostras clínicas, em nosso estudo, diferiu dos dados apresentados por Alcaráz et al. (2003), cujo isolamento foi bem menos freqüente, apenas uma cepa.

Porém, todas estas cepas foram isoladas de várias amostras clínicas com freqüência maior ou menor, como observado por Ieven et al. (1995) e Kleeman et al. (1993). Entretanto, Alcaráz et al. (2003) mostraram que *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus* e *S. saprophyticus* foram mais isolados de amostras clínicas do que de amostras ambientais.

Os *Staphylococcus* coagulase-negativa, particularmente o *Staphylococcus epidermidis* está entre os microrganismos isolados com mais freqüência em Laboratórios de Microbiologia Clínica. Dentre a maioria de infecções atribuídas aos *Staphylococcus* coagulase-negativa, estão as infecções hospitalares. A fonte de infecção é a pele e as mucosas e a porta de entrada, freqüentemente, um cateter intravascular (Heilmann & Peters, 2000).

Os pacientes que usam cateteres ou implantes médicos fabricados com polímeros (polietileno, poliuretano, borracha de silicone) para fins diagnósticos ou procedimentos terapêuticos, estão sujeitos a desenvolverem infecção, sendo o *Staphylococcus epidermidis* o microrganismo mais isolados nestas infecções, principalmente a relacionada ao uso destes dispositivos (Heilmann & Peters, 2000).

Na presente pesquisa, as cepas estudadas eram de origem hospitalar e foram isoladas de cateteres. A maior freqüência de isolamento de espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa, observada, era de *Staphylococcus epidermidis*, dado concordante com a literatura (Heilmann & Peters, 2000; Hussain et al., 2000; Petinaki et al., 2001; Alcaráz et al., 2003; Cunha et al., 2004).

No quadro clínico das infecções causadas pelo *S. epidermidis* não existem sinais fulminantes de infecção e o curso clínico é mais subagudo ou mesmo

crônico e o diagnóstico da infecção é difícil. A terapia para as infecções associadas aos polímeros é problemática, apesar da apropriada antibioticoterapia, comprovada eficácia *in vitro* e boa resposta do hospedeiro; geralmente, não é possível erradicar o foco infeccioso e para interromper a infecção há necessidade da remoção do cateter. O *S. epidermidis* requer a presença de um hospedeiro para causar a infecção e somente nesta circunstância, ou seja, ecossistema humano cutâneo ou mucocutâneo, passa de um organismo comensal ou saprófita para patógeno (Heilmann & Peters, 2000).

As outras espécies dos *Staphylococcus* coagulase-negativa, que não *S. epidermidis*, são comensais de pele humana ou animal e apenas alguns deles tornam-se patogênicos, em virtude dos avanços da ciência na medicina humana e veterinária (Lina et al., 2000).

Os avanços nas técnicas de identificação das espécies de *Staphylococcus* não-*aureus* permitiu identificar as espécies com potencial patogênico em humanos, como: *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi*, *S. warneri*, *S. caprae* ou em animais: *S. intermedius*, *S. hycus* e *S. simulans* (Kloos & Bannerman, 1994).

No presente estudo seguiu-se o esquema de identificação convencional de Kloos & Bannerman (1995) e Ruoff (1999) adaptado por Bernardi et al. (2001) e Kloos & Schleifer (1975) modificado por Bannerman (2003) e sistema de identificação *APIStaph system* (bioMérieux). Na comparação entre os dois métodos convencionais de identificação e o sistema de referência *APIStaph* observou-se que o número de cepas identificadas como *S. epidermidis* foi correta e semelhante nos três métodos. Porém, as identificações não foram concordantes na espécie *S. warneri*. Cunha et al. (2004) em estudo de comparação entre métodos de

identificação (Kloos & Schleifer 1975; Bannerman 2003) e sistema *API Staph* mostraram que a sensibilidade do método para identificar *S. epidermidis* foi de 97,8% de sensibilidade e 100% de especificidade. Para *S. warneri* 52,9% de sensibilidade e 98,8% de especificidade. Para *S. hominis* 75% de sensibilidade e 97,6% especificidade. E para *S. haemolyticus* 62,5% de sensibilidade e 96,7% de especificidade.

Bannerman et al. (1993), relataram baixa acurácia de identificação pelo sistema *API Staph* das espécies *S. warneri* e *S. hominis*.

Cunha et al. (2004) explicaram que este fato pode estar relacionado com a falta de testes complementares como: resistência à novobiocina, crescimento anaeróbio em tioglicolato e produção de hemolisina. Ainda, de acordo com este autor a identificação das espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa é ainda difícil para a maioria dos laboratórios clínicos. O esquema proposto por Kloos e Schleifer, 1975 é o método de referência usado para identificação das espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa, mas, para rotina laboratorial este método é relativamente trabalhoso e requer a utilização de grande número de testes bioquímicos.

Ieven et al. (1995) e De Paulis et al. (2003) relataram que a identificação dos *Staphylococcus* coagulase-negativa é muito importante para a determinação de suas características fisiopatológicas, clínicas e estudos epidemiológicos, uma vez que esses microrganismos são agentes etiológicos de uma série de processos infecciosos.

Nas últimas décadas houve um aumento e emergência de cepas *Staphylococcus* coagulase-negativa resistentes ao antibiótico meticilina, principalmente em hospitais (Jaffe et al., 2000).

A maioria das cepas *Staphylococcus* coagulase-negativa apresentam uma proteína ligada à penicilina, a qual diminui a afinidade pelos antibióticos beta-lactâmicos, constituindo-se em um dos mecanismos de resistência associado com a oxacilina (meticilina). Outros mecanismos de resistência incluem a hiperprodução da enzima beta-lactamase (Alcaráz et al., 2003).

O tratamento de escolha para as infecções causadas pelo *Staphylococcus* coagulase-negativa, com frequência é a vancomicina. Devido à emergência de enterococos resistentes a vancomicina (Bradley et al., 1999) e estafilococos vancomicina-resistente (Hiramatsu, 1998; Sievert et al., 2002), a recomendação é reduzir o uso desta droga (Ferreira et al., 2003).

No entanto, Ferreira et al., (2003) mostraram que é importante o Laboratório Clínico distinguir entre as cepas *Staphylococcus* coagulase-negativa a sensibilidade e a resistência à oxacilina, para o controle do uso desnecessário da vancomicina em hospitais. Alcaráz et al. (2003) relataram que o uso indevido de um antimicrobiano, no caso vancomicina, apresenta complicações terapêuticas, alto custo e pode levar à seleção de mutantes resistentes. Dickinson & Archer (2000) e Raad et al. (1998) estimaram que quase 90% dos estafilococos são penicilina resistentes e a resistência a oxacilina está aumentando.

Dickinson & Archer (2000) relataram que a resistência a oxacilina envolve resistência cruzada com todos os outros antibióticos beta-lactâmicos.

Na presente pesquisa, os dados obtidos usando o teste fenotípico para a detecção da resistência a oxacilina estão apresentados na Tabela 1 e 2. As cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativa foram avaliadas pelo método de disco difusão e os dados mostraram que 70,37% das cepas foram resistentes a oxacilina. Os resultados são concordantes com aqueles obtidos por outros estudiosos (Ferreira

et al., 2002; Louie et al., 2001). Dickema et al. (2001) citaram que, mais de 70% dos *Staphylococcus* coagulase-negativa no mundo são resistentes a oxacilina e as cepas hospitalares tornaram-se resistentes a vários outros agentes antimicrobianos. Ferreira et al. (2003) observaram que os dados nacionais são escassos. Sader et al. (2001) relataram uma frequência de 80% de resistência entre os *Staphylococcus* coagulase-negativa envolvidos nas infecções de corrente sanguínea. No estudo de Ferreira et al. (2003) encontraram frequência de resistência a oxacilina de 64% entre os *Staphylococcus* coagulase-negativa isolados de diferentes amostras clínicas.

Christensen et al. (1982) e Peters et al. (1982) relataram que a maioria das espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa isoladas de cateteres ou de próteses produzem grande quantidade de uma substância mucóide extracelular ou *slime*, a qual não era detectada em meios de cultura utilizados na rotina em laboratório.

Christensen et al. (1987) relataram que muitas espécies de bactérias causadoras de doenças apresentaram espontaneamente, variação fenotípica durante a colonização de uma superfície caracterizando sua virulência. Estes pesquisadores, encontraram uma associação entre produção de *slime*, entre cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativa que colonizam cateteres e, a patogênese de infecção por um corpo estranho.

Alcaráz et al., (2003) e Barcs et al. (1989) propuseram que a habilidade de produzir o *slime* extracelular pode ser considerada marcador de patogenicidade, associado com a virulência dos *Staphylococcus* coagulase-negativa. Muitas cepas *Staphylococcus* coagulase-negativa formam um aderente filme bacteriano, o *slime*, cuja formação funciona como um fator de virulência. Afirma-se que este é o mecanismo pelo qual a bactéria adere e coloniza as próteses.

Freeman et al. (1989) propuseram o ágar Vermelho Congo, como método alternativo para detectar a produção de *slime* em *Staphylococcus* coagulase-negativa.

No presente estudo foi usado o ágar Vermelho Congo e a produção de *slime* foi detectada em 77,78% das cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativa (Tabelas 4 e 5). Este meio de cultura permite verificar as modificações fenotípicas das colônias dos *Staphylococcus* coagulase-negativa, as quais são categorizadas pelas cores negra e vermelha. As colônias produtoras de *slime* apresentam cor negra e as não produtoras cor vermelha.

Em relação à distribuição das cepas produtoras de *slime* de amostras clínicas, os resultados obtidos no presente estudo são semelhantes àqueles relatados por Galdbart et al. (2000); Rupp & Archer (1994), os quais notaram que o *S. epidermidis* coloniza os cateteres. Mostra também que o *slime* foi detectado em espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa, particularmente em *Staphylococcus epidermidis*. Alcaráz et al. (2003) relataram que a produção de *slime* é uma característica das cepas hospitalares *Staphylococcus* coagulase-negativa patogênicas.

Em nosso estudo a origem das cepas era de ambiente hospitalar e isoladas de cateteres. Para detectar a habilidade destas cepas de produzir *slime* foram usados dois métodos: qualitativo e quantitativo.

Stepanovic et al. (2000) notaram que o teste de aderência em placas é um dos métodos usados com freqüência para quantificar a formação do biofilme produzido pelos *Staphylococcus* coagulase-negativa, além de funcionar como um indicador de patogenicidade.

Os dados obtidos, na presente pesquisa, mostraram que ambos os métodos detectaram *slime* em todas as cepas *Staphylococcus* coagulase-negativa (Tabelas 3 a 6), com exceção para as espécies *S. hominis* e *S. schleiferi* os quais em ágar Vermelho Congo não demonstraram produção de *slime* e pelo método quantitativo detectou-se esta produção. Estudos anteriores de Barcs et al. (1989) mostraram que existe uma alta coincidência na detecção de *slime*, em *Staphylococcus* coagulase-negativa, usando métodos quantitativos e qualitativos. Os nossos resultados são consistentes com Alcaráz et al. (2003), os quais detectaram a produção de *slime* em algumas cepas por um e/ou por outro método.

No presente estudo a análise da capacidade de aderência das diferentes espécies de *Staphylococcus* mostrou moderado grau de aderência do *S. haemolyticus* (cepa Ha1), *S. hominis* (cepas Ho1 e Ho2), *S. schleiferi* (Sc1) e *S. warneri* (W1). Os dados apresentados para *S. haemolyticus* são consistentes com os resultados obtidos por Stepanovic et al. (2000), os quais mostraram variados graus de aderência (fraca, moderada e forte) para essa espécie de *Staphylococcus*.

A Tabela 2 mostra a alta resistência a oxacilina entre as cepas *Staphylococcus* coagulase-negativa e também mostra que cepas produtoras de *slime* são resistentes a oxacilina, com exceção das cepas *S. epidermidis* (E2), *S. hominis* (Ho1 e Ho2), *S. haemolyticus* (Ha1), *S. lugdunensis* (L1), *S. schleiferi* (Sc1), *S. xylosus* (X2) e *S. warneri* (W2). As 19 cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativa resistentes a oxacilina e produtoras de *slime* foram isoladas de cateteres removidos de pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva. Arciola et al. (2002) relataram que a produção de *slime* esta associada com a reduzida sensibilidade aos antimicrobianos.

Mohan et al. (2002) estudaram 192 cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativa quanto à resistência aos antimicrobianos e observaram que contra 15 antibióticos mais usados as cepas mostraram multidroga-resistência com mais de 90% de resistência à penicilina, mais de 50% a cefalexina e ciprofloxacina e mais de 20% a meticilina. Os autores destacaram a importância da identificação das espécies e do teste de sensibilidade aos antibióticos para os *Staphylococcus* coagulase-negativa de amostras clínicas.

A presente pesquisa mostrou que em relação a resistência aos antimicrobianos, 19 cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativa (70,37%) foram resistentes à oxacilina e 24 cepas resistentes à penicilina. Barberis et al. (2001) consideraram as cepas oxacilina resistentes, também resistentes à penicilina e ampicilina. De acordo com CLSI (2005) os estafilococos penicilina-sensíveis são também sensíveis para outras penicilinas, cefalotinas e carbapenens com uso aprovado pelo FDA para as infecções estafilocócicas.

Observou-se neste estudo, a presença de amostras resistentes à penicilina e sensíveis a oxacilina (Tabela 13 e 14). O documento do CLSI (2005) relata que estas cepas são resistentes à penicilina penicilinase-lábil, mas sensíveis a outras penicilinas penicilinase-estável, beta-lactâmicos e beta-lactâmicos associados com inibidores de beta-lactamase, cefalotinas e carbapenens.

Adicionalmente, o documento CLSI (2005) cita que *Staphylococcus* spp. resistentes a oxacilina são resistentes a todos antibióticos beta-lactâmicos atualmente disponíveis. Desta forma, a sensibilidade ou resistência ao grande número de antibióticos beta-lactâmicos pode ser deduzida testando apenas penicilina e oxacilina. O teste de rotina para outras penicilinas, associações dos inibidores de beta-lactamase, cefalosporinas e carbapenens, não é recomendado.

Na presente pesquisa as cepas *Staphylococcus* coagulase-negativa resistentes aos antibióticos da classe dos Macrolídeos (eritromicina), Lincosamidas (clindamicina) foram 22 (81,48%) resistentes à eritromicina e 18 (66,66%) à clindamicina conforme é mostrado na Tabela 14. Os dados obtidos são consistentes com estudos de Barberis et al. (2001), que observaram que as cepas oxacilina resistentes eram freqüentemente resistentes a vários agentes antimicrobianos, principalmente, eritromicina e clindamicina. Em nosso estudo a porcentagem de resistência a oxacilina no Brasil é comparável aos obtidos por Del'Alamo et al. (1999).

Fiebelkorn et al. (2003) e Jorgensen et al. (2004) relataram que a resistência aos macrolídeos em estafilococos pode ser devido à modificação do alvo ribossomal e está associada com o fenótipo de resistência macrolideo-lincosamida-estreptograminaB. A resistência pode ser constitutiva ou induzida após a exposição ao macrolídeo. Baixos níveis de eritromicina são os mais efetivos indutores da resistência a clindamicina.

A aderência bacteriana é considerada um fator de virulência, o qual contribui com as infecções associadas a cateteres e outros dispositivos (Arciola et al., 2001).

François et al. (1996), sugeriram que a interação da bactéria com biomateriais desempenham importante papel no progresso de severas infecções hospitalares.

Peters et al. (1982), Christensen et al. (1993), e Arciola et al. (2001), notaram que espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa tem habilidade de colonizar materiais artificiais, devido a produção de polissacarídeos extracelulares (*slime*) e formar biofilme.

Observou-se nesta pesquisa que a habilidade de formar biofilme entre as diversas espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa foi demonstrada por microscopia eletrônica de varredura (Figuras 6 a 13). Dados consistentes com Peters et al. (1982), os quais usando microscopia eletrônica de varredura mostraram que a aderência dos estafilococos a superfície de cateteres foi seguida de uma proliferação própria e de produção de *slime*, material que cobre a colônia bacteriana. Christensen et al. (1993), colocaram como hipótese que a habilidade do *S. epidermidis* de aderir e colonizar um corpo estranho é muito importante na patogênese da infecção de um corpo estranho. Os resultados de Christensen, em relação à importância na produção de *slime* em infecções por *S. epidermidis* ou outras cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativa, confirmam os dados obtidos neste estudo. A importância clínica das cepas produtoras de *slime* é a facilidade que elas têm de colonizar cateteres intravenosos e produzir infecção da corrente sanguínea.

Peters et al. (1982) notaram que o passo mais importante na patogênese das infecções associadas a corpos estranhos causadas pelo *Staphylococcus epidermidis* ou outras espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa é a colonização da superfície do polímero formando agrupamentos celulares em multicamadas, os quais estão embutidos em um material extracelular amorfo.

Na presente pesquisa, observou-se que os biofilmes formados pelas espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa sobre a superfície do cateter, apresentaram a mesma característica acima descrita, ou seja, agrupamento celular envolto em substância amorfa, a qual é mais evidente nas eletromicrografias que mostram o *S. epidermidis*, *S. xylosus* e *S. hominis* (Figuras 6, 10 e 11).

Hussain et al. (1993) relataram que infecção devido a presença de cateter ocorre também pela inoculação de poucas bactérias da pele do paciente durante o procedimento de inserção do cateter. A bactéria colonizante junto com o material extracelular, o qual é principalmente composto de ácido teicóico da parede celular da bactéria e produtos do hospedeiro são referidos como biofilme.

Peters et al. (1981) usando microscopia eletrônica de varredura demonstraram a presença de biofilme aderente sobre cateter intravascular removido de paciente.

Vuong & Otto (2002) relataram que a formação de biofilme é considerado o principal fator de virulência para infecções estafilocócicas.

Heilman & Peters (2000) mostraram que a formação do biofilme sobre superfície de cateteres é realizado em dois passos: uma aderência rápida da bactéria à superfície, seguida de uma fase mais prolongada que envolve a multiplicação bacteriana e aderência intercelular. Atualmente, a formação do biofilme tem sido estudada por meio de mecanismos moleculares. Vários fatores estão envolvidos na aderência bacteriana inicial: forças físico-químicas, hidrofobicidade e proteínas de superfície celular.

Muller et al. (1993) relataram que na fase de proliferação celular, acúmulo de bactérias formando agrupamentos, além de proteína, também está associada com a aderência inicial, uma estrutura polissacarídica, ou seja, um polissacarídeo capsular/adesina (PS/A) e produção de *slime*.

Heilmann & Peters (2000) relataram que após a aderência inicial à superfície do cateter, a bactéria prolifera e acumula-se agrupada em multicamadas. A formação de multicamadas requer a aderência intercelular, realizada por uma

adesina polissacarídica intercelular (PIA-polysaccharide intercellular adhesin). De acordo com Mack et al. (1996) PIA representa uma única estrutura polissacarídica.

Arciola et al. (2002) descreveram que a síntese do *slime* é controlado por um operon *ica* e que a ativação deste operon é o alvo da síntese da adesina polissacarídica intercelular-PIA

Fey et al. (1998) mostraram que PIA representa um importante fator de patogenicidade e funciona como mediador da reação de hemaglutinação. A hemaglutinina do *S. epidermidis* está associada com a produção de biofilme e estrutura do polissacarídeo.

O'Gara & Humphreys (2001) descreveram que a produção do PIA, que representa a chave do fator de virulência nos *Staphylococcus* coagulase-negativa, está associado a um dispositivo de "on↔off" ou fase de variação, empregado por muitas espécies bacterianas.

Heilmann et al. (1997) relataram que os genes (*icaABC*) que intervêm o agrupamento celular e a síntese do PIA foram clonados e seqüenciados. Mais tarde, o gene *icaD* localizado entre *icaA* e *icaB*, também foi identificado. O gene *icaA* carrega a N-acetilglicosaminatransferase, e sozinha exibe baixa atividade de transferase. A co-expressão de *icaA* junto com *icaD* aumenta a atividade e síntese dos oligômeros N-acetilglicosamina.

Arciola et al. (2002) mostraram que técnicas moleculares para identificação dos genes *ica*, que codificam a síntese do *slime*, representa uma ferramenta muito importante para uma identificação acurada de cepas virulentas formadoras de *slime*.

Neste estudo a presença dos genes *icaA* e *icaD* responsáveis pela síntese do *slime* foi investigada em 2 cepas de referência e 27 cepas isoladas de cateter pelo método PCR.

Ziebuhr et al. (1997) demonstraram que existe uma forte correlação entre a formação de biofilme e presença do gene de agrupamento *ica*.

Vuong & Otto (2002) observaram em seus resultados que o gene *ica* está presente em amostras relacionadas a infecções e que cepas saprófitas não expressam estes genes.

No nosso estudo, a presença dos genes *icaA* e *icaD* foi demonstrada por PCR em: *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. xylosus* e *S. chromogenes*, exceção para as cepas *S. saprophyticus* e *S. schleiferi*, todas provenientes de cateter.

Vuong et al. (2003) relataram que o principal mecanismo de virulência entre os *Staphylococcus* coagulase-negativa é a formação do biofilme.

Otto (2004) relatou que o potencial de patogenicidade dos *Staphylococcus* coagulase-negativa deve-se principalmente a sua capacidade de formar biofilmes sobre implantes médicos. Em biofilme, as bactérias são protegidas contra antibióticos e ataques do sistema imune. A formação do biofilme é o fator de virulência dos *Staphylococcus* coagulase-negativa mais estudado e compreende a aderência à superfície do cateter e o agrupamento celular.

Götz (2002) demonstrou que os *Staphylococcus* spp. formam biofilme sobre cateteres após uma colonização primária seguida pela aderência e agrupamento intercelular. O autor acredita que vários fatores estão envolvidos na aderência primária, a qual depende da interação físico-química da superfície celular com a superfície abiótica. De acordo com Heilmann et al. (1997) o fator mais

importante e mais estudado e que tem influência na aderência primária do *S. epidermidis* é a autolisina AtlE, na qual a seqüência repetitiva, presumivelmente, interage com a superfície abiótica pela interação hidrofóbica.

Mack et al. (2000) mostraram que a segunda fase da formação do biofilme requer a adesina polissacarídica intercelular (PIA), um homopolímero parcialmente desacetilado com resíduo N-acetilglicosamina ligado pela ponte 1-6 beta-glicosídeo, o qual é produzido pelo locus do gene *ica*.

Na presente pesquisa detectou-se *Staphylococcus* coagulase-negativa formadores de biofilme resistentes a mais de seis antibióticos, os quais foram considerados multirresistentes. Vuong & Otto (2002) relataram que a formação de biofilme tem sido considerado o fator de patogenicidade mais importante entre os *Staphylococcus* coagulase-negativa, principalmente o *S. epidermidis*.

Neste estudo destacou-se a importância da identificação correta das espécies *Staphylococcus* coagulase-negativa, os fatores de virulência envolvidos em cepas hospitalares e a resistência aos antimicrobianos. Outras metodologias para a avaliação dos fatores de patogenicidade destas espécies estão sendo estudados, bem como técnicas moleculares mais sensíveis estão sendo empregadas para melhor compreender os mecanismos pelos quais estes microrganismos tornam-se patogênicos.

6 - CONCLUSÕES

1) A avaliação qualitativa da produção de *slime* por cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativa em ágar vermelho Congo, mostrou cepas produtoras e não produtoras de *slime*. Todas as cepas de *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. xylosus* e *S. warneri* eram cepas produtoras de *slime*.

1a) Na avaliação quantitativa da produção de *slime* por cepas *Staphylococcus* coagulase-negativa em placas de poliestireno foram verificadas cepas fraca e fortemente aderentes. As cepas que apresentaram aderência fraca foram: *S. haemolyticus* (Ha₁), *S. hominis* (Ho₁ e Ho₂), *S. schleiferi* e *S. warneri* (W₁). As cepas fortemente aderentes foram: *S. epidermidis* (E₁-E₁₀), *S. haemolyticus* (Ha₂-Ha₄), *S. lugdunensis* (L₁-L₂), *S. saprophyticus*, *S. xylosus* (X₁-X₂) e *S. warneri* (W₂-W₄).

2) A formação do biofilme (agrupamento de cocos envoltos em *slime*) sobre a superfície do cateter foi demonstrada por microscopia eletrônica de varredura para a maioria das cepas *Staphylococcus* coagulase-negativa exceção para *S. chromogenes* (C₁), *S. haemolyticus* (Ha₃) e *S. warneri* (W₁).

3) A maioria das espécies *Staphylococcus* coagulase-negativa mostraram que houve associação entre a produção de polissacarídeo extracelular (*slime*), origem das cepas e reduzida sensibilidade aos antimicrobianos, sugerindo o potencial patogênico no ambiente hospitalar.

4) A maioria das cepas *Staphylococcus* coagulase-negativa eram oxacilina resistentes e estavam associadas à produção de polissacarídeos extracelulares (*slime*).

5) A reação PCR usada para detectar os genes de aderência intercelular (*icaA* e *icaD*) em cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativa mostrou a presença dos genes *icaA* e *icaD* em 100% dos isolados com exceção para *S. saprophyticus* e *S. schleiferi*.

5a) Uma cepa de *S. haemolyticus* e uma de *S. warneri* não apresentaram o gene *icaA*, mas o gene *icaD*.

7-REFERÊNCIAS

ALCARÁZ, L.E.; SATORRES, S.E.; LUCERO, R.M.; CENTORBI, O.N.P. Species identification, slime production and oxacillin susceptibility in coagulase-negative staphylococci isolated from nosocomial specimens. **Braz. J. Microbiol.**, v. 34, p. 45-51, 2003.

ALTOPARLAK, U.; KADANALI, A.; CELEBI, S. Slime factor positivity in coagulase negative staphylococci isolated from nasal samples of hemodialysis patients. **Int. J. Clin. Pract.**, v. 58, p. 1112-1114, 2004.

AMMENDOLIA, M.G.; DI ROSA, R.; MONTANARO, L.; ARCIOLA, C.R.; BALDASSARI, L. Slime production and expression of the slime-associated antigen by staphylococcal clinical isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 3235-3238, 1999.

AN, Y.H.; FRIEDMANN, R.J. Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. **J. Microb. Meth.**, v. 30, p. 141-152, 1997.

ARCIOLA, C.R.; BALDASSARI, L.; MONTANARO, L. Presence of *icaA* and *icaD* and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 2151-2156, 2001.

ARCIOLA, C.R.; CAMPOCCIA, D.; GAMBERINI, S.; CERNELLATI, M.; DONATI, E.; MONTANARO, L. Detection of slime production by means of an optimized Congo red

agar plate based on a colorimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus. **Biomaterials**, v. 23, p. 4233-4239, 2002.

ARMON, R.; ARBEL, T.; GREEN, M. A quantitative and qualitative study of biofilm disinfection on glass, metal and PVC surfaces by chlorine, bromine and bromochloro-5, 5 dimethylhydanton (BCDMH). **Wat. Sci. Tech.**, v. 38, p. 175-179, 1998

BADDOUR, L.M.; BARKER, L.P.; CHRISTENSEN, G.D.; PARISI, J.T.; SIMPSON, W.A. Phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* in infection of transvenous endocardial pacemaker electrodes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, p. 676-679, 1990.

BADDOUR, L.M.; CHRISTENSEN, G.D.; SIMPSON, W.A.; BEACHEY, E.H. Adherencia microbiana. In: MADEL/DOUGLAS/BENNETT **Enfermidades Infecciosas Princípios e Práticas**. 3. ed. Rio de Janeiro: MEDSI Ed. Médica e Científica, 1991. cap. 2, p. 10-27.

BADDOUR, L.M.; SMALLEY, D.L.; KRAUS, A.P.; LOWOREAUX, W.J.; CHRISTENSEN, G.D. Comparison of microbiologic characteristics of pathogenic and saprophytic coagulase-negative staphylococci from patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 5, p. 197-205, 1986.

BALDASSARI, L.; DONELLI, G.; GELOSIA, A.; SIMPSON, W.A.; CHRISTENSEN, G.D. Expression of slime interferes with in vitro detection of host protein receptors of *Staphylococcus epidermidis*. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 1522-1526, 1997.

BALDASSARI, L.; DONELLI, G.; GELOSIA, A.; VOGLINO, M.C.; SIMPSON, W. A.; CHRISTENSEN, G.D. Purification and characterization of the staphylococcal slime-associated antigen and its occurrence among *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 3410-3415, 1996.

BANDYK, D.F.; BERNI, G.A.; THIELE B.L.; TOWNE, J.B. Aortofemoral graft infection due to *Staphylococcus epidermidis*. **Arch. Surg.**, v. 119, p. 102-108, 1984.

BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus, Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; PFALLER, M.A.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. 8th. ed. Washington: ASM Press, 2003, p. 384-404.

BANNERMAN, T.L.; KLEEMAN, K.T.; KLOOS, W.E. Evaluation of the Vitek systems gram-positive identification card for species identification of coagulase-negative staphylococci. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, p. 1322-1325, 1993.

BARBERIS, I.L.; PÁJARO, M.C.; GODINO, S.D.; PASCUAL, L.; DANIELE, M.D. Antimicrobial sensitivity and adherence study in strains of coagulase-negative *Staphylococcus* spp. **Rev. Latin. Microbiol.**, v. 43, p. 109-113, 2001.

BARCS, I.; VALVINAGY, T.; PANOVICS, J. Clinical occurrence and virulence testing of coagulase-negative staphylococci. **Acta Microbiol. Hung.**, v. 66, p.415-424, 1989.

BARTHELSON, R.; HOPKINS, C.; MOBASSERI, A. Quantitation of bacterial adherence by image analysis. **J. Microbiol. Meth.**, v. 38, p. 17-23, 1999.

BERNARDI, A.C.A; PIZZOLITTO, E.L.; PIZZOLITTO, A.C. Identificação de cocos aeróbios Gram-positivos, catalase positiva com implicação em processos infecciosos. **Rev. Ciênc. Farm.**, v. 22, p. 223-238, 2001.

BLACK, J.G. Interações hospedeiro-micróbio-relações hospedeiro micróbio e processos mórbidos. **Microbiologia Fundamentos e Perspectivas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2002. cap. 14, p. 348-369.

BRADLEY, S.J.; WILSON, A.L.; ALLEN, M.C.; SHER, H.A.; GOLDSTONE, A.H.; SCOTT, G.M. The control of hyperendemic glycopeptide-resistant *Enterococcus* spp. on a hematology unit by changing antibiotic usage. **J. Antimicrob. Chemoter.**, v. 43 p. 261-266, 1999.

BROOKS, G.F.; BUTEL, J.S.; MORSE, S.A. Patogenia da infecção bacteriana. In: Jawetz, Melnick & Adelberg. **Microbiologia médica**. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. cap.9, p. 108-116.

BUSTANJI, Y.; ARCIOLA, C.R.; CONTI, M.; MANDELLO, E.; MONTANARO, L.; SAMORI, B. Dynamics of the interaction between a fibronectina molecule and a living bacterium under mechanical force. **PNAS**, v. 100, p. 13292-13297, 2003.

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

CARLÉN, A.; NIKDEL, K.; WENNERBERG, A.; HOLMBERG, K.; OLSSON, J. Surface characteristics and in vitro biofilm formation on glass ionomer and composite resin. **Biomaterials**, v. 22, p. 481-487, 2001.

CHEESBOUGER, J.S.; FINCH, R.G.; BURDEN, R.P. A prospective study of the mechanisms of infection associated with hemodialysis catheters. **J. Infect. Dis.**, v. 154, p. 579-589, 1986.

CHHATWAL, G.S.; JENKINSON, H.F. Anchorless adhesions and invasions of Gram-positive bacteria: a new class of virulence factors. **Trends Microbiol.**, v. 10, p. 205-208, 2002.

CHOO, M.H.; HOLMES, D.R.; GERSH, B.J.; MALONEY, J.D.; MEREDITH, J.; PLUTH, J.R.; TRUSTY, J. Permanent pacemakers infection: characterization and management. **Am. J. Cardiol.**, v. 48, p. 559-564, 1981.

CHRISTENSEN, B.E. The role of extracellular polysaccharides in biofilms. **J. Biotech.**, v. 10, p. 181-202, 1989

CHRISTENSEN, G.D.; BADDOUR, L.M.; SIMPSON, W. A. Phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* slime production in vitro and in vivo. **Infect. Immun.**, v. 55, p. 2870-2877, 1987.

CHRISTENSEN, G.D.; BALDASSARI, L.; SIMPSON, W.A. Colonization of medical devices by coagulase-negative staphylococci. In: BISNO, A.L.; WALDVOGEL, F.A. **Infection associated with indwelling medical devices**. 2nd. ed. Washington: ASM Press, 1994. p. 45-78.

CHRISTENSEN, G.D.; SIMPSON, W.A.; BISNO, A.L.; BEACHEY, E.H. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. **Infect Immun.**, v. 37, p. 318-326, 1982.

CHRISTENSEN, G.D.; SIMPSON, W.A.; BISNO, A.L.; BEACHEY, E.H. Experimental foreign body infections in mice challenged with slime producing *Staphylococcus epidermidis*. **Infect. Immunol.**, v. 38, p. 407-419, 1993.

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

CLERI, D.J.; CORRADO M.L.; SELIGMAN, S.J. Quantitative culture of intravenous catheters and other intravascular inserts. **J. Infect. Dis.**, v. 141, p. 781-786, 1980.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – ninth Edition, M2-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania, 2005.

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. Bacteriol.**, v. 184, p. 4400-4408, 2002.

CORDERO, J.; MUNUERA, L.; FOLGUEIRA, M.D. The influence of the chemical composition and surface of the implant on infection. **Injury**, v. 27, p. 34-59, 1996.

COSTA, S.F.; MICELI, M.H.; ANAISSIE, E.J. Mucosa or skin as source of coagulase-negative staphylococcal bacteremia? **Lancet Infect. Dis.**, v. 4, p. 278-286, 2004.

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z. Microbial biofilms. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 49, p. 711-745, 1995.

COSTERTON, W.; VEEH, R.; SHIRTLIFF; PASMORE, M.; POST, C.; EHRLICH, G. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. **J. Clin. Invest.**, v. 112, p. 1466-1477, 2003.

CRAMTON, S.E.; ULRICH, M.; GÖTZ, F.; DÖRING, G. Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 4079-4085, 2001.

CUNHA, M.L.R.S.; SINZATO, Y.K.; SILVEIRA, L.V.A. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative staphylococci. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 855-860, 2004.

DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiol. Molec. Biol. Rev.**, v. 64, p. 847-867, 2000.

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

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

DICKEMA, D.J.; PFALLER, M.A.; SCHIMITZ, F.J.; SMAYEVSKY, J.; BELL, J.; JONES, R.N.; BEACH, M. 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, p. 114-132, 2001.

DICKINSON, T.M.; ARCHER, G.L. Phenotypic expression of oxacillin resistance in *Staphylococcus epidermidis*: Roles of *mecA* Transcriptional Regulation and resistant-subpopulation selection. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, p. 1616-1623, 2000.

DICKINSON, R.B.; NAGEL, J.A.; MC DEVITT, D.; FOSTER, T.J.; PROCTOR, R.A.; COOPER, S.L. Quantitative comparison of clumping factor and coagulase-mediated *Staphylococcus aureus* adhesion to surface-bound fibrinogen under flow. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 3143-3150, 1995.

DOBINSKY, S.; BARTSCHT, K.; MACK, D. Influence of Tn917 insertion of transcription of the *icaADBC* operon in six biofilm-negative transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis*. **Plasmid**, v. 47, p. 10-17, 2002.

DONLAN, R. M. Biofilms and device-associated infections. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 7, p. 277-281, 2001.

DOUGHERTY, S. H. Implant infections In: VON RECUM, A.F. **Handbook of biomaterials evaluation**. 2nd. ed. New York: Macmillan Publishing Co, 1986.

EGINTON, P.J.; GIBSON, H.; HOLAH, J.; HANDLEY, P.S.; GILBERT, P. The influence of substratum properties on the attachment of bacterial cells. **Colloids and Surfaces**, v. 5, p. 153-159, 1995.

FALLGREN, C.; UTT, M.; LJUNGH, A. Isolation and characterization of a 17-kDa staphylococcal heparin-binding protein with broad specificity. **J. Med. Microbiol.**, v. 50, p. 547-557, 2001.

FARBER, B.F.; KAPLAN, M.H.; CLOGSTON, A.G.; *Staphylococcus epidermidis* extracted slime inhibits the antimicrobial action of glycopeptide antibiotics. **J. Infect. Dis.**, v. 40, p. 37-40, 1990.

FERREIRA, R.B.R.; IORIO, N.L.P.; MALVAR, K.L.; NUNES, A.P.F.; FONSECA, L.S.; BASTOS, C.C.R.; SANTOS, K.R.N. Coagulase-negative staphylococci: comparison of phenotypic and genotypic oxacillin susceptibility tests and evaluation of the agar screening test by using different concentrations of oxacillin. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 3609-3614, 2003.

FERREIRA, R.B.R.; NUNES, A.P.F.; KOKIS, V.M.; KREPSKY, N.; FONSECA, L.S.; BASTOS, M.C.F.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M.; SANTOS, K.R.N. Simultaneous detection of the *mecA* and *ileS-2* genes in coagulase-negative staphylococci isolated from Brazilian hospitals by multiplex PCR. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 39, p. 205-212, 2002.

FEY, P.D.; ULPHANI, J.S.; HEILMANN, C.; GÖTZ, F.; MACK, D.; RUUP, M.E. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) mediates hemagglutination (HA) in *Staphylococcus epidermidis*. Washington: **Abstr. 98th Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol.** 1998.

FIEBELKORN, K.R.; CRAWFORD, S.A.; MCELMEEL, J.H.; JORGENSEN, J.H. Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 4740-4744, 2003.

FITZGERALD, S.F.; FITZPATRICK, F.; DILLANE, T.; SMYTH, E.G.; HUMPHREYS, H.; O'GARA, J. P. Genomic diversity of *Staphylococcus epidermidis* isolates from the intensive care unit. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 10, p. 1081-1088, 2004.

FITZGERALD, R.H.; JONES, D.R. Hip implant infection. **Am. J. Med.**, v. 78, p. 225-228, 1985.

FITZGERALD, R.H.; RICHARDSON, J.F.; SANE, M.J. Four apparent outbreaks of prosthetic valve endocardites caused by coagulase negative staphylococci. **Zentrabl. Bakteriol. Suppl.**, v. 14, p. 463-469, 2005.

FOSTER, T.J.; McDEVITT, D. Molecular basis of adherence of staphylococci to biomaterials. In: BISNO, A.L.; WALDVOGEL, F.A. **Infections associated with indwelling medical devices**. 2^aed. Washington, D.C., USA, ASM Press, 1994, p. 31-44.

FRANÇOIS, P.; VAUDAUX, P.; FOSTER, T.J.; LEW, D.P. Host bacteria interactions in foreign body infections. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 20, p. 514-520, 1996.

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

FREEMAN, D.J.; FALKINER, F.R.; KEANE, C.T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **J. Clin. Pathol.**, v. 42, p. 872-874, 1989.

GAIKAWAD, S.S.; DEODHAR, L.P. Experimental foreign body infection in mice by *Staphylococcus epidermidis*. **J. Post. Med.**, v. 29, p. 229-231, 1984.

GALDBART, J.O.; ALLIGNET, J.; TUNG, H.S.; RYDÉN, C.; SOLH, N. E. Screening for *Staphylococcus epidermidis* markers discriminating between skin-flora strains and those responsible for infections of joint prostheses. **J. Infect. Dis.**, v. 5, p. 351-355, 2000.

GARCIA, P.C.; PAYÁ, E.G.; OLIVARES, R.C.; COTERA, A.F.; RODRIGUEZ, J.T.; SANZ, M.R. Diagnóstico de las infecciones asociadas a cateteres vasculares centrales. **Rev. Chil. Infect.**, vol. 20, p. 41-50, 2003.

GELOSIA, A.; BALDASSARI, L.; DEIGHTON, L.; NGUYEN, T.V. Phenotypic and genotypic markers of *Staphylococcus epidermidis* virulence. **J. Clin Microbiol.**, v. 7, p. 193-199, 2001.

GEORGE, R.; LEIBROCK, L.; EPSTEIN, M. Long-term analyses of cerebrospinal fluid shunt infection. **J. Neurosurg.**, v. 51, p. 804-811, 1979.

GERKE, C.; KRAFFT, A.; SÜBMUTH, R.; SCHWEITZER, O.; GÖTZ, F. Characterization of N-Acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 18586-18593, 1998.

GNANN, J.W.; COBBS, C.G. Infections of prosthetic valves and intravascular devices
In: MANDELL, G.L.; DOUGLAS, R.G.; BENNETT, J.E. **Principles and practice of infectious diseases**. 2nd ed. New York:, John Willey & Sons, Inc. 1985.

GOERING, R.V.; WINTERS, M.A. Rapid method for epidemiological evaluation of gram-positive cocci by field inversion electrophoresis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, p. 577-580, 1992.

GOKAL, R.J.M.; RAMOS, D.M.A.; FRANCIS R.E.; FERNERT.H.J.; GOODSHIP, G.; PROUD, A.; BINT, M.K.; KERR, D.N.S. Peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis. **Lancet**, v. 2, p. 1388-1391, 1987.

GÖTZ, F. *Staphylococcus* and biofilms. **Mol. Microbiol.**, v. 43, p. 1367-1378, 2002.

GRISTINA, A.G.; DOBBINS, B.; GIAMMARA, J.C.; LEWIS, W.C. Biomaterial-centered sepsis and the total artificial heart: microbial adhesion vs tissue integration. **JAMA**, v. 259, p. 870-874, 1988.

HANDKE, L.D.; CONLON, K.M.; SLATER, S.R.; ELBARUNI, S.; FITZPATRICK, F.; HUMPHREYS, H.; GILES, W.P.; RUPP, M.E.; FEY, P.D.; O'GARA, J.P. Genetic and phenotypic analysis of biofilm phenotypic variation in multiple *Staphylococcus epidermidis* isolates. **J. Med. Microbiol.**, v. 53, p. 367-374, 2004.

HARTFORD, O.; O'BRIEN, L.; SCHOFIELD, K.; WELLS, J.; FOSTER, T.J. The Fbe (SdrG) protein of *Staphylococcus epidermidis* HB promotes bacterial adherence to fibrinogen. **Microbiology**, v. 147, p. 2545-2552, 2001.

HARVILL, E.T.; MILLER, J.F. Manipulating the host to study bacterial virulence. **Curr. Op. Microbiol.**, v. 3, p. 93-96, 2000.

HEILMANN, C.; HUSSAIN, M.; PETES, G.; GÖTZ, F. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. **Mol. Microbiol.**, v. 24, p. 1013-1024, 1997.

HEILMANN, C.; PETERS, G. Biology and pathogenicity of *S. epidermidis*. In: FISCHETTI, V.A.; NOVICK, R.P.; FERRETI, J.J.; PORTNOY, D.A.; ROOD, J.I. **Gram-positive pathogens.**, 1. ed. Washington, D.C.: ASM Press, 2000. Cap. 46, p. 442-449.

HEINZELMANN, M.; HERZIG, D.O.; MARK, B.S.; MERCER-JONES, A.; BERGAMINI, T.M.; POLK JR, H.C. Phagocytosis and oxidative-burst response of planktonic *Staphylococcus epidermidis* RP62A and its non-slime-producing variant in human neutrophils. **Clin. Diag. Lab. Immun.**, v. 4, p. 705-710, 1997.

HIRAMATSU, K. Vancomycin resistance in staphylococci. **Drug Resist. Updates**, v. 1, p. 135-150, 1998.

HUEBNER, J.; GOLDMANN, D.A. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. **Annu. Rev. Med.**, v. 50, p. 223-236, 1999.

HUSSAIN, M.; COLLINS, C.; HASTINGS, J.G.M.; WHITE, P.J. Radiochemical assay to measure the biofilm produced by coagulase-negative staphylococci on solid surfaces and its use to quantitate the effects of various antibacterial compounds on the formation of the biofilm. **J. Med. Microbiol.**, v. 37, p. 62-69, 1992.

HUSSAIN, M.; HEILMANN, C.; PETERS, G.; HERRMANN, M. Teichoic acid enhances adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to immobilized fibronectin. **Microbial Pathogenesis**, v. 31, p. 261-270, 2001.

HUSSAIN, M.; WILCOX, M.H.; WHITE, P.J. The slime of coagulase negative staphylococci: biochemistry and relation to adherence. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 10, p. 191-207, 1993.

HUSSAIN, Z.; STOAKES, L.; MASSEY, V.; DIAGRE, D.; FITZGERALD, V.; EL SAYED, S.; LANNIGAN, R. Correlation of oxacillin MIC with *mecA* gene carriage in coagulase-negative staphylococci. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 752-754, 2000.

IEVEN, M.; VERHOEVEN, J.; PATTYN, S.R.; GOOSSENS, H. Rapid and economical method for species identification of clinical significant coagulase-negative staphylococci. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 1060-1063, 1995.

INMAN, R.D.; GALLEGOS, K.V.; BRAUSE, B.D.; REDECHA, P.B.; CHRISTIAN, C.L. Clinical and microbial features of prosthetic joint infections. **Am. J. Med.**, v. 77, p. 47-53, 1984.

ISHAK, M.A.; GRÖSCHEL, D.H.M.; MANDELL, G.L.; WENZEL, R.P. Association of slime with pathogenicity of coagulase-negative staphylococci causing nosocomial septicemia. **J. Clin. Microbiol.**, v. 22, p. 1025-1029, 1985.

IVEY, F.M.; HICKS, C.A.; CALHOUN, J.H.; MADER, J.T. Treatment options for infected knee arthroplasties. **Rev. Infect. Dis.**, v. 12, p. 468-478, 1990.

JAFFE, R.; LANE, J.D.; ALBURY, S.V.; NIEMEYER, D.M. Rapid extraction from and direct identification in clinical samples of methicillin-resistant staphylococci using the PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 3407-3412, 2000.

JOHANNES, K.; KNOBLOCH, M.; BARTSCHT, K.; SABOTTKE, A.; ROHDE, H.; HUBERT-HEINZ, F.; 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, p.2624-2633, 2001.

JONES, P.G.; HOPFER, R.L.; ELTING, L.; JACKSON, J.A.; FAINSTEIN, V.; BODEY, G.P. Semiquantitative cultures of intravascular catheters from cancer patients. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 4, p. 299-306, 1986.

JORGENSEN, J.H.; CRAWFORD, S.A.; MCELMEEL, M.L.; FIEBELKORN, K.R. Detection of inducible clindamycin resistance on staphylococci in conjunction with performance of automated broth susceptibility testing. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 1800-1802, 2004.

KARCHMER, A.W.; ARCHER, G.L.; DISMUKES, W.E. *Staphylococcus epidermidis* causing prosthetic valve endocardites: microbiologic and clinical observations as guides to therapy. **Ann. Intern. Med.**, v. 98, p. 447-455, 1983.

KLEEMAN, K.T.; BANNERMAN, T.L.; KLOOS, W.E. Species distribution of coagulase-negative using the PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, p. 1318-1321, 1993.

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

KLOOS, W.E.; BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. 6. ed. Washington, D.C.: ASM Press, 1995, p. 282.

KLOOS, W.E.; BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus* and *Micrococcus* In: MURRAY, P. R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7. ed. Washington, D.C.: ASM Press, 1999, p. 264.

KLOOS, W.E.; MUSSELWHITE, M.S. Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. **Appl. Microbiol.**, v. 30, p. 381-394, 1975.

KLOOS, W. E.; SCHLEIFER, K. H. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. **J. Clin. Microbiol.**, v. 1, p. 82-8, 1975.

KLUG, D.; WALLET, F.; KACET, S.; COURCOL, R.J. Involvement of adherence and adhesion *Staphylococcus epidermidis* genes in pacemaker lead-associated infections. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 3348-3350, 2003.

KOCIANOVA, S.; VUONG, C.; YAO, Y.; VOYICH, J.M.; FISCHER, E.R.; DeLEO, F.R.; OTTO, M. Key role of poly- γ -DL-glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. **J. Clin. Invest.**, v. 115, p. 688-694, 2005.

KOCKRO, R.A.; HAMOL, J.A.; JANSEN, B.; PETERS, G.; SCHEIHING, M.; GIACOMELLI, R.; KUNZE, S.; ASCHOFF, A. Use of scanning electron microscopy to investigate the prophylactic efficacy of rifampin-impregnated CSF shunt catheters. **J. Med. Microbiol.**, v. 49, p. 441-450, 2000.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M. SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. **Diagnóstico Microbiológico Texto e Atlas Colorido**. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. 1782p.

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

LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, p. 999-1007, 2001.

LINA, G.; ETTIENNE, J.; VANDENESCH, F. Biology and pathogenicity of Staphylococci other than *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* In: FISCHETTI, V.A.; NOVICK, R.P.; FERRETI, J.J.; PORTNOY, D.A.; ROOD, J.I. **Gram-positive pathogens**. 1st. ed. Washington: ASM Press 2000. p. 450-462.

LITRAN, M.T.; KROPEC, A.; ABEYGUNAWARDANA, C.; JOYCE, J.; MARK, G.; GOLDMANN, D.A.; PIER, G.B. Immunochemical properties of the *Staphylococcus* Poly-N-Acetylglucosamine surface polysaccharide. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 4433-4440, 2002.

LOUIE, L.; MAJURY, A.; GOODFELLOW, J.; LOUIE, M.; SIMOR, A.E. Evaluation of a latex agglutination test (MRSA-Screen) for detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 4149-4151, 2001.

LOWY, F.D.; HAMMER, S.M. *Staphylococcus epidermidis* infections. **Ann. Intern. Med.**, v. 99, p. 834-839, 1983.

MacFADDIN, J.F. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria**. 3rd. ed. Philadelphia: Lawrence McGrew, Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 901p.

MacFARLANE, E.L.A.; HANCOCK, R.E.W. Antibiotic resistance and survival in the host. In: BROGDEN, K.A.; ROTH, J.A.; BOLIN, C.A.; STATON, T.B.; MIMON, F.C. **Virulence mechanisms of bacterial pathogens**. 3. ed. Washington, D.C.: ASM Press, 2000. chapter. 6, p. 93-104.

MACK, D.; FISCHER, W.; KROKOTSCH, A.; LEOPOLD, K.; HARTMANN, R. EGGE, H.; LAUFS, R. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 175-183, 1996.

MACK, D.; RIEDEWALD, J.; ROHDE, H.; MAGNUS, T.; FEUCHT, H.H.; ELSNER, H.A.; LAUFS, R.; RUPP, M.E. Essential functional role of the polysaccharide intercellular adhesin of *Staphylococcus epidermidis* in hemagglutination. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 1004-1008, 1999.

MACK, D.; ROHDE, H.; DOBINSKY, S.; RIEDEWALD, J.; NEDELMANN, M.; KNOBLOCH, J.K.M.; ELSNER, H.A.; FEUCHT, H.H. Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 3799-3807, 2000.

MACK, D.; SABOTTKE, A.; DOBINSKY, S.; ROHDE, H.; HORSTKOTTE, A.; JOHANNES, K.; KNOBLOCH, M. Differential expression of methicillin resistance by different biofilm-negative *Staphylococcus epidermidis* transposon mutant classes. **Antimicrob. Agentes Chemother.**, v. 46, p. 178-183, 2002.

MAKI, D.G. Infections caused by intravascular devices used for infusion therapy: pathogenesis, prevention and management. In: BISNO, A.L.; WALDVOGEL, F.A. **Infection associated with indwelling medical devices.** 2nd. ed. Washington: ASM Press, 1994. p.155-212.

MARPLES, R.R.; RICHARDSON, J.F.; SANE, M.J. Four apparent outbreaks of prosthetic valve endocardites caused by coagulase-negative staphylococci. **Zentrabl. Bakteriol. Suppl.**, v. 14, p. 463-469, 1985.

MARTÍN, L.J.V.; ROTH, E.P.; MARTÍN, F.C.; GIL, O.D.; BATISTA, N.; MORALES, M.; ÁLVAREZ, S.M. Detection of *Staphylococcus aureus* clinical isolates harboring the *ica* gene cluster for biofilm establishment. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 1569-1570, 2002.

MARTINEAU, F.; PICARD, F.J.; KE, D.; PARADIS, S.; ROY, P.H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M.G. Development of a PCR assay of identification of *Staphylococcus* at genus and species levels. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 2541-2547, 2001.

McALLISTER, T.A.; MOCAN, H.; MURPHY, A.V.; BEATTIE, T.J. Antibiotic susceptibility of staphylococci from CAPD peritonitis in children. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 19, p. 95-100, 1987.

McKENNEY, D.; HÜBNER, J.; MULLER, E.; WANG, Y.; GOLDMANN, D.A.; PIER, G.B. The *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin. **Infect. Immun.**, vol. 66, p. 4711-4720, 1998.

MENICHETTI, F. Current and emerging serious Gram-positive infections. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 11, p. 22-28, 2005.

MERRIT, K.; GAIND, A.; ANDERSON, J.M.; Detection of bacterial adherence on biomedical polymers. **Biomed. Mater Res.**, vol. 39, p. 415-422, 1997.

MERRITT, K.; HITCHINS, V.M.; BROWN, S.A. Safety and cleaning of medical materials and devices. **J. Biomed Mater Res.**, v.53, p.131-136, 1999.

MINTO, E.C.M.; BARELLI, C.; MARTINEZ, R.; DARINI, A.L.C. Identification and medical importance of coagulase-negative *Staphylococci* species. **Rev. Paul. Med.**, v.4, p.175-178, 1999.

MOHAN, U.; JINDAL, N.; AGGARWAL, P. Species distribution and antibiotic sensitivity pattern of coagulase negative staphylococci isolate from various clinical specimens. **Indian J. Med. Microbiol.**, v. 20, p. 45-46, 2002.

MORALES, M.; MÉNDEZ-ALVAREZ, S.; MARTIN-LÓPEZ, J.V.; MARRERO, C.; FREYTES, C.O. Biofilm: the microbial “bunker” for intravascular catheter-related infection. **Support care cancer**, v. 12, p. 701-707, 2004.

MULLER, E.; HÜBNER, J.; GUTIERREZ, N.; TAKEDA, S.; GOLDMANN, D.A. Isolation and characterization of transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis* deficient in capsular polysaccharide/adhesin and slime. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 551-558, 1993.

MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. 6. ed. Washington, D.C.: ASM Press. 1995. 1482p.

MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7. ed. Washington D.C.: ASM Press, 1999. 1.773p.

MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. 8. ed. Washington D.C.:ASM Press. 2003, v. 1, 1.211p.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S.; PFALLER, M.A., **Microbiologia médica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Ed., 2004. p. 163-171.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; 7th ed. NCCLS document M2-A7. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

NILSDOTTER-AUGUSTINSSON, A.; CLAEISSON, C.; LINDGREN, P.E.; LUNDQVIST-GUSTAFSSON, H.; ÖHMAN, L. Adherence of *Staphylococcus epidermidis* to extracellular matrix proteins and effects of fibrinogen-bound bacteria on oxidase activity and apoptosis in neutrophils. **APMS**, v. 113, p. 361-373, 2005.

NOVICK, R.N.; MUIR, T.W. Virulence gene regulation by peptides in *Staphylococcus* and other Gram-positive bacteria. **Current Opinion in Microbiol.**, v. 2, p. 40-45, 1999.

ODIO, C.; MCCRAKEN, H.; NELSON, J.D. CSF shunt infection in pediatries. **Ann. J. Dis. Child.**, v. 38, p. 1103-1108, 1984.

O'GARA, J.; HUMPHREYS, H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. **J. Med. Microbiol.**, v. 50, p. 582-587, 2001.

OTTO, M. Virulence factors of the coagulase-negative staphylococci. Disponível em: <http://www.bioscience.org/2004/v9/af/1295/3.htm> Acesso em 18 set. 2005.

OTTO, M.; GÖTZ, F. ABC transporters of staphylococci. **Res. Microbiol.**, v. 152, p. 351-356, 2001.

PARK, Y.J.; PARK, J.J.; LEE, S.O.; OH, E.J.; KIM, B.K. Low-resistance to glycopeptides amongst staphylococcus species: surveillance in a university hospital and evaluation of a vancomycin screening agar. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 4, p. 155-159, 2001.

PATOGÊNESE E VIRULÊNCIA. Disponível em: <http://www.delphianos.com.br>
Acesso em 19 jun. 2002.

PEACOCK, S.J.; LINA, G.; ETIENNE, J.; FOSTER, T.J. *Staphylococcus schleiferi* expresses a fibronectin-binding protein. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 4272-4275, 1999.

PETERS, G.; LOCCI, R.; PULVERER, G. Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci and surfaces of intravenous catheters. **J. Infect. Dis.**, v. 146, p. 479-482, 1982.

PETERS, G.; LOCCI, R.; PULVERER, G. Microbial colonization of prosthetic devices: Scanning electron microscopy of naturally infected intravenous catheters. **Zentralbl. Bakteriол. Mikrobiol.**, v. 173, p. 293-299, 1981.

PETINAKI, E.; KONTOS, F.; MIRIAGOU, V.; MANIATI, M.; HATZI, F.; MANIATIS, A.N. Survey of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the hospitals of central Greece. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 18, p. 61-65, 2001.

PIZZOLITTO, E. L. **Contribuição ao estudo *in vitro* da corrosão induzida por microrganismos sobre liga metálica a base de cobre, de uso na Odontologia - Modelo experimental com as cepas cariogênicas *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*.** 1997. 117f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Instituto de Química, UNESP, Araraquara, 1997.

POLONIO, R.E.; MERMEL, L.A.; PAQUETTE, G.E.; SPERRY, J.F. Eradication of biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* (RP62A) by a combination of sodium salicylate and vancomycin. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 45, p. 3262-3266, 2001.

PRINTZEN, G. Relevance, pathogenicity and virulence of microorganisms in implant related infections. **Injury**, v. 27, p. 9-15, 1996.

QUINN, F.D.; NEWMAN, W.; KING, C.H. In search of virulence factors of human bacterial disease. **Trends Microbiol.**, v. 5, p. 20-26, 1997.

RAAD, I. Intravascular-catheter-related infections. **Lancet**, v. 21, p. 893-898, 1998.

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

RUITER, J.H.; DEGENER, J.E.; VAN MERCHELENS, R.; BOS, R. Late purulent pacemaker pocket infection caused by *Staphylococcus epidermidis*: serious complication of in situ management. **PACE**, v. 8, p. 903-907, 1985.

RUOOF, K.L. *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Stomatococcus* and miscellaneous gram-positive cocci that grow aerobically. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7th. ed. Washington: ASM Press, 1999. 1.773p.

RUPP, M.E.; ARCHER, G.L. Coagulase-negative staphylococci pathogens associated with medical progress. **Clin. Infect. Dis.**, v. 19, p. 231-243, 1994.

RUPP, M.E.; ARCHER, G.L. Hemagglutination and adherence to plastic by *Staphylococcus epidermidis*. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 4322-4327, 1992.

RUPP, M.E.; ULPHANI, J.S.; FEY, P.D.; BARTSCHT, K.; MACK, D.. Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 2627-2632, 1999a.

RUPP, M.E.; ULPHANI, J.S.; FEY, P.D.; MACK, D. Characterization of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 2656-2659, 1999b.

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

SALYERS, A.A.; WHITT, D.D. **Bacterial pathogenesis a molecular approach.** 2nd. ed. Washington: ASM Press, 1994. 418p.

SELAHATTIN, A.; SAFFET, E.; OZERDEM, A.N. Differential production of slime by *Staphylococcus saprophyticus* under aerobic and anaerobic conditions. **J. Med. Microbiol.**, v. 49, p. 1051-1052, 2000.

SCHAECHTER, M.; EISENSTEIN, B.I. Estabelecimento de doenças infecciosas. In: SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N.C.; EISENSTEIN, B.I.; MEDOFF, G. **Microbiologia mecanismo das doenças infecciosas**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2002. p. 3-9.

SCHWANK, S., RAJACIC, Z.; ZIMMERLI, W.; BLASER, J. Impact of bacterial biofilm formation on in vitro and in vivo activities of antibiotics. **Antimicrobiol. Agents Chemother.**, v. 42, p. 895-898, 1998.

SHERETZ, R.J.; HOPFER, R.L.; ELTING, L.; JACKSON, J.A.; THOMANN, C.A.; MATTERN, W.D. Infections associated with subclavian Uldall catheters. **Arch. Intern. Med.**, v. 143, p. 52-56, 1983.

SHIRO, H.; MULLER, E.; GUTIERREZ, N.; BOISOT, S.; GROUT, M.; TOSTESON, T.D.; GOLDMANN, D.; PIER, G.B. Transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis* deficient in elaboration of capsular polysaccharide/adhesin and slime are avirulent in rabbit model of endocarditis. **J. Infect. Dis.**, v. 169, p. 1042-1049, 1994.

SIEVERT, D.M.; BOULTON, M.L.; STOLMAN, D.J.; STOBIEFSKI, M.G.; DOWNES, F.P.; SOMSEL, P.A.; RUDRIK, J.T.; BROWN, W.; HAFEEZ, W.; LUNDSTROM, T.;

FLANAGAN, E.; JOHNSON, R.; MITCHELL, J. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin-United States 2002. **Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, p. 565-567, 2002.

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

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; VLAHOVIC, M.S. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **J. Microbiol. Meth.**, v. 40, p. 175-179, 2000.

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

VANDESCATEELE, S.J.; PEETERMANS, W.E.; MERCKX, R.R.; RIJNDERS, B.J.A.; ELDERE, J.V. Realibility 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, p. 114-119, 2003.

VAUDAUX, P.E.; LEW, D.P.; WALDVOGEL, F.A. Host factors predisposing to and influencing therapy of foreing body infections. In: BISNO, A.L.; WALDVOGEL, F.A. **Infections associated with indwelling medical devices**. 2nd. ed. Washington.: ASM Press, 1994, p.1-30.

von EIFF, C.; HEILMANN, C.; PETERS, G. New aspects in the molecular basis of polymer-associated infections due to staphylococci. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 18, p. 843-846, 1999.

von EIFF, C.; HEILMANN, C.; PETERS, G. *S. epidermidis*: why is it so successful? **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 4, p. 297-300, 1998.

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

von EIFF, C.; PROCTOR, R.A.; PETERS, G. Coagulase-negative staphylococci. **Postgraduate Medicine**, v. 110, p. 1-9, 2001.

VOGEL, L.; SLOOS, J.H.; SPAARGAREN, J.; SUIKER, I.; DIJKSHOORN, L. Biofilm production by *Staphylococcus epidermidis* isolates associated with catheter related bacteremia. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 36, p. 139-141, 1999.

VUONG, C.; GERKE, C.; SOMERVILLE, G.A.; FISCJER, E.R.; OTTO, M. Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. **J. Infect. Dis.**, v. 188, p. 706-718, 2003.

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

VUONG, C.; VOIYCH, J.M.; FISCHER, E.R.; BRAUGHTON, K.R.; WHITNEY, A.R.; DE LEO, F.R.; OTTO, M. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. **Cel. Microbiol.**, v. 6, p. 269-275, 2004.

WEST, T.E.; WALSH, J.J.; KROL, C.P.; AMSTERDAN, D. *Staphylococcus* peritonitis in patients on continuous peritoneal dialysis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 23, p. 809-812, 1986

WILKS, D.; SISSONS, J.G.P. Infection. In: TOMLINSON, S.; HEARGERTY; WEETMAN, A.P. **Mechanisms of disease: an introduction to clinical science**. 1. ed. United Kingdom: Cambridge University Press, 1977. p. 160-201.

WILLIAMS, D.F. Introduction: Implantable materials and infection. **Injury**, v. 27, p. 1-4, 1996.

YASSIEN, M.; KHARDORI, N. Interaction between biofilms formed by *Staphylococcus epidermidis* and quinolones. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 40, p. 79-89, 2001.

ZANON, U.; MARANGONI, D.V. Complicações infecciosas hospitalares. In: SCHECHTER, M.; MARANGONI, D.V. **Doenças Infecciosas: Conduta Diagnóstica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 1998. p. 96-110.

ZHANG, X.; BISHOP, P.L.; KUPFERLE, M.J. Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. **Wat. Sci. Tech.**, v. 37, p. 345-348, 1998.

ZIEBUHR, W.; DIETRICH, K.; TRAUTMANN, M.; WILHELM, M. Chromosomal rearrangements affecting biofilm production and antibiotic resistance in a *Staphylococcus epidermidis* strain causing shunt-associated ventriculitis. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 290, p. 115-120, 2000.

ZIEBUHR, W.; HEILMANN, C.; GOTZ, F.; MEYER, P.; WIMS, K.; STRAUBE, E.; HACKER, J. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (ica) and phase variation in *S. epidermidis* blood culture strain and mucosal isolates. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 890-896, 1997.

ZIEBUHR, W.; KRIMMER, V.; RACHID, S.; LÖBNER, 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, p. 345-356, 1999.

8 – APÊNDICE

8.1 – APÊNDICE A: Formulação dos meios de cultura utilizados no trabalho.

Ágar Base-Sangue – (MERCK)

Substrato nutritivo.....	20,0g
Cloreto de sódio.....	5,0g
Ágar.....	15,0g
Água destilada.....	1000,0mL

pH $6,8 \pm 0,2$ a 25°C

Ágar Mueller-Hinton – (MERCK)

Infusão de carne bovina.....	2,0g
Hidrolisado de caseína.....	17,5g
Amido.....	1,5g
Ágar.....	17,0g
Água destilada.....	1000,0mL

pH $7,3 \pm 0,2$ a 25°C

Ágar de Cérebro-Coração – (MERCK)

Extrato de cérebro-coração e peptona.....	27,5g
D (+) glicose.....	2,0g
Cloreto de sódio.....	5,0g
Hidrogenofosfato di-sódico.....	2,5g
Ágar.....	15,0g
Água destilada.....	1000,0mL

pH $7,3 \pm 0,2$ a 25°C

Ágar Vermelho Congo (Freeman *et al.*, 1989)

Ágar de cerebro-coração-BHI (MERCK).....	37,0g
Sacarose (MERCK).....	50,0g
Corante vermelho Congo (VETEC).....	0,8g
Água destilada.....	1000,0mL

pH $7,3 \pm 0,2$ a 25°C

Ao meio esterilizado e resfriado a 55°C foi acrescentando assepticamente solução aquosa do corante vermelho Congo e sacarose.

Ágar Vermelho de Fenol (utilização de carboidratos) – (DIFCO)

Extrato de carne.....	1,0g
Peptona proteose N° 3.....	10,0g
Cloreto de Sódio.....	5,0g
Vermelho de fenol.....	0,018g
Ágar1.....	5,0g
Água destilada.....	1000,0mL

pH final 6.8 ± 0.2 a 25°C

Infusão de Cérebro-Coração (BHI) – (MERCK)

Extrato de cérebro-coração e peptona.....	27,5g
D (+) glicose.....	2,0g
Cloreto de sódio.....	5,0g
Hidrogenofosfato di-sódico.....	2,5g
Água destilada.....	1000,0mL

pH $7,3 \pm 0,2$ a 25°C

Caldo Triptona Soja (TSB) – (DIFCO)

Triptona.....	17,0g
Soitona.....	3,0g
Dextrose.....	2,5g
Cloreto de sódio.....	5,0g
Fosfato di-potássico.....	2,5g
Água destilada.....	1000,0mL

pH 7,3 ± 0,2 a 25°C

Caldo Mueller-Hinton – (DIFCO)

Infusão de carne bovina.....	300,0g
Ácido de casamino técnico.....	17,5g
Amido.....	1,5g
Água destilada.....	1000,0mL

pH 7,3 ± 0,2 a 25°C

8.2 – APÊNDICE B: Formulação das soluções utilizadas na pesquisa.**Tampão Fosfato 0,2M (pH 7,1)**

Solução A	33,00mL
Solução B	67,00mL

a) Solução A

Fosfato monossódico 1-hidratado (MERCK).....	2,76g
Água destilada.....	100,0mL

b) Solução B

Fosfato dissódico 12-hidratado (MERCK).....	7,17g
Água destilada.....	qsp.....100,0mL

Tampão Fosfato 0,1M (pH 7,1)

Tampão fosfato 0,2M (pH 7,1).....	50,00mL
Água destilada.....	50,00mL

Solução Tampão Fosfato 0,1M (pH 7,1) – Glutaraldeído a 2,5%

Tampão fosfato 0,1M (pH 7,1).....	48,50mL
Glutaraldeído 50% solução aquosa (FLUKA).....	2,50mL

Solução de etanol a 15%

Álcool etílico absoluto P.A. (MERCK).....	15,00mL
Água destilada.....	85,00mL

Solução de etanol a 30%

Álcool etílico absoluto P.A. (MERCK).....	30,00mL
Água destilada.....	70,00mL

Solução de etanol a 50%

Álcool etílico absoluto P.A. (MERCK).....	50,00mL
Água destilada.....	50,00mL

Solução de etanol a 70%

Álcool etílico absoluto P.A. (MERCK).....	70,00mL
Água destilada.....	30,00mL

Solução de etanol a 95%

Álcool etílico absoluto P.A. (MERCK).....	95,00mL
Água destilada.....	5,00mL

Salina fisiológica a 0,85%

Cloreto de sódio	0,85g
Água destilada	100,00mL

Solução de lizosima

Lizosima.....	4mg/mL
Glicose.....	50mM
Na ₂ EDTA.....	10mM
Trizma base.....	25mM

Os componentes são preparados separadamente, 10 vezes concentrados, em soluções estoque. No momento do uso, as soluções são diluídas em água Mili Q, a fim de se atingir a concentração desejada. As soluções de trizma base e Na₂EDTA são autoclavadas a 121 °C durante 15 minutos, e a solução de glicose, esterilizada por filtração em membrana filtrante, com poros de 0,22µm de diâmetro.

Tampão Tris-EDTA pH-8,0(TE)

Trisma base..... 10mM

Na₂EDTA 1mM

A solução é preparada após adição de dissolução a quente do Na₂EDTA em água Mili Q,, posteriormente acrescenta-se o trizma base e o pH ajustado a 8,0 com ácido clorídrico.

Mistura corante

Ficol..... 15,00%

Xileno cianol..... 0,25%

Azul de bromofenol..... 0,25%

Solução de brometo de etídio 5mg/mL

O brometo de etídio é preparado em tampão tris-HCl 50mM, pH 8,5; a solução é armazenada em frasco escuro e diluída com TEB a uma concentração final de 0,4µg/mL.