



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Instituto de Biociências - Campus de Botucatu
Departamento de Microbiologia e Imunologia

Detecção da Produção de Biofilme em
Staphylococcus aureus e Estafilococos Coagulase-
Negativa isolados de Recém-Nascidos

Patrícia Sanches

**Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza
da Cunha**

**BOTUCATU - SP
2008**

Universidade Estadual Paulista
Instituto de Biociências de Botucatu

Detecção da Produção de Biofilme em
Staphylococcus aureus e Estafilococos Coagulase-
Negativa isolados de Recém-Nascidos

Trabalho de conclusão de curso realizado no laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas – Modalidade Médica.

Patrícia Sanches

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

**BOTUCATU - SP
2008**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Sanches, Patrícia.

Detecção da produção de Biofilme em *Staphylococcus aureus* e
Estafilococcus Coagulase-negativa isolados de recém-nascidos / Patrícia
Sanches. - Botucatu [s.n], 2008.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas – Modalidade
médica) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de
Botucatu, 2008

Orientadora: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

1. Microbiologia médica
2. Biofilme (Microbiologia)

Palavras-chave: Biofilme; PCR; Stafilococos Coagulase-Negativa; *Staphylo-*
coccus aureus

TÍTULO RESUMIDO: Detecção da Produção de Biofilme

TÍTULO: Detecção da Produção de Biofilme em *Staphylococcus aureus* e Estafilococos Coagulase-Negativa isolados de Recém-Nascidos

AUTORES: Patrícia Sanches, Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha.

AFILIAÇÃO INSTITUCIONAL: Laboratório de Bacteriologia; Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP – Brasil. Caixa Postal 510, CEP 18618-000.

RESUMO

Uma coleção de 50 amostras de *Staphylococcus aureus* e 50 de estafilococos coagulase-negativa (ECN) isoladas de recém-nascidos (RN) da unidade neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu foram estudadas quanto à produção de biofilme. Para isto foi utilizada a técnica de PCR na detecção dos genes *icaA*, *icaC* e *icaD* e os métodos fenotípicos de aderência em placa de poliestireno, aderência em tubo de borossilicato e método do Agar Congo Vermelho (CRA). Dos 50 *S. aureus* estudados, 100% foram positivos para a produção de biofilme pela PCR, 98% pelo método do tubo, 100% pelo método da placa de poliestireno e 98% pelo CRA. Já das 50 amostras de ECN, 94% foram positivas pela PCR, 76% pelo método do tubo, 82% pelo teste da placa e 74% pelo CRA. Feita a comparação dos métodos utilizados, tendo por referência o padrão-ouro (PCR), foi possível observar que o método que melhor se correlacionou com o padrão-ouro, foi o método da aderência em placa de poliestireno, apresentando melhor sensibilidade e especificidade para ambas as espécies.

PALAVRAS-CHAVE: Biofilme, *Staphylococcus aureus*, Estafilococos coagulase negativa.

INTRODUÇÃO

O gênero *Staphylococcus* compreende mais de quarenta espécies, sendo que a maioria vive como inofensivo comensal na pele e mucosa de mamíferos e aves. Os estafilococos estão entre os mais freqüentes microorganismos isolados em microbiologia médica (Becker et al., 2007). São membros da família Staphylococcaceae e classificados como cocos Gram-positivos, catalase-positiva, porém podem ser divididos em dois grupos no que diz respeito à produção de coagulase; as espécies coagulase-negativas (ECN) são diferenciadas dos *Staphylococcus aureus* (coagulase-positiva) pela sua incapacidade de coagular plasma de coelho (Whitener et al., 1993).

Staphylococcus aureus e *Staphylococcus epidermidis* são as duas espécies com maior impacto clínico, enquanto a primeira apresenta um amplo potencial patogênico, a segunda é um típico oportunista, que afeta principalmente pacientes imunocomprometidos. Ambas as espécies são caracterizadas pelo crescente grau de resistência aos antibióticos, o que dificulta as opções de tratamento das infecções causadas por esses patógenos (Becker et al., 2007). Podem ser responsáveis por inúmeras alterações biológicas, incluindo infecções da pele como furúnculo, carbúnculo, abscessos profundos, infecções de sítios cirúrgicas, impetigo; e outras infecções como osteomielite, infecções de queimaduras, bacteremias, endocardite, entre outras (Trilla et al., 1995).

Um fator de risco importante para o aumento no número de infecções causadas pelo gênero *Staphylococcus*, principalmente ECN, está relacionado a implantes de materiais estranhos (Olsson et al., 2007); estes incluem cateteres intravasculares e de hemodiálise. Os cateteres vasculares são fontes de infecção, por serem facilmente colonizados por microorganismos da pele presentes ao longo do local de inserção, especialmente pelos ECN,

que são microrganismos prevalentes como flora normal da pele e mucosa (Cunha et al., 2002). Os pacientes mais vulneráveis a esse tipo de infecção são aqueles internados em unidades de terapia intensiva e unidades de transplante, já que na maioria das vezes são submetidos a tais procedimentos. Além disso, a imunossupressão e a utilização de antimicrobianos de amplo espectro tornam estes pacientes mais vulneráveis (Agvald-Öhman et al., 2004).

Os fatores de virulência produzidos pelos ECN e como eles contribuem na patogenicidade das infecções associadas com corpos estranhos estão em investigação. Evidências indicam que a patogenicidade pode estar relacionada com a produção de um polissacarídeo extracelular que permite a aderência desse microorganismo à superfície lisa, colonizando cateteres, válvulas cardíacas, marcapassos e próteses articulares, formando o biofilme (Vogel et al., 2000). Este confere proteção aos microrganismos contra os mecanismos de defesa imune do hospedeiro e de agentes antimicrobianos, sendo diretamente pelo bloqueio da penetração desses na célula bacteriana, ou indiretamente por mantê-la em um inativo estado de repouso. Por estas razões, sua formação é considerada o principal fator de virulência dos ECN e as mais importantes infecções causadas por estes microrganismos são as que envolvem corpos estranhos (Cafiso et al., 2004).

Algumas linhagens de *Staphylococcus aureus* possuem cápsula bacteriana que está fortemente associada com a parede celular bacteriana. Essas linhagens podem também apresentar uma estrutura lábil polissacarídea extracapsular (Caputy et al., 1982). Antigamente, a produção de biofilme pelo *Staphylococcus aureus* não era considerada como um fator de virulência. Recentemente, algumas pesquisas relataram que a produção de biofilme por algumas linhagens de *Staphylococcus aureus* possuem alta capacidade de colonização quando comparada a linhagens que não são produtoras de biofilme. Portanto,

Staphylococcus aureus produtor de biofilme pode apresentar importância no estabelecimento de infecções (Baselga et al., 1993).

No curso das infecções relacionadas aos dispositivos prostéticos, dois distintos estágios ocorrem sucessivamente, primeiramente temos a adesão da bactéria às proteínas séricas do paciente que, previamente recobrem o biomaterial inserido (Veenstra et al., 1996); em um segundo estágio temos a formação de agrupamento bacteriano em multicamadas, associado com a produção do polissacarídeo de adesão intercelular (Gerke et al., 1998). Esse polissacarídeo produzido pelas próprias células estafilocócicas é denominada polysaccharide intercellular adhesin (PIA), composto por N-acetilglucosamina β -1,6-glicosídeo, e sintetizado pela enzima N-acetilglucosaminiltransferase (Mack et al., 1999). É funcional na adesão célula-célula e na hemaglutinação, sendo essencial para a acumulação do biofilme na maioria das linhagens clínicas de *S. epidermidis* (Mack et al., 2002).

O PIA é codificada por um operon denominado intercellular adhesion (*ica*), composto de quatro genes *icaA*, *icaD*, *icaC*, *icaB*, e uma região promotora denominada *icaR*. Para analisar a função individual de *icaA* e *icaD* na atividade da N-acetilglucosaminiltransferase, Gerke et al. (1998) induziram a expressão destes genes no *Staphylococcus carnosus* usando dois plasmídeos compatíveis. Foi demonstrado que *icaD* sozinho não induz atividade enzimática de transferase, enquanto que *icaA* isolado induz pouca atividade. Entretanto, quando *icaA* e *icaD* são expressos conjuntamente, a atividade enzimática da transferase é aumentada, formando maior quantidade de PIA. A concreta função de *icaD* ainda é desconhecida. A interação de *icaA* e *icaD* pode ser necessária para a ligação β -1,6 dos resíduos de N-acetilglucosamina, formando o polissacarídeo de adesão intercelular (PIA). Outra possibilidade proposta é que as proteínas transcritas por *icaA*, uma

proteína transmembrana que contém aproximadamente 412 aminoácidos (Mack et al, 1999), necessitam de *icaD* para obter uma conformação ativa. Neste mesmo trabalho foi mostrado que o produto do gene *icaC*, uma proteína hidrofóbica integral de membrana com aproximadamente 355 aminoácidos (Mack et al., 1999), é necessário para a síntese de oligômeros de N-acetilglucosamina para reagir com anticorpos do PIA. A proteína transcrita por *icaB* provavelmente é uma proteína secretora que aparenta não estar envolvida na biossíntese do PIA. Os genes *icaA*, *icaD* e *icaC* devem, de qualquer maneira, serem co-expressos em uma linhagem para se obter a síntese de longos oligômeros. Portanto, Gerke *et al.* (1998) em seu estudo, conseguiram mostrar que *icaA*, *icaD* e *icaC* estão envolvidos na biossíntese do oligômero completo do PIA. Os genes *icaA* e *icaD* constituem N-acetilglucosaminiltransferase atividade, sendo que *icaA* representa a verdadeira transferase e que necessita de *icaD* para uma completa atividade.

Portanto, podemos observar que com o aumento no uso de materiais implantados em quase todos os campos da medicina moderna, os microrganismos colonizantes da pele, como *S. aureus* e ECN acabam ganhando acesso à corrente circulatória e muitas vezes desencadeando graves infecções que podem levar a graves conseqüências. Existe um grande interesse e importância no estudo dos fatores de virulência produzidos por estes microrganismos, sendo assim esse estudo teve como objetivo principal a detecção da produção de biofilme em amostras de *S. aureus* e ECN isoladas de recém-nascidos da Unidade Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu e a comparação de métodos fenotípicos com a detecção de genes responsáveis pela produção de biofilme.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram estudadas 50 amostras de *S. aureus* e 50 de estafilococos coagulase-negativa (ECN), isoladas de materiais clínicos provenientes de recém-nascidos internados na Unidade de Tratamento Intensivo (UTI-Neonatal) e quatro linhagens de referência internacional: *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. simulans* ATCC 27851, *S. warneri* ATCC 10209, *S. xylosus* ATCC 29979.

Identificação de *S. aureus* e estafilococos coagulase-negativa

Os isolados, obtidos a partir de espécimes clínicos foram semeados em ágar sangue e corados pelo método de Gram objetivando-se sua pureza e a observação de sua morfologia e coloração específica. Após a confirmação dessas características, as amostras foram submetidas às provas de catalase e coagulase. O gênero *Staphylococcus* foi diferenciado de *Micrococcus*, com base na prova de oxidação e fermentação da glicose e pela resistência à bacitracina (0,04 U) indicada pela ausência de halo de inibição ou formação de halo de até 9 mm e pela sensibilidade à furazolidona (100 µg) caracterizada por halos de inibição de 15 a 35 mm de diâmetro (Koneman et al., 1997).

Para a identificação dos ECN foi utilizado o esquema simplificado proposto por Cunha *et al.* (2004), o qual estabelece a realização de testes de utilização de açúcares: xilose, sacarose, trealose, manitol, maltose, e frutose, caracterização de hemolisinas, urease, ornitina decarboxilase e resistência à novobiocina. Para controle dos resultados dos testes, foram utilizadas as seguintes linhagens de ECN de referência internacional: *S. epidermidis*

(ATCC 12228), *S. simulans* (ATCC 27851), *S. warneri* (ATCC 10209) e *S. xylosus* (ATCC 29979).

Posteriormente à confirmação da espécie, as linhagens foram conservadas a -20°C e em nitrogênio líquido.

Detecção de genes *icaA*, *icaC* e *icaD* específicos para produção de biofilme

Extração do ácido nucléico

O ácido nucléico total foi extraído a partir de amostras de *Staphylococcus* cultivadas em ágar sangue e inoculadas individualmente em caldo Infusão de Cérebro e Coração e incubadas a 37°C por 24 horas.

A extração foi realizada com o Kit GFX (Amersham Pharmacia Biotech) que consiste na digestão inicial das células de estafilococos com lisozima (10 mg/ml) e proteinase K (20 mg/ml). A seguir 500 µl da solução de extração foi adicionada à mistura e esta centrifugada a 10.000 x g por 4 min. Em seguida o sobrenadante foi transferido para a coluna GFX e centrifugado a 5.000 x g por 1 min. O líquido coletado foi descartado e 500 µl de solução de extração foi adicionado novamente à coluna. Após a centrifugação e descarte do líquido coletado, 500 µl da solução de lavagem foi adicionada à coluna e esta submetida à centrifugação a 20.000 x g por 3 min. A seguir, a coluna foi transferida para um tubo de 1,5 ml e 200 µl de água Milli Q aquecida a 70°C foi utilizada para a eluição.

Amplificação do ácido nucléico (PCR)

As reações foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 ml em volumes totais de 25 µl contendo 10 pmol de cada *primer* (tabela 1), 2,0 U de *Taq* polimerase, 100 µM de desoxiribonucleotídeos trifosfatados e 20 mM de Tris-HCl ph 8,4, 0,75 mM MgCl e 3mg de ácido nucléico. A incubação foi realizada em termociclador apropriado, empregando os parâmetros descritos por Arciola et al. (2001) que consistiram de: 94°C por cinco minutos para o primeiro ciclo seguido por 50 ciclos de desnaturação a 94°C por trinta segundos, anelamento dos *primers* a 55,5°C por trinta segundos e extensão a 72°C por trinta segundos. Após completar os 50 ciclos, os tubos foram incubados a 72°C por um minuto antes de resfriar à 4°C. Em todas as reações realizadas foram utilizadas linhagens de referência internacional como controle positivo e negativo, *S. epidermidis* ATCC 35984 (produtora de biofilme) e um controle negativo *S. epidermidis* ATCC 12228.

Tabela 1: Oligonucleotídeos para a detecção dos genes *icaA*, *icaD* e *icaC*

| <i>Função</i> | <i>Nome</i> | <i>Seqüência</i> | <i>Produto amplificado (pb)</i> |
|---------------|--------------|--------------------------------|---------------------------------|
| <i>Primer</i> | <i>icaA1</i> | ACA GTC GCT ACG AAA AGA AA | 103 |
| <i>Primer</i> | <i>icaA2</i> | GGA AAT GCC ATA ATG ACA AC | 103 |
| <i>Primer</i> | <i>icaD1</i> | ATG GTC AAG CCC AGA CAG AG | 198 |
| <i>Primer</i> | <i>icaD2</i> | CGT GTT TTC AAC ATT TAA TGC AA | 198 |
| <i>Primer</i> | <i>icaC1</i> | TAA CTT TAG GCG CAT ATG TTT | 400 |
| <i>Primer</i> | <i>icaC2</i> | TTC CAG TTA GGC TGG TAT TG | 400 |

Fonte: Arciola et al. 2005

Visualização dos produtos amplificados

A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 2% preparado em tampão 1,0 X TBE e corado com SYBR® safe. O tamanho dos produtos amplificados foi comparado com o padrão de 100 pares de base e posteriormente fotografados sob transiluminação UV.

Estudo da produção de biofilme

Pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em tubo de Christensen et al. (1982).

Para a pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em tubo, colônias isoladas de estafilococos em ágar sangue foram inoculadas em tubos de 12,0 x 75,0 mm contendo 2,0 ml de caldo Trypticase Soja (TSB - Difco) e incubadas a 37°C por 48h, sem agitação. Posteriormente, o conteúdo foi desprezado e alíquotas de 1,0 ml de solução aquosa a 0,4% de azul tripan (Sigma) foram adicionadas em cada tubo. Após suave agitação, para garantir a coloração do material aderido à superfície interna dos tubos, o corante foi desprezado. O resultado positivo foi indicado pela presença de uma camada de material corado aderido à parede interna dos tubos. A presença de um anel corado somente na superfície de contato líquido-ar, não foi considerado como resultado positivo.

Pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em placa de poliestireno de Christensen et al. (1985) modificado.

A pesquisa da produção de biofilme em placas de cultura proposto por Christensen et al. (1985), apresenta bases espectrofotométricas, baseando-se na densidade óptica (DO) do material aderente produzido pela bactéria.

Foram utilizadas culturas em TSB incubadas por 24 horas e posteriormente diluídas a 1:1 com TSB preparado com 2% de glicose em placas, previamente esterilizadas, de 96 cavidades com fundo plano. Os poços foram preenchidos em quaduplicata com 200 µl da cultura diluída, nos quais também foram colocadas amostras controle: controle positivo, negativo e um com TSB puro e incubado por 24 horas à 37°C. Então o conteúdo de cada poço foi aspirado cuidadosamente e lavado quatro vezes com 200µl de tampão fosfato salina (PBS), pH 7,2. A temperatura ambiente, as placas foram secas em 1 hora. A seguir os poços foram corados com cristal violeta a 2% por um minuto e aspirado o excesso por meio da lavagem das placas com água destilada. Novamente as placas foram secas a temperatura ambiente por mais 1 hora e então realizada a leitura da densidade óptica no leitor de Elisa da marca Labssystem modelo Multiskan EX. Uma vez que não dispúnhamos do filtro de 570 nm, utilizado no estudo de Christensen *et al.* (1985), adaptamos a técnica recorrendo a dois novos filtros, de comprimento de onda, 492 nm e 540 nm, próximos ao recomendado. Após esta primeira leitura as placas foram preenchidas com etanol 95% e depois de 5 minutos o conteúdo foi transferido para novas placas, nas quais novas leituras foram realizadas.

Pesquisa da produção de biofilme pelo método do Agar Congo Vermelho (CRA) de Arciola et al. (2001).

A caracterização fenotípica da produção de biofilme foi estudada pela cultura de amostras de *Staphylococcus aureus* e ECN em placas de Ágar Congo Vermelho (CRA) proposto por Arciola et al.(2001). Placas de CRA (0,8g de corante vermelho congo e 36 g de sacarose para 1 litro de Infusão de Cérebro e Coração – BHI) foram inoculadas e incubadas aerobicamente por 24 horas à 37°C e subsequente “overnight” à temperatura ambiente. No CRA, espécies produtoras de biofilme formarão colônias pretas, enquanto que as não produtoras formarão colônias vermelhas.

Análise Estatística

Os testes de avaliação de sensibilidade e especificidade (Sox, 1986, Fletcher et al., 1991) foram embasados na comparação entre os métodos fenotípicos testados na detecção da produção de biofilme e a técnica de PCR, tida como padrão ouro para a detecção dos genes envolvidos na síntese de biofilme; sendo que foram consideradas amostras biofilme positivas todas aquelas que apresentaram pelo menos um dos genes pesquisados.

Para a análise da correlação entre os métodos, foi utilizado o Teste de Proporções, no qual o nível de significância foi fixado em $p < 0,05$ (Curi, 1997).

ÉTICA

Todos os procedimentos seguidos estiveram de acordo com os padrões éticos do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, aprovado em 04 de agosto de 2008 (Of. 314/08 – CEP).

RESULTADOS

Amostras

A partir de isolados de materiais clínicos provenientes de recém-nascidos internados na Unidade de Tratamento Intensivo (UTI-Neonatal), foram estudadas 50 amostras de *S. aureus* e 50 de estafilococos coagulase-negativa (ECN).

Os materiais clínicos dos quais foram isolados estes microrganismos foram: sangue, cânula, dreno torácico, cateter e secreções. Das 100 amostras estudadas, 49 foram de hemocultura, 19 de secreções, 20 de ponta de cateter, 10 de ponta de cânula e duas de dreno torácico.

Com relação ao material clínico em que foram isolados *S. aureus*, 22 (44%) foram de hemocultura, 15 (30%) de secreções e 13 (26%) de corpos estranhos.

Identificação de ECN

A distribuição das amostras de ECN, segundo a espécie e ilustrada na figura 1, revela que o *S. epidermidis* foi a espécie mais freqüentemente isolada, representando 68% da população de ECN estudada.

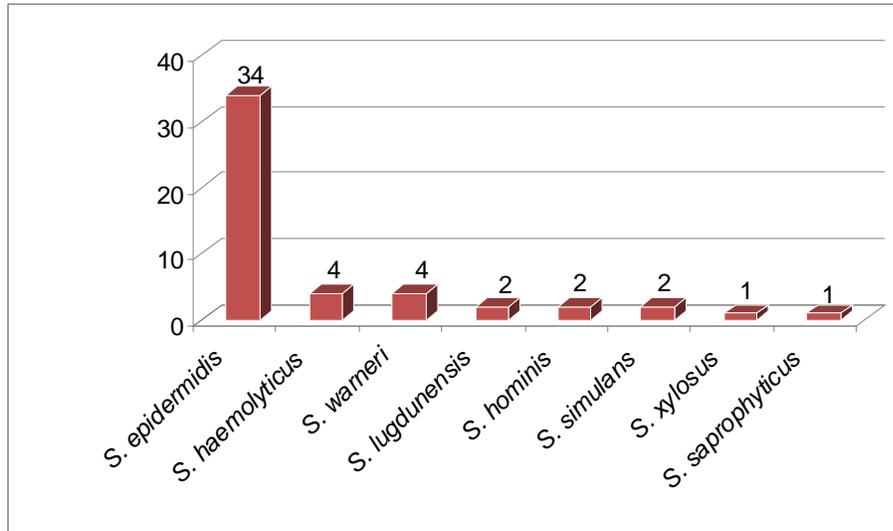


Figura 1- Distribuição das espécies de ECN isoladas de recém-nascidos.

Das 50 amostras de ECN, houve prevalência quanto ao material clínico isolado, de hemocultura (54%), seguida de corpos estranhos (38%) e por último de secreções (8%). Das 27 hemoculturas analisadas, em 20 (74,1%) foram isolados *S. epidermidis*, três (11,1%) *S. haemolyticus*, dois (7,4%) *S. lugdunensis*, um (3,7%) *S. simulans* e um (3,7%) *S. warneri*. Nas 19 amostras isoladas a partir de corpos estranhos, em 12 (63,2%) foram isolados *S. epidermidis*, três (15,8%) *S. warneri*, dois (10,4%) *S. hominis*, um (5,3%) *S. saprophyticus*, e um (5,3%) *S. xylosus*. Já nas quatro amostras isoladas de secreções, em duas (50%) encontramos *S. epidermidis*, uma (25%) *S. haemolyticus* e uma (25%) *S. simulans*.

Estudo da Produção de Biofilme

Detecção de genes icaA, icaC e icaD específicos para produção de biofilme

A presença dos genes *icaA* (103 pb), *icaC* (400 pb) e *icaD* (198 pb) foi demonstrada pela amplificação dos fragmentos correspondentes (figuras 2, 3 e 4).

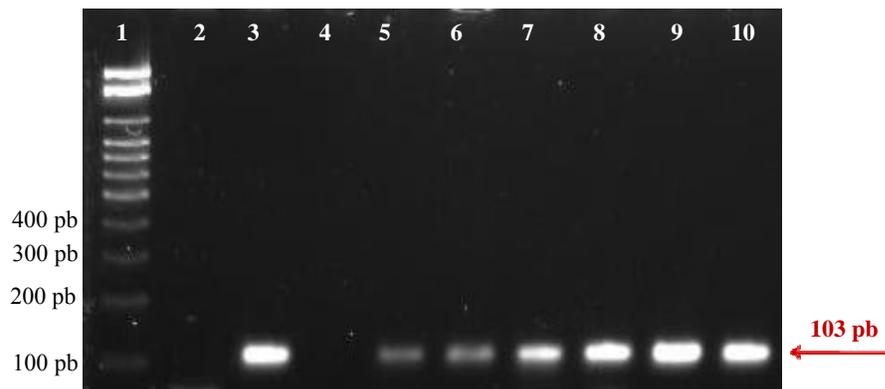


Figura 2: Gel de agarose 2% corado com SYBR® Safe, representando a amplificação do gene *icaA* (103pb). Linha 1: marcador de 100 pares de base; Linha 2: controle negativo; Linha 3: controle positivo; Linha 4: amostra negativa; Linhas 5 a 9: amostras positivas.

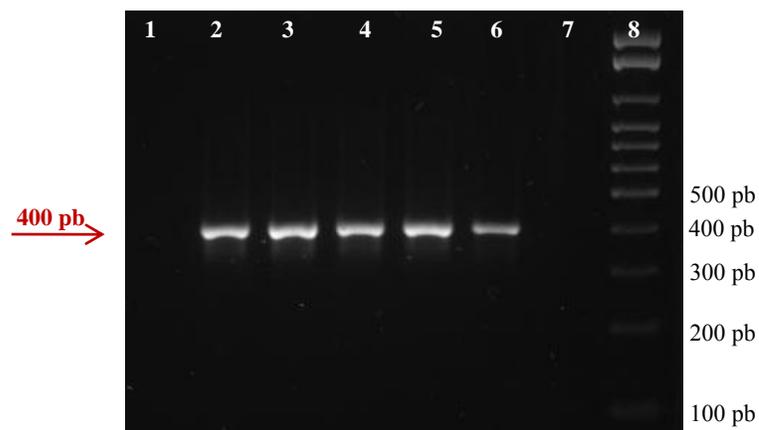


Figura 3: Gel de agarose 2% corado com SYBR® Safe, representando a amplificação do gene *icaC* (400 pb). Linha 1: amostra negativa; Linhas 2 a 5: amostras positivas; Linha 6: controle positivo; Linha 7: controle negativo; Linha 8: marcador de 100 pares de base.

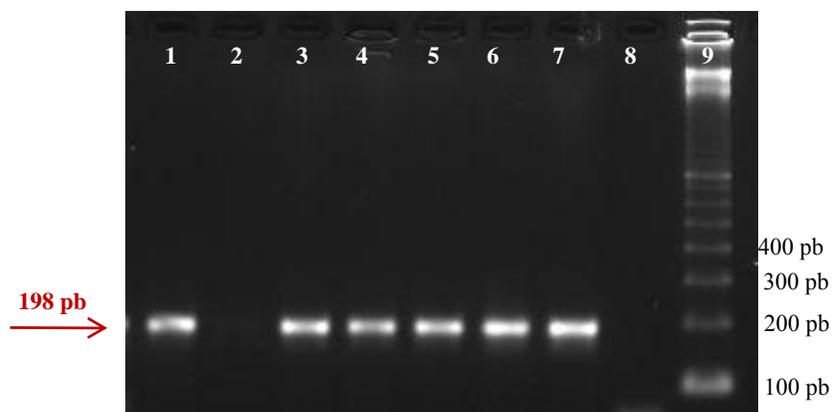


Figura 4: Gel de agarose 2% corado com SYBR® Safe, representando a amplificação do gene *icaD* (198 pb). Linhas 1, 3 a 6: amostras positivas; Linha 2: amostra negativa; Linha 7: controle positivo; Linha 8: controle negativo; Linha 9: marcador de 100 pares de bases.

Em amostras de ECN houve a presença dos três genes concomitantemente em 43 (86%) amostras, duas (4%) amostras apresentaram somente *icaA* e *icaD*, duas (4%) apenas *icaA* e três (6%) amostras não apresentaram nenhum dos genes estudados. A distribuição dos genes de acordo com a espécie de ECN e *S. aureus* está representada na tabela 2.

Tabela 2 – Distribuição dos genes *ica* de acordo com a espécie.

| <i>Espécies</i> | <i>icaA, icaC e icaD</i> | <i>icaA e icaD</i> | <i>icaA</i> | <i>Gene (-)</i> |
|-------------------------|--------------------------|--------------------|-------------|-----------------|
| <i>S. aureus</i> | 22 | 28 | 0 | 0 |
| <i>S. epidermidis</i> | 30 | 1 | 1 | 2 |
| <i>S. haemolyticus</i> | 3 | 0 | 1 | 0 |
| <i>S. warneri</i> | 4 | 0 | 0 | 0 |
| <i>S. hominis</i> | 1 | 0 | 0 | 1 |
| <i>S. simulans</i> | 1 | 1 | 0 | 0 |
| <i>S. xylosum</i> | 1 | 0 | 0 | 0 |
| <i>S. lugdunensis</i> | 2 | 0 | 0 | 0 |
| <i>S. saprophyticus</i> | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Total | 65 | 30 | 2 | 3 |

Já nas 50 amostras de *S. aureus* incluídas no estudo, todas foram positivas para pelo menos um dos genes do operon *ica* pesquisados (*icaA*, *icaC* e *icaD*): 28 (56%) amostras apresentaram os genes *icaA* e *icaD*, 22 (44%) amostras os três genes concomitantemente, e nenhuma amostra se mostrou negativa para a presença dos genes estudados.

Pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em tubo de Christensen et al. (1982).

Na pesquisa da produção de biofilme pela técnica de aderência em tubo de borossilicato (figura 5), das 50 amostras de ECN estudadas, em 42 (84%) foram observadas a produção de biofilme na parede do tubo, enquanto que oito (16%) amostras se mostraram negativas para essa técnica. Já em amostras de *S. aureus*, 49 (98%) produziram biofilme na parede do tubo.



Figura 5: A) Biofilme negativo.
B) Biofilme positivo.

Segundo os testes estatísticos, o método do tubo para *S. aureus* apresentou sensibilidade de 98% e especificidade de 100%. Já para as amostras de ECN, a sensibilidade foi de 85% e a especificidade de 33,3%.

Pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em placa de poliestireno de Christensen et al. (1985) modificado.

Padronização da técnica proposta por Christensen et al. (1985)

Para determinar os valores a serem considerados como ponto de corte foram repetidos os mesmos procedimentos com uma placa contendo TSB puro. Feita a leitura, com os filtros de 492 nm e 540 nm, foi calculado a média (M) e o desvio padrão (DP) da placa em cada comprimento de onda obtendo-se os seguintes valores mostrados na tabela 3.

Tabela 3: Valores de média e desvio padrão.

| | <i>Placa seca</i> | | <i>Placa com etanol 95%</i> | |
|----------------------|-------------------|---------------|-----------------------------|---------------|
| Filtro | 492 nm | 540 nm | 492 nm | 540 nm |
| Média | 0,043 nm | 0,059 nm | 0,072 nm | 0,276 nm |
| Desvio Padrão | 0,003 nm | 0,007 nm | 0,014 nm | 0,102 nm |

Para a obtenção do ponto de corte multiplicou-se o desvio padrão por três e adicionou ao valor da média da amostra de TSB puro do mesmo comprimento de onda. Os resultados foram assim classificados: não aderente com valores da densidade óptica iguais ou menores que o ponto de corte, fraco aderente com valores acima do ponto de corte até o valor da multiplicação deste por dois, e acima desse valor a amostra foi considerada fortemente aderente como segue na tabela 4.

Tabela 4: Valores de ponto de corte.

| | <i>Placa seca (492nm)</i> | <i>Placa seca (540nm)</i> | <i>Placa com etanol 95% (492nm)</i> | <i>Placa com etanol 95% (540nm)</i> |
|-----------------------|---|---|---|---|
| Não aderente | $DO \leq 0,052 \text{ nm}$ | $DO \leq 0,08 \text{ nm}$ | $DO \leq 0,114 \text{ nm}$ | $DO \leq 0,582 \text{ nm}$ |
| Fraco aderente | $0,052 \text{ nm} > DO \leq 0,104 \text{ nm}$ | $0,08 \text{ nm} > DO \leq 0,16 \text{ nm}$ | $0,114 \text{ nm} > DO \leq 0,228 \text{ nm}$ | $0,582 \text{ nm} > DO \leq 1,164 \text{ nm}$ |
| Forte aderente | $DO > 0,104 \text{ nm}$ | $DO > 0,16 \text{ nm}$ | $DDO > 0,228 \text{ nm}$ | $DO > 1,164 \text{ nm}$ |

A partir destes valores calculados, as amostras analisadas foram tidas como positivas quando seu valor de ponto de corte correspondia à classificação de fraco aderente ou forte aderente, e em negativas quando não aderentes. A partir daí foi calculada a sensibilidade e especificidade para cada situação, tomando como padrão-ouro a técnica de PCR. Isto foi feito para que pudéssemos analisar qual das leituras realizadas é a melhor para esse método.

Os valores de sensibilidade e especificidade para cada microrganismo e para cada leitura estão descritos na tabela 5.

Tabela 5 - Valores de sensibilidade e especificidade para cada microrganismo.

| | | <i>Placa seca (492nm)</i> | <i>Placa seca (540nm)</i> | <i>Placa com etanol 95% (492nm)</i> | <i>Placa com etanol 95% (540nm)</i> |
|------------------|---|-------------------------------|-------------------------------|---|---|
| <i>S. aureus</i> | S | 84% | 98% | 90% | 100% |
| | E | 100% | 100% | 100% | 100% |
| ECN | S | 76,6% | 85% | 79% | 87% |
| | E | 100% | 100% | 100% | 100% |

S: sensibilidade; E: especificidade.

De acordo com a análise estatística, podemos afirmar que a melhor leitura é feita na placa com etanol 95% com o filtro de 540 nm, isso porque foi a leitura que apresentou a melhor sensibilidade e especificidade para ambos os microrganismos, e portanto foi utilizada para a análise dos resultados.

Das amostras de *S. aureus* estudadas, todas foram positivas, sendo que 12 (24%) amostras foram classificadas como fracas aderente e 38 (76%) como fortes aderente. Já nas amostras de ECN, nove (18%) foram não aderentes, sendo que destas, três (33,3%) foram negativas pela técnica de PCR; 24 (48%) foram fracas aderentes e 17 (34%) foram fortes aderentes.

Pesquisa da produção de biofilme pelo método do Agar Congo Vermelho (CRA) de Arciola et al. (2001).

Na pesquisa da produção de biofilme pelo método do CRA foi possível a visualização de quatro cores de colônias: pretas, bordô escura, bordô metálica e somente bordô.

A partir disto, foi feita análise estatística da sensibilidade e especificidade para cada caso de duas maneiras: primeiramente foi considerada somente a coloração preta como positiva e em um segundo as colorações preta e bordô escura como positivas; sempre tendo como padrão-ouro a técnica de PCR. Foram obtidos os seguintes resultados descritos na tabela 6.

Tabela 6 – Valores de sensibilidade e especificidade para cada microrganismo.

| | | <i>Pretas</i> | <i>Pretas e bordô escura</i> |
|------------------|----------------|---------------|------------------------------|
| <i>S. aureus</i> | Sensibilidade | 46% | 98% |
| | Especificidade | 100% | 100% |
| ECN | Sensibilidade | 49% | 79% |
| | Especificidade | 100% | 100% |

Como podemos observar na tabela 6, quando consideramos positivas as colônias que se apresentam nas cores preta ou bordô escura, a sensibilidade da técnica é maior para ambos os microrganismos, portanto, foram consideradas como positivas as colônias que se apresentaram tanto na cor preta como bordô escura.

Nas amostras de *S. aureus*, todas foram positivas pela técnica, sendo que 23 (46%) apresentaram colônias pretas e 26 (52%) colônias bordô escuras. Já nas amostras de ECN tivemos 23 (46%) colônias pretas, 14 (28%) bordô escuras e 13 (26%) bordô. Além dessas colorações, também pudemos observar que quatro amostras de ECN, pertencentes à espécie *S. warneri*, apresentavam colônias com aspecto metalizado, o que não ocorreu em mais nenhuma amostra de outra espécie.

Comparação entre os Métodos Fenotípicos

A comparação entre os métodos fenotípicos testados na detecção da produção de biofilme foram embasados na técnica de PCR, tida como padrão ouro. Foram consideradas amostras biofilme positivas todas aquelas que apresentaram pelo menos um dos genes do operon *ica* pesquisados.

Tabela 7 – Comparação entre os métodos utilizados.

| | | | Biofilme positivo* | Biofilme Negativo* | Sensibilidade | Especificidade |
|-----------------------|------------------|--------------|---------------------------|---------------------------|----------------------|-----------------------|
| Teste do Tubo | <i>S. aureus</i> | Aderente | 49 | 0 | 98% | 100% |
| | | Não-aderente | 1 | 0 | | |
| | ECN | Aderente | 38 | 2 | 85% | 33,3% |
| | | Não-aderente | 9 | 1 | | |
| Teste da Placa | <i>S. aureus</i> | Aderente | 50 | 0 | 100% | 100% |
| | | Não-aderente | 0 | 0 | | |
| | ECN | Aderente | 41 | 0 | 87% | 100% |
| | | Não-aderente | 6 | 3 | | |
| Teste CRA | <i>S. aureus</i> | Aderente | 49 | 0 | 98% | 100% |
| | | Não-aderente | 1 | 0 | | |
| | ECN | Aderente | 37 | 0 | 79% | 100% |
| | | Não-aderente | 10 | 3 | | |

* Detecção de biofilme baseado na técnica de PCR.

Como foi possível observar o método que apresentou melhor sensibilidade (100% e 87%) e especificidade (100%) para *S. aureus* e ECN, respectivamente, foi o método de aderência em placa de poliestireno.

DISCUSSÃO

Os microrganismos mais frequentemente envolvidos com infecções em unidades de terapia intensiva (UTIs) neonatais são os Gram positivos, com destaque para o *S. aureus* considerado o mais importante agente tanto de infecções endêmicas quanto de surtos, seguido pelo *S. epidermidis*, que é relacionado a episódios de sepse associados a neonatos com cateter venoso central (Drews et al., 1995; Gaynes et al., 1996). Os recém-nascidos uma vez hospitalizados, podem adquirir doenças relacionadas com infecções através de

contato (profissionais de saúde, mãe), ou por transmissão indireta através de equipamentos instrumentais contaminados (Stillman et al., 1987; Brady, 2005).

A produção do biofilme por esses microrganismos tem sido enfatizada por vários autores como um indicador epidemiológico de infecção em pacientes pediátricos (Fitzgerald et al. 2005, Hall et al. 1987). Atualmente, devido ao grande número de infecções relacionadas a microrganismos produtores de biofilme faz-se necessário a utilização de uma metodologia confiável para seu diagnóstico. Arciola et al. (2001) mostram que técnicas moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) na identificação dos genes *ica*, responsáveis pela síntese de biofilme, é uma ferramenta importante, uma vez que a técnica é considerada simples, rápida e confiável, além de requerer quantidades mínimas de DNA.

No presente estudo, a presença dos genes *icaA*, *icaC* e *icaD* foi investigada em ECN e *S. aureus*. Todas as amostras de *S. aureus* (100%) analisadas apresentaram pelo menos um dos genes estudados (Fitzpatrick et al., 2005). Já nas amostras de ECN, encontramos 94% das amostras positivas para pelo menos um dos genes pesquisados. Assim, observamos neste trabalho, que houve a produção de biofilme em todas (100%) as amostras de *S. aureus* isoladas de recém-nascidos (Cramton et al., 1999; Fowler et al., 2001 e Arciola et al., 2001), e em 94% de ECN. Lopez et al. (2004), apontam para uma importante diferença entre *S. epidermidis* e o *S. aureus*, uma vez que o primeiro por não ser capaz de produzir grande quantidade de enzimas e toxinas, tem como característica primordial ocasionar infecções subagudas ou crônicas; além disso é tratado como um importante agente de infecções hospitalares por sua capacidade de formação do biofilme. Nesse estudo *S. aureus* esteve mais associado significativamente ($p < 0,05$) com infecção do que o *S. epidermidis*. Esses resultados estão de acordo com a literatura, que destaca o *S. aureus* com

espécie sempre considerada patogênica e associada a uma série de infecções e intoxicações. Os dados encontrados revelaram maior proporção de amostras produtoras de biofilme em *S. aureus* do que em *S. epidermidis* (100 versus 94%), assim como verificado por Arciola et al. (2001).

Para *S. epidermidis*, a percentagem de amostras produtoras de biofilme foi de 94%, porém as amostras em questão foram isoladas principalmente de hemoculturas (61,2%), corpos estranhos (35,5%) do que em secreções (3,3%). Esses dados estão de acordo com os já constatados por nosso grupo (Cunha et al., 2002). Além das técnicas moleculares utilizamos o método qualitativo Ágar Congo Vermelho (CRA), proposto por Arciola et al. (2001). Através deste, todas as amostras de *S. aureus* produtoras de biofilme foram detectadas, porém em ECN apenas 74%, indicando a baixa correlação desse método para a determinação de produção de biofilme em amostras de ECN (Fitzpatrick et al., 2002), uma vez que 13 amostras (26%) negativas para esta técnica, 10 (72%) apresentavam os três genes estudados, dando um indicativo de falso-negativo nas análises (Chaieb et al., 2005). Apesar da boa correlação que apresentou com as amostras de *S. aureus*, este se mostrou um método subjetivo e não confiável quanto a leitura das colorações, pois fundamentou-se nas impressões e na experiência dos responsáveis pela leitura. Portanto, como afirmado por Fitzpatrick et al. (2005), o método de CRA pode ser considerado de fácil execução, principalmente quando comparado com a análise molecular dos genes envolvidos, porém é um método impreciso na determinação da capacidade de formação de biofilme no diagnóstico laboratorial de isolados clínicos.

O método qualitativo, mais comumente utilizado, é o teste de aderência em tubo de borossilicato proposto por Christensen et al. (1982). Alguns autores como Cunha et al. (2006) e Morales et al. (2004) fizeram uso deste método obtendo resultados importantes,

quanto à sensibilidade e a especificidade, fornecendo diagnóstico confiável e adequado para uso em rotina. Essas afirmações foram confirmadas em nosso trabalho na utilização deste método para a espécie *S. aureus*, onde houve detecção com 98% de sensibilidade e 100% de especificidade das amostras produtoras de biofilme, porém em ECN, o resultado não foi tão satisfatório, com uma sensibilidade de 85% e inadequada especificidade (33,3%).

Neste trabalho, também foi usado o método quantitativo de aderência em placa de poliestireno, proposto por Christensen et al. (1985) modificado e padronizado em nosso laboratório. Nesta técnica foram feitas diversas leituras em diferentes condições sendo que as leituras em placas com etanol 95% e filtro de 540 nm, foram as que apresentaram melhor sensibilidade (100% para *S. aureus* e 87% para ECN) e especificidade (100% para *S. aureus* e ECN) e portanto usadas como parâmetro para a avaliação. Todas as amostras *S. aureus* positivas pela técnica de PCR, apresentaram-se também positivas para esta técnica, sendo que 24% foram fracas aderentes e 76% fortes aderentes e portanto se mostrando um bom método para a identificação de produção de biofilme. Entretanto, nas amostras de ECN, apesar de a técnica conseguir identificar 41 amostras dentre 47 positivas pela PCR, esta apresentou resultados falso-negativos para seis amostras produtoras de biofilme.

Assim sendo, na avaliação da confiabilidade dos três métodos utilizados na detecção de biofilme em *S. aureus*, frente ao padrão ouro (PCR), foi possível observar que o método que melhor se correlacionou em relação aos genótipos positivos do biofilme, foi o método de aderência em placa de poliestireno, com melhor sensibilidade (100%) e especificidade (100%).

Os outros dois métodos qualitativos, teste do tubo e CRA, apresentaram boa correlação entre si, mesma sensibilidade e especificidade (98% e 100%, respectivamente). Apesar do método de CRA ter se mostrado subjetivo na leitura das colorações das colônias,

este apresentou em nossos estudos, uma boa correlação entre os três métodos, mesmo sendo contestado por Marthur et al. (2006) onde ele não encontrou boa correlação deste método com os outros anteriormente apresentados.

Já em relação à comparação entre os três métodos utilizados na detecção de biofilme em ECN, foi possível observar que o método que apresentou a melhor correlação com a técnica padrão-ouro, foi também o teste da placa de poliestireno, apresentando sensibilidade de 87% e especificidade de 100%. Os outros dois métodos utilizados, teste do tubo e CRA, apresentaram a menor especificidade (33,3%) e sensibilidade (79%), respectivamente, os quais diferem do encontrado na literatura (Morales et al., 2004; Cunha et al., 2006; James et al., 1995). Além disso, com o método do CRA, observamos uma coloração com aspecto metálico que não havia sido descrita antes na literatura a qual associamos esta característica fenotípica peculiar com a espécie *S. warneri*.

A partir do estudo desenvolvido e dos resultados expostos, podemos observar que os métodos fenotípicos para a detecção da produção de biofilme em *S. aureus* mostraram-se confiáveis (adequadas sensibilidades e especificidades) para serem usados na rotina laboratorial de identificação do biofilme, além de serem mais baratos e rápidos no diagnóstico. Entretanto, não observamos a mesma correlação das metodologias em ECN, uma vez que os métodos fenotípicos não se mostraram confiáveis (menores sensibilidades e especificidades) na detecção do biofilme. Assim, para ECN, a forma mais segura para a detecção de biofilme, mostrou-se ser a técnica de PCR (padrão-ouro), mesmo sendo mais cara e trabalhosa. Desta forma, nota-se a necessidade de se desenvolver novos métodos ou aperfeiçoar os já existentes de modo a torná-los mais precisos e eficientes.

As análises dos dados encontrados em nosso estudo permitem concluir a importância da produção de biofilme em amostras de ECN e destacam a produção desse

fator de virulência também em *S. aureus* isolados de infecções nosocomiais, o que pode acarretar em sérios problemas de saúde pública no que se refere à infecções neonatais, principalmente em recém-nascidos que apresentam os fatores de risco, como a menor idade e uso de procedimentos invasivos, cateteres e ventilação mecânica. Em adição, a produção de biofilme é também um fator importante para a falha da antibioticoterapia de pacientes com cateteres e outros biomateriais, contribuindo para a ocorrência de infecções recidivantes e o surgimento de patógenos multi-resistentes. Estratégias terapêuticas que interfiram na expressão ou atividade dos genes ou produtos envolvidos com a produção do biofilme necessitam serem descobertas para proporcionar novas e benéficas terapias alternativas.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer às crianças da UTI neonatal do HC/FMB – UNESP de Botucatu, incluídas neste estudo, sem as quais este trabalho não poderia ser efetivado. Assim como a agência de fomento FAPESP, pelo financiamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agvald-öhman C, Lund B, Edlund C 2004. Multiresistant coagulase-negative staphylococci disseminate frequently between intubated patients in a multidisciplinary intensive care unit. *Critical Care* 8(1): 42-47.

Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L 2001. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production of Staphylococcal strains from catheter-associated infections. *Journal of Clinical Microbiology* 39(6): 2151-2156.

Arciola CR, Gamberini S, Campoccia D, Visai L, Speziale P, Baldassari L, Montanaro L 2005. A multiplex PCR method for the detection of all five individual genes of *ica* locus in *Staphylococcus epidermidis*. A survey on 400 clinical isolates from prosthesis-associated infections. doi: 10.1002/jbm.a.30445.

Baselga R, Albizu I, Cruz M, Cacho E, Barberan M, Amorena B 1993. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implications in colonization and virulence. *Infection and Immunity* 61(11): 4857-4862.

Becker K, Bierbaum G, Eiff C, Engelmann S, Götz F, Hacker J, Hacker M, Peters G, Rosenstein R 2007. Understanding the physiology and adaptation of staphylococci: A post-genomic approach. *Int. J. Med. Microbiol.*, doi: 10.1016/j.ijmm.2007.04.004.

Brady MT 2005. Health care-associated infections in the neonatal intensive care unit. *Am J Infect Control* 33: 268-75.

Cafiso V, Bertuccio T, Santagati M, Campanile F, Amicosante G, Perilli MG, Selan L, Artini M, Nicoletti G, Stefani S 2004. Presence of the *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. *Clinical Microbiology and Infection* 10(12): 1081-1088.

Caputy GG, Costerton W 1982. Morphological examination of the glycocalyxes of *Staphylococcus aureus* strains wiley and smith. *Infection and Immunity* 36(2): 759-767.

Chaieb K, Mahdouani K, Bakhrouf A 2005. Detection of *icaA* and *icaD* loci polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needles in a dialysis unit. *J Hosp Infect* 61: 225-230.

Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH 1982. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect and Immun* 37(1): 318-326.

Christensen GD, Simpson A, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH 1985. Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology* 22(6): 996-1006.

Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Gotz F 1999. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun* 67: 5427–5433.

Cunha MLRS, Rugolo LMSS, Lopes CAM 2006. Study of virulence factors in coagulase-negative staphylococci isolated from newborns. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 661-668.

Cunha MLRS, Lopes CAM, Rugolo LMSS, Chalita LVAS 2002. Significância clínica de estafilococos coagulase-negativa isolados de recém-nascidos. *Jornal de Pediatria* 78(4): 279-88.

Cunha MLRS, Sinzato YK, Silveira LVA 2004. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative Staphylococci. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99(8): 855-860.

Curi PR 1997. *Metodologia e análise de pesquisa em Ciências Biológicas*, 1ª ed. Botucatu: Tipomic.

Drews MB et al 1995. Low birth weight and nosocomial infection in a neonatal intensive care unit. *Journal of Hospital Infection* 30: 65-71.

Fitzgerald RH, Richardson JF, Sane MJ 2005. Four apparent outbreaks of prosthetic valve endocardites caused by coagulase negative staphylococci. *Zentralbl. Bakteriologie, Supplementum* 14: 463-9.

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

Fitzpatrick F, Humphreys H, Smyth EG, Kennedy CA, O’Gara JP 2002. Environmental regulation of biofilm formation in intensive care unit isolates of *Staphylococcus epidermidis*. J Hosp Infect 52: 212-218.

Fletcher RH, Fletcher SW, Wagner EH 1991. Diagnóstico Epidemiologia Clínica, Porto Alegre: Artes Médicas 3: 68-107.

Fowler VG, Fey PD, Reller LB, Chamis AL, Corey GR, Rupp ME 2001. The intercellular adhesin locus *ica* is present in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from bacteremic patients with infected and uninfected prosthetic joints. Med Microbiol Immunol (Berl) 189: 127–131.

Gaynes RP et al 1996. Nosocomial infections among neonates in high-risk nurseries in the United States. Pediatrics 98: 357-351.

Gerke C, Krafts A, Sübmuth R, Schweitzer O 1998. Characterization of the *N*-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. J. Biol. Chem 273(29): 18586–18593.

Hall RT et al. 1987. Characteristic of coagulase-negative *Staphylococci* from infants with bacteremia. Pediatr. Infect. Dis. J. 6: 377-383.

James GA, Costerton JW 1995. Interspecies bacterial interactions in biofilms. J Ind Microbiol Biotechnol 15: 257-262.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC 1997. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, J.B. Lippincott, Philadelphia.

Lopez JVM et al. 2004. Simultaneous PCR detection of ica cluster and methicilin and mupirocin resistance genes in catheter-isolated *Staphylococcus*. Inter Microbiol 7: 63-66.

Mack D, Riedewald J, Rohde H, Magnus T, Feucht HH, Elsner HA, Laufs R, Rupp ME 1999. Essential functional role of the polysaccharide intercellular adhesin of *Staphylococcus epidermidis* in hemagglutination. Infection and Immunity 67(2): 1004-1008.

Mack D, Sabottke A, Dobinsky S, Rohde H, Horstkotte MA, Knobloch JKM 2002. Differential expression of methicillin resistance by different biofilm-negative *Staphylococcus epidermidis* transposon mutant classes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46(1): 178-183.

Marthur T, Singhal S, Upadhyay DJ, Fatman T, Rattan A 2006. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci*: An evaluation of three different screening method. Indian J Med Microbiol 24: 25-29.

Morales M et al. 2004. Biofilm: the microbial “bunker” for intravascular catheter-related infection. Support Care Cancer 12: 701-707.

Olsson E, Friberg Ö, Venizelos N, Koskela A, Källman J, Söderquist B 2007. Coagulase-negative staphylococci isolated from sternal wound infections after cardiac surgery: attachment to and accumulation on sternal fixation stainless steel wires. *APMIS* 115: 142-51.

Sox HC 1986. Probability theory in the use of diagnostic tests, *An Introduction to Critical Study of Literature*, *Ann. Inter. Med* 104: 60-66.

Stillman RI, Wenzel RP, Donowitz LG 1987. Emergence of coagulase negative staphylococci as major nosocomial bloodstream pathogens. *Infect Control* 8: 108-112.

Trilla A, Miro JM 1995. Identifying high risk patients for *Staphylococcus aureus* infections: skin and soft tissue infections. *J Chemother* 7(Suppl. 3):37-43.

Veenstra GJC, Cremers FFM, Dijk H, Flier A 1996. Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Bacteriol* 178(2): 537-541.

Vogel L, Sloos JH, Spaargaren J, Suiker I, Dijkshoorn L 2000. Biofilm production by *Staphylococcus epidermidis* isolates associated with catheter related bacteremia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 36: 139-141.

Whitener C et al. 1993. Endocarditis due to coagulase-negative staphylococci: microbiologic, epidemiologic, and clinical considerations. *Infectious Disease Clinics of North America* 7: 81-96.