



Instituto de  
Biociências

**unesp**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



PG-BGA

## Biofilme estafilocócico: prevenção, detecção da produção e determinação do perfil de resistência a antimicrobianos.

**ADILSON DE OLIVEIRA**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia de Parasitas e Microorganismos.

*Profª Adj. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha*

**BOTUCATU – SP  
2014**



**unesp**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



PG-BGA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Biofilme estafilocócico: prevenção, detecção da produção e  
determinação do perfil de resistência a antimicrobianos.

**ADILSON DE OLIVEIRA**

**MARIA DE LOURDES RIBEIRO DE SOUZA DA CUNHA**

**ORIENTADOR**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia de Parasitas e Microrganismos.

*Profª Adj. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha*

**BOTUCATU – SP  
2014**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Oliveira, Adilson.

Biofilme estafilocócico : prevenção, detecção da produção e determinação do perfil de resistência a antimicrobianos / Adilson Oliveira. - Botucatu, 2014

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Capes: 21201005

1. Biofilme. 2. Antibióticos. 3. Drogas - Resistência em microorganismos. 4. Estafilococos. 5. Reação em cadeia de polimerase.

Palavras-chave: Antibióticos; Biofilme; Métodos fenotípicos e genotípicos; Peptídeo RIP; Staphylococcus sp..

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho a minha esposa **Silvia Helena**, filhas **Flávia** e **Lisandra** que sempre me incentivaram e apoiaram na busca do crescimento pessoal e profissional.

Aos meus pais **Sebastião** (em memória) e **Luzia**, que dentro de suas possibilidades, sempre procuraram fazer o melhor por mim.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado força, determinação e coragem todos os dias,

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha, pelos ensinamentos, assistência e colaboração durante todo o período do curso,

Ao pessoal do laboratório de Bacteriologia, em especial as amigas Luiza Pinheiro, Valéria Catanelli Pereira, Carla Ivo Brito (em memória), Katheryne Martins Benini e ao amigo Danilo Flávio Moraes Ribola que estiveram comigo na execução do trabalho e pelos bons momentos que vivenciamos juntos,

Aos professores Ary Fernandes Jr., Eduardo Bagagli, Vera Lúcia M. Rall, Terue Sadatsune pelas trocas de experiências,

Aos funcionários do Instituto de Biociências, pela amizade e ajuda que sempre dispensaram a mim,

Aos funcionários da seção de pós-graduação pelo bom atendimento durante o curso,

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Auxílio Pesquisa - Processo: 2011/07285-5) e à Secretaria da Educação do Estado de São Paulo pelo suporte financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

A todos que de uma forma ou de outra, não menos importante que ninguém, estiveram comigo durante esse período.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>09</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>15</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>27</b>
<b>ARTIGO I .....</b>	<b>32</b>
Resumo .....	33
Abstract.....	35
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
Amostras .....	39
Identificação de <i>Staphylococcus</i> spp .....	40
Deteção de genes do operon <i>ica</i> específico para produção de biofilme .....	41
Expressão de genes do operon <i>ica</i> pela técnica de RT-PCR.....	43
Estudo da produção de biofilme .....	45
Pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em tubo de borossilicato .	45
Pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em placa de poliestireno .	46
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>48</b>
Amostras .....	48
Deteção dos genes <i>icaADBC</i> responsáveis pela produção de biofilme .....	50
Deteção da expressão dos genes <i>icaADBC</i> pela técnica de RT-PCR .....	53
Pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em tubo de borossilicato .	57
Pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em placa de poliestireno .	58
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>66</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>67</b>
<b>ARTIGO II.....</b>	<b>74</b>
Resumo .....	75
Abstract.....	76
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>77</b>

<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>79</b>
Amostras .....	80
Identificação dos microrganismos .....	80
Pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em placa de poliestireno .	81
Extração e amplificação do ácido nucléico (PCR) .....	82
Expressão dos genes do operon <i>ica</i> pela técnica de RT-PCR .....	83
Teste do polipeptídeo RIP na prevenção da formação de biofilme em pontas de cateteres com visualização através da microscopia eletrônica de varredura .....	86
Teste do polipeptídeo RIP na prevenção da formação de biofilme em placa de poliestireno .....	87
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>87</b>
Pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em placa de poliestireno .	87
Deteção da presença e expressão dos genes <i>icaADBC</i> pela técnica de RT-PCR .....	89
Teste do polipeptídeo RIP na prevenção da formação de biofilme em pontas de cateteres com visualização através da microscopia eletrônica de varredura.....	89
Teste do polipeptídeo RIP na prevenção da formação de biofilme em placa de poliestireno.....	99
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>101</b>
<b>AGRADECIMENTO.....</b>	<b>106</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>107</b>
<b>ARTIGO III .....</b>	<b>112</b>
Resumo .....	113
Abstract.....	115
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>117</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>118</b>
<b>Amostras .....</b>	<b>118</b>
Identificação dos microrganismos.....	119
Pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em placa de poliestireno.	119
Determinação da concentração inibitória mínima em células planctônica de <i>Staphylococcus</i> spp.....	121
Determinação da Concentração Bactericida mínima em biofilme de <i>Staphylococcus</i> spp.....	123
Análise estatística.....	125
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>125</b>

Pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em placa de poliestireno	125
Determinação da concentração inibitória mínima em células planctônicas de <i>Staphylococcus</i> spp.....	126
Determinação da concentração inibitória mínima em biofilme de <i>Staphylococcus</i> spp.....	127
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>134</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>137</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>139</b>
<b>CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>144</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>145</b>

## RESUMO

*Staphylococcus aureus* juntamente com outras espécies de estafilococos coagulase-negativa são importantes patógenos responsáveis por infecções nosocomiais associadas ao uso de dispositivos implantáveis. O fator mais importante na patogênese de infecções estafilocócicas associadas a estes dispositivos é a habilidade do patógeno de formar biofilme, que confere proteção contra o sistema imunológico do hospedeiro e da ação de antimicrobianos, sendo o Polissacarídeo de Adesão Intercelular (PIA) codificado pelo operon *icaADBC* o principal componente do biofilme estafilocócico. Esse estudo objetivou estudar a estrutura do biofilme de diferentes espécies de *Staphylococcus*, avaliar a antibioticoterapia utilizada para tratamento dessas infecções em células livres e em biofilme e alternativas para prevenção da formação de biofilme. Foram estudadas 200 amostras de *Staphylococcus* spp. sendo 50 da espécie *S. aureus* e 150 do grupo dos estafilococos coagulase-negativa (ECN), incluindo 50 amostras de *S. epidermidis*, 20 *S. haemolyticus*, 20 *S. warneri*, 20 *S. hominis*, 20 *S. lugdunensis* e 20 amostras de *S. saprophyticus* isoladas de pacientes do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB). As amostras foram submetidas à pesquisa dos genes *icaADBC* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e à expressão pela técnica de Transcriptase Reversa-PCR (RT-PCR). A produção de biofilme foi verificada através dos métodos fenotípicos de aderência ao tubo de borossilicato e na placa de poliestireno. A determinação da concentração inibitória mínima em células planctônicas e em biofilme foi testada para as drogas oxacilina, vancomicina, eritromicina, gentamicina, linezolida e sulfametoxazol-trimetropim pelo método de microdiluição em caldo. O teste do peptídeo (RIP) na prevenção da formação de biofilme foi realizado com cultura de bactérias em TSB glicose 2% com pontas de cateteres e visualização através da

microscopia eletrônica de varredura (MEV) e em placas de poliestireno. Pela técnica de PCR, 97 (48,5%) amostras foram positivas para o gene *icaA*, 64 (32%) para *icaB*, 102 (51,0%) para *icaC*, 160 (80%) para *icaD* e 20 (10%) não revelaram nenhum dos genes. O presente estudo revelou uma diferente combinação da expressão dos genes nas diferentes espécies estudadas, sendo o gene *icaC* o mais expresso em ECN e pouca expressão do gene *icaA*, o que justifica o fato da maioria das amostras não produzir biofilme no teste fenotípico. Do total de amostras 49 (24,5%) produziram biofilme, 26 expressando o gene *icaA*, 12 sem a expressão do *icaA* mas revelando outros genes do operon e 11 não expressaram os genes do operon *ica*, sugerindo a presença de um mecanismo alternativo (*ica*-independente) na formação de biofilme estafilocócico nessas amostras. A produção de biofilme e expressão dos genes *ica* foi mais frequente em *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*. Em relação ao teste com os antibióticos, nenhuma amostra planctônica foi resistente à vancomicina e linezolida. Em relação às células em biofilme o MIC aumentou em duas, quatro, oito e até dezesseis vezes em relação às células planctônicas, de forma mais frequente com a vancomicina e a eritromicina. Dos antimicrobianos testados a linezolida mostrou melhores resultados na inibição de estafilococos em biofilme, sem aumento no MIC quando comparado com células planctônicas e nenhuma amostra resistente. A concentração bactericida mínima para células do biofilme variou entre 8 e >256 µg/ml para oxacilina, 128 - >128 µg/ml para vancomicina, 256 - >256 µg/ml para eritromicina, 256 - >256 µg/ml para gentamicina, >64 µg/ml para linezolida e 32/608 - >32/608 µg/ml para sulfametoxazol/trimetoprim, sendo que mesmo altas concentrações desses antimicrobianos não foram capazes de eliminar os *Staphylococcus* spp. em biofilme. Os resultados revelaram inibição da formação de biofilme na presença de RIP em todas as amostras de ECN, porém não interferiu com a formação de biofilme por *S. aureus*. O

peptídeo RIP revelou ser uma importante ferramenta que futuramente poderá ser utilizada na prevenção de infecções causadas por ECN relacionadas à produção do biofilme.

## ABSTRACT

*Staphylococcus aureus*, together with other coagulase-negative staphylococci (CoNS), is an important pathogen that causes nosocomial infections associated with the use of implantable devices. The most important factor in the pathogenesis of staphylococcal infections associated with these devices is the ability of the pathogen to form a biofilm, which protects bacteria against the host immune system and against the action of antimicrobial drugs. The main component of staphylococcal biofilms is polysaccharide intercellular adhesin (PIA), which is encoded by the *icaADBC* operon. The objectives of this study were to investigate the structure of biofilms of different *Staphylococcus* species, to evaluate the effect of antibiotics used to treat these infections on planktonic and biofilm cells, and to identify alternatives for the prevention of biofilm formation. A total of 200 *Staphylococcus* spp., including 50 *S. aureus* and 150 CoNS strains (50 *S. epidermidis*, 20 *S. haemolyticus*, 20 *S. warneri*, 20 *S. hominis*, 20 *S. lugdunensis* and 20 *S. saprophyticus*), isolated from patients seen at the University Hospital of the Botucatu School of Medicine (HC-FMB), were studied. The presence of the *icaADBC* genes was investigated by the polymerase chain reaction (PCR) and their expression was determined by reverse transcriptase-PCR (RT-PCR). Biofilm formation was evaluated using the phenotypic method of adherence to borosilicate tubes and polystyrene plates. The minimum inhibitory concentration (MIC) of oxacillin, vancomycin, erythromycin, gentamicin, linezolid and sulfamethoxazole-trimethoprim for planktonic and biofilm cells was determined by the broth microdilution method. The effect of RNA-inhibiting peptide (RIP) on the prevention of biofilm formation was tested using bacterial cultures grown in TSB-2% glucose

containing catheter tips and visualization by scanning electron microscopy and on polystyrene plates. The *icaA* gene was detected by PCR in 97 (48.5%) strains, the *icaB* gene in 64 (32%), the *icaC* gene in 102 (51%), and the *icaD* gene in 160 (80%). Twenty (10%) strains did not carry any of the genes. The present study demonstrated a different combination of expression of these genes in the different species studied, with higher expression of the *icaC* gene and low expression of the *icaA* gene in CoNS, a finding that could explain the fact that most isolates did not produce a biofilm in the phenotypic test. Forty-nine (24.5%) of all strains produced a biofilm; of these, 26 expressed the *icaA* gene, 12 did not express this gene but carried other genes of the operon, and 11 did not express *ica* operon genes, suggesting the presence of an alternative (*ica*-independent) mechanism of staphylococcal biofilm formation in these strains. Biofilm formation and expression of the *ica* genes were more frequent in *S. aureus*, *S. epidermidis* and *S. saprophyticus*. Antimicrobial resistance testing showed that none of the planktonic samples was resistant to vancomycin or linezolid. With respect to biofilm cells, a two-, four-, eight- and up to 16-fold increase in MICs was observed compared to planktonic cells. This observation was more frequent for vancomycin and erythromycin. Among the antimicrobial drugs tested, linezolid showed the best performance in inhibiting staphylococci in the biofilm, without an increase in the MIC when compared to planktonic cells, and none of the strains was resistant to this drug. The minimum bactericidal concentration for biofilm cells ranged from 8 to >256 µg/ml for oxacillin, 128 to >128 µg/ml for vancomycin, 256 to >256 µg/ml for erythromycin, 256 to >256 µg/ml for gentamicin, >64 µg/ml for linezolid, and 32/608 µg/ml to >32/608 µg/ml for sulfamethoxazole-trimethoprim. Even the highest concentrations of these antibiotics were unable to eliminate *Staphylococcus*

spp. in the biofilm. The results showed the inhibition of biofilm formation in the presence of RIP for all CoNS strains studied; however, RIP did not interfere with biofilm formation by *S. aureus*. RIP was found to be an important tool that could be used in the future to prevent infections caused by CoNS related to biofilm formation

## INTRODUÇÃO GERAL

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são comensais da pele e mucosas do homem e outros mamíferos, estando entre os microrganismos mais isolados em microbiologia médica (1). Atualmente o gênero é composto por 49 espécies e 26 subespécies (2), pertencem à família Staphylococcaceae, são cocos Gram-positivos formando agrupamentos semelhantes a cachos de uvas, produtores da enzima catalase rotineiramente utilizada para diferenciar os estafilococos dos estreptococos e divididos em dois grupos também com base na produção de uma enzima, a coagulase que tem a capacidade de coagular o plasma sanguíneo (3). Os estafilococos produtores da enzima coagulase são denominados *Staphylococcus* coagulase-positiva, dentre as quais a espécie *Staphylococcus aureus* é a mais conhecida e estudada por produzir muitas toxinas que contribuem para a virulência dessa bactéria, aumentando sua habilidade de invadir o corpo e danificar os tecidos, provocando desde infecções superficiais como foliculite e abscessos até infecções sistêmicas. O fato dessas bactérias colonizarem a pele e mucosas, facilita a contaminação de dispositivos médicos, o que torna esses microrganismos importantes patógenos envolvidos em infecções nosocomiais, principalmente as relacionadas ao uso de corpos estranhos em pacientes imunocomprometidos (1, 4).

Os estafilococos que não produzem a enzima coagulase são denominados estafilococos coagulase-negativa (ECN), eram considerados comensais, mas nas duas últimas décadas os ECNs foram reconhecidos como agentes causadores de doenças humanas. Várias espécies foram descritas até o momento, entre as mais comuns envolvidas em infecções humanas estão o *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. saccharolyticus*, *S. warneri*, *S. lugdunensis*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii* (1).

Bacteremias causadas por ECN geralmente estão associadas a procedimentos invasivos com dispositivos médicos, sendo comuns em neonatos, pacientes com câncer ou internados em UTI e que normalmente estão com o sistema imunológico debilitado. Os cateteres vasculares são as principais portas de entrada por serem facilmente colonizados por microrganismos da microbiota normal da pele e mucosas (5, 6).

Tanto em *S. aureus* como nos ECNs, o que facilita o desenvolvimento de infecções associadas a dispositivos médicos é a capacidade de aderência e fixação dessas bactérias em superfícies de biomateriais (7, 8). Entre os vários mecanismos envolvidos na adesão bacteriana, a produção de biofilme desempenha um importante papel (7, 9). Os biofilmes são comunidades microbianas “sésseis” caracterizadas por células ligadas a um substrato e uma as outras envolvidas em uma matriz extracelular. As bactérias dentro do biofilme apresentam um fenótipo diferente em relação à taxa de crescimento e transcrição de genes. No caso dos ECNs, esse mecanismo é considerado um dos principais fatores de virulência, protegendo esses microrganismos da ação de antibióticos administrados para o tratamento e do sistema imunológico, sendo muitas vezes necessária a remoção do corpo estranho para obter a cura (10,11).

A matriz do biofilme pode ser composta de polissacarídeos, proteínas ou DNA extracelular produzidos pelas próprias bactérias, a composição pode variar de espécie para espécie ou mesmo em uma mesma espécie dependendo da origem das amostras (12).

Quanto à formação da estrutura do biofilme, este processo ainda está sendo muito estudado com experimentos utilizando diferentes espécies de bactérias, um dos modelos propostos é a formação em três etapas: 1) adesão e colonização da superfície 2) maturação, onde ocorre a adesão intercelular com a proliferação e acumulação de células em multicamadas, sendo esta adesão promovida por uma matriz polimérica de

origem polissacarídica ou protéica 3) desprendimento do biofilme com liberação das células (13).

Para facilitar a compreensão deste processo, alguns estudos descrevem desde a adesão primária ao material não revestido até a fase de desprendimento na espécie *S. epidermidis*. Segundo Morales et. al (7) a fixação direta ao material plástico não revestido é dependente das propriedades físico-químicas da superfície bacteriana e plástica, sendo portanto este tipo de ligação impulsionado principalmente por interações hidrofóbicas ou eletrostáticas. Estudos demonstraram que na fixação inicial da superfície do polímero, além das ligações não específicas como interações eletrostáticas e hidrofóbicas, também ocorre a atuação de adesinas específicas incluindo duas proteínas de superfície estafilocócica (SSP-1 e SSP-2) que medeiam a adesão ao poliestireno, bem como a proteína Autolisyn E (Atle) que além de se ligar diretamente à superfície polimérica tem a capacidade de se ligar também à vitronectina, sugerindo sua participação em estágios superiores, e Autolisyn adhesin (Aae) que além de se ligar diretamente ao polímero também tem capacidade de ligação à vitronectina, fibronectina e ao fibrinogênio (14, 15).

Logo após o seu implante, o dispositivo é recoberto com proteínas do hospedeiro, e possivelmente a ligação dos estafilococos a estas moléculas ocorre através das adesinas da superfície bacteriana provavelmente a SdgR (conhecida como Fbe), GehD, EmpB, e AtlE, que se ligam respectivamente ao fibrinogênio, colágeno e vitronectina. Estas adesinas produzidas pelo *S. epidermidis* são conhecidas como MSCRAMMs (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*), estas proteínas estão localizadas na superfície bacteriana e se ligam especificamente as proteínas da matriz extracelular do hospedeiro (15).

Depois da adesão inicial segue a fase da maturação com o acúmulo das bactérias que se multiplicam e vão se aglomerando em várias camadas. Em estafilococos para formar as camadas bacterianas, as células vão se ligando umas as outras através do PIA (polissacarídeo de adesão intercelular) considerado a principal molécula responsável pela adesão intercelular, o qual é também chamado de poli-N-acetilglucosamina (PNAG) de acordo com a sua composição química (7, 16). O PIA está localizado na superfície celular, composto por duas frações polissacarídicas: polissacarídeo I (>80%) com 15 a 20% dos resíduos diacetilados e, portanto carregados positivamente e polissacarídeo II (< 20%) estruturalmente relacionado ao polissacarídeo I, mas com baixa quantidade de resíduos D-glicosamina não N-acetilados e contém fosfato e éster ligado a succinato, sendo aniônica (7, 17).

A produção do PIA é mediada por produtos do gene cromossomal *ica* (*intercelular adhesion*), organizados em uma estrutura *operon*. Este *operon* contém os genes *icaADBC*, mais o *icaR*, que tem a função regulatória e é transcrito no sentido oposto. Assim que ocorre a ativação deste *operon*, são codificadas quatro proteínas necessárias para a síntese do PIA que são *IcaA*, *IcaD*, *IcaB* e *IcaC* (16, 18, 19, 20) (Figura 1).



Figura 1 – Organização genética do *operon ica*.

Vuong et al. (21), propuseram um modelo de biossíntese de PIA combinando o resultado de várias pesquisas sobre o papel dos genes *icaADBC*. De acordo com este

modelo a biossíntese do PIA ocorre em três passos: (1) A proteína IcaA codificada pelo gene *icaA* tem ação de N-acetilglicosaminatransferase e a ação combinada com a proteína IcaD formam oligômeros de 10-20 resíduos, (2) a principal função da proteína IcaC é a formação de oligômeros completos de PIA com 130 resíduos e exportação da cadeia para o meio extracelular, (3) e IcaB é responsável pela deacetilação do PIA (Figura 2).

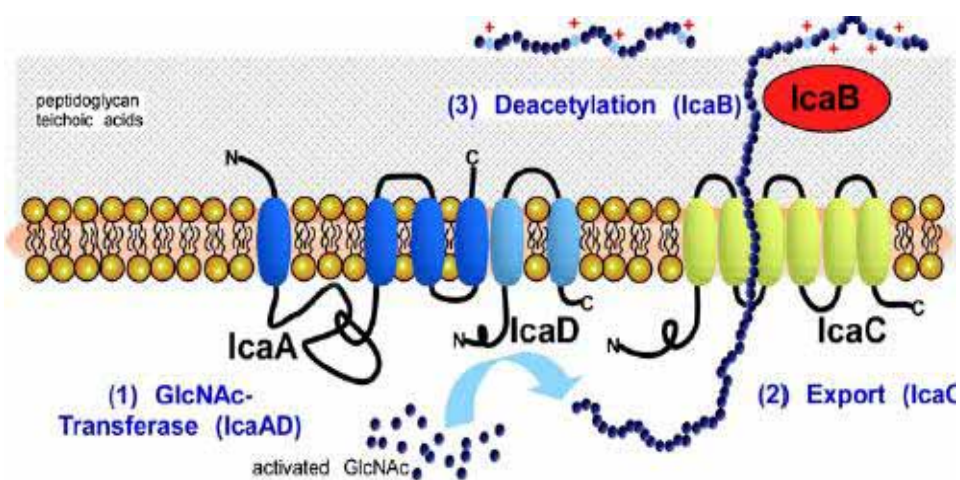


Figura 2 – Modelo de biossíntese do polissacarídeo de adesão intercelular-PIA.

Vários autores relatam que a produção de PIA e sua deacetilação são fatores importantes na virulência de *S. epidermidis* sendo predominante na fase de acúmulo do biofilme (21, 22). Porém, alguns estudos tem demonstrado que a produção de PIA não é essencial para a formação de biofilme em todas as amostras de *S. epidermidis* (23). Estudos revelaram amostras isoladas de infecções associadas a biofilme que não possuíam os genes *ica* (24). Outras duas proteínas além do PIA parecem estar envolvidas na produção de biofilme, a proteína - Aap (*accumulation-associated protein*) (25) e a proteína associada a biofilme – Bap (*biofilm-associated protein*) (26). Estudos com espécies isoladas de infecções de próteses revelaram que 27% das amostras

formavam biofilme independente de PIA, e na maioria dos casos a formação de biofilme estava associada à Aap (27). Aap é uma proteína de 220KD e necessita ser proteoliticamente clivada em uma proteína menor de 140KD para conseguir induzir a formação de biofilme, supõe-se que a adesão intermediada por Aap tenha um importante papel na patogênese de infecções por *S. epidermidis* (25).

Em *S. aureus* isolados de animais foi encontrada uma proteína de superfície conhecida como Proteína Associada ao Biofilme (Bap), alguns estudos mostraram que esta proteína está associada com a aderência a superfícies poliméricas, adesão intercelular e produção de biofilme (26, 28). Estudos também sugeriram que quando *bap* é expresso, ocorre a formação de biofilme mesmo na ausência do operon *icaADBC*. Em espécies de *S. epidermidis* de origem humana, foi encontrado um homólogo de *bap*, chamado de *bhp*. Devido a grande similaridade nas sequências, foi sugerido que este gene está envolvido na produção de biofilme em isolados de *S. epidermidis* por codificar Bhp, uma proteína de 284,4 kDa que atua na formação e na acumulação, na ausência do PIA, semelhante ao que ocorre com *bap* em isolados de animais (28). Porém, ainda não está totalmente elucidado o mecanismo pelo qual Bap e Bhp atuam na formação de biofilme (25, 28, 29).

Na fase de maturação é importante destacar que são formados canais na estrutura do biofilme, os quais são importantes para levar água e nutrientes para as camadas mais profundas. Os resultados de alguns estudos com *S. epidermidis* mostraram que um grupo de peptídeos surfactantes conhecidos como Modulinas Fenol Solúvel (psm), com destaque para a  $psm\beta$  tem papel importante durante o desenvolvimento do biofilme, com a formação de canais, contribuição na formação da estrutura tridimensional e no desprendimento do aglomerado de biofilme (26). Estudos recentes demonstraram que *S. aureus* produzem fibras extracelulares que auxiliam a tensão física do biofilme,

garantindo mais resistência, e que estas fibras consistem desses pequenos peptídeos polimerizados chamados de modulinas fenol solúveis (30).

O rompimento das células do biofilme é um fator importante para disseminação das bactérias para colonização de outros locais. Alguns fatores estão implicados neste processo como força mecânica, interrupção do fornecimento de algumas substâncias e enzimas que podem destruir a matriz promovendo o descolamento na superfície do biofilme (31). Dentre estes fatores estão os peptídeos surfactantes Modulinas Fenol Solúvel que desempenham um importante papel na desagregação da estrutura do biofilme contribuindo para a disseminação (32). A Tabela 1 mostra resumidamente o papel dos genes e seus produtos envolvidos nas fases da produção de biofilme.

**Tabela 1.** Funções dos fatores envolvidos na produção de biofilme

Fase da formação de biofilme	Gene	Função do produto
Adesão primária		
	<i>fbe/sdrG</i>	SdrG (Fbe) – adesão ao fibrinogênio
	<i>empB</i>	EmpB, - adesão a fibronectina
	<i>atle</i>	AtlE – adesão ao polímero e vitronectina
	<i>aae</i>	Aae – adesão a superfície do polímero, vitronectina, fibronectina e fibrinogênio
	<i>gehD</i>	GehD – adesão ao colágeno
Acúmulo bacteriano		
	<i>icaACDB</i>	icaACDB – adesão intercelular
	<i>aap</i>	Aap – adesão intercelular
	<i>psm<math>\beta</math></i>	Psm $\beta$ – fibras extracelulares e formação de canais
Desprendimento		
	<i>psm<math>\beta</math></i>	Psm $\beta$ – promove o descolamento da matriz

\*Adaptado de Otto. 2009 (33)

Para que as bactérias sobrevivam durante a invasão do hospedeiro e consigam estabelecer a infecção, se faz necessário a regulação da expressão de um grupo de moléculas que determinam a sua patogenicidade, chamadas de fatores de virulência. O

biofilme é considerado um importante fator de virulência das bactérias e sua formação depende da combinação e expressão de uma variedade de genes, a qual é influenciada por fatores ambientais como condições de crescimento, suplementação de carboidratos, concentração sub-inibitória de antimicrobianos e alta osmolaridade. Para esta regulação as bactérias se utilizam de um sistema de intercomunicação chamado de *quorum sensing* que funciona como um sensor de densidade populacional (28, 29). Os sistemas *quorum sensing* descritos em *Staphylococcus* spp. parecem estar relacionados com a formação de biofilme. O mais conhecido é o gene regulador acessório ou *agr* (34).

No caso do “quorum-sensing” (QS) em *Staphylococcus aureus*, estas bactérias regulam seus fatores de virulência através de dois sistemas, que regulam um ao outro (35, 36). O QS1 consiste na ativação do RNAII através da RAP (proteína ativadora de RNA) uma proteína de 21-KDa que induz a fosforilação da proteína alvo de RAP (TRAP) (36, 37). Conforme as bactérias vão se multiplicando, a RAP atinge um limiar de concentração (em meio à fase de crescimento exponencial) induzindo a fosforilação da sua molécula alvo, a TRAP (38). A fosforilação da TRAP leva a um mecanismo pouco conhecido para a síntese do QSII, que é composta pelos produtos do sistema *Agr*. O *Agr* codifica duas transcrições divergentes, o RNAII e RNA III (39). O RNAII codifica *AgrA*, *AgrC*, *AgrD* e *AgrB*, onde *AgrD* é um polipeptídeo que produz o peptídeo auto-indutor (AIP), que é processado e segregado com auxílio de *AgrB*. Uma vez que o *agr* é ativado e o AIP é secretado, o AIP induz a fosforilação de seu receptor *AgrC*, levando a produção da molécula de RNA regulador denominado RNAIII (39). O RNAIII regula a produção de várias toxinas secretadas. Os sistemas QS1 e QS2 se interagem, pois, uma vez que o AIP é produzido no meio da fase exponencial de crescimento, indiretamente regula a fosforilação da proteína alvo TRAP (38). A

interação entre a fosforilação da TRAP e AgrC através de seus respectivos auto-indutores, RAP ou AIP, regula a expressão de moléculas de adesão ou toxinas. Sendo assim, a TRAP demonstra ser uma molécula chave na regulação da patogênese, pois quando sua expressão é inibida por mutagênese ou sua fosforilação é suprimida por mutagênese ou por peptídeos inibitórios, as bactérias não formam biofilmes, não produzem toxinas e não causam doenças (40, 41).

Em relação à prevenção de infecções estafilocócicas associadas ao biofilme, estudos realizados com um peptídeo (YSPWTNF-NH<sub>2</sub>), conhecido como RIP (peptídeo inibidor de RNA), mostraram que este pode inibir a atividade do RNAlII, impedindo a fosforilação da TRAP, interferindo no sistema *quorum sensing*. O RIP tem se mostrado muito eficaz no tratamento de infecções estafilocócicas associadas a dispositivos médicos, incluindo aquelas causadas por cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* resistentes a múltiplas drogas (40, 41). Estudos com implantes em animais para observação da produção de biofilme, e a utilização do peptídeo inibidor de RNA, mostraram que a injeção do peptídeo (RIP) nos animais inibiu o RNAlII, impedindo a fosforilação da proteína (TRAP), interferindo no sistema *quorum-sensing*, como resultado houve uma baixa produção de biofilme e infecções (42). Outros estudos mostraram o RIP interferindo no sistema *quorum-sensing*, além de ser muito eficaz na terapia de prevenção de infecções estafilocócicas associadas a dispositivos, também reduz a carga bacteriana e pode ser útil para o tratamento de feridas infectadas, podendo representar uma alternativa interessante para o futuro em relação aos antibióticos convencionais (43).

Quanto aos antibióticos, as bactérias nos biofilmes, geralmente apresentam um aumento na concentração inibitória mínima (CIM), resultando em redução da suscetibilidade a estes. Vários fatores contribuem para o aumento dessa resistência

aos antimicrobianos, por exemplo, o modo de crescimento do biofilme permite que as bactérias sobrevivam à exposição a vários antibióticos em concentrações até 1000 vezes maiores em relação às bactérias planctônicas (44).

Estudos mostraram que a relativa resistência aos antimicrobianos pode ser devido à penetração limitada destes, ou a atividade metabólica de modo lento, pois algumas partes do biofilme são difíceis de atingir. Alguns antibióticos reduziram a atividade em ambientes privados de oxigênio, o que também contribui para a resistência do biofilme, devido à disponibilidade de oxigênio ser reduzida nos níveis mais profundos (45). Outro fator pode ser a expressão de certos genes dentro do biofilme que confere aumento da resistência aos antimicrobianos entre as espécies gram-positivas, principalmente os estafilococos, revelando preocupações quanto ao uso de antibióticos e a necessidade de novos agentes (44, 46, 47). Devido ao *Staphylococcus* spp. ser uma das principais causas de infecções relacionadas a dispositivos médicos, pela sua capacidade de aderência e a consequente formação do biofilme, nos quais as bactérias apresentam resistência a múltiplas drogas antimicrobianas, tornando o tratamento de infecções do biofilme um esforço difícil e caro, o presente estudo objetiva o estudo da estrutura do biofilme de diferentes espécies de *Staphylococcus*, avaliação da antibioticoterapia utilizada para tratamento dessas infecções em células livres e em biofilme e a busca de alternativas para prevenção da formação de biofilme estafilocócico.

## OBJETIVOS

### Objetivo Geral

Estudar a estrutura do biofilme de diferentes espécies de *Staphylococcus*, avaliar a antibioticoterapia utilizada para tratamento dessas infecções em células livres e em biofilme e alternativas para prevenção da formação de biofilme estafilocócico.

### Objetivos Específicos

- Avaliar a produção de biofilme em amostras de *S. aureus* e Estafilococos Coagulase-negativa (ECN) isoladas de materiais clínicos de pacientes do HC da Faculdade de Medicina de Botucatu por microscopia eletrônica.
- Detectar a presença do operon *ica* em *S. aureus* e ECN pela técnica de PCR.
- Detectar a expressão do operon *ica* pela técnica de RT-PCR.
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* e ECN em células livres e em biofilme.
- Avaliar a produção de biofilme na presença do polipeptídeo inibidor de RNAIII (RIP)

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Vuong C., Otto M. (2002) *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microb Infect* **4**:481-89.
- 2 Euzéby JP., Tindall BJ. (2012) List of Prokariotic names with Standing in Nomenclature LPSN genus *Staphylococcus*. Acesso em 10 de Novembro de 2013. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/s/Staphylococcus.html>.
- 3 Klingenberg C., Aarag E., Ronnestad A., Sollid J.E., Abrahamsen M.D., Kjeldsen G., Flaegstad T. (2005) Coagulase-Negative Staphylococcal Sepsis em Neonates – Association Between Antibiotic Resistance, Biofilm Formation and the Host Inflammatory Response. *The Ped Infec Dis* **24**:817-22.
- 4 Goldmann D.A., Pier G.B. (1993) Pathogenesis of infections related to intravascular catheterization. *Clin Microbiol* **6**:176-92.
- 5 Del Pozo JL., Patel R. (2009 ) Infection associated with prosthetic joints. *N Engl J Med* **361**: 787–94.
- 6 Tacconelli E., Smith G., Hieke K., Lafuma A., Bastide P. Epidemiology, medical outcomes and costs of catheter- related bloodstream infection in intensive care units of four European countries: literature- and registry-based estimates. *J Hosp Infect* 2009 **72**: 97–103.
- 7 Morales M., Mendez-Alvarez S., Martin-Lopes J.V., Marreiro C., Freytes C.O. (2004) Biofilm: the microbial “bunker” for intravascular catheter-related infection. *Support Care Cancer* **12**:701-07.
- 8 Nilsson-Augustsson A., Claesson C., Lindgren P.E., Lundqvist-Gustafsson H., Ohman L. (2005) Adherence of *Staphylococcus epidermidis* to extracellular matrix proteins and effects of fibrinogen-bound bacteria on oxidase activity and apoptosis in neutrophils. *APMS* **113**: 361-73.
- 9 Dobinski, S., Bartscht, K., Mack, D. (2002) Influence of Tn917 insertion of transcription of the *icaADBC* operon in six biofilm-negative transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis*. *Plasmid* **47**:10-17.

- 10 Cafiso V., Bertuccio T., Santagati M., Campanile F., Amicosante G., Perilli M.G., 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. *Clin Microbiol Infect* **10**:1081-88.
- 11 Gotz F. *Staphylococcus* and biofilms. (2002) *Mol. Microbiol.* **43**:1367-78.
- 12 Costerton W., Veeh R., Shirtliff M., Pasmore M., Post C., Ehrlich G. (2003) The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest* **112**: 1466-77.
- 13 Otto M. (2013) Staphylococcal Infections: Mechanisms of Biofilm Maturation and Detachment as Critical Determinants of Pathogenicity *Annu. Rev. Med* **64**:175–88.
- 14 Veenstra G.J., Cremers F.F.M., Dijk H.V., Flier A. (1996) Ultrastructural Organization and Regulation of a Biomaterial Adhesin of *Staphylococcus epidermidis* *J Bacteriol* **178**:537–41
- 15 Heilmann C., Thumm G., Chhatwal G.S., Hartleib J., Uekotter A., Peters G. (2003) Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* **149**:2769-78.
- 16 Christensen G.D., Simpson W.A., Bisno A.L., Beachey E.H. (1982) Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun* **37**:318-26.
- 17 Freeman D.J., Falkner, F.R., Keane C.T. (1989) New method for detecting slime production by coagulase-negative *Staphylococci*. *J Clin Pathol* **42**:872-74.
- 18 Christensen G.D., Simpson W.A., Yonger J.J., Baddor L.M., Barrett F.F., Melton D.M., Beachey E.H. (1985) Adherence of coagulase-negative *Staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *Staphylococci* to medical devices. *J Clin Microbiol* **22**: 996-06.
- 19 Baker B.J., Tyson G.W., Goosherst L., Banfield J.F. (1984) Extremely Acidophilic Protists from Acid Mine Drainage Host Rickettsiales-Lineage Endosymbionts That Have Intervening Sequences in Their 16S RNA Genes. *Appl. Environ Microbiol* doi: 10.1128/AEM. 02500.

- 20 Cunha M.L.R.S., Caramori J.C.T., Fioravante A.M., Batalha J.E.N., Montelli A.C., Barretti P. (2004) Significance of slime as virulence factor in coagulase-negative staphylococcus peritonitis in CAPD. *Perit Dial Int* **24**:191-93.
- 21 Vuong C., Kocianova S., Voyich J.M., Yao Y., Fischer E.R., DeLeo F.R.D., Otto M. (2004) A Crucial Role for Exopolysaccharide Modification in Bacterial Biofilm Formation, Immune Evasion, and Virulence. *J Bio CHEM.* **279**:54881-86.
- 22 Frank K.L., Hanssen A.D., Patel R. (2004). *icaA* Is Not a Useful Diagnostic Marker for Prosthetic Joint Infection. *J Clin Microbiol* **42**:4846-49.
- 23 Rohde H., Burandt EC., Sienssem N., Frommelt L., Burdesk C. Wurster S., Scherp S., Davies AP., Harris LG., Horstikotte MA., Knobloch JK., Ragnath C. Kaplan J., Mack D. (2007) Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials* **28**:1711–20.
- 24 Arciola CR., Campoccia D., Baldassari L., Donati ME., Pirini V., Gamberini S., Montaro L. (2006) Detection of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* from implant infections. Comparison of a PCR-method that recognizes the presence of *ica* genes with two classic phenotypic methods. *J Biomed Mater Res A* **76**:425-430.
- 25 Rohde H., Burdesk C., Bartscht K., Hussain M., Buck F. Horstkotte MA., Knobloch JK., Heilmann C., Herrmann M., Mack D. (2005) Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol Microbiol* **55**:1883–95.
- 26 Tormo MA., Mart M., Valle J., Manna AC., Cheung AL., Lasa I., Penades JR., (2005). SarA Is an Essential Positive Regulator of *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Development. *J Bacteriol* **187**:2348-56.
- 27 Rohde H., Burandt EC., Sienssem N., Frommelt L., Burdesk C., Wurster S., Scherp S., Davies AP., Harris LG., Horstikotte MA., Knobloch JK., Ragnath C., Kaplan J., Mack D. (2007) Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials* **28**:1711–20.

- 28 Cucarella C., Solano C., Valle J., Amorena B., Lasa I., Penadés JR. (2001) Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. J. Bacteriol **183**:2888-96.
- 29 Vadyvaloo V., Otto M. (2005) Molecular genetics of *Staphylococcus epidermidis* on indwelling medical devices. Int J Artf Organs **28**:1069-78.
- 30 Wang R., Khan B.A., Cheung G.Y.C., Bach T.H.L., Lee M.J., Kong K.F., Queck S.Y., Otto M. (2011) *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice J Clin invest. **121**:238-48.
- 31 Otto M. (2008). Staphylococcal Biofilms Curr Top Microbiol Immunol. **322**: 207-228.
- 32 Schwartz K., Syed A.K., Stephenson R.R., Rickard A.H., Boles B.R. (2012). Functional Amyloids Composed of Phenol Soluble Modulins Stabilize *Staphylococcus aureus* Biofilms. Plos Pathogens. **8**:1-6.
- 33 Otto M. (2009) *Staphylococcus epidermidis* — the ‘accidental’ pathogen Nat Rev Microbiol **7**: 555-67.
- 34 Novick RP. (2003) Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. Mol Microbiol **48**:1429-49.
- 35 March J.C., Bentley W.E. (2004) *Quorum sensing* and bacterial crosstalk in biotechnology. Curr Opin Biotechnol **15**:495-502.
- 36 Korem M., Gov Y., Kiran M.D., Balaban N. (2005) Transcriptional profiling of target of RNAIII-activating protein, a master regulator of staphylococcal virulence. Infect Immun **73**:6220-28.
- 37 Gov Y., Korem M., Singh V.K., Jayaswal R.K., Wilkinson B.J., Rich S.M., Balaban N. (2004) Quorum sensing in *Staphylococci* is regulated via phosphorylation of three conserved histidine residues. J Biol Chem **279**:14665-72.
- 38 Balaban N., Goldkorn T., Gov Y., Hirshberg M., Koyfman N., Mathews HR., Nhan RT., Singh B., Uziel O. (2001) Regulation of *Staphylococcus aureus* pathogenesis via target of RNAIII-activating protein (TRAP). J Biol Chem **276**:2658-67.

- 39 Novick RP., Ross HF., Projan SJ., Kornblum J., Kreiswirth B., Moghazeh S. (1993) Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J* **12**:3967-75.
- 40 Balaban N., Stoodley P., Fux C.A., Wilson S., Costerton J.W., Dell'Acqua G. (2005) Prevention of staphylococcal biofilm-associated infections by the quorum sensing inhibitor RIP. *Clin Orthop Relat Res* **437**:48-54.
- 41 Yang G., Gao Y., Dong J., Liu C., Xue Y., Fan M., Shen B., Shao N. (2005) A novel peptide screened by phage display can mimic TRAP antigen epitope against *Staphylococcus aureus* infections. *J Biol Chem* **280**:27431-35.
- 42 Balaban N., Cirioni O., Giacometti A., Ghiselli R., Braunstein J.B., Silvestri C., Mocchegiani F., Saba V., Scalise G. (2007) Treatment of *Staphylococcus aureus* biofilm infection by the quorum sensing inhibitor RIP. *A Agents Chemo* **51**:2226-29.
- 43 Simonetti O., Cirioni O., Ghiselli R., Goteri G., Scalise A., Orlando F., Silvestri C., Riva A., Saba V., Madanahally KD., Offidani A., Balaban N., Scalise G., Giacometti A. (2008) RNAIII-Inhibiting peptide enhances healing of wounds infected with methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:2205-11.
- 44 Sauer K., Camper A.K., Erlich G.H., Costerton J.W., Davies D.G. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* **184**:1140-54.
- 45 Drenkard E. (2003) Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect.* **5**:1213-19.
- 46 Whiteley M., Bangera M.G., Bumgarner R.E., Parsek M.R., Teitzel G.M., Lory S., Greenberg E.P. (2001) Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* **413**:860-64.
- 47 Plouffe J.F. (2000) Emerging therapies for serious gram-positive bacterial infections: A focus on linezolid. *Clin Infect Dis* **31**:S144-9.

**ARTIGO I**

O artigo foi escrito de acordo com as normas de publicação da Revista Científica Microbiology and Immunology.

**Detecção da presença e expressão do operon *ica* em *Staphylococcus aureus* e espécies de Estafilococos coagulase-negativa**

Adilson de Oliveira, Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP.

E-mail: Adilson de Oliveira – [adilsonoliveiralp@ig.com.br](mailto:adilsonoliveiralp@ig.com.br); Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha – [cunhamlr@ibb.unesp.br](mailto:cunhamlr@ibb.unesp.br).

Autor correspondente: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, Caixa Postal 510, CEP 18618-000.

## RESUMO

*Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase-negativa (ECN) são causas frequentes de infecções hospitalares associadas ao uso de dispositivos médicos. A produção de biofilme é considerada um dos principais fatores de virulência. O biofilme é formado por multicamadas de bactérias aderidas ao substrato conferindo proteção contra a ação de antibióticos e do sistema imunológico do hospedeiro. O principal componente do biofilme é o polissacarídeo de adesão intercelular (PIA) codificado pelo operon *ica* e que contém os genes *icaADBC*, porém pode ocorrer a formação de biofilme *ica* independente, onde as bactérias se utilizam de outros mecanismos como proteínas extracelulares na matriz do biofilme. Foram estudadas 200 amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de materiais clínicos de pacientes do HC da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) e identificadas pelo método fenotípico e genotípico, sendo 50 de *S. aureus* e 150 de estafilococos coagulase-negativa (ECN). A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada para a pesquisa dos genes *icaADBC* e a expressão pela técnica de Transcriptase Reversa-PCR (RT-PCR). A produção de biofilme foi pesquisada pelos métodos fenotípicos de produção de biofilme em tubos de borossilicato (TM) e adesão à placa de poliestireno (TCP). A pesquisa dos genes por PCR mostrou 97 (48,5%) amostras de *Staphylococcus* spp. positivas para o gene *icaA*, 64 (32%) para *icaB*, 102 (51,0%) para *icaC*, 160 (80%) para *icaD* e 20 (10%) não revelaram nenhum dos genes. Na técnica de RT-PCR o gene *icaC* foi o mais expresso, 53 (56,9%) de 93 amostras em que estava presente, o gene *icaD* 66 (41,2%) de 160 amostras, o *icaB* 24 (44,4%) de 54 amostras e o *icaA* 28 (29,5%) de 95 amostras. A espécie *S. aureus* foi a que mais apresentou o gene *icaA*. O presente estudo revelou uma diferente combinação da expressão dos genes nas diferentes espécies estudadas, sendo o gene *icaC* o mais

expresso em ECN e pouca expressão do gene *icaA*, o que justifica o fato da maioria das amostras não produzir biofilme no teste fenotípico. Do total de amostras 49 (24,5%) produziram biofilme, 28 expressando o gene *icaA*, 12 sem a expressão do *icaA* mas revelando outros genes do operon e 11 não expressaram os genes do operon *ica*, sugerindo a presença de um mecanismo alternativo (*ica*-independente) na formação de biofilme estafilocócico nessas amostras. A produção de biofilme e expressão dos genes *ica* foi mais frequente em *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*. O estudo demonstrou que há muito ainda para se esclarecer em relação à produção de biofilme nas espécies *S. hominis*, *S. warneri* e *S. lugdunensis*.

**Palavras-chave:** Biofilme; *Staphylococcus aureus*; Estafilococos Coagulase-negativa; Métodos fenotípicos; PCR; RT-PCR.

## ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci (CoNS) are frequent causes of medical device-associated nosocomial infections. The formation of a biofilm is a major virulence factor. The biofilm consists of multiple layers of bacteria adhered to the substrate and protects against the action of antibiotics and of the host immune system. The main component of the biofilm is a polysaccharide, called polysaccharide intercellular adhesin (PIA), which is encoded by the *ica* operon comprising the *icaADBC* genes. However, biofilm formation can also occur in *ica*-independent manners, with the bacteria using other mechanisms such as extracellular proteins in the matrix of the biofilm. A total of 200 *Staphylococcus* spp. isolated from clinical materials of patients seen at the University Hospital of the Botucatu School of Medicine (HC-FMB) were studied. The isolates were identified as *S. aureus* (n = 50) and CoNS (n = 150) by phenotypic and genotypic methods. The polymerase chain reaction (PCR) was used for detection of the *icaADBC* genes and their expression was analyzed by reverse transcriptase-PCR (RT-PCR). Adherence to borosilicate test tubes and polystyrene plates was used for the phenotypic analysis of biofilm formation. The *icaA* gene was detected by PCR in 97 (48.5%) of *Staphylococcus* spp., *icaB* in 64 (32%), *icaC* in 102 (51%), and *icaD* in 160 (80%). Twenty (10%) strains did not carry any of the genes. Using RT-PCR, the *icaC* gene was most expressed [53 (56,9%) of the 93 strains in which the gene was present]. The *icaD* gene was expressed in 66 (41.2%) of 160 strains, *icaB* in 24 (44,4%) of 54 strains, and *icaA* in 28 (29.5%) of 95 strains. The *icaA* gene was most frequently detected in *S. aureus*. The present study revealed a different combination of gene expression in the different species studied, with higher expression of the *icaC* gene and low expression of the *icaA* gene in CoNS. This finding explains the observation that most strains did not produce a biofilm in the

phenotypic test. Forty-nine (24.5%) of all strains produced a biofilm; of these, 28 expressed the *icaA* gene, 12 did not express this gene but carried other genes of the operon, and 11 did not express any genes of the *ica* operon, suggesting the presence of an alternative (*ica*-independent) mechanism of staphylococcal biofilm formation in these strains. Biofilm formation and expression of the *ica* genes were more frequent in *S. aureus*, *S. epidermidis* and *S. saprophyticus*. This study showed that much remains to be clarified regarding biofilm formation in the species *S. hominis*, *S. warneri* and *S. lugdunensis*.

**Keywords:** Biofilm; *Staphylococcus aureus*; Coagulase-negative staphylococci; Phenotypic methods; PCR; RT-PCR.

## INTRODUÇÃO

Os estafilococos fazem parte da microbiota normal da pele e membranas mucosas de seres humanos e de outros animais. Devido à capacidade de produzir biofilme, esses microrganismos estão envolvidos num grande número de infecções nosocomiais geralmente em pacientes que fazem uso de dispositivos médicos como próteses, válvulas cardíacas e principalmente em cateteres vasculares (1-4). A capacidade de formar biofilme desses microrganismos é considerada um importante fator de virulência, devido o biofilme proteger as bactérias do sistema imunológico do hospedeiro e conferir resistência aos antimicrobianos utilizados no tratamento dessas infecções (5, 6). A espécie *Staphylococcus epidermidis* foi a primeira a ser descrita como produtora de biofilme, porém outras espécies de estafilococos coagulase-negativa e *Staphylococcus aureus* também tem essa capacidade (7, 8). Os biofilmes são comunidades microbianas “sésseis” caracterizadas por células ligadas a um substrato e uma as outras envolvidas em uma matriz extracelular (8, 9), a matriz pode ser composta de polissacarídeos, proteínas ou DNA extracelular produzidos pelas próprias bactérias, podendo a composição variar de espécie para espécie ou mesmo entre a mesma espécie dependendo da origem das amostras (10).

Em estafilococos um dos principais componentes responsáveis pela adesão intercelular é o PIA (polissacarídeo de adesão intercelular), o qual é também chamado de poli-N-acetilglucosamina (PNAG) de acordo com a sua composição química (11, 12). A produção do PIA é mediada por produtos do gene cromossomal *ica* (*intercelular adhesion*), organizados em uma estrutura *operon* que contém os genes *icaADBC*, mais o *icaR*, que tem a função regulatória e é transcrito no sentido oposto. Com a ativação deste *operon*, são codificadas quatro proteínas necessárias para a síntese do PIA que são IcaA, IcaD, IcaB e IcaC (12, 13, 14, 15). O gene *icaA*

codifica a enzima N-acetilglicosaminatransferase, que é utilizada na síntese do PIA. Quando ocorre apenas a transcrição do gene *icaA*, apenas uma baixa atividade enzimática é induzida, já quando expresso em conjunto com o gene *icaD* ocorre um crescimento da atividade de N-acetilglicosaminatransferase, formando oligômeros com aproximadamente 20 resíduos. O gene *icaC* quando expresso atua na síntese de oligômeros mais longos com 130 resíduos que reagem com anti-soros específicos para PIA e na exportação do PIA sintetizado para o meio extracelular. O gene *icaB* tem função de desacetilação com introdução de carga positiva no PIA, sendo crucial para a formação de biofilme e para função biológica (16). De acordo com alguns autores (16, 17) a produção de PIA e sua desacetilação são fatores importantes na virulência de *S. epidermidis* sendo predominante na fase de acúmulo do biofilme.

Alguns estudos tem demonstrado que a produção de PIA não é essencial para a formação de biofilme em *S. epidermidis* (18, 19). Além do PIA a proteína - Aap (*accumulation-associated protein*) (20) e a proteína associada a biofilme – Bap (*biofilm-associated protein*) (21) estão associadas à formação de biofilme. Estudos com espécies isoladas de infecções de próteses revelaram amostras formadoras de biofilme independente de PIA, e na maioria dos casos a formação de biofilme estava associada à Aap (22).

A Proteína Associada ao Biofilme (Bap) foi encontrada em amostras de *S. aureus* isoladas de animais, alguns estudos mostraram que esta proteína está associada com a aderência à superfícies poliméricas, adesão intercelular e produção de biofilme (21, 23). Em espécies de *S. epidermidis* de origem humana, foi encontrado um homólogo de *bap*, chamado de *bhp*, sendo sugerido que este gene está envolvido na produção de biofilme em isolados de *S. epidermidis*. Esse gene codifica a proteína Bap homology protein (Bhp), de 284,4 kDa que atua na formação

e na acumulação na ausência do PIA, semelhante ao que ocorre com *bap* em amostras de *S. aureus* (24). Apesar de muitas pesquisas demonstrarem a importância do operon *ica* em amostras produtoras de biofilme, ainda não está totalmente elucidado a presença e expressão do operon *ica* em diferentes espécies de estafilococos. O objetivo do presente estudo foi a detecção do operon *ica* e a expressão dos genes em relação à produção de biofilme em amostras de *S. aureus* e espécies de estafilococos coagulase-negativa isoladas de materiais clínicos.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Amostras**

Foram estudadas 200 amostras de *Staphylococcus* spp., sendo 50 da espécie *S. aureus* e 150 do grupo dos estafilococos coagulase-negativa (ECN). Entre os ECN foram estudadas 50 amostras de *S. epidermidis*, 20 *S. haemolyticus*, 20 *S. warneri*, 20 *S. hominis*, 7 *S. lugdunensis* isoladas de hemocultura e 20 amostras de *S. saprophyticus* isoladas de urina de pacientes com infecção do trato urinário atendidos no Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB). Devido à dificuldade de isolar amostras de *S. lugdunensis* de amostras clínicas humanas foram incluídas 13 amostras de *S. lugdunensis* isoladas de leite de cabra. Para controle foram utilizadas linhagens de referência internacional, incluindo *S. epidermidis* ATCC 12228 e *S. aureus* ATCC 33591 não produtores de biofilme (controle negativo) e *S. epidermidis* ATCC 35983 e *S. aureus* ATCC 29213 produtores de biofilme (controle positivo).

### **Identificação de *Staphylococcus* spp.**

Os isolados foram semeados em ágar sangue e corados pelo método de Gram, objetivando-se sua pureza, a observação de sua morfologia e coloração específica. Após a confirmação dessas características, as linhagens foram submetidas à prova de catalase. O gênero *Staphylococcus* foi diferenciado de *Micrococcus*, com base na prova de oxidação e fermentação da glicose e pela resistência à bacitracina (0,04U), indicada pela ausência de halo de inibição ou formação de halo de até 9mm e pela sensibilidade à furazolidona (100µg) caracterizada por halos de inibição de 15 a 35 mm de diâmetro (25).

Para a identificação de *S. aureus* foi realizada a prova de coagulase em tubo e para identificação de ECN foi utilizado o esquema simplificado proposto por Cunha et al. (26), 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. Posteriormente foi realizada a confirmação genotípica das espécies de ECN. A identificação genotípica foi realizada usando primers de sequências conservadas adjacentes aos genes 16S e 23S pela técnica Internal Transcribed Spacer PCR (ITS-PCR) descrita por Couto et al. (27) usando os primers *G1* “GAAGTCGTAACAAGG” 16S e *L1* “CAAGGCATCCACCGT” 23S. A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese em agarose metaphor 3% preparado em tampão 1,0 X TBE e corada com Saber Safe. Para controle dos resultados, foram utilizadas as seguintes linhagens de referência internacional: *S. epidermidis* (ATCC 12228), *S. epidermidis* (ATCC 35983), *S. haemolyticus* (ATCC 29970), *S. hominis* (ATCC 27844), *S. hominis subsp.novobiosepticus* (ATCC 700237), *S. lugdunensis* (ATCC 700328), *S. saprophyticus* (ATCC 15305) e *S. warneri* (ATCC 10209).

## **Detecção de genes do operon *ica* específico 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 h.

A extração foi realizada com o Kit Illustra (GE Healthcare) 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 foi centrifugada a 10.000 x g por 4 min. Em seguida o sobrenadante foi transferido para a coluna e centrifugado a 5.000 x g por 1 min. O líquido coletado foi descartado e 500µl 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 que foi utilizada para a eluição.

### **Amplificação do ácido nucléico (PCR)**

As reações de PCR 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 DNA polimerase, 100 µM de desoxiribonucleotídeos trifosfatados, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 0,75 mM de MgCl<sub>2</sub> e 3µL de ácido nucléico. A incubação foi realizada em termociclador apropriado, empregando os parâmetros descritos por

Arciola et al. (28, 29) que consistem 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 com controle positivo e negativo, *S. epidermidis* ATCC 35983 (produtora de biofilme) e como controle negativo *S. epidermidis* ATCC 12228 (não produtora).

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

Nome	Sequência de nucleotídeos 5'a 3'	Produto amplificado (bp)
<i>icaA1</i>	TCT CTT GCA GGA GCA ATC AA	187
<i>icaA2</i>	TCA GGC ACT AAC ATC CAG CA	187
<i>icaB1</i>	CTG ATC AAG AAT TTA AAT CAC AAA	302
<i>icaB2</i>	AAA GTC CCA TAA GCC TGT TT	302
<i>icaC1</i>	TAA CTT TAG GCG CAT ATG TTT	400
<i>icaC2</i>	TTC CAG TTA GGC TGG TAT TG	400
<i>icaD1</i>	ATG GTC AAG CCC AGA CAG AG	198
<i>icaD2</i>	CGT GTT TTC AAC ATT TAA TGC AA	198

Fonte: Arciola et al. 2001, 2005

Para a pesquisa do gene *icaA* em *S. aureus* foi utilizado o primer específico descrito por Rohde et al. (22) tabela 2. Para as reações realizadas foram utilizadas linhagens de referência internacional, como controle positivo *S. aureus*

ATCC 29213 (produtora de biofilme) e negativo *S. aureus* ATCC 33591 (não produtora).

**Tabela 2:** Oligonucleotídeos para a detecção dos genes *icaA* em *S. aureus*

Nome	Sequência de nucleotídeos 5'a 3'	Produto amplificado (bp)
<i>icaA1</i>	TGG CTG TAT TAA GCG AAG TC	669
<i>icaA2</i>	CCT CTG TCT GGG CTT GAC C	669

Fonte: Rohde et al. 2007

### Visualização dos produtos amplificados

A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 2% preparado em tampão 0,5 X TBE e corada com Syber safe (invitrogen). O tamanho dos produtos amplificados foi comparado com o padrão de 100 bp e posteriormente fotografados sob transiluminação UV.

### Expressão de genes do operon *ica* pela Técnica de RT-PCR

#### Extração de RNA

O RNA total foi extraído a partir de amostras de *Staphylococcus* spp. cultivadas em ágar sangue e inoculadas individualmente em caldo Infusão de Cérebro e Coração e incubadas a 37°C por 24 horas. Para a extração foi utilizado o Kit Illustra RNAspin Mini RNA de acordo com as orientações do fabricante. Foi transferido 200 µL da cultura de *Staphylococcus* para um eppendorf estéril de 1,5mL. Após centrifugação a 10.000g por 1 minuto, foi removido todo o sobrenadante e adicionado 100µL de TE contendo 2mg/mL de lisozima, e incubado a 37°C por 10 minutos. Para lise das células foi adicionado 350µL de Buffer RA1

juntamente com 3,5µL de β-mercaptoethanol. Em seguida a solução foi aplicada em filtros RNAspin Mini Filter units e centrifugada a 11.000g por 1 minuto, descartando os filtros após centrifugação. Para o ajuste das condições de ligação foi adicionado 350µL de etanol 70% no filtrado, que foi transferido para o RNAspin Mini Column e centrifugado a 8.000g por 30 segundos. Para a ligação na membrana foi adicionado 350µL de MDB (membrane desalting buffer) e centrifugado a 11.000g por 1 minuto. A lavagem das amostras foi feita em duas fases. Para a primeira lavagem foi adicionado 600µL de Buffer RA3 na coluna e centrifugado a 11.000g por 1 minuto. Para a segunda lavagem foi adicionado 250µL de RA3 na coluna e centrifugado a 11.000 por 2 minutos. Em seguida a coluna foi colocada em um novo eppendorf de 1,5mL para a eluição do RNA, que foi realizada com 45µL de H<sub>2</sub>O RNA free acrescentada de 5µL de RNA guard e centrifugado a 11.000g por 1 minuto. O tratamento com DNase para a eliminação total de possíveis resíduos de DNA foi feito adicionando 2µL de Buffer, em seguida adicionando 2µL de DNase e incubação por 1 hora a 37°C. Em seguida foi adicionado 2µL de Stop DNase, e incubação a 65° por 10 minutos para inibição da enzima DNase. O RNA foi levado imediatamente a temperatura de -80°C.

### **Obtenção de cDNA**

Foram preparados 2 Mix (Mix 1 e Mix 2). Para o Mix 1 foram utilizados 14µL de RNA (já aliquoteado e tratado com DNase) 1µL de Random primer, 1µL de dNTP e 4µL de água nuclease free (kit de extração). Para o Mix 2 foram utilizados 4 µL de 5X First-Strand Buffer, 1 µL de DTT (0,1M) e 1 µL de SuperScript III (200 U/µL). O Mix 1 foi levado ao termociclador a 65°C por 5 minutos. Em seguida foi

retirado do termociclador e colocado imediatamente no gel por aproximadamente 5 minutos. Logo em seguida foi adicionado o Mix 2 (volume de 6 $\mu$ L) e colocado a amostra novamente no termociclador, dando continuidade no programa. Em seguida o cDNA foi congelado a -80°C.

### **Reação de RT-PCR**

O programa utilizado no Termociclador foi RT-PCR, com ciclos de 65°C por 5 minutos; 25°C por 5 minutos; 50°C por 60 minutos; 70°C por 15 minutos e término a 20°C. Após o PCR do controle interno (gene que codifica o RNA 16S) para controle do procedimento de extração, reação de RT-PCR e da eficiência da ação da enzima DNase na degradação de DNA contaminante no RNA extraído, foi realizada a reação de PCR para verificar a expressão dos genes do operon *ica* utilizando os primers descritos na Tabela 1.

Em seguida foi realizada a eletroforese para visualização dos produtos amplificados conforme descrito anteriormente para a técnica de PCR.

### **Estudo da produção de biofilme**

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

Na pesquisa da produção de biofilme efetuada pelo método de Christensen et al. (12), as colônias isoladas de estafilococos coagulase-negativa 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 de

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 considerada como resultado positivo.

### **Pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em placa de Poliestireno (TCP) - (Christensen et al. 1985) modificado**

O método da pesquisa da produção de biofilme em placas de cultura proposto por Christensen et al. (14), foi utilizado com algumas modificações. Este método apresenta bases espectrofotométricas, baseando-se na leitura da 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. Foram utilizadas placas previamente esterilizadas de 96 cavidades com fundo plano (Costar, modelo 3599 fabricado pela *Corning Incorporated*). Os poços foram preenchidos em quaduplicata com 200µl da cultura diluída, utilizando pipeta multicanal. Em todos os testes foram utilizados uma amostra como controle positivo, uma como controle negativo e uma com TSB estéril. As placas foram incubadas por 24 horas à 37°C e posteriormente o conteúdo de cada poço foi aspirado cuidadosamente utilizando-se pipeta multicanal, e então, lavados quatro vezes com 200µl de tampão fosfato salina (PBS), pH 7,2. A secagem da placa foi realizada em temperatura ambiente por 1 hora. A seguir, os poços foram corados com cristal violeta a 2% por um minuto, em seguida, o volume foi aspirado e o excesso de corante retirado através de uma lavagem das placas com

água destilada utilizando-se de pipeta multicanal. A seguir, foi feita a secagem das placas em temperatura ambiente por 60 minutos e realizada a leitura da densidade óptica no leitor de Elisa, da marca Labssystem modelo Multiskan EX em filtro 540 nm. Para determinação do ponto de corte foi utilizado o mesmo procedimento descrito acima com uma placa inteira contendo TSB estéril. Após a leitura foi determinado a média (M) e o desvio padrão (DP) da placa (Tabela 3).

**Tabela 3:** Valores de média e desvio padrão para o cálculo do ponto de corte

<b>Leitor de Elisa</b> <b>(nm)</b>	<b>Placa</b> <b>Diluição 1:1</b>
<b>Filtro</b>	540
<b>Média</b>	0,084
<b>Desvio Padrão</b>	0,009

Para calcular o ponto de corte, foi utilizado o procedimento recomendado por Christensen et al. (14), multiplicou-se o desvio padrão por três e adicionou o valor da média da densidade óptica da amostra de TSB estéril no mesmo comprimento de onda segundo fórmula descrita abaixo:

(Ponto de corte= DP x 3 + M da DO do TSB estéril)

As amostras foram classificadas em três categorias:

- **Não aderente (NA)**, DO igual ou menor que o ponto de corte,
- **Fraco aderente (FRA)**, DO maior que o ponto de corte ou igual ou menor que o dobro desse valor,
- **Forte aderente (FOA)**, DO maior que o dobro do ponto de corte.

**Tabela 4:** Valores do ponto de corte

<b>Resultado*</b>	<b>Filtro 540nm</b>
<b>NA</b>	$\leq 0,111$
<b>FA</b>	$>0,111$ ou $\leq 0,222$
<b>FOA</b>	$>0,222$

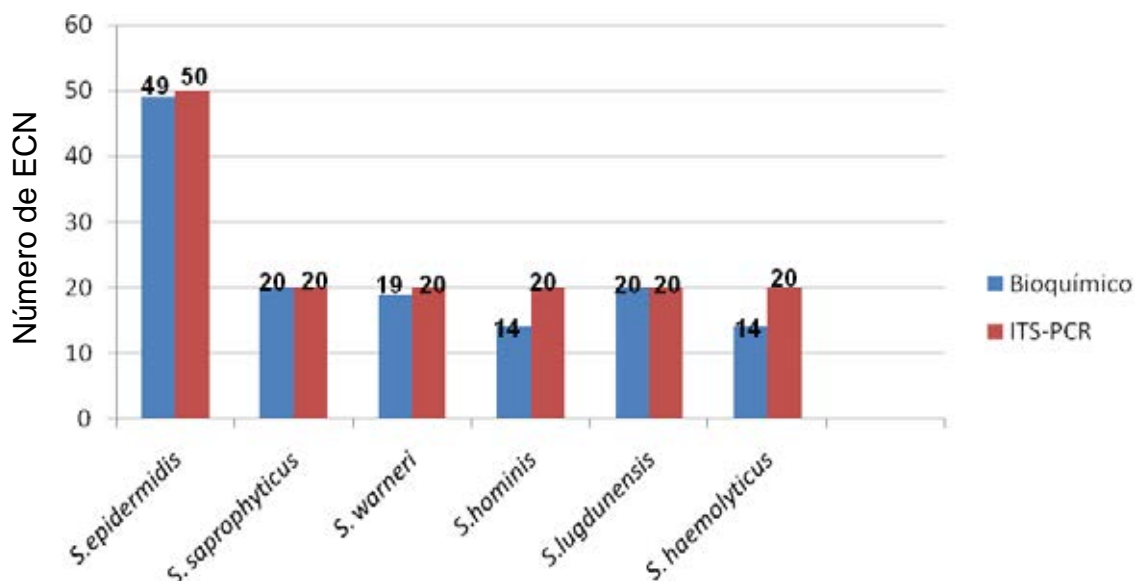
\* **NA**- Não aderente; **FA**- Fraco aderente; **FOA**- Forte aderente

As amostras foram classificadas como negativas, quando o valor do ponto de corte correspondia à classificação de não aderente e em positivas, quando o valor do ponto de corte correspondia à classificação de fraco aderente ou forte aderente.

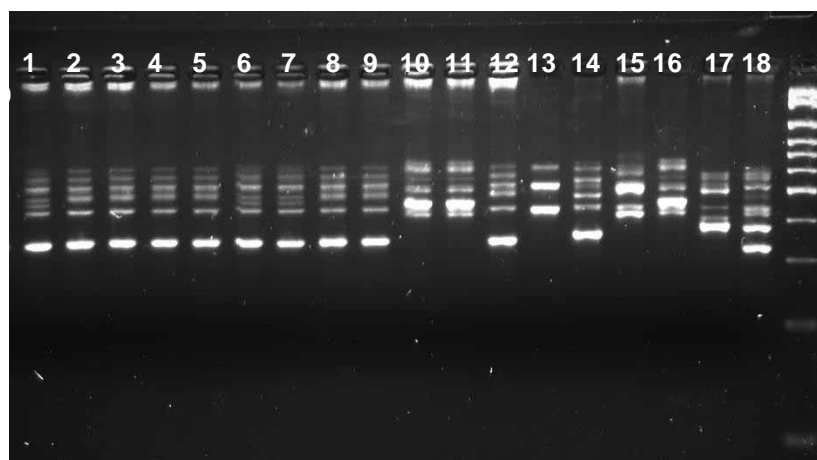
## **RESULTADOS**

### **Amostras**

A identificação fenotípica de *Staphylococcus* spp. revelou 50 (100%) *S. aureus*, 49 (98%) *S. epidermidis*, 20 (100%) *S. saprophyticus*, 14 (70%) *S. haemolyticus*, 14 (70%) *S. hominis*, 19 (95%) *S. warneri* e 20 (100%) *S. lugdunensis*. A técnica genotípica ITS-PCR identificou 50 (100%) *S. epidermidis*, 20 (100%) *S. saprophyticus*, 20 (100%) *S. haemolyticus*, 20 (100%) *S. hominis*, 20 (100%) *S. warneri* e 20 (100%) *S. lugdunensis* (Figuras 1 e 2).



**Figura 1.** Determinação das espécies de ECN identificadas por provas bioquímicas e pela técnica de ITS-PCR.



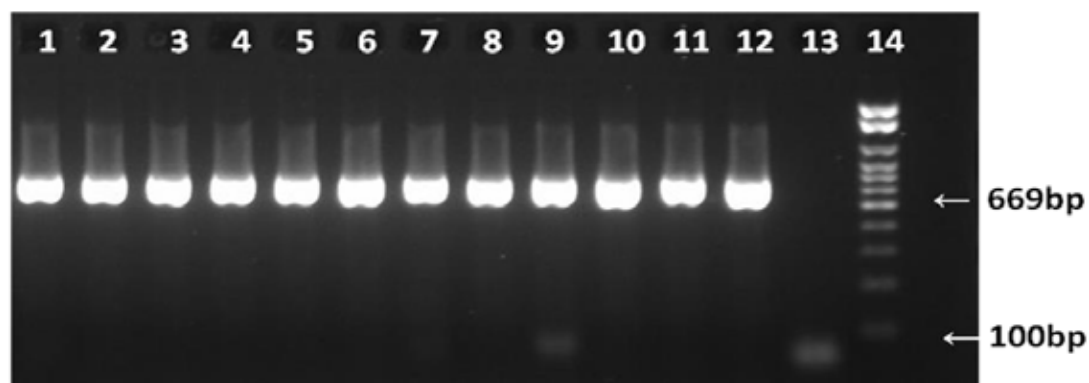
**Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose para confirmação genotípica das espécies de estafilococos coagulase-negativa pela técnica de ITS-PCR. 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 12: *S. epidermidis*; 10 e 11: *S. warneri*; 14: *S. epidermidis* ATCC 12228; 15: *S. haemolyticus* ATCC 10209; 16: *S. warneri* ATCC 29970; 17: *S. hominis* ATCC 700237; 18: *S. capitis* ATCC 27843; 19: marcador de peso molecular (100 bp).

### **Deteção dos genes *icaADBC* responsáveis pela produção de biofilme**

As 200 amostras de *Staphylococcus* foram submetidas à análise pela técnica de PCR para detecção dos genes *icaA*, *icaD*, *icaB*, e *icaC*. Do total de amostras, 97 (48,5%) foram positivas para o gene *icaA*, 64 (32,0%) para *icaB*, 102 (51,0%) para *icaC*, 160 (80,0%) para *icaD* e 16 (8%) negativas para o operon completo. A espécie *S. aureus* foi a que mais apresentou os genes *icaA* 47 (94% ) (Figura 3), já em relação ao *icaB* apenas 7 (14%) amostras. Em relação aos genes *icaC* e *icaD*, um maior número de amostras foram positivas, sendo 14 (28%) para *icaC* e 43 (86%) para *icaD*.

*S. epidermidis* apresentou 22 (44%) amostras positivas para o gene *icaA* e foi a espécie que revelou mais amostras positivas para os genes *icaB*, *C* e *D*, com 30 (60%) positivas para o *icaB*, 37 (74%) *icaC* e 45 (90%) *icaD*. As outras espécies de ECN não demonstraram muitas variações na distribuição dos genes (Tabela 5), exceto *S. lugdunensis* que revelou um alto índice de amostras positivas para o gene *icaA* (80%).

A presença concomitante dos genes foi encontrada em 88% das amostras de *S. aureus*, com maior frequência *icaAD* (50%) e *icaADC* (24%), seguida pela espécie *S. epidermidis* (76%), *S. lugdunensis* (65%), *S. hominis* (65%), *S. saprophyticus* (60%), *S. haemolyticus* (60%) e *S. warneri* (40%) (Tabela 6).



**Figura 3.** Gel de agarose 2% corado com Syber Safe representando a amplificação do gene *icaA* em *S. aureus* (bp) - amostras positivas: 1-11 controle positivo: 12; controle negativo: 13; Marcador de peso molecular (100 bp): 14.

**Tabela 5:** Frequência dos genes *icaADBC* de acordo com as espécies

Espécies	Genes				Negativo
	<i>icaA</i>	<i>icaB</i>	<i>icaC</i>	<i>icaD</i>	
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	
<i>S. aureus</i> (n=50)	47 (94)	7 (14)	14 (28)	43 (86)	1 (2)
<i>S. epidermidis</i> (n=50)	22 (44)	30 (60)	37 (74)	45 (90)	2 (4)
<i>S. haemolyticus</i> (n=20)	1 (5)	8 (40)	9 (45)	15 (75)	4 (20)
<i>S. saprophyticus</i> (n=20)	8 (40)	7 (35)	12 (60)	17 (85)	2 (10)
<i>S. hominis</i> (n=20)	2 (10)	5 (25)	14 (70)	15 (75)	0 (0)
<i>S. warneri</i> (n=20)	1 (0,5)	4 (20)	8 (40)	11 (55)	7 (35)
<i>S. lugdunensis</i> (20)	16 (80)	3 (15)	8 (40)	14 (70)	0 (0)
Total	97(48,5)	64 (32)	102 (51)	160(80)	16(8)

N: Número de amostras (%) : Porcentagem de amostras

**Tabela 6:** Presença concomitante dos genes *icaADBC* de acordo com as espécies.

Genes	Espécies						
	<i>S. aureus</i> (n=50) N(%)	<i>S. epidermidis</i> (n=50) N (%)	<i>S. haemolyticus</i> (n=20) N (%)	<i>S. saprophyticus</i> (n=20) N (%)	<i>S. hominis</i> (n=20) N (%)	<i>S. warneri</i> (n=20)	<i>S. lugdunensis</i> (n=20) N (%)
<i>ica</i> <i>A,D,B,C</i>	2 (4)	18 (36)	1 (5)	5 (25)	0 (0)	1 (5)	1 (5)
<i>ica A,D, C</i>	10 (20)	1 (2)	0 (0)	3 (15)	2 (10)	0 (0)	5 (25)
<i>ica</i> <i>A,C</i>	2(4)	0(0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>ica</i> <i>A,D</i>	25 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (20)
<i>ica</i> <i>A, B</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (5)
<i>ica</i> <i>B, C</i>	0 (0)	0 (0)	1 (5)	0 (0)	1 (5)	1 (5)	0 (0)
<i>ica</i> <i>D, C</i>	0 (0)	8 (16)	4 (20)	3 (15)	6 (30)	4 (20)	1 (5)
<i>ica</i> <i>D, B</i>	1 (2)	0 (0)	3 (15)	0 (0)	3 (15)	1 (5)	0 (0)
<i>ica</i> <i>D,B,C</i>	0 (0)	8 (16)	3 (15)	1 (5)	1 (5)	1 (5)	1 (5)
<i>ica</i> <i>A,D,B</i>	4 (8)	3 (6)	0 (0)	1 (5)	0 (0)	1 (5)	0 (0)

**N:** Número de amostras    **(%):** Porcentagem de amostras

### **Deteção da expressão dos genes *icaADBC* pela técnica de RT-PCR**

As amostras de cada espécie que apresentaram pelo menos um dos genes *ica* na PCR foram submetidas à técnica de RT-PCR para determinação da expressão dos genes (Figura 4).

Do total de 50 amostras de *S. aureus* 2 (4%) apresentavam o operon completo detectado pela PCR *icaADBC*, 24 amostras apresentavam pelo menos um dos genes *ica* e apenas uma amostra não revelou nenhum dos genes. Nesta espécie pela técnica de RT-PCR os genes *icaA* e *icaD* foram os mais expressos, 14 e 13 amostras respectivamente, e em 9 (18%) amostras se apresentaram em concomitância, o *icaB* em 2 (4%) amostras e em concomitância com os genes *AD*. A expressão de *icaC* foi encontrada em apenas 1 (2%) amostra e em concomitância com os outros três genes.

Das 50 amostras de *S. epidermidis*, 18 (36%) apresentavam o operon completo detectado pela PCR com os genes *icaADBC*, 30 (60%) pelo menos um dos genes do operon *ica* e apenas duas amostras não apresentaram nenhum dos genes. Nesta espécie o gene *icaD* foi o mais expresso na RT-PCR, em 29 (66,4%) de 45 amostras em que estava presente, o *icaC* 22 (59,5%) de 37 amostras, o *icaB* 17 (56,6%) de 30 amostras e o *icaA* em 12 (54,5%) de 22 amostras e 8 (16%) amostras expressaram o operon completo *icaADBC*.

Do total de 20 amostras de *S. saprophyticus*, 5 (25%) apresentaram o operon completo *icaADBC*, 13 (65%) pelo menos um dos genes do operon *ica* e duas amostras não revelaram nenhum gene. A expressão do gene *icaD* foi verificada em 9 (52,9%) de 17 amostras em que estava presente, o *icaC* em 9 (75%) de 12 amostras e o *icaB* 3 (42,9%) de 7 amostras. Nenhuma amostra dessa espécie expressou o gene *icaA*.

Em *S. haemolyticus*, apenas uma das 20 amostras estudadas apresentou o operon completo com os genes *icaADBC*, 15 (75%) pelo menos um dos genes do operon *ica* e 4 amostras não apresentaram nenhum gene. O gene *icaC* foi expresso em 5 (55,5% ) de 9 amostras em que estava presente, o *icaD* em 5 (33,3%) de 15 amostras, o *icaB* em uma das 8 amostras em que estava presente e o gene *icaA* foi expresso na única amostra em que estava presente.

Das 20 amostras de *S. hominis*, nenhuma revelou o operon completo, 2 (10%) apresentavam os genes *icaADC*, e 18 amostras com pelo menos um dos genes do operon *ica*. A técnica de RT-PCR nesta espécie demonstrou a expressão do *icaC* em 7 (50%) de 14 amostras em que estava presente, o *icaD* 2 (13,3%) de 15 amostras e o *icaB* 1 (20%) de 5 amostras.

Do total de 20 amostras de *S. warneri*, 1 (5%) apresentou o operon completo *icaADBC*, 13 (65%) pelo menos um dos genes do operon *ica* e 6 (30%) amostras não revelaram nenhum gene. Destas somente o gene *icaC* foi expresso em 4 (20%) das amostras, sendo que estava presente em 8 das amostras.

Em *S. lugdunensis*, somente 1 (5%) do total de 20 amostras estudadas apresentou o operon completo *icaADBC*, as outras 19 amostras revelaram pelo menos um dos genes do operon, sendo o *icaC* expresso em 5 (62,5%) de 8 amostras, o gene *icaD* em 8 (57,1%) de 14 amostras e o gene *icaA* 1 (6,2%) de 16 amostras.

Os resultados revelaram que do total de amostras de *Staphylococcus* spp. estudadas a expressão do gene *icaC* foi mais frequente, 53 (56,9%) de 93 amostras em que estava presente, o gene *icaD* 66 (41,2%) de 160 amostras, o *icaB* 24 (44,4%) de 54 amostras e o *icaA* foi o que menos expressou, 28 (29,5%) de 95 amostras (Tabela 7 e 8).

**Tabela 7.** Expressão dos genes do operon *ica* pela Técnica de RT-PCR em *Staphylococcus aureus*.

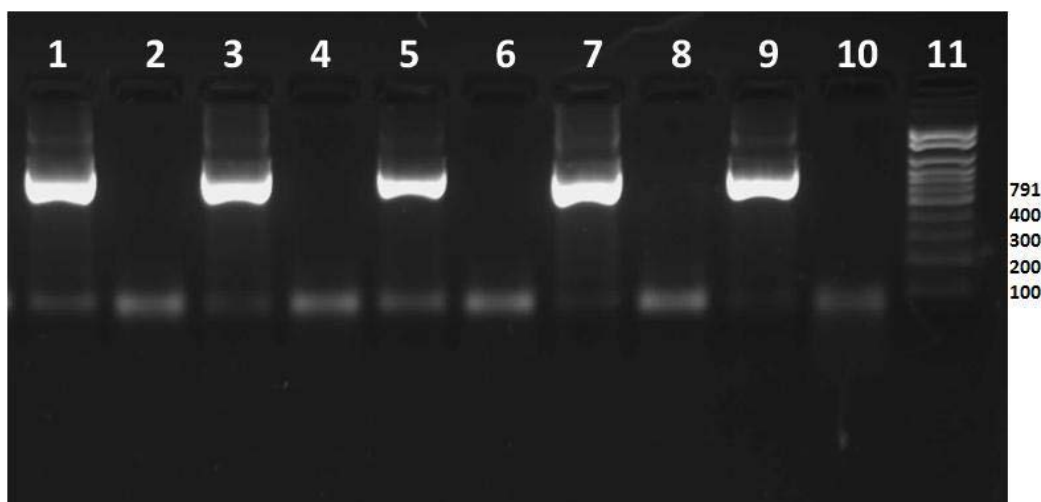
<i>S. aureus</i> N(%)	Genes <i>ica</i> N° amostras Positivas		
	PCR	RT-PCR	
	2 <i>A</i> <i>D</i> <i>B</i> <i>C</i>	1 <i>A</i> <i>D</i> <i>B</i> <i>C</i>	1*
	10 <i>A</i> <i>D</i> <i>C</i>	2 <i>A</i> <i>D</i>	8*
	4 <i>A</i> <i>D</i> <i>B</i>	1 <i>A</i> <i>D</i> <i>B</i> ; 2 <i>A</i> <i>D</i>	1*
50 (100)	25 <i>A</i> <i>D</i>	6 <i>A</i> <i>D</i> ; 1 <i>A</i> ; 1 <i>D</i>	17*
	2 <i>A</i> <i>C</i>	-	2*
	1 <i>D</i> <i>B</i>	-	1*
	4 <i>A</i>	1 <i>A</i>	3*
	1 <i>D</i>	-	1*
	1 -	-	-
<b>Total</b> <b>50 (100)</b>	<b>49 (98)</b>	<b>15 (30,6)</b>	<b>34 (68)</b>

- Amostra negativa no PCR,\* Amostras que não expressaram nenhum gene

**Tabela 8.** Expressão dos genes do operon *ica* pela Técnica de RT-PCR em espécies de Estafilococos coagulase-negativa.

Espécie	Genes <i>ica</i>		
	Nº [%]	PCR	Nº amostras Positivas RT-PCR (n)
<i>S. epidermidis</i>	18	<i>ADBC</i>	(8) <i>ADBC</i> (1) <i>ABC</i> (1) <i>AD</i> (1) <i>ADB</i> (3) <i>DBC</i> (1) <i>A</i> (1) <i>DC</i> (2) <i>D</i>
50 [100,0]	3	<i>ADB</i>	(2) <i>DB</i> (1) <i>D</i>
	8	<i>DBC</i>	(2) <i>DBC</i> (1) <i>D</i> (2) <i>DC</i> (3)*
	1	<i>ADC</i>	(1)*
	8	<i>DC</i>	(4) <i>DC</i> (4) *
	2	<i>C</i>	(1) <i>C</i> (1)*
	7	<i>D</i>	(1) <i>D</i> (6) *
	1	<i>B</i>	(1) *
	2	-	
<i>S. saprophyticus</i>	5	<i>ADBC</i>	(1) <i>DC</i> (2) <i>DBC</i> (2)*
20 [100,0]	3	<i>ADC</i>	(1) <i>DC</i> (1) <i>D</i> (1) <i>C</i>
	1	<i>DBC</i>	(1) <i>DC</i>
	3	<i>DC</i>	(2) <i>DC</i> (1) <i>C</i>
	5	<i>D</i>	(1) <i>D</i> (4) *
	1	<i>B</i>	(1) <i>B</i>
	2	-	
<i>S. haemolyticus</i>	1	<i>ADBC</i>	(1) <i>A</i>
20 [100,0]	3	<i>DBC</i>	(1) <i>C</i> (1) <i>D</i> (1)*
	4	<i>DC</i>	(1) <i>DC</i> (2) <i>C</i> (1) <i>D</i>
	1	<i>BC</i>	(1) <i>C</i>
	3	<i>DB</i>	(1) <i>DB</i> (2)*
	4	<i>D</i>	(1) <i>D</i> (3)*
	4	-	
<i>S. hominis</i>	2	<i>ADC</i>	(1) <i>DC</i> (1)*
20 [100,0]	1	<i>DBC</i>	(1) <i>DC</i>
	6	<i>DC</i>	(2) <i>C</i> (4)*
	1	<i>BC</i>	(1) <i>BC</i>
	3	<i>DB</i>	(3)*
	4	<i>C</i>	(2) <i>C</i> (2)*
	3	<i>D</i>	(3)*
<i>S. warneri</i>	1	<i>ADBC</i>	(1)*
20 [100,0]	1	<i>DBC</i>	(1)*
	1	<i>BC</i>	(1)*
	1	<i>DB</i>	(1)*
	4	<i>DC</i>	(3) <i>C</i> (1)*
	1	<i>C</i>	(1) <i>C</i>
	4	<i>D</i>	(4)*
	7	-	
<i>S. lugdunensis</i>	1	<i>ACDB</i>	(1) <i>C</i>
20 [100,0]	5	<i>ACD</i>	(2) <i>DC</i> (1) <i>D</i> (2) <i>C</i>
	4	<i>AD</i>	(1) <i>AD</i> (3) <i>D</i>
	1	<i>AB</i>	(1) *
	5	<i>A</i>	(5) *
	1	<i>CDB</i>	(1) *
	1	<i>CD</i>	(1) *
	2	<i>D</i>	(1) <i>D</i> (1) *
<b>Total</b>	<b>150 [100,0]</b>	<b>135 [90,0]</b>	<b>76 [56,3]</b>

- Amostras negativa na PCR,\* Amostras que não expressaram nenhum gene



**Figura 4.** PCR em gel de agarose para a confirmação da conversão do RNA em cDNA, através da pesquisa do gene 16S ribossomal, e confirmação da eficiência do tratamento do RNA pela enzima DNase. Amostras: 1, 3, 5, 7 e 9 - RNA convertido em cDNA através da expressão do gene 16S ribossomal; 2, 4, 6, 8 e 10 - RNA das amostras de *S. epidermidis* tratadas com DNase; 11 marcador molecular de 100 pb.

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

A produção de biofilme em *S. aureus* e *S. epidermidis* demonstrou estar associada diretamente à expressão dos genes do operon *ica*. Em *S. aureus* além da associação com o operon *ica*, a presença e expressão do *icaA* revelou-se fundamental nas amostras. Também em *S. epidermidis* os resultados demonstraram a produção de biofilme associado ao operon *ica* e a expressão do *icaA* e *D*, com a maioria das amostras que produziram biofilme expressando os dois genes e somente 3 (21%) das produtoras não revelaram o *icaA*, mas expressaram os genes *icaDBC*.

Em *S. saprophyticus* 5 (38,5%) das amostras produtoras não revelaram o operon *icaA*, 8 (61,5) revelaram outros genes, porém nenhuma delas apresentou o gene *icaA*.

Em relação às amostras de *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri* e *S. lugdunensis*, poucas amostras produziram biofilme no teste fenotípico (15%), (5%), (15%) e (10%), respectivamente, e houve pouca associação com os genes do operon *ica*. Assim, os resultados demonstraram que a produção de biofilme não parece ser característica dessas espécies.

#### **Pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em placa de Poliestireno (TCP) - (Christensen *et al.* 1985) modificado**

A partir da leitura das placas com filtro de 540nm foi verificado que das 200 amostras submetidas a este teste, 41 (20,5%) foram classificadas como fraco aderentes e 8 (4%), como forte aderentes, totalizando 49 (24,5%) de amostras positivas e 151 (75,5%) negativas como não aderentes. Das 49 amostras positivas, 14 (28,6%) foram *S. aureus*, das quais somente uma amostra revelou-se forte aderente e expressou o operon completo na técnica de RT-PCR e 13 fraco aderentes, sendo que todas expressaram o gene *icaA*.

Em *S. epidermidis* 13 (26,5%) foram produtoras de biofilme, sendo 4 forte aderentes, 2 (15,4%) expressaram o operon completo *icaADBC* na técnica de RT-PCR, 1 (7,6%) os genes *icaAD* e 1 (7,6%) os genes *icaDBC*. Das 9 (69,2%) amostras fraco aderentes 5 (38,5) expressaram o operon completo *icaADBC*, 1 (7,6%) *icaADB*, 1 (7,6%) *icaABC* e 2 (15,3%) revelaram os genes *icaDBC*. Nessa espécie, 10 (76,9%) amostras produtoras de biofilme revelaram os genes *icaA* e *D* em concomitância.

*S. saprophyticus* revelou 13 (56%) amostras positivas neste teste, das quais 1 (7,6%) foi forte aderente e possuía os genes *icaDBC* na RT-PCR, e 12 (92%) fraco aderentes, das quais 1 (7,6%) revelou os genes *icaDBC*, 4 (30,7%) *icaDC*, 1 (7,6%) apenas *icaC* e 5 (15%) na ausência total do operon *ica*. Das amostras produtoras nenhuma amostra revelou o gene *icaA* na RT-PCR.

Da espécie *S. haemolyticus* 3 (15%) foram produtoras de biofilme, 1 (33,3%) forte aderente com o gene *icaA* e 2 (66,6%) fraco aderentes, sendo que uma revelou o gene *icaD* e uma na ausência total do operon. *S. hominis* revelou apenas 1 (5%) amostra produtora de biofilme fraco aderente na ausência do operon *ica*. Em *S. warneri* 3 (15%) foram produtoras fraco aderentes na ausência do operon completo na RT-PCR e em *S. lugdunensis* 2 (10%) amostras foram positivas, uma revelando os genes *icaAD* na RT-PCR e uma na ausência do operon completo.

Todas as 49 amostras que se revelaram positivas no teste de aderência no tubo de borossilicato também foram positivas no teste de aderência à placa de poliestireno (Tabela 8).

**Tabela 8.** Relação das amostras produtoras de biofilme no método de aderência a ao tubo de borossilicato e na placa de poliestireno com a expressão dos genes no método genotípico

Espécies	Quantidade de amostras	TM	TCP	Expressão dos genes RT-PCR
<i>S. aureus</i>	1	+	FOA	<i>icaACDB</i>
<i>S. aureus</i>	1	+	FA	<i>icaADB</i>
<i>S. aureus</i>	10	+	FA	<i>icaAD</i>
<i>S. aureus</i>	2	+	FA	<i>icaA</i>
<i>S. epidermidis</i>	2	+	FOA	<i>icaACDB</i>
<i>S. epidermidis</i>	1	+	FOA	<i>icaAD</i>
<i>S. epidermidis</i>	1	+	FOA	<i>icaCDB</i>
<i>S. epidermidis</i>	5	+	FA	<i>icaACDB</i>
<i>S. epidermidis</i>	1	+	FA	<i>icaADB</i>
<i>S. epidermidis</i>	1	+	FA	<i>icaACB</i>
<i>S. epidermidis</i>	2	+	FA	<i>icaCDB</i>
<i>S. saprophyticus</i>	1	+	FOA	<i>icaCDB</i>
<i>S. saprophyticus</i>	1	+	FA	<i>icaCDB</i>
<i>S. saprophyticus</i>	4	+	FA	<i>icaCD</i>
<i>S. saprophyticus</i>	2	+	FA	<i>icaC</i>
<i>S. saprophyticus</i>	5	+	FA	-
<i>S. haemolyticus</i>	1	+	FOA	<i>icaA</i>
<i>S. haemolyticus</i>	1	+	FA	<i>icaD</i>
<i>S. haemolyticus</i>	1	+	FA	-
<i>S. hominis</i>	1	+	FA	-
<i>S. warneri</i>	3	+	FA	-
<i>S. lugdunensis</i>	1	+	FOA	<i>icaAD</i>
<i>S. lugdunensis</i>	1	+	FA	-

+ Positiva no teste do tubo; **FA**:Fraco aderente; **FOA**:Forte aderente; - negativa na RT-PCR

## DISCUSSÃO

A adesão bacteriana e a conseqüente formação de biofilme pelos *Staphylococcus* spp. tem sido considerada um importante fator de virulência em infecções associadas ao uso de cateteres e outros dispositivos médicos (3, 4), pelo fato do biofilme conferir proteção contra o sistema imunológico do hospedeiro e da ação de antimicrobianos (5, 6). Neste estudo foi incluído um total de 50 amostras de *S. aureus* e 150 de ECN, pelo fato de serem as bactérias mais comumente isoladas e associadas a infecções de implantes cirúrgicos e dispositivos médicos. O método fenotípico apresentou ótimos resultados na identificação das espécies de ECN quando comparado com a técnica de ITS-PCR, com somente 14 (9,3%) amostras revelando discrepâncias na identificação principalmente para as espécies *S. hominis* e *S. haemolyticus*. As divergências encontradas podem ser explicadas pelo fato dos métodos fenotípicos dependerem da expressão de genes, e em algumas espécies pode ocorrer a interferência de fatores como disponibilidade de nutrientes, fermentação tardia, mutação, entre outros. De acordo com Couto et al. (27), devido a alguns métodos fenotípicos serem baseados em resultados colorimétricos, qualquer interferência que ocorra no desenvolvimento desses testes, pode levar a dúvidas na interpretação dos resultados.

Neste estudo os resultados revelaram 47 (94%) amostras de *S. aureus* positivas para o gene *icaA*, similares ao dados encontrados por Rohde et al. (22). Também os resultados se mostraram semelhantes a outros estudos como EL-Din et al. (30), que em 14 amostras de *S. aureus* isoladas de pele e mucosa de pacientes com câncer, 10 (71,4%) apresentaram os genes *icaA* e *D* e Gad et al. (31) que encontraram 83% dos genes *icaAD* em concomitância em amostras isoladas de cateteres relacionados a infecções urinárias, além de Yasdani et al. (32) que

detectaram também uma alta prevalência dos gene *icaAD* em *S. aureus* isolados de diversas infecções.

Em nosso estudo 28% das amostras de *S. aureus* foram positivas para a produção de biofilme e todas relacionadas à expressão dos genes do operon *ica*, dados semelhantes ao encontrado por Satorres e Alcaraz (33) que relataram a detecção dos genes *icaA* e *D* e produção de biofilme através de método fenotípico em 22% de amostras de *S. aureus*. Também em estudo realizado por Atshan et al. (34) com isolados de clones de MSSA e MRSA, os resultados demonstraram que todas as amostras com o operon *icaADBC* completo expressaram os genes na RT-PCR e a maioria foi produtora de biofilme no teste fenotípico de aderência a placa de poliestireno. Ainda outros autores (32) relataram a produção de biofilme no método fenotípico em todas as amostras que revelaram os genes *icaAD* na técnica de PCR

*S. epidermidis* foi a segunda espécie entre os coagulase-negativa que mais apresentou os genes *ica* em suas amostras, sendo 44% para *icaA*, 60% para *icaB*, 74% para *icaC* e 90% para *icaD*, e a que mais revelou o operon completo com os genes *icaADBC*. A técnica de RT-PCR revelou que 8 (9,2%) amostras expressaram o operon completo, além de uma *icaACB*, uma *icaADB* e uma *icaAD* e o resultado do método fenotípico de aderência na placa de poliestireno, mostrou que do total de amostras que expressaram o operon completo, duas revelaram-se forte aderentes, 5 fraco aderentes e uma não aderente. No caso das amostras que expressaram os genes do operon completo ou a combinação de dois ou mais genes do operon *ica* e revelaram-se fraco aderentes ou negativa nos testes fenotípicos, alguma condição ambiental ou mecanismo de regulação gênica podem ter influenciado na produção da proteína, como ocorre em outros testes fenotípicos. Em relação as três amostras

produtoras de biofilme na ausência de *icaA* as bactérias podem ter se utilizado de outro mecanismo de formação de biofilme *ica* independente (20, 21, 22). Das demais amostras positivas no teste fenotípico, apenas 3 não expressaram o gene *icaA*. Também as amostras produtoras de biofilme que revelaram o gene *icaA* na técnica de RT-PCR, também apresentavam o gene *icaD* em concomitância. Esses resultados sugerem a importância desses dois genes na formação do biofilme na maioria das amostras. Também é importante ressaltar que de 13 amostras positivas no método fenotípico apenas uma não expressou os genes *icaB* e *icaC*. O *icaB* codifica a proteína IcaB responsável pela deacetilação do PIA facilitando a adesão das células com o PIA e entre as células (16, 33, 35).

*Staphylococcus saprophyticus* revelou 40% das amostras positivas para o gene *icaA*, 35% *icaB*, 60% *icaC* e 85% *icaD*, sendo a segunda espécie de ECN que mais apresentou os genes *icaADBC* em concomitância. De acordo com Rup et al. (37), *S. saprophyticus* causa infecções urinárias agudas e sintomáticas em crianças e adolescentes de ambos os sexos. Cernohorská et al. (38) relataram que de 87 amostras estudadas obtidas de infecções urinárias, 18,7% foram produtoras de biofilme e resistentes a diversos antibióticos. Em nosso estudo das 20 amostras de *S. saprophyticus* submetidas à técnica de RT-PCR 5 (25%) expressaram o operon completo e 3 os genes *icaADC*. Do total de amostras, 13 (65%) produziram biofilme no teste de aderência à placa de poliestireno, sendo uma forte aderente e 13 fraco aderentes, das quais 5 amostras não expressaram nenhum gene do operon *ica*. Estes resultados sugerem que as bactérias podem ter se utilizado de outros mecanismos para formação do biofilme. Alguns estudos tem demonstrado a formação de biofilme em amostras de *S. epidermidis* mesmo na ausência de PIA (22), sugerindo que outras duas proteínas além do PIA podem estar envolvidas na formação do biofilme,

como a proteína Aap (accumulation-associated protein) (20), a proteína Bhp homóloga de Bap (biofilm-associated proteina) encontrada em *S. aureus* de origem animal (21). Porém, a maioria dos estudos que relatam a formação de biofilme na ausência de PIA foi realizada com *S. epidermidis* e *S. aureus*, de modo que se fazem necessárias pesquisas mais específicas para elucidar a presença de outros genes ou substâncias envolvidas na produção de biofilme nessa espécie.

As espécies *S. haemolyticus*, *S. hominis* e *S. warneri* apresentaram baixa frequência do gene *icaA*, dados semelhantes ao encontrado por El-Din et al. (30). Em relação a *S. haemolyticus*, Vuong e Otto (16) e Cerca et al. (39) relataram esta espécie como uma das mais envolvidas nas infecções nosocomiais, em pacientes com câncer e imunodeprimidos e que fazem uso de dispositivos médicos, também apresentando resistência a um grande número de antibióticos. Das 20 amostras estudadas apenas uma apresentou o operon completo com os genes *icaADBC* e expressou apenas o *icaA* e apenas 3 (15%) produziram biofilme nos métodos fenotípicos, uma forte aderente revelando o gene *icaA*, e duas fraco aderentes uma revelando o gene *icaD*, e a outra nenhum gene do operon, sugerindo que a produção de biofilme não é um fator de virulência importante nesta espécie. Embora Fredheim et. (40) relatam que a formação de biofilme é comum nessa espécie, proteínas e DNA extracelular são de maior relevância funcional para a acumulação no biofilme, enquanto o PIA desempenha um papel secundário.

A espécie *S. hominis* expressou os genes do operon *ica* em 5 (25%) das amostras, com exceção do *icaA*. Já o *S. warneri* só expressou o gene *icaC* em apenas duas. Das 20 amostras estudadas de *S. hominis* apenas uma foi positiva nos testes fenotípicos, revelando-se fraco aderente na placa de poliestireno, e das 20 de *S. warneri* apenas 3 (15%) produziram biofilme, também classificadas como fraco

aderentes, porém as amostras positivas no teste fenotípico de ambas as espécies não expressaram nenhum gene do operon *ica*. Em estudos realizados por Silva et al. (41) 44% das amostras de *S. hominis* produziram biofilme na ausência do operon *ica*. Embora se tenha poucos estudos sobre estas duas espécies em relação à produção de biofilme e pesquisas dos genes do operon *ica*, as semelhanças encontradas com relação aos resultados em ambas, sugerem que a produção de biofilme em *S. hominis* e *S. warneri* não dependem da expressão dos genes do operon *ica*.

De acordo com Frank et al. (42), *Staphylococcus lugdunensis* é um patógeno virulento associado tanto a infecções comunitárias como nosocomiais, apresentando um potencial de virulência semelhante ao *S. aureus*. A espécie *S. lugdunensis* apresentou o gene *icaA* em (80%) do total de amostras, porém com apenas uma amostra positiva para o operon completo. Das 20 amostras estudadas quanto a produção de biofilme, somente 2 (10%) foram positivas nos testes fenotípicos, sendo que uma dessas amostras expressou os genes *icaAD* na RT-PCR e a outra não expressou nenhum gene do operon *ica*. De acordo com Frank e Patel (43) apesar da presença do operon *icaADBC* em isolados de *S. lugdunensis*, o PNAG não é um componente importante da matriz extracelular do biofilme nesta espécie, sugerindo que a matriz do biofilme está relacionada mais a fatores protéicos.

## CONCLUSÃO

O conhecimento dos mecanismos envolvidos na produção de biofilme deriva de estudos e caracterização voltados para o *S. aureus* e *S. epidermidis*. Neste estudo além de *S. aureus* e *S. epidermidis*, foram pesquisadas as espécies *S. saprophyticus*,

*S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri* e *S. lugdunensis* a fim de elucidar a capacidade de formação de biofilme nestas espécies.

A pesquisa dos genes pela técnica de PCR demonstrou que a espécie *S. aureus* foi a que mais apresentou o gene *icaA*. O RT-PCR revelou uma diferente combinação da expressão dos genes nas diferentes espécies estudadas, sendo o gene *icaC* o mais expresso e com pouca expressão do gene *icaA*. Do total de amostras estudadas 49 produziram biofilme, 26 expressando o gene *icaA*, 12 não expressando o gene *icaA* mas revelando outros genes do operon e 11 não expressaram nenhum dos genes *ica*, sugerindo a presença de um mecanismo alternativo (*ica*-independente) na formação de biofilme estafilocócico nessas amostras. A produção de biofilme foi mais frequente em *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*. No caso de *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri* e *S. lugdunensis*, nosso estudo sugere que o biofilme não é um fator de virulência importante nessas espécies, com poucos isolados positivos nos testes fenotípicos e na RT-PCR, e mais pesquisas são necessárias para elucidar a virulência dessas espécies.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos à Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo (FAPESP – Processo: 2011/07285-5) e Secretaria da Educação do Estado de São Paulo pelo suporte financeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Dietrich M., Holger R., Dobinsky S., Riedewald J., Nedelmann M., Knobloch JM (2000) Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. *Infect Immun* **68**:3799-807.
- 2 Otto M (2004) Virulence factors of the coagulase-negative staphylococci. *Front Biosc* **9**:841-63.
- 3 Rohde H., Mack D., Christner M., Burdelski C., Franke G., Knobloch JM (2006) Pathogenesis of staphylococcal device-related infections: from basic science to new diagnostic, therapeutic and prophylactic approaches. *Rev Med Microbiol* **17**:45-54.
- 4 Vandecasteele SJ., Peetermans WE, Merckx R., Van Eldere J (2003) Expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus epidermidis* during in vitro and in vivo foreign body infections. *J Infect Dis* **188**:730-37.
- 5 Peetermans WE., Merckx R., Rijnders A., Van Eldere J (2003) Reliability of the *ica*, *aap* and *AtlE* genes in the discrimination between invasive, colonizing and contaminant *Staphylococcus epidermidis* isolates in the diagnosis of catheter-related infection. *Clin Microbiol Infect* **9**:114-19.
- 6 de Silva G., Kantzanou M., Justice A., Massey R., Wilkinson A., Day N., Peacock S (2002) The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative Staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microb* **40**:2382-88.

- 7 Cramton S., Gerke C., Schnell N., Nichols W., Götz F (1999) The intercellular adhesion (*Ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun* **67**:5427-33.
- 8 Götz F (2002) *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol* **43**:1367-78.
- 9 Cafiso V., Bertuccio T., Santagati M., Campanile F., Amicosante G., Perilli M.G., 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. *Clin Microbiol Infect* **10**:10812.
- Costerton W., Veeh R., Shirtliff M., Pasmore M., Post C., Ehrlich G. (2003) The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest* **112**: 1466-77.
- 10 Costerton W., Veeh R., Shirtliff M., Pasmore M., Post C., Ehrlich G (2003) The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest* **112**: 1466-77.
- 11 Morales M., Mendez-Alvarez S., Martin-Lopes J.V, Marreiro C., Freytes C.O. (2004) Biofilm: the microbial “bunker” for intravascular catheter-related infection. *Support Care Cancer* **12**:701-07.
- 12 Christensen G.D., Simpson W.A., Bisno A.L., Beachey E.H (1982) Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun* **37**:318-26.
- 13 Ziebuhr W, Heilmann F, Götz F, Meyer K (1997) Detection of the intercellular adhesin gene cluster (*Ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect Immun* **65**:890-96.
- 14 Christensen G.D., Simpson W.A., Yonger J.J., Baddor L.M., Barrett F.F., Melton D.M., Beachey E.H (1985) Adherence of coagulase-negative

- Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *Staphylococci* to medical devices. *Journ Clin Microbiol* **22**: 996-06.
- 15 Cunha M.L.R.S., Caramori J.C.T., Fioravante A.M., Batalha J.E.N., Montelli A.C., Barretti P (2004) Significance of slime as virulence factor in coagulase-negative staphylococcus peritonitis in CAPD *Perit Dial Int* **24**:191-93.
- 16 Vuong C., Kocianova S., Voyich J.M., Yao Y., Fischer E.R., DeLeo F.R.D., Otto M (2004) A Crucial Role for Exopolysaccharide Modification in Bacterial Biofilm Formation, Immune Evasion, and Virulence. *J Bio. CHEM* **279**:54881-86.
- 17 Frank, K.L., Hanssen A.D., Patel R (2004). *icaA* Is Not a Useful Diagnostic Marker for Prosthetic Joint Infection. *J Clin Microbiol* **42**:4846-49.
- 18 Rohde H., Burandt EC., Sienssem N., Frommelt L., Burdesk C. Wurster S., Scherp S., Davies AP., Harris LG., Horstikotte MA., Knobloch JK., Ragunath C. Kaplan J., Mack D (2007) Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials* **28**:1711–20.
- 19 Arciola CR., Campoccia D., Baldassari L., Donati ME., Pirini V., Gamberini S., Montaro L (2006) Detection of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* from implant infections. Comparison of a PCR-method that recognizes the presence of *ica* genes with two classic phenotypic methods. *J Biomed Mat Res A* **76**:425–430.

- 20 Rohde H., Burdesk C., Bartscht K., Hussain M., Buck F. Horstkotte MA., Knobloch JK., Heilmann C., Herrmann M., Mack D (2005) Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol Microbiol* **55**:1883-95.
- 21 Tormo MA., Mart M., Valle J., Manna AC., Cheung AL., Lasa I., Penades JR (2005). SarA Is an Essential Positive Regulator of *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Development. *J Bacteriol* **187**:2348-56.
- 22 Rohde H., Burandt EC., Sienssem N., Frommelt L., Burdesk C. Wurster S., Scherp S., Davies AP., Harris LG., Horstkotte MA., Knobloch JK., Ragunath C. Kaplan J., Mack D (2007) Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials* **28**:1711–20.
- 23 Cucarella C., Solano C., Valle J., Amorena B., Lasa I., Penadés JR (2001) Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* **183**:2888-96.
- 24 Vadyvaloo V., Otto M (2005) Molecular genetics of *Staphylococcus epidermidis* on indwelling medical devices. *Int J Artf Organs* **28**:1069-78.
- 25 Baker J.S (1984). Comparison of various methods for differentiation of staphylococci and micrococci. *J Clin Microbiol* **19**:875-79.
- 26 Cunha M.L.R.S., Sinzato Y.K., Silveira L.V.A (2004) Comparison of methods for the identification of coagulase-negative staphylococci. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **99**:855-60.

- 27 Couto I., Pereira S., Miragaia M., Sanches IS., Lencastre H (2001) Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by Internal Transcribed Spacer PCR. *I. Clin. Microbiol* **39**:3099–103.
- 28 Arciola C.R., Baldassarri L., Montanaro L (2001). Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol* **39**: 2151-56.
- 29 Arciola C.R., 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.
- 30 El-Din S.S.S., El-Rehewy M.S., Ghazaly M.M., Abd-Elhamid M.H (2011) Biofilm Formation by Blood Stream Staphylococcal Isolates from Febrile Pediatric Cancer Patients at South Egypt Cancer Institute. *J Am Science* **7**:674-86.
- 31 Gad GFM., El-Feky MA., El-Rehewy MS., Hassan MA., Abolella H., El-Baky RMA (2009) Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. *J Infect Dev Ctries* **3**:342-51.
- 32 Yazdani R., Oshaghi M., Havayi A., Pishva E., Salehi R., Sadeghizadeh M., Foroohesh H (2006). Detection of *icaAD* Gene and Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus* Isolates from Wound Infections. *Iranian J Publ Health* **35**:25-28.

- 33 Satorres S.E., Alcaráz L.E (2007) Prevalence of *icaA* and *icaD* genes in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from patients and hospital staff. *Cent Eur J Pub Health* **15**: 87–90.
- 34 Atshan S.S., Shamsudin M.N., Sekawi Z., Lung L.T.T., Hamat R.A., Karunanidhi A., Ali A.M., Ghaznavi-Rad E., Moghaddam H.G., Seng J.S.C., Nathan J.J., Pei C.P (2012) Prevalence of Adhesion and Regulation of Biofilm-Related Genes in Different Clones of *Staphylococcus aureus* *Journal of Biomedicine and Biotechnology* Volume 2012, Article ID 976972, 10 pages.
- 35 Vuong C., Otto M (2002) *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microb Infect* **4**:481-89.
- 36 Rogers K.L., Fey P.D., Rupp M.E (2009) Coagulase-negative staphylococcal infections. *Infect. Dis Clin North Am* **23**:73–98.
37. Rupp M.E., Soper D.E., Archer G.L (1992) Colonization of the female genital tract with *Staphylococcus saprophyticus*. *J Clin Microbiol* **30**:2975-9.
- 38 Cernohorská L., Votava M (2010) Antibiotic resistance and biofilm formation in *Staphylococcus saprophyticus* strains isolated from urine. *Epid Microbiol Imunol* **59**:88-91.
- 39 Cerca N., G., Pier., M., Vilanova R., Oliveira., Azeredo J (2005) Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Res Microbiol* **156**:506–14.
- 40 Fredheim EGA, Klingenberg C, Rohde H, Frankenberger S, Gaustad P, Flægstad T, Sollid JE (2009) Biofilm Formation by *Staphylococcus haemolyticus*. *J Clin Microbiol* **47**:1172-80.

- 41 Silva G.D.I., Kantzanou M., Justice A., Massey R.C., Wilkinson A.R., Day N.P.J., Peacock S.J (2002) The *ica* Operon and Biofilm Production in Coagulase-Negative Staphylococci Associated with Carriage and Disease in a Neonatal Intensive Care Unit. *J Clin Microbiol* **40**:382–88.
- 42 Frank K.L., Reichert E.J., Piper K.E., Patel R (2007) In Vitro Effects of Antimicrobial Agents on Planktonic and Biofilm Forms of *Staphylococcus lugdunensis* Clinical Isolates. *Antim Agent Chemot* **51**:888-95
- 43 Frank K.L, Patel R (2007) Poly-N-Acetylglucosamine Is Not a Major Component of the Extracellular Matrix in Biofilms Formed by *icaADBC*-Positive *Staphylococcus lugdunensis* Isolates. *Infect Immun* **75**:4728-42.

## ARTIGO II

O artigo foi redigido de acordo com as normas de publicação da Plos One

**Título:** Biofilme estafilocócico em superfícies de cateteres: avaliação por microscopia eletrônica da inibição da produção pelo Peptídeo inibidor de RNA (RIP).

Adilson de Oliveira, Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências,  
Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP.

E-mail: Adilson de Oliveira – [adilsonoliveiralp@ig.com.br](mailto:adilsonoliveiralp@ig.com.br); Maria de Lourdes  
Ribeiro de Souza da Cunha – [cunhamlr@ibb.unesp.br](mailto:cunhamlr@ibb.unesp.br).

Autor correspondente: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP,  
Botucatu, Caixa Postal 510, CEP 18618-000.

## Resumo

*Staphylococcus aureus* e Estafilococos coagulase-negativa (ECN) tornaram-se os principais agentes de infecções relacionadas a dispositivos médicos devido à sua capacidade de formar biofilme. O biofilme confere proteção às bactérias contra o sistema imunológico do hospedeiro e da ação de antimicrobianos, o que se faz necessário o estudo de estratégias para evitar a formação de biofilme. Neste estudo avaliamos a capacidade do peptídeo inibidor de RNA (RIP) de inibir a formação de biofilme em 10 amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de materiais clínicos selecionadas de um total de 200 amostras avaliadas quanto à produção fenotípica de biofilme, presença e expressão do operon *ica*, sendo incluídas no estudo uma amostra de *S. aureus*, duas de *S. epidermidis*, duas de *S. haemolyticus*, duas de *S. lugdunensis* e uma de *S. warneri*, *S. hominis* e de *S. saprophyticus*. As amostras foram cultivadas por 24 horas em caldo tripticase de soja (TSB) adicionado de 2% de glicose em placas de poliestireno de 96 poços contendo seguimentos de cateteres, na presença e na ausência do RIP. Em seguida os seguimentos de cateteres foram observados através da microscopia eletrônica de varredura. Os resultados revelaram inibição da formação de biofilme na presença de RIP em todas as amostras de ECN, porém não interferiu na formação de biofilme de *S. aureus*. O peptídeo RIP se mostrou uma importante ferramenta que futuramente poderá ser utilizada na prevenção de infecções causadas por ECN relacionadas à produção do biofilme.

**Palavras-chave:** Biofilme; *Staphylococcus aureus*; estafilococos coagulase-negativa; infecção; peptídeo RIP, microscopia eletrônica de varredura.

**Abstract**

*Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci (CoNS) have become the main causative agents of medical device-associated infections due to their ability to form a biofilm. The biofilm protects bacteria against the host immune system and against the action of antimicrobial drugs. The investigation of strategies designed to prevent biofilm formation is therefore necessary. In this study, we evaluated the capacity of RNA-inhibiting peptide (RIP) to inhibit biofilm formation in 10 *Staphylococcus* spp. strains isolated from clinical materials. These strains were selected among 200 isolates evaluated regarding the phenotypic formation of a biofilm and the presence and expression of the *ica* operon. One *S. aureus* strain, two *S. epidermidis* strains, two *S. haemolyticus* strains, two *S. lugdunensis* strains, and one *S. warneri*, *S. hominis* and *S. saprophyticus* strain each were included in the study. The strains were cultured for 24 hours in 96-well polystyrene plates containing catheter segments and tryptic soy broth supplemented with 2% glucose, in the presence or absence of RIP. The catheter segments were then examined by scanning electron microscopy. The results showed the inhibition of biofilm formation in the presence of RIP for all CoNS strains studied; however, RIP did not interfere with biofilm formation by *S. aureus*. RIP was found to be an important tool that could be used in the future to prevent infections caused by CoNS related to biofilm formation.

**Keywords:** Biofilm; *Staphylococcus aureus*; coagulase-negative staphylococci; infection; RNA-inhibiting peptide, scanning electron microscopy.

## Introdução

As infecções associadas a dispositivos médicos estão relacionadas com a capacidade de aderência e fixação de bactérias nas superfícies com formação de biofilme [1, 2]. O biofilme é constituído por um agregado de microrganismos envolvidos por uma matriz extracelular de origem polissacarídica ou protéica produzida pelas próprias bactérias, que permanecem aderidas em superfícies abióticas ou bióticas [3, 4]. As bactérias dentro do biofilme apresentam um fenótipo diferente em relação à taxa de crescimento e transcrição de genes [5]. Esse mecanismo é considerado o principal fator de virulência dos estafilococos, protegendo do sistema imune do hospedeiro e da ação de antibióticos [5, 6].

A formação do biofilme depende da combinação e expressão de uma variedade de genes, a qual é influenciada por fatores ambientais como condições de crescimento, suplementação de carboidratos, concentração sub-inibitória de antimicrobianos e alta osmolaridade. Para esta regulação as bactérias se utilizam de um sistema de comunicação celular chamado de *quorum sensing* que funciona como um sensor de densidade populacional [7, 8]. A comunicação baseia-se em moléculas sinalizadoras, chamadas auto-indutores, através das quais podem regular seu comportamento de acordo com a densidade populacional. Quando um pequeno número de bactérias libera auto-indutor no ambiente, sua concentração é muito baixa para ser detectada; porém, quando estão em alta densidade populacional, a concentração de auto-indutores alcança um nível suficiente para fazer com que as células respondam aos estímulos, ativando ou reprimindo genes alvos. Dessa maneira, este sistema permite que as bactérias coordenem seu comportamento de acordo com as condições do ambiente, bem como a expressão de fatores de virulência, formação de biofilmes e outros [9]. Os estafilococos regulam seus fatores

de virulência através de dois sistemas, que regulam um ao outro [10, 11]. O QS1 consiste na ativação do RNAII através da RAP (proteína ativadora de RNA) uma proteína de 21-KDa que induz a fosforilação da proteína alvo de RAP (TRAP) presente nas membranas celulares [11, 12]. Conforme as bactérias vão se multiplicando, a RAP atinge um limiar de concentração (em meio à fase de crescimento exponencial) induzindo a fosforilação da sua molécula alvo, a TRAP (13). A fosforilação da TRAP leva a um mecanismo pouco conhecido para a síntese do QSII, que é composta pelos produtos do sistema *Agr* (gene regulador acessório). O *Agr* codifica duas transcrições divergentes, o RNAII e RNA III [14]. O RNAII codifica *AgrA*, *AgrC*, *AgrD* e *AgrB* onde *AgrD* é um polipeptídeo que produz o peptídeo auto-indutor (AIP), que é processado e segregado com auxílio de *AgrB*. Uma vez que o *agr* é ativado e o AIP é secretado, o AIP induz a fosforilação de seu receptor *AgrC*, levando a produção da molécula de RNA regulador denominado RNAIII [14]. O RNAIII regula a produção de várias toxinas secretadas. Os sistemas QS1 e QS2 se interagem, pois, uma vez que o AIP é produzido no meio da fase exponencial de crescimento, indiretamente regula a fosforilação da proteína alvo TRAP [13]. A interação entre a fosforilação da TRAP e *AgrC* através de seus respectivos auto-indutores, RAP ou AIP, regula a expressão de moléculas de adesão ou toxinas. Sendo assim, a TRAP demonstra ser uma molécula chave na regulação da patogênese, pois quando sua expressão é inibida por mutagênese ou sua fosforilação é suprimida por mutagênese ou por peptídeos inibitórios, as bactérias não formam biofilmes, não produzem toxinas e não causam doenças [15, 16].

Estudos realizados por Balaban et al. [15] com um peptídeo (YSPWTNF-NH<sub>2</sub>), conhecido como inibidor de RNA (RIP), mostraram que este pode inibir a atividade do RNAIII, impedindo a fosforilação da TRAP, interrompendo a

expressão dos fatores de virulência, inclusive a formação de biofilme. Estudos com implantes em animais para observação da produção de biofilme mostraram que a injeção do peptídeo (RIP) resultou em baixa produção de biofilme e ocorrência de infecções [16]. Outros estudos realizados por Simonetti et al. [17] mostraram que o peptídeo RIP além de ser muito eficaz na terapia de prevenção de infecções estafilocócicas associadas a dispositivos, reduz a carga bacteriana e pode ser útil para o tratamento de feridas infectadas, podendo representar uma alternativa interessante para o futuro em relação aos antibióticos convencionais. Entretanto alguns autores afirmam que o sistema TRAP não tem função na ativação do sistema *Agr*, não apresentando nenhum papel na patogênese de doenças causadas por *Staphylococcus* [18, 19].

Com base nas descrições citadas anteriormente, e como ainda existe uma controvérsia sobre a importância do sistema QS na expressão dos fatores de virulência, bem como da função do RIP como um peptídeo inibidor, este trabalho objetivou avaliar por microscopia eletrônica o efeito do RIP na produção de biofilme em cateteres contaminados com *S. aureus* e Estafilococos Coagulase-negativa (ECN).

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Amostras**

Para seleção das amostras produtoras de biofilme, foram estudadas 200 amostras de *Staphylococcus* spp., sendo 50 amostras da espécie *S. aureus* e 150 do grupo dos estafilococos coagulase-negativa (ECN). Entre os ECN foram estudadas 50 amostras de *S. epidermidis*, 20 *S. haemolyticus*, 20 *S. warneri*, 20 *S. hominis* e 7 *S. lugdunensis* isoladas de hemocultura e 20 amostras de *S. saprophyticus* isoladas

de urina de pacientes com infecção do trato urinário atendidos no Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB). Devido à dificuldade de isolar amostras de *S. lugdunensis* de amostras clínicas humanas foram incluídas 13 amostras de *S. lugdunensis* isoladas de leite de cabra. Para controle foram utilizadas linhagens de referência internacional, incluindo *S. epidermidis* ATCC 12228 e *S. aureus* ATCC 33591 (controle negativo) e *S. epidermidis* ATCC 35983 e *S. aureus* ATCC 29213 (controle positivo).

### **Identificação dos micro-organismos**

Depois do crescimento em placa de ágar sangue, os micro-organismos foram submetidos à coloração de Gram para análise da pureza das amostras, morfologia e coloração específica. Os micro-organismos foram identificados conforme preconizado por Koneman et al. [20].

### **Identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus***

Para a identificação de *S. aureus* foi realizada a prova de coagulase em tubo e para ECN foram utilizados os critérios propostos por Cunha et al. [9], conforme esquema simplificado de provas bioquímicas, o qual estabelece a realização das provas de catalase, coagulase e de testes de utilização de açúcares: xilose, sacarose, trealose, manitol, maltose, bem como da caracterização de hemolisinas, redução de nitrato, urease, ornitina descarboxilase e sensibilidade à novobiocina. Posteriormente foi realizada a confirmação genotípica das espécies de ECN usando primers de sequências conservadas adjacentes aos genes 16S e 23S pela técnica Internal Transcribed Spacer PCR (ITS-PCR) descrita por Couto et al. [21].

### **Pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em placa de Poliestireno (Christensen et al. [22]) modificado**

O método da pesquisa da produção de biofilme em placas de cultura proposto por Christensen et al. [22], foi utilizado com algumas modificações. Este método apresenta bases espectrofotométricas, baseando-se na leitura da 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. Foram utilizadas placas previamente esterilizadas de 96 cavidades com fundo plano (Costar, modelo 3599 fabricado pela *Corning Incorporated*). Os poços foram preenchidos em quadruplicata com 200µl da cultura diluída, utilizando pipeta multicanal. Em todos os testes foram utilizados linhagens de referência internacional controle positivo em *S. aureus* ATCC 29213 (produtora de biofilme) e negativo ATCC 33591 (não produtora) e em *S. epidermidis* controle positivo ATCC 35983 (produtora de biofilme) e negativo ATCC 12228 (não produtora) e TSB estéril. As placas foram incubadas por 24 horas à 37°C e posteriormente o conteúdo de cada poço foi aspirado cuidadosamente utilizando-se pipeta multicanal, e então, lavados quatro vezes com 200µl de tampão fosfato salina (PBS), pH 7,2. A secagem da placa foi realizada em temperatura ambiente por 1 hora. A seguir, os poços foram corados com cristal violeta a 2% por um minuto, em seguida, o volume foi aspirado e o excesso de corante retirado através de uma lavagem das placas com água destilada utilizando-se de pipeta multicanal. A seguir, foi feita a secagem das placas em temperatura ambiente por 60 minutos e realizada a leitura da densidade óptica no

leitor de Elisa, da marca Labssystem modelo Multiskan EX em filtro de 540 nm. Os valores para leitura obtidos através do ponto de corte estão expressos na tabela 1.

Tabela 1: Valores do ponto de corte

<b>Resultado*</b>	<b>Filtro 540nm</b>
<b>NA</b>	$\leq 0,111$
<b>FRA</b>	$>0,111$ ou $\leq 0,222$
<b>FOA</b>	$>0,222$

\* **NA**- Não aderente; **FRA**- Fraco aderente; **FOA**- Forte aderente

As amostras foram classificadas como negativas, quando o valor do ponto de corte correspondia à classificação de não aderente e em positivas, quando o valor do ponto de corte correspondia à classificação de fraco aderente ou forte aderente.

### **Extração e Amplificação do ácido nucléico (PCR)**

As extrações de ácido nucléico e as reações de PCR foram realizadas empregando os parâmetros e os primers descritos por Arciola et al. [23, 24] (Tabela 2). Em todas as reações realizadas foram utilizadas linhagens de referência internacional com controle positivo e negativo, *S. epidermidis* ATCC 35983 (produtora de biofilme) e como controle negativo *S. epidermidis* ATCC 12228 (não produtora).

Tabela 2: Oligonucleotídeos para a detecção dos genes *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD*

Nome	Sequência de nucleotídeos 5'a 3'	Produto amplificado (bp)
<i>icaA1</i>	TCT CTT GCA GGA GCA ATC AA	187
<i>icaA2</i>	TCA GGC ACT AAC ATC CAG CA	187
<i>icaA1</i> *	TGG CTG TAT TAA GCG AAG TC	669
<i>icaA2</i> *	CCT CTG TCT GGG CTT GAC C	669
<i>icaB1</i>	CTG ATC AAG AAT TTA AAT CAC AAA	302
<i>icaB2</i>	AAA GTC CCA TAA GCC TGT TT	302
<i>icaC1</i>	TAA CTT TAG GCG CAT ATG TTT	400
<i>icaC2</i>	TTC CAG TTA GGC TGG TAT TG	400
<i>icaD1</i>	ATG GTC AAG CCC AGA CAG AG	198
<i>icaD2</i>	CGT GTT TTC AAC ATT TAA TGC AA	198

Fonte: Arciola et al. 2001, 2005; Rohde et al.2007. \* Primer específico para detecção do gene *icaA* em *S. aureus*.

### Visualização dos produtos amplificados

A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 2% preparado em tampão 0,5 X TBE e corada com Syber safe (invitrogen). O tamanho dos produtos amplificados foi comparado com o padrão de 100 bp e posteriormente fotografados sob transiluminação UV.

### Expressão de genes do operon *ica* pela Técnica de RT-PCR

#### Extração de RNA

O RNA total foi extraído a partir de amostras de *Staphylococcus* spp. cultivadas em ágar sangue e inoculadas individualmente em caldo Infusão de

Cérebro e Coração e incubadas a 37°C por 24 horas. Para a extração foi utilizado o Kit Illustra RNAspin Mini RNA de acordo com as orientações do fabricante. Foi transferido 200 µL da cultura de *Staphylococcus* para um eppendorf estéril de 1,5mL. Após centrifugação a 10.000g por 1 minuto, foi removido todo o sobrenadante e adicionado 100µL de TE contendo 2mg/mL de lisozima, e incubado a 37°C por 10 minutos. Para lise das células foi adicionado 350µL de Buffer RA1 juntamente com 3,5µL de β-mercaptoethanol. Em seguida a solução foi aplicada em filtros RNAspin Mini Filter units e centrifugada a 11.000g por 1 minuto, descartando os filtros após centrifugação. Para o ajuste das condições de ligação foi adicionado 350µL de etanol 70% no filtrado, que foi transferido para o RNAspin Mini Column e centrifugado a 8.000g por 30 segundos. Para a ligação na membrana foi adicionado 350µL de MDB (membrane desalting buffer) e centrifugado a 11.000g por 1 minuto. A lavagem das amostras foi feita em duas fases. Para a primeira lavagem foi adicionado 600µL de Buffer RA3 na coluna e centrifugado a 11.000g por 1 minuto. Para a segunda lavagem foi adicionado 250µL de RA3 na coluna e centrifugado a 11.000 por 2 minutos. Em seguida a coluna foi colocada em um novo eppendorf de 1,5mL para a eluição do RNA, que foi realizada com 45µL de H<sub>2</sub>O RNA free acrescentada de 5µL de RNA guard e centrifugado a 11.000g por 1 minuto. O tratamento com DNase para a eliminação total de possíveis resíduos de DNA foi feito adicionando 2µL de Buffer, em seguida adicionando 2µL de DNase e incubação por 1 hora a 37°C. Em seguida foi adicionado 2µL de Stop DNase, e incubação a 65° por 10 minutos para inibição da enzima DNase. O RNA foi levado imediatamente a temperatura de -80°C.

### **Obtenção de cDNA**

Foram preparados 2 Mix (Mix 1 e Mix 2). Para o Mix 1 foram utilizados 14µL de RNA (já aliquotado e tratado com DNase) 1µL de Random primer, 1µL de dNTP e 4µL de água nuclease free (kit de extração). Para o Mix 2 foram utilizados 4 µL de 5X First-Strand Buffer, 1 µL de DTT (0,1M) e 1 µL de SuperScript III (200 U/µL). O Mix 1 foi levado ao termociclador a 65°C por 5 minutos. Em seguida foi retirado do termociclador e colocado imediatamente no gel por aproximadamente 5 minutos. Logo em seguida foi adicionado o Mix 2 (volume de 6µL) e colocado a amostra novamente no termociclador, dando continuidade no programa. Em seguida o cDNA foi congelado a -80°C.

### **Reação de RT-PCR**

O programa utilizado no Termociclador foi RT-PCR, com ciclos de 65°C por 5 minutos; 25°C por 5 minutos; 50°C por 60 minutos; 70°C por 15 minutos e término a 20°C. Após o PCR do controle interno (gene que codifica o RNA 16S) para controle do procedimento de extração, reação de RT-PCR e da eficiência da ação da enzima DNase na degradação de DNA contaminante no RNA extraído, foi realizada a reação de PCR para verificar a expressão dos genes do operon *ica* utilizando os primers descritos na Tabela 2.

Em seguida foi realizada a eletroforese para visualização dos produtos amplificados conforme descrito anteriormente para a técnica de PCR.

### **Teste do polipeptídeo (RIP) na prevenção da formação de biofilme em pontas de cateteres com visualização através da microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

O efeito do RIP na produção de biofilme foi verificado em 10 amostras selecionadas a partir dos resultados da presença do operon *ica*, expressão pela técnica de RT-PCR e produção de biofilme pelo teste de aderência a placa de poliestireno, utilizando-se segmentos de cateter esterilizados. As amostras produtoras de biofilme foram primeiramente isoladas em caldo BHI, a seguir foram transferidas  $10^8$  UFC de bactérias em tubos cônicos (Falcon-CORNING) contendo 2 ml de meio de cultura TSB preparado com 2% de glicose. Alguns tubos continham cultura pura e outros além da cultura foram adicionados de 100 ou 200 $\mu$ g/ml do peptídeo inibidor de RNA (RIP) e um segmento de 0,5cm de cateter umbilical VYGON (Referência 1270.04, 0,8 x 1,5mm de diâmetro). Esses tubos foram incubados em agitação constante a 100rpm/37°C por 48 horas para crescimento bacteriano e formação do biofilme. Após esse período os segmentos de cateter foram retirados e imersos em solução de glutaraldeído 2,5% fixados em uma série de alcoóis (15, 30, 50, 70, 90 e 100%) por 15 minutos cada um, respectivamente; secos em centrífuga a vácuo por cinco minutos; metalizados com ouro e visualizados em microscópio eletrônico de varredura para evidenciação da produção de biofilme na presença e na ausência do polipeptídeo RIP. Foram utilizadas as linhagens de *S. epidermidis* ATCC 12228 como controle negativo e *S. epidermidis* ATCC 35983 como controle positivo. Todos os testes e a microscopia eletrônica de varredura foram realizados em duplicata.

### **Teste do polipeptídeo (RIP) na prevenção da formação de biofilme em placa de Poliestireno**

Foi utilizado o mesmo método da pesquisa da produção de biofilme em placas de cultura proposto por Christensen et al. [22] com as 10 amostras selecionadas para o teste anterior. As amostras produtoras de biofilme foram primeiramente isoladas em caldo BHI, a seguir foram transferidas  $10^8$  UFC de bactérias em tubos cônicos (Falcon-CORNING) contendo 2 ml de meio de cultura TSB preparado com 2% de glicose. Alguns tubos continham cultura pura e outros além da cultura foram adicionados de 200 $\mu$ g/ml do peptídeo inibidor de RNA (RIP). Em seguida foram realizados os mesmos procedimentos utilizados no teste de aderência a placa de poliestireno. Foram utilizadas as linhagens de *S. epidermidis* ATCC 12228 como controle negativo e *S. epidermidis* ATCC 35983 como controle positivo. Todas as amostras foram feitas em quadruplicata para garantir a reprodutibilidade do teste.

## **Resultados**

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

A partir da leitura das placas com filtro de 540 nm, foi verificado que das 200 amostras submetidas a este teste, 41 (20,5%) foram classificadas como fraco aderentes e 8 (4%), como forte aderentes, totalizando 49 (24,5%) amostras positivas e 151 (75,5%) negativas (Tabela 3). A partir desses resultados foram selecionadas 10 amostras produtoras de biofilme para detecção do operon *ica* na técnica de PCR, verificação da expressão dos genes na técnica de RT-PCR e submetidas ao teste do

peptídeo (RIP) para verificar o efeito na formação de biofilme em pontas de cateteres, com visualização através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e em placas de poliestireno.

Tabela 3 – Amostras de *Staphylococcus* spp. produtoras de biofilme pelo método de aderência em placa de Poliestireno.

Espécies	Quantidade de amostras	Resultado
<i>S. aureus</i>	13	FA
<i>S. aureus</i>	1	FOA
<i>S. aureus</i>	36	NA
<i>S. epidermidis</i>	9	FA
<i>S. epidermidis</i>	4	FOA
<i>S. epidermidis</i>	37	NA
<i>S. saprophyticus</i>	12	FA
<i>S. saprophyticus</i>	1	FOA
<i>S. saprophyticus</i>	7	NA
<i>S. haemolyticus</i>	2	FA
<i>S. haemolyticus</i>	1	FOA
<i>S. haemolyticus</i>	17	NA
<i>S. hominis</i>	1	FA
<i>S. hominis</i>	19	NA
<i>S. warneri</i>	3	FA
<i>S. warneri</i>	17	NA
<i>S. lugdunensis</i>	1	FA
<i>S. lugdunensis</i>	1	FOA
<i>S. lugdunensis</i>	18	NA

**FA:**Fraco aderente; **FOA:**Forte aderente; **NA:** Não aderente

### Detecção da presença e expressão dos genes *icaADBC* pela técnica de RT-PCR

Os resultados da pesquisa e expressão do operon *ica* estão expressos na Tabela 4.

Tabela 4. Frequência dos genes *ica*, expressão na técnica de RT-PCR e produção de biofilme pelo método de aderência em placa de Poliestireno nas amostras selecionadas para o estudo.

Espécies	PCR	RT	Teste da placa
<i>S. aureus</i>	ACDB	ACDB	FOA
<i>S. epidermidis</i>	ACDB	ACDB	FOA
<i>S. epidermidis</i>	ACDB	CDB	FOA
<i>S. saprophyticus</i>	ACDB	CDB	FOA
<i>S. haemolyticus</i>	ACDB	A	FOA
<i>S. haemolyticus</i>	CD	C	FA
<i>S. hominis</i>	ACD	-	FA
<i>S. warneri</i>	CD	-	FA
<i>S. lugdunensis</i>	AD	AD	FOA
<i>S. lugdunensis</i>	A	-	FA

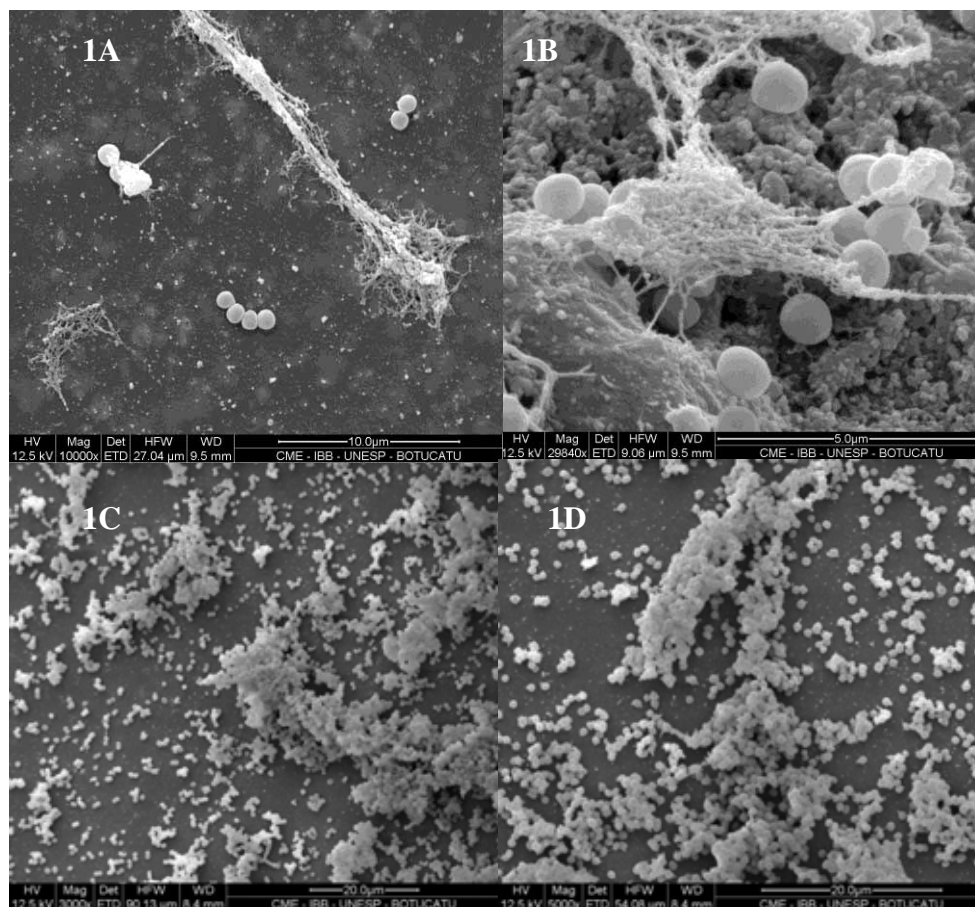
**FA:**Fraco aderente; **FOA:**Forte aderente

### Teste do polipeptídeo (RIP) na prevenção da formação de biofilme em pontas de cateteres com visualização através da microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para este teste foram utilizadas 10 amostras produtoras de biofilme no teste de aderência a placa de poliestireno, sendo duas da espécie *S. epidermidis*, uma de *S. saprophyticus*, duas de *S. haemolyticus*, uma de *S. hominis*, uma de *S. warneri*, duas de *S. lugdunensis* e uma de *S. aureus*. Como controles foram utilizadas as cepas de

*S. epidermidis* ATCC 35983 produtor de biofilme (fraco aderente) e o ATCC 12228 não produtor. Como controle negativo também foi utilizado uma ponta de cateter em TSB estéril adicionado do peptídeo RIP.

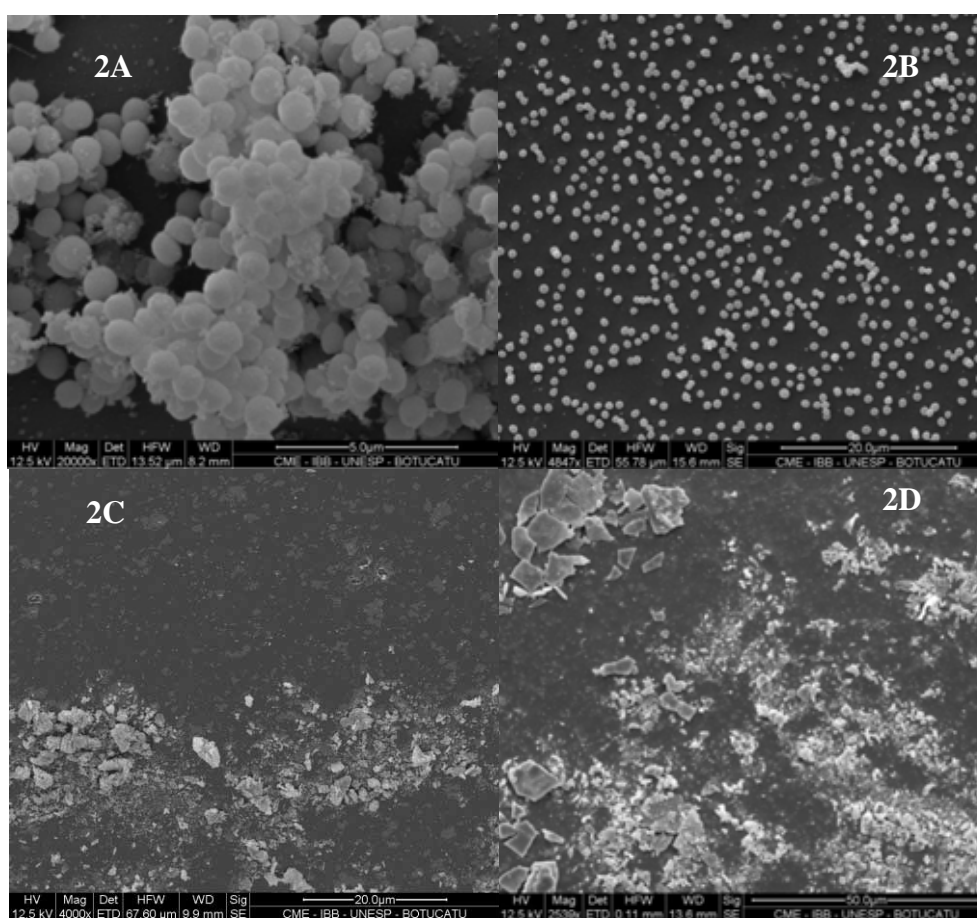
Os resultados da microscopia eletrônica de varredura revelaram que a adição de 100µg/ml de peptídeo inibidor de RNA (RIP) não foi suficiente para prevenir a formação de biofilme em *S. epidermidis* ATCC 35983 (controle positivo) e de *S. saprophyticus* produtor de biofilme forte aderente e que expressou na técnica de RT-PCR os genes *icaCDB* (Figuras 1A-D). No seguimento de cateter com TSB puro a microscopia eletrônica de varredura de *S. epidermidis* ATCC 35983 revelou um biofilme com aparência “elástica” revestindo as células e distribuído em algumas partes do cateter (Figura 1-A). Na presença de 100µg/ml de RIP (Figuras 1-B, 1-D), observou-se um biofilme bem consistente, tomando quase a totalidade do seguimento do cateter com elevado número de células agrupadas e ligadas entre si, com poucas células isoladas.



**Figura 1.** Micrografia eletrônica de varredura mostrando a estrutura do biofilme em *S. epidermidis* ATCC35983 - TSB puro (1A), TSB com 100ug/ml de RIP (1B); *S. saprophyticus*- TSB puro (1C), TSB com 100ug/ml de RIP (1D).

Após a observação dos resultados anteriores, a concentração do peptídeo inibidor de RNA (RIP) foi aumentada para 200 $\mu$ g/ml no TSB com glicose a 2%. As Figuras 2A-2B apresentam os resultados da MEV para a mesma amostra de *S. saprophyticus* testada anteriormente. *S. saprophyticus* forte aderente com expressão dos genes *icaDBC* revelou um biofilme com uma matriz diferente da observada em *S. epidermidis*. As células se apresentaram ligadas umas a outras por substâncias com características proteicas e em vez da matriz recobrindo as células, encontramos um material floculento (Figura 2A). A amostra com o RIP não revelou formação de

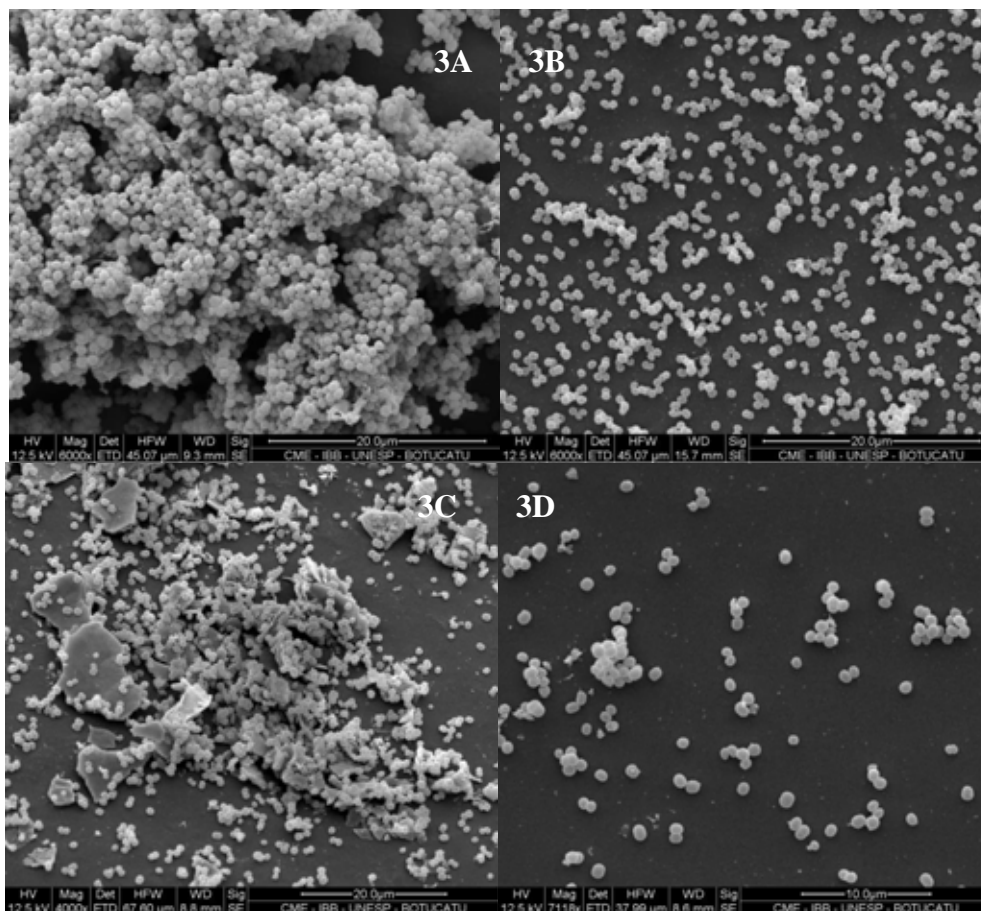
biofilme, as células apareceram dispersas não recobrimo a totalidade da superfície do cateter, indicando inclusive redução do número de bactérias (Figura 2B). Em relação ao controle negativo, seguimento de cateter em TSB puro sem inóculo e TSB puro adicionado de 200µg/ml de RIP a MEV não revelou alteração (Figuras 2C-2D).



**Figura 2.** Micrografia eletrônica de varredura mostrando a estrutura do biofilme em *S. saprophyticus* - TSB puro (2A), TSB com 200ug/ml de RIP (2B); Controle negativo - TSB puro (2C), TSB com 200ug/ml de RIP (2D).

Das amostras clínicas de *S. epidermidis*, uma expressou o operon completo (*icaADBC*) na técnica de RT-PCR e a MEV revelou um biofilme muito complexo

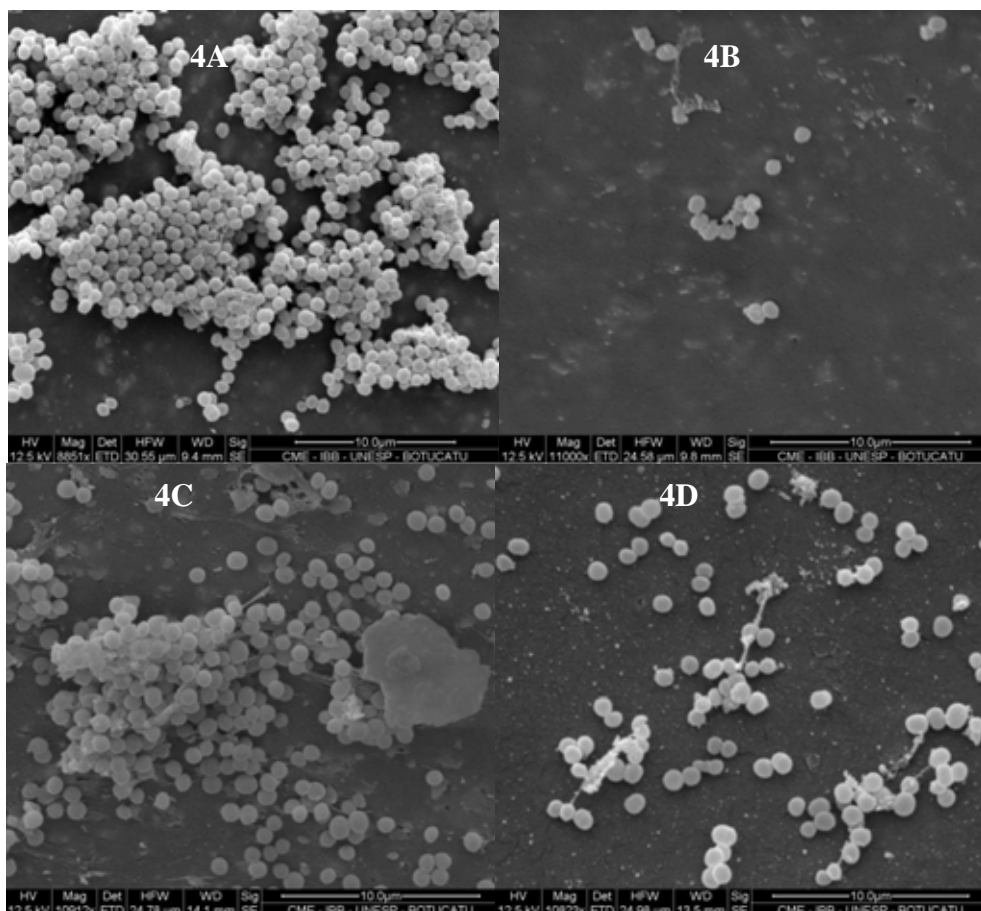
envolvendo grande parte do seguimento do cateter com um número elevado de bactérias (Figura 3A), já na amostra com 200µg/ml de RIP, as células dispersas e em menor quantidade envolvendo o seguimento do cateter, diminuindo consideravelmente a formação do biofilme (Figura 3B). A segunda amostra de *S. epidermidis* forte aderente no teste da placa de poliestireno não expressou o gene *icaA* na técnica de RT-PCR, mas expressou os genes *icaCDB*. Apesar de presentes em grande parte do cateter, as concentrações maiores de biofilme foram encontradas nas extremidades, as células ligadas entre si por substância de aspecto “gelatinoso” sobre uma superfície amorfa (Figura 3C). A amostra com o RIP revelou diminuição da formação de biofilme, com as células dispersas e em menor quantidade (Figura 3D).



**Figura 3.** Micrografia eletrônica de varredura mostrando a estrutura do biofilme em *S. epidermidis* - TSB puro (3A, 3C), TSB com 200ug/ml de RIP (3B, 3D).

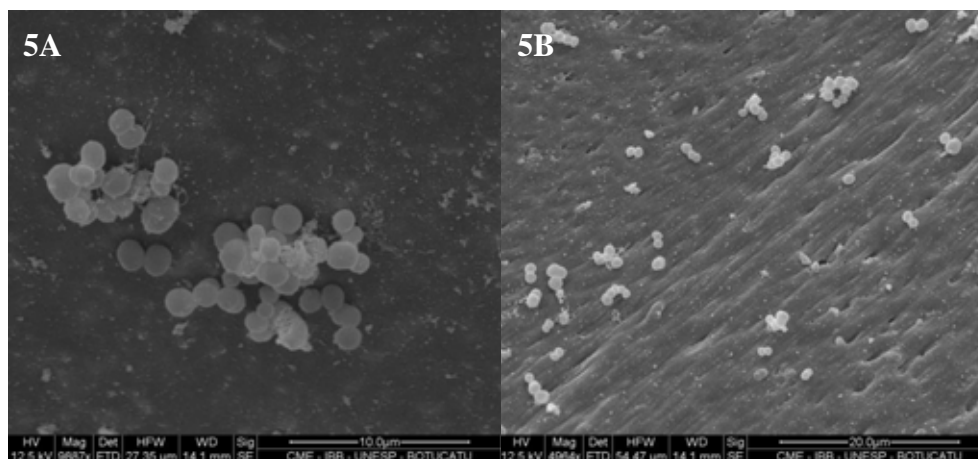
Das amostras de *S. haemolyticus* uma apresentou-se forte aderente no teste fenotípico e expressou apenas o gene *icaA* na técnica de RT-PCR. A MEV revelou um biofilme consistente com grande quantidade de polissacarídeo ligando e envolvendo as células (Figura 4A). A amostra com o peptídeo RIP não mostrou formação de biofilme, inclusive diminuiu consideravelmente a quantidade de bactérias envolvendo o cateter (Figura 4B). A outra amostra de *S. haemolyticus* revelou-se fraco aderente no teste fenotípico, positiva no PCR apenas para os genes *icaCD* e expressão somente de *icaC* no RT-PCR. A MEV revelou biofilme não recobrendo toda a superfície do cateter com a maioria encontrada nas extremidades

(Figura 4C). A amostra com o peptídeo RIP revelou que não houve formação de biofilme, inclusive diminuiu consideravelmente a quantidade de bactérias envolvendo o cateter (Figura 4D).



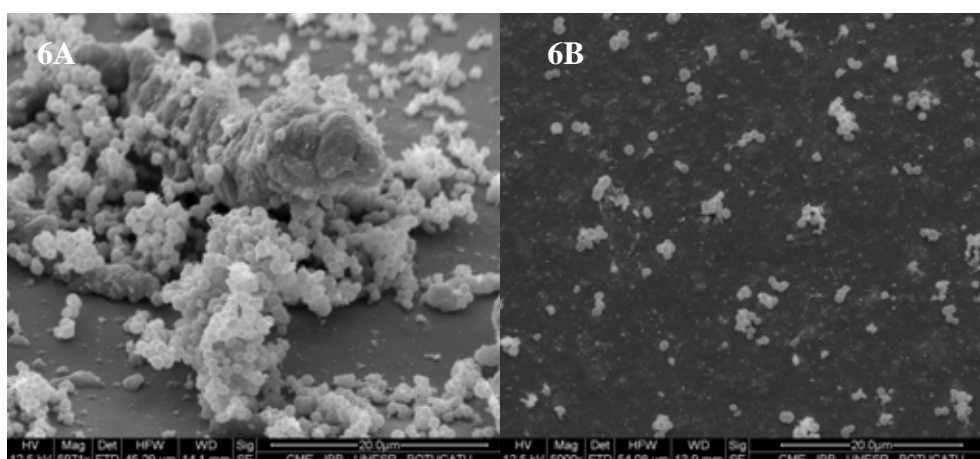
**Figura 4.** Micrografia eletrônica de varredura mostrando a estrutura do biofilme em *S. haemolyticus*- TSB puro (4A, 4C), TSB com 200ug/ml de RIP (4B, 4D).

Na espécie *S. hominis* uma única amostra foi positiva fraco aderente no teste fenotípico e não expressou nenhum gene do operon *ica*. A ME revelou um agrupamento pequeno de células encontrado mais frequente nas extremidades do cateter (Figura 5A). O cateter com o RIP não formou biofilme e revelou uma quantidade ainda menor de bactérias aderidas em pontos isolados (Figura 5B).



**Figura 5.** Micrografia eletrônica de varredura mostrando a estrutura do biofilme em *S. hominis* - TSB puro (5A), TSB com 200ug/ml de RIP (5B).

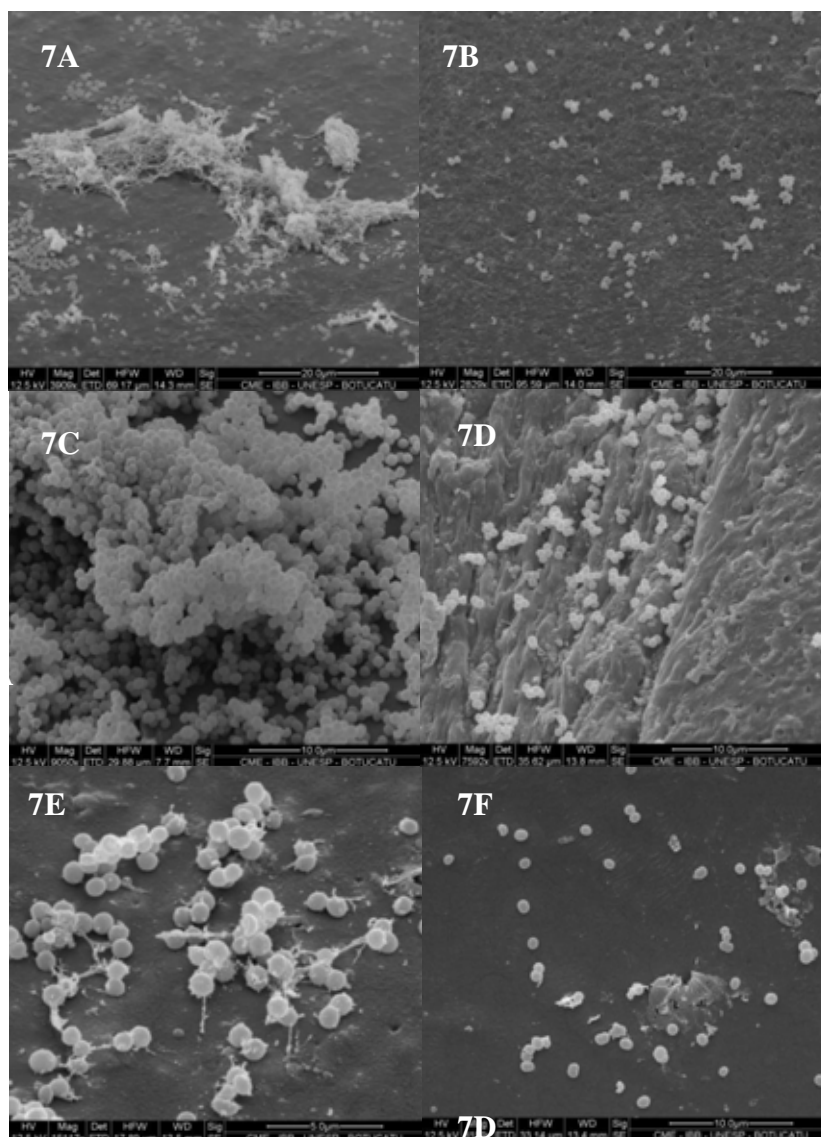
A amostra de *S. warneri* revelou-se fraco aderente no teste da placa e não expressou nenhum gene do operon *ica*. A MEV mostrou um grande número de bactérias revestindo quase a totalidade da superfície do cateter, o biofilme revelou-se bem estruturado e consistente, as células ligadas entre si por uma substância de característica “gelatinosa” possivelmente proteínas, porém ocorrendo principalmente nas extremidades do cateter (Figura 6A). Na amostra com o RIP a ME revelou as células dispersas não ocorrendo a formação do biofilme e visível diminuição do número de bactérias na superfície do cateter (Figura 6B).



**Figura 6.** Micrografia eletrônica de varredura mostrando a estrutura do biofilme em *S. warneri* - TSB puro (6A), TSB com 200ug/ml de RIP (6B).

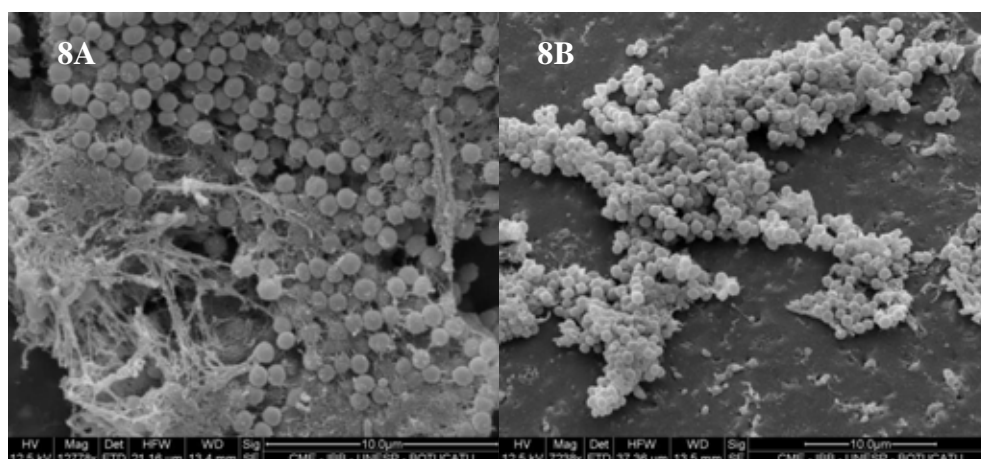
Da espécie *S. lugdunensis* foram estudadas duas amostras, uma amostra que foi forte aderente no teste da placa e expressou os genes *icaAD* na técnica de RT-PCR. A MEV mostrou um biofilme bem estruturado de aparência “elástica”, característico de polissacarídeo semelhante ao da espécie *S. epidermidis ica* positivo, porém encontrados com maior frequência nas extremidades do cateter (Figura 7A). Na amostra com o RIP as células apareceram isoladas não ocorrendo a formação de biofilme em nenhuma parte do cateter (Figura 7B). A outra amostra de *S. lugdunensis* revelou-se fraco aderente no teste fenotípico e não expressou nenhum gene do operon *ica* na técnica de RT-PCR apesar de apresentar o gene *icaA* no PCR. A MEV revelou um grande número de bactérias recobrando quase a totalidade da superfície do cateter, demonstrando um biofilme com um agrupamento grande de células ligadas por substância de aparência “gelatinosa” semelhante ao descrito anteriormente na ausência da expressão de *ica* (Figura 7C). Na amostra com o peptídeo RIP a MEV não revelou formação de biofilme (Figura 7D), houve uma redução considerável do número de bactérias na superfície do cateter, as células foram encontradas apenas nas extremidades. No controle negativo *S. epidermidis*

ATCC 12228 com o TSB puro a MEV revelou uma quantidade pequena de bactérias isoladas revestindo a superfície do cateter sem formação de biofilme (Figura 7E), e na amostra com o RIP houve ainda uma redução do número de bactérias (Figura 7F).



**Figura 7.** Micrografia eletrônica de varredura mostrando a estrutura do biofilme em *S. lugdunensis* - TSB puro (7A, 7C), TSB com 200ug/ml de RIP (7B, 7D); *S. epidermidis* ATCC 12228 – controle negativo TSB puro (7E), TSB com 200ug/ml de RIP (7F).

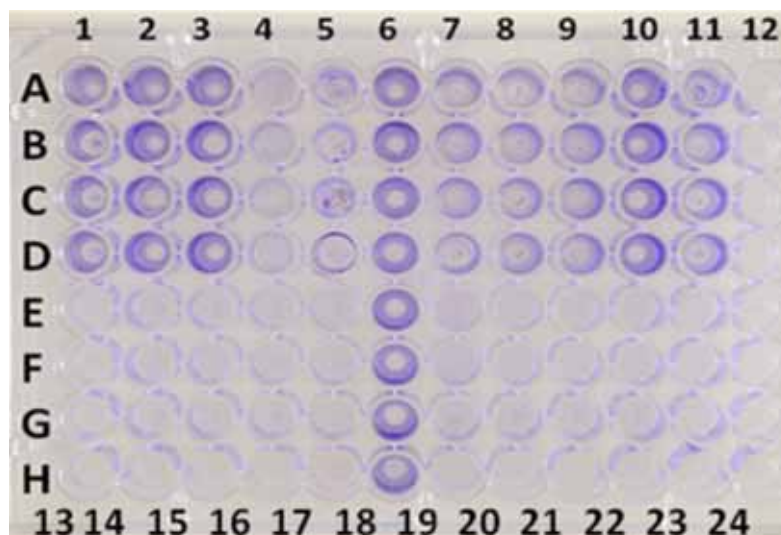
A amostra de *S. aureus* estudada revelou-se forte aderente no teste de produção em placa de poliestireno, na técnica de PCR apresentou o operon completo *icaADBC* e expressou os 4 genes na técnica de RT-PCR. A MEV eletrônica revelou um biofilme com grupamento grande de células e uma estrutura de aparência “elástica” provavelmente de polissacarídeo bem visível revestindo as células (Figura 8A). Nesta espécie a amostra com o RIP não mostrou redução total do biofilme, foram encontrados grupamentos de células menores em estrutura de biofilme em diversas partes da superfície do cateter (Figura 8B).



**Figura 8.** Micrografia eletrônica de varredura mostrando a estrutura do biofilme em *S. aureus* - TSB puro (8A), TSB com 200ug/ml de RIP (8B).

### **Teste do peptídeo (RIP) na prevenção da formação de biofilme em placa de Poliestireno**

Neste teste todas as amostras das diferentes espécies de ECN testadas não formaram biofilme na presença de 200ug/ml de RIP. Somente a amostra de *S. aureus* revelou-se positiva (forte aderente), revelando uma excelente concordância com os resultados obtidos na MEV.



**Figura 9:** Colunas ABCD – TSB Glicose 2% puro- Colunas EFGH TSB Glicose 2% adicionado de 200ug/ml de RIP: 1 – *S. saprophyticus* (U-2); 2 – *S. epidermidis* (H-1640/08); 3-*S. haemolyticus* (H-30001/04); 4-*S. haemolyticus* (H-1009/06); 5 - *S. warneri* (S-2539/07); 6- *S.aureus* (H-2386/06); 7- *S. lugdunensis* (PF26); 8- *S. lugdunensis* (PF63); 9- *S. hominis* (H-35778/03); 10 - *S. epidermidis* (H-2123/08); 11- *S. epidermidis* ATCC 35983; 12- *S. epidermidis* ATCC 12228- Controle negativo.

## Discussão

Os Sistemas QS em *Staphylococcus* têm um enorme impacto no sucesso do patógeno durante a infecção por meio do controle de mecanismos de fisiologia e virulência bacteriana como a produção de biofilme. Em nosso estudo avaliamos a produção de biofilme através da MEV em amostras de *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. lugdunensis* e *S. aureus* cultivadas com TSB glicose a 2% puro e adicionado do peptídeo inibidor de RNA (RIP). De acordo com Balaban et al. [15, 26] o peptídeo (YSPWTNF-NH<sub>2</sub>), conhecido como RIP (peptídeo inibidor de RNA) pode inibir a atividade do RNAlII, impedindo a fosforilação da TRAP, interferindo no sistema *quorum sensing*. Korem et al. [27] e Balaban et al. [28] relataram que o RIP age diferentemente dos antibióticos comuns, inibindo a comunicação célula a célula entre as bactérias e prevenindo a adesão e expressão dos fatores de virulência, e que estudos genômicos mostraram que na ausência da fosforilação da TRAP a bactéria perde a capacidade de produzir toxinas, de adesão a superfícies e produzir biofilme. A avaliação de 100µg/ml do peptídeo RIP não inibiu a formação de biofilme no controle positivo *S. epidermidis* ATCC 35983 e em uma amostra forte aderente de *S. saprophyticus*. O resultado da MEV revelou que no seguimento de cateter que estava no meio de cultura contendo o RIP na concentração 100µg/ml houve um aumento no número de bactérias e produção de biofilme por ambas as espécies. Neste caso pode ter ocorrido que o peptídeo nessa concentração tenha se comportado como alguns antibióticos que em concentrações sub-inibitórias tem pouco ou nenhum efeito sobre as bactérias em biofilme [13, 14] e podem inclusive estimular a formação de biofilme [15].

Após esses resultados, a concentração do peptídeo inibidor de RNA (RIP) foi aumentada para 200µg/ml no TSB com glicose a 2%. O resultado da MEV revelou que o peptídeo RIP na concentração de 200µg/ml impediu a formação do biofilme em todas as amostras de ECN estudadas. Na presença de RIP as células apareceram isoladas tanto nas amostras forte aderentes como nas fraco aderentes que expressaram o gene *icaA*, outros genes do operon *ica* ou não expressaram nenhum dos genes na técnica de RT-PCR. Os resultados de nosso estudo foram similares aos obtidos por outros autores [16] que relataram a eficiência do peptídeo RIP na inibição da formação de biofilme estafilocócico. Outro fato interessante observado nos seguimentos de cateter com o RIP, é que além de impedir a formação de biofilme, reduziu consideravelmente a quantidade de bactérias, inclusive na amostra ATCC 12228 não produtora de biofilme. Simonetti et al. [17] relataram que o RIP pode ser muito útil no tratamento de feridas infectadas por reduzir a carga bacteriana, podendo ser uma alternativa para o futuro em relação aos antibióticos convencionais.

Para o estudo e comparação da estrutura do biofilme em *S. epidermidis*, foram analisadas através da microscopia eletrônica de varredura uma amostra forte aderente no teste fenotípico que expressou o operon completo *icaADBC* na técnica de RT-PCR e outra forte aderente que expressou os genes *icaDBC*. A amostra com o operon completo revelou um biofilme bem estruturado com um grande conjunto de células ligadas umas a outras e recobertas por polissacarídeo revestindo quase a totalidade do cateter, o “*slime*” recobrindo e ligando as células. Por outro lado, a amostra que expressou os genes *icaDBC* com a ausência da expressão *icaA* revelou um biofilme menos estruturado com característica diferente dos descritos anteriores, os cocos apareceram ligados entre si, porém em pequenos grupos e sobre uma

superfície amorfa, talvez pelo fato de que na ausência do gene *icaA* a quantidade de polissacarídeo foi menor ou as bactérias utilizaram outros mecanismos para obter essa configuração.

A análise do biofilme formado por *S. saprophyticus* forte aderente com expressão dos genes *icaDBC* revelou um biofilme com uma matriz diferente da observada em *S. epidermidis* *ica* positivo. As células se encontraram em grande número ligadas umas a outras por substâncias com características proteicas e em vez da matriz recobrimo as células, encontramos um material floculento que segundo Marrie e Costerton [29] representam materiais desidratados do biofilme. Esses resultados sugerem que *S. saprophyticus* podem apresentar outros genes que codificam outras substâncias envolvidas na formação da matriz do biofilme nessa espécie.

Em relação à amostra de *S. haemolyticus* forte aderente que expressou somente o gene *icaA* na MEV as bactérias se apresentaram em pequenos grupos ligadas por cordões característicos de polissacarídeo, também observado nas amostras de *S. epidermidis* *ica* positivas, porém não mostrou uma matriz com grande volume de polissacarídeo. Fredheim et al. [30] em estudo da formação e da estrutura do biofilme de *S. haemolyticus* relataram que de 72 amostras apenas duas apresentaram genes do operon *ica*, sendo positivas para o *icaD*. Entretanto, no teste fenotípico de aderência a placa de poliestireno realizado pelos autores, a maioria produziu biofilme na ausência do operon *ica*. Em relação aos componentes da matriz do biofilme em *S. haemolyticus* os autores relatam que proteínas e DNA extracelular são de relevância funcional para a fase de acúmulo e formação do biofilme, enquanto o PIA desempenha apenas uma menor função, o que pode justificar os resultados encontrados em nosso estudo para esta espécie.

Em *S. hominis* e *S. warneri* a microscopia eletrônica revelou em ambas as espécies um biofilme com característica proteica. *S. hominis* formou estruturas pequenas encontradas nas extremidades do cateter, enquanto *S. warneri* formou estruturas bem consistentes com um maior número de bactérias aderidas, porém também encontrados nas extremidades do seguimento de cateter. As semelhanças encontradas com relação aos resultados em ambas, sugerem que a produção de biofilme nessas espécies não depende da expressão do gene *icaA*. De acordo com Kini et al. [31] *S. warneri* está relacionada a muitos casos de endocardite, este fato pode estar associado ao tipo de componentes da matriz do biofilme nessas espécies com mais afinidade a superfícies bióticas.

*Staphylococcus lugdunensis* que se revelou forte aderente no teste da placa e expressou os genes *icAD* na técnica de RT-PCR, a MEV mostrou um biofilme bem estruturado, característico de polissacarídeo semelhante ao da espécie *S. epidermidis*, porém encontrado com maior frequência nas extremidades do cateter. Já a amostra que se revelou fraco aderente no teste da placa e não expressou nenhum gene do operon *ica* na técnica de RT-PCR, a MEV revelou um grande número de bactérias recobrando quase a totalidade da superfície do cateter, demonstrando um biofilme com um grande agrupamento de células, sem a aparência “elástica” do polissacarídeo. De acordo com Frank e Patel [32] muitos tipos de infecções por *S. lugdunensis*, incluindo endocardite nativa, infecção de prótese articular, e infecção relacionada ao cateter intravascular, estão associados com a formação de biofilme, porém estudos realizados pelos autores demonstraram que na maioria dos biofilmes desta espécie o polissacarídeo sintetizado por produtos do operon *icaADBC* não é o principal componente da matriz, sugerindo que a maioria dos biofilmes é composto por proteínas. Experimentos utilizando-se de diversas substâncias químicas no meio

de crescimento para a formação de biofilme sugeriram que as condições do meio podem influenciar nos componentes e estrutura do biofilme. Apesar de ser uma espécie importante quanto à associação com infecções, há poucos dados na literatura sobre o potencial dessa espécie na formação de biofilme, sendo os resultados encontrados nesse estudo de grande importância para a caracterização do potencial patogênico dessa espécie.

*S. aureus* forte aderente que revelou os genes *icaADBC* e a expressão dos quatro genes na RT-PCR mostrou um grupamento de células bem consistente recoberto por uma estrutura de aparência “elástica”, bem visível, provavelmente de polissacarídeo. Em estudos realizados por Sun et al. [33] foi pesquisado as propriedades e arquitetura do biofilme em *S. aureus* em placas de poliestireno através da microscopia eletrônica. Os resultados da MEV revelaram que o biofilme consistiu em grupos de células de várias camadas com arquitetura tridimensional, semelhante ao encontrado em nossos estudos. Entretanto, na amostra de *S. aureus* o peptídeo RIP mostrou uma redução muito discreta, foram encontrados grupamentos de células menores em estrutura de biofilme em diversas partes da superfície do cateter. Talvez para essa espécie seja necessário um aumento na concentração do peptídeo para inibir totalmente a produção do biofilme.

Para confirmar ação do peptídeo RIP na prevenção da formação do biofilme, também fizemos a mesma comparação das amostras utilizando placas de poliestireno, e os resultados foram semelhantes ao encontrado na microscopia, o RIP inibiu a formação do biofilme em todas as amostras de ECN, porém em *S. aureus* não ocorreu a inibição revelando-se forte aderente no teste da placa mesmo na presença do peptídeo.

A microscopia eletrônica de varredura revelou nas amostras produtoras de biofilme que expressaram o operon completo ou o gene *icaA* uma estrutura característica de polissacarídeo, enquanto as produtoras de biofilme, mas que não expressaram o operon *ica* ou o gene *icaA*, um biofilme diferente, provavelmente de constituição proteica. A MEV juntamente com o teste de aderência a placa de poliestireno confirmou em espécies de ECN a inibição da formação de biofilme pelo peptídeo inibidor de RNA (RIP) sugerindo perspectivas futuras de utilização dessa substância no controle de infecções relacionadas a cateteres e formação de biofilme.

#### **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos à Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo (FAPESP – Processo: 2011/07285-5) e Secretaria da Educação do Estado de São Paulo pelo suporte financeiro.

## Referências

1. Morales M, Mendez-Alvarez S, Martin-Lopes JV, Marreiro C, Freytes CO. (2004) Biofilm: the microbial “bunker” for intravascular catheter-related infection. *Support Care Cancer* **12**:701-07.
2. Nilsson-Augustinsson A, Claesson C, Lindgren P.E, Lundqvist-Gustafsson H, Ohman L. (2005) Adherence of *Staphylococcus epidermidis* to extracellular matrix proteins and effects of fibrinogen-bound bacteria on oxidase activity and apoptosis in neutrophils. *APMS* **113**: 361-73.
3. Gotz F. *Staphylococcus* and biofilms. (2002) *Mol.Microbiol.***43**:1367-78.
4. O’Neill E, Pozzi C, Houston P, Smyth D, Humphreys H, Robinson DA & O’Gara JP (2007) Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. *J Clin Microbiol*, in press.
5. Donlan MR. (2002) Biofilm: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* **8**:881-980.
6. Cafiso V, Bertuccio T, Santagati M, Campanile F, Amicosante G, Perilli M.G, 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. *Clin Microbiol Infect* **10**:1081-88.
7. Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penadés JR. (2001) Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.***183**:2888-896.

8. Vadyvaloo V, Otto M. (2005) Molecular genetics of *Staphylococcus epidermidis* indwelling medical devices. *Int J Artf Organs* **28**:1069-78.
9. Cunha MLRS, Sinzato YK, Silveira LVA, (2004). Comparison of methods for the identification of coagulase-negative staphylococci. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **99**:855-60.
10. Balaban N, Goldkorn T, Gov Y, Hirshberg M, Koyfman N, Mathews HR, Nhan RT, Singh B, Uziel O. (2001) Regulation of *Staphylococcus aureus* pathogenesis via target of RNAIII-activating protein (TRAP). *J Biol Chem* **276**:2658-67.
11. Korem M, Gov Y, Madanahally DK, Balaban N. (2005). Transcriptional profiling (microarray analysis) of TRAP, a master regulator of staphylococcal virulence. *Infect Immun.* **73**:6220-8.
12. Balaban N, Stoodley P, Fux CA, Wilson S, Costerton JW, Dell'Acqua G. (2005) Prevention of staphylococcal biofilm-associated infections by the quorum sensing inhibitor RIP. *Clin Orthop Relat Res* **437**:48-54.
13. Rachid S, Ohlsen K, Witte W, (2000). Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:3357-63.
14. Polonio RE, Mermel LA, Paquette GE, (2001) Eradication of biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* (RP62A) by a combination of sodium salicylate and vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**:3262-6.
15. Balaban N, Giacometti A, Cirioni O, Gov Y, Ghiselli R, Mocchegiani F, Viticchi C, Del Prete MS, Saba V, Scalise G, Dell'Acqua (2003) Use the quorum-sensing inhibitor RNAIII-inhibiting peptide to prevent biofilm formation in vivo by drug-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* **187**:625-30.

16. Balaban N, Cirioni O, Giacometti A, Ghiselli R, Braunstein JB, Silvestri C, Mocchegiani F, Saba V, Scalise G. (2007) Treatment of *Staphylococcus aureus* biofilm infection by the quorum sensing inhibitor RIP. *Agents Chemo* **51**:2226-29.
17. Simonetti O, Cirioni O, Ghiselli R, Goteri G, Scalise A, Orlando F, Silvestri C, Riva A, Saba V, Madanahally KD, Offidani A, Balaban N, Scalise G, Giacometti A. (2008) RNAIII-Inhibiting peptide changes healing of wounds infected with methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* **52**:2205-11.
18. Shaw LN, Jonsson IM, Singh VK, Tarkowski A, Stewart GS. (2007) Inactivation of traP Has No Effect on the Agr Quorum-Sensing System or Virulence of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **75**:4519-27.
19. Adhikari RP, Arvidson S, Novick P. (2007) A Nonsense Mutation in *agrA* Accounts for the Defect in *agr* Expression and the Avirulence of *Staphylococcus aureus* 8325-4 *traP:kan*. *Infect Immun* **75**:4534-40.
20. Koneman EW, et al; *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 5a ed. Philadelphia: JB Lippincott; 1997.
21. Couto I, Pereira S, Miragaia M, Sanches IS, Lencastre H, (2001). Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by Internal Transcribed Spacer PCR.I. *Clin. Microbiol.* **39**:3099–103.
23. Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L, (2001). Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol.* **39**: 2151-56.

- 24 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.
25. Rohde H., Burandt EC., Sienssem N., Frommelt L., Burdesk C. Wurster S., Scherp S., Davies AP., Harris LG., Horstikotte MA., Knobloch JK., Rangunath C. Kaplan J., Mack D. (2007) Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials* **28**:1711–20.
26. Balaban N, Goldkorn T, Gov Y, Hirshberg M, Koyfman N, Mathews HR, Nhan RT, Singh B, Uziel O. (2001) Regulation of *Staphylococcus aureus* pathogenesis via target of RNAIII-activating protein (TRAP). *J Biol Chem* **276**:2658-67.
27. Korem M, Gov Y, Madanahally DK, Balaban N. (2005). Transcriptional profiling (microarray analysis) of TRAP, a master regulator of staphylococcal virulence. *Infect Immun.* **73**:6220-8.
28. Balaban N, Stoodley P, Fux CA, Wilson S, Costerton JW, Dell'Acqua G. (2005) Prevention of staphylococcal biofilm-associated infections by the quorum sensing inhibitor RIP. *Clin Orth Rel Res* **437**:48-54.
29. Marrie TJ, Costerton JW. (1984). Scanning and Transmission Electron Microscopy of In Situ Bacterial Colonization of Intravenous and Intraarterial Catheters. *J Clin Microbiol.* **19**:687-93.
30. Fredheim EGA, Klingenberg C, Rohde H, Frankenberger S, Gaustad P, Flægstad T, Sollid JE. (2009) Biofilm Formation by *Staphylococcus haemolyticus*. *J Clin Microbiol.* **47**:1172-80.

31. Kini GD, Patel K, Parris AR, Tang JS, (2010). Unusual Presentation of Endocarditis Caused by *Staphylococcus warneri*. *Open Microbiol J.* **4**:103-05.
32. Frank KL, Patel R. (2007) Poly-N-Acetylglucosamine Is Not a Major Component of the Extracellular Matrix in Biofilms Formed by *icaADBC*-Positive *Staphylococcus lugdunensis* Isolates. *Infect Immun.* **75**:4728-42
33. Sun JL, Zhang SK, Chen XX, Chen JY, Zhong B. (2012) Growth properties of *Staphylococcus aureus* in biofilm formed on polystyrene plate. *Han Af J Microbiol Res.* **6**:3284-91.

## Artigo III

Este artigo foi escrito de acordo com as normas da revista “*Journal of Antimicrobial Chemotherapy*”.

### **Comparação do perfil de resistência a antimicrobianos em células livres e em biofilme de *Staphylococcus aureus* e Estafilococos coagulase-negativa**

Adilson de Oliveira, Luiza Pinheiro, Carla Ivo Brito, Valéria Cataneli Pereira, Danilo Flávio Riboli, Katheryne Benini Martins, Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha.

1. Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

Autor correspondente:  
Adilson de Oliveira  
e-mail: [adilsonoliveiralp@ig.com.br](mailto:adilsonoliveiralp@ig.com.br)  
Departamento de Microbiologia e Imunologia  
Instituto de Biociências de Botucatu  
UNESP - Campus de Botucatu  
Distrito de Rubião Júnior, s/n  
CEP: 18618-970 - Botucatu, SP, Brasil  
Tel: (14)3880-0429

## Resumo

**Objetivos:** Este estudo teve como objetivos determinar o perfil de resistência a antimicrobianos em células livres e em biofilme de *Staphylococcus aureus* e espécies de Estafilococos coagulase-negativa.

**Métodos:** Foram estudadas 200 amostras de *Staphylococcus* spp., sendo 50 amostras da espécie *S. aureus* e 150 do grupo dos estafilococos coagulase-negativa (ECN) incluindo 50 amostras de *S. epidermidis*, 20 *S. haemolyticus*, 20 *S. warneri*, 20 *S. hominis*, 20 *S. lugdunensis* e 20 amostras de *S. saprophyticus* isoladas de pacientes do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB). A produção de biofilme foi realizada pelo teste de aderência a placa de poliestireno para seleção das amostras positivas que foram submetidas ao método de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para células planctônicas e em biofilme, e da concentração bactericida mínima do biofilme (CBMB).

**Resultados:** Um total de 49 amostras de *Staphylococcus* spp. (14 *S. aureus*, 13 *S. epidermidis*, 13 *S. saprophyticus*, 3 *S. haemolyticus*, 1 *S. hominis*, 3 *S. warneri*, e 2 *S. lugdunensis*) foram positivas para a produção de biofilme e utilizadas para a determinação do perfil de resistência. A determinação da CIM para células planctônicas revelou em *S. aureus* 3 (21,4%) amostras resistentes à oxacilina e 6 (42,8) à eritromicina. Em ECN 31 (88,6%) foram resistentes à oxacilina, 14 (40%) à eritromicina, 18 (51,4%) à gentamicina e 8 (22,8%) ao sulfametoxazol/trimetoprim. Nenhuma amostra planctônica foi resistente à vancomicina e à linezolida. Em relação às células do biofilme o MIC aumentou em duas, quatro, oito e até dezesseis vezes em relação às células planctônicas, de forma mais frequente com a vancomicina e a eritromicina. A concentração bactericida mínima para células do biofilme variou entre 8

e >256 µg/ml para oxacilina, 128 - >128 µg/ml para vancomicina, 256 - >256 para eritromicina, 256 - >256 para gentamicina, >64 para linezolida e 32/608 - >32/608 para sulfametoxazol/trimetoprim.

**Conclusões:** Os resultados revelaram que *S. aureus* e ECN em biofilme mostraram um aumento considerável na CIM em relação às planctônicas. Em relação à CBMB o estudo confirmou que mesmo altas concentrações de vancomicina não foram capazes de eliminar os biofilmes de *S. aureus* e espécies de ECN. Dos antimicrobianos testados a linezolida mostrou melhores resultados na inibição de estafilococos em biofilme, sem aumento no MIC quando comparado com células planctônicas e nenhuma amostra resistente.

## Abstract

**Objectives:** To determine the antimicrobial resistance profile of planktonic and biofilm cells of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci (CoNS).

**Methods:** A total of 200 *Staphylococcus* spp. strains were studied, including 50 *S. aureus* and 150 CoNS strains (50 *S. epidermidis*, 20 *S. haemolyticus*, 20 *S. warneri*, 20 *S. hominis*, 20 *S. lugdunensis*, and 20 *S. saprophyticus*). The strains were isolated from patients seen at the University Hospital of the Botucatu School of Medicine (HC-FMB). Biofilm formation was investigated by adherence to polystyrene plates and positive strains were analyzed by the broth microdilution method to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) for planktonic and biofilm cells and the minimum bactericidal concentration for biofilm cells (MBCB).

**Results:** Forty-nine *Staphylococcus* spp. strains (14 *S. aureus*, 13 *S. epidermidis*, 13 *S. saprophyticus*, 3 *S. haemolyticus*, 1 *S. hominis*, 3 *S. warneri*, and 2 *S. lugdunensis*) were positive for biofilm formation and were used to evaluate the resistance profile. Determination of the MIC for planktonic cells revealed three (21.4%) *S. aureus* strains that were resistant to oxacillin and six (42.8%) resistant to erythromycin. Among CoNS, 31 (88.6%) strains were resistant to oxacillin, 14 (40%) to erythromycin, 18 (51.4%) to gentamicin, and eight (22.8%) to sulfamethoxazole/trimethoprim. None of the planktonic samples was resistant to vancomycin or linezolid. With respect to biofilm cells, a two-, four-, eight- and up to 16-fold increase in MICs was observed compared to planktonic cells. This observation was more frequent for vancomycin and erythromycin. The MBCB ranged from 8 to >256 µg/ml for oxacillin, 128 to >128 µg/ml for vancomycin µg/ml, 256 to >256 µg/ml for erythromycin and gentamicin, >64 for linezolid µg/ml, and 32/608 to >32/608 µg/ml for sulfamethoxazole/trimethoprim.

**Conclusions:** The results showed a considerable increase in the MIC for *S. aureus* and CoNS biofilm cells when compared to planktonic cells. Analysis of MBCM confirmed that even high concentrations of vancomycin are unable to eliminate the biofilms of *S. aureus* and CoNS species. Among the antimicrobial drugs tested, linezolid exhibited the best performance in inhibiting staphylococci in the biofilm, without an increase in the MIC when compared to planktonic cells. None of the strains was resistant to this drug.

## Introdução

*Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* são amplamente envolvidos em infecções relacionadas ao uso de dispositivos médicos como cateteres vasculares, próteses e válvulas cardíacas artificiais, devido a capacidade desses microrganismos de aderir a superfícies lisas desses materiais e formar biofilme<sup>1</sup>. Além de *S. epidermidis* outras espécies de estafilococos coagulase-negativa (ECN) como *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. lugdunensis* e *S. saprophyticus* estão associados a essas infecções e também são capazes de produzir biofilme, embora com menor frequência<sup>2</sup>. O biofilme é formado por um grupo de bactérias sésseis aderidas a um substrato e umas as outras sendo envolvidas por uma matriz extracelular<sup>3,4</sup>. Um dos principais componentes dessa matriz em estafilococos é o polissacarídeo de adesão intercelular (PIA), mas também pode ser composta de proteínas ou DNA extracelular<sup>5</sup>. O biofilme dificulta a entrada dos antimicrobianos dentro das bactérias, interferindo com o mecanismo de ação desses agentes e também mantém as bactérias protegidas do sistema imunológico do hospedeiro, resultando em infecções persistentes e difíceis de tratar<sup>6</sup>.

As bactérias em biofilme apresentam um fenótipo diferente em comparação às culturas planctônicas, já que o biofilme favorece o desenvolvimento de diversas interações entre as bactérias, com a frequência de mutações que pode ser bem maior em relação às células planctônicas e a transferência de genes de resistência. As bactérias em biofilme podem ser até mil vezes mais resistentes ao tratamento com antibióticos que o mesmo microrganismo em crescimento planctônico<sup>7</sup>.

Muitos estudos têm relatado as dificuldades encontradas no tratamento com antimicrobianos em infecções relacionadas a biofilme. Entretanto, os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos realizados em laboratórios clínicos de rotina

para a escolha do antimicrobiano continuam sendo realizados com as células planctônicas, o que dificulta a avaliação da eficácia do antimicrobiano testado, já que no paciente essas bactérias estão protegidas no biofilme e a resposta não será a mesma obtida nos testes. O objetivo do presente estudo foi determinar a sensibilidade de *S. aureus* e ECN planctônicos e em células em biofilme a seis agentes antimicrobianos de diferentes classes de drogas utilizados no tratamento de infecções estafilocócicas.

## **Materiais e métodos**

### **Amostras**

Foram estudadas 200 amostras de *Staphylococcus* spp., sendo 50 amostras da espécie *S. aureus* e 150 do grupo dos estafilococos coagulase-negativa (ECN). Entre os ECN foram estudadas 50 amostras de *S. epidermidis*, 20 *S. haemolyticus*, 20 *S. warneri*, 20 *S. hominis* e 7 *S. lugdunensis* isoladas de hemocultura e 20 amostras de *S. saprophyticus* isoladas de urina de pacientes com infecção do trato urinário atendidos no Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB). Devido a dificuldade de isolar amostras de *S. lugdunensis* de amostras clínicas humanas foram incluídas 13 amostras de *S. lugdunensis* isoladas de leite de cabra. Para controle foram utilizadas linhagens de referência internacional, incluindo *S. epidermidis* ATCC 12228 e *S. aureus* ATCC 33591 (controle negativo) e *S. epidermidis* ATCC 35983 e *S. aureus* ATCC 29213 (controle positivo).

### **Identificação dos micro-organismos**

Depois do crescimento em placa de ágar sangue, os micro-organismos foram submetidos à coloração de Gram para análise da pureza da amostra, morfologia e coloração específica. Os micro-organismos foram identificados conforme preconizado por Koneman et al.<sup>8</sup>.

### **Identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus***

Para a identificação de *S. aureus* foi realizada a prova de coagulase em tubo e para o ECN, foram utilizados os critérios propostos por Cunha et al.<sup>9</sup>, conforme esquema simplificado de provas bioquímicas, o qual estabelece a realização das provas de catalase, coagulase e de testes de utilização de açúcares: xilose, sacarose, trealose, manitol, maltose, bem como da caracterização de hemolisinas, redução de nitrato, urease, ornitina descarboxilase e sensibilidade à novobiocina. Posteriormente foi realizada a confirmação genotípica das espécies de ECN usando primers de sequências conservadas adjacentes aos genes 16S e 23 S pela técnica Internal Transcribed Spacer PCR (ITS-PCR) descrita por Couto et al.<sup>10</sup>

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

O método da pesquisa da produção de biofilme em placas de cultura proposto por Christensen et al.<sup>11</sup>, foi utilizado com algumas modificações. Este método apresenta bases espectrofotométricas, baseando-se na leitura da 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. Foram utilizadas placas previamente esterilizadas de 96 cavidades com fundo plano (Costar, modelo 3599

fabricado pela *Corning Incorporated*). Os poços foram preenchidos em quaduplicata com 200µl da cultura diluída, utilizando pipeta multicanal. Em todos os testes foram utilizados linhagens de referência internacional controle positivo em *S. aureus* ATCC 29213 (produtora de biofilme) e negativo ATCC 33591 (não produtora) e em *S. epidermidis* controle positivo ATCC 35983 (produtora de biofilme) e negativo ATCC 12228 (não produtora) e TSB estéril. As placas foram incubadas por 24 horas à 37°C e posteriormente o conteúdo de cada poço foi aspirado cuidadosamente utilizando-se pipeta multicanal, e então, lavados quatro vezes com 200µl de tampão fosfato salina (PBS), pH 7,2. A secagem da placa foi realizada em temperatura ambiente por 1 hora. A seguir, os poços foram corados com cristal violeta a 2% por um minuto, em seguida, o volume foi aspirado e o excesso de corante retirado através de uma lavagem das placas com água destilada utilizando-se de pipeta multicanal. A seguir, foi feita a secagem das placas em temperatura ambiente por 60 minutos e realizada a leitura da densidade óptica no leitor de Elisa, da marca Labssystem modelo Multiskan EX em filtro de 540 nm. Os valores para leitura obtidos através do ponto de corte estão expressos na tabela 1.

Tabela 1: Valores do ponto de corte

<b>Resultado*</b>	<b>Filtro 540nm</b>
<b>NA</b>	$\leq 0,111$
<b>FRA</b>	$>0,111$ ou $\leq 0,222$
<b>FOA</b>	$>0,222$

\* **NA**- Não aderente; **FRA**- Fraco aderente; **FOA**- Forte aderente

As amostras foram classificadas como negativas, quando o valor do ponto de corte correspondia à classificação de não aderente e em positivas, quando o valor do ponto de corte correspondia à classificação de fraco aderente ou forte aderente.

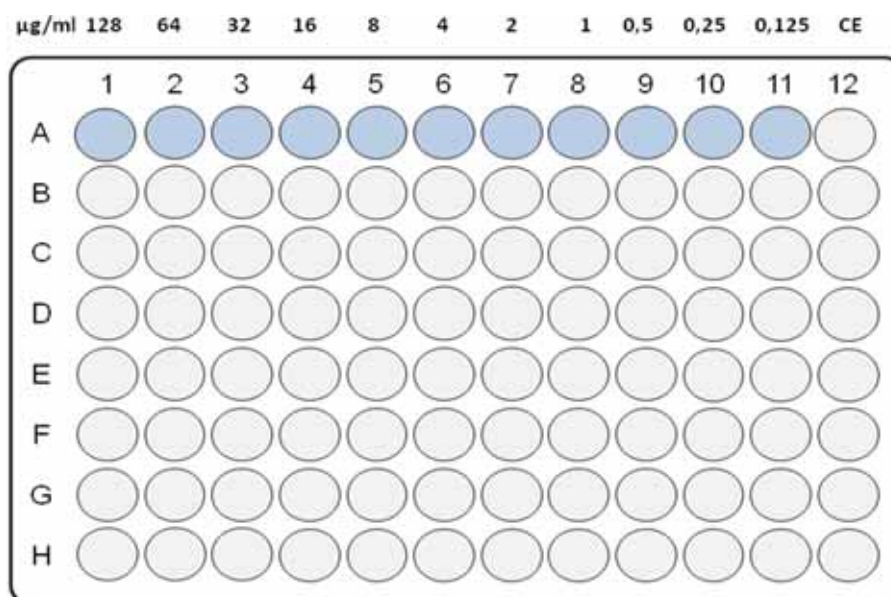
**Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de oxacilina, vancomicina, eritromicina, gentamicina, linezolida e sulfametoxazol-trimetropim pelo método de microdiluição em caldo em células plactônicas de *Staphylococcus spp.***

Para a microdiluição em caldo, foram utilizadas placas de microtitulação estéreis, com caldo Müeller-Hinton ajustado com cátions (Oxoid, 1 U.K.), conforme recomendado pelo CLSI (2012)<sup>12</sup> e com as normativas do documento do NCCLS 2003<sup>13</sup>. Uma solução-estoque de cada droga foi preparada em água destilada na concentração de 3200 µg/ml. Em placa de microtitulação foram feitas diluições seriadas nas concentrações de uma escala logarítmica de 2 (CLSI, 2012) conforme descritos na Tabela 2 em µg/ml e Figura 1, em caldo Müeller-Hinton, com um volume final de 100µL. Para o preparo do inóculo as amostras foram inicialmente semeadas em Ágar Sangue e após incubação por 24 h, colônias isoladas foram semeadas em caldo BHI e após incubação, uma suspensão bacteriana com turvação correspondente a escala 0,5 de McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL) foi preparada e diluída em 1:1000, adicionada nos poços com volume final de 200 µL, e concentração final bacteriana de  $5 \times 10^4$ . As placas foram incubadas em estufa a 35°C e a leitura do MIC feita após 24 e 48 horas de incubação. Foram utilizados um controle positivo, contendo o caldo e a suspensão bacteriana, e um controle negativo contendo apenas o caldo Müeller-Hinton. Adicionalmente, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *S. aureus* ATCC 29213, suscetíveis à vancomicina, foram utilizados como controle negativo e *E. faecalis* ATCC 51299 resistente a vancomicina e *S. aureus* ATCC 33591 resistentes a oxacilina foram utilizados como controle positivo. O MIC foi considerado como a menor concentração de antimicrobiano que inibiu completamente o crescimento do microrganismo, conforme detectado a olho nu:

foram classificados com crescimento positivo os poços que apresentaram turvação e/ou presença de bactérias no fundo do poço.

Tabela 2. Diluições conforme CLSI 2012 para as drogas utilizadas

Drogas	Diluição em µg/ml											
Oxacilina	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
Vancomicina	-	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
Eritromicina	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
Gentamicina	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
Linezolida	-	-	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
Sulfamet/	32/	16/	8/	04/	2/	1/	0,5/	0,25/	0,125	0,06/	0,03/	-
Trimetrom.	608	304	152	76	38	19	9,5	4,74	/2,3	1,18	0,59	-

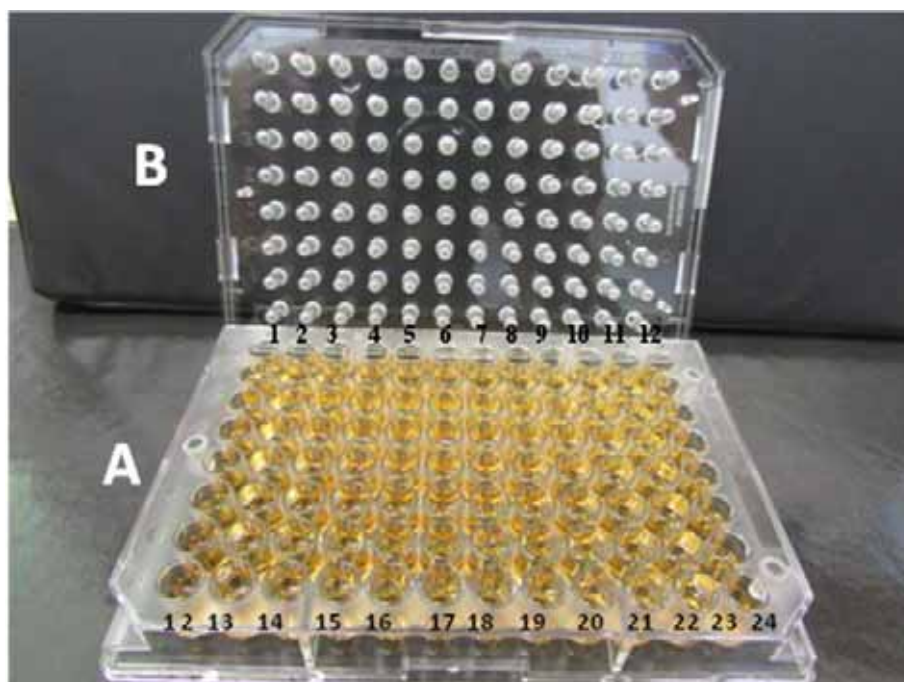


**Figura 1** – Esquema de diluição da droga vancomicina conforme CLSI 2012 Linhas → 1 – 11: drogas, 12: controle estéril (CA-MHB) – Colunas → 1 A – F: Amostras *Staphylococcus* spp.; G: controle positivo, H: controle negativo

**Determinação da Concentração Bactericida mínima (CBMB) e oxacilina, vancomicina, eritromicina, gentamicina, linezolida e sulfametoxazol e trimetropina pelo método de microdiluição em caldo em biofilme de *Staphylococcus spp.***

As concentrações bactericidas para o biofilme (CBMB) foram determinadas, utilizando uma adaptação de um método de ensaio publicado anteriormente<sup>14</sup>. Os isolados cultivados por 22 h a 37°C em TSB adicionado de 2% de glicose foram ajustados para uma turbidez de 1,0 da Escala de McFarland (correspondendo a  $1 \times 10^8$  a  $2 \times 10^8$  UFC / ml) e diluído a 1:50 em TSB com glicose 2%. Alíquotas de 200µl foram colocadas em placas de 96 poços de fundo plano (Nuclon Delta, Nunc, Dinamarca) cobertas com uma tampa de 96 pinos (Nunc-TSP; nunc) e incubadas por 24 h a temperatura para permitir a formação de biofilme sobre os pinos (Figura 2). Para remover as células não aderentes, os filmes formados nos pinos foram lavados por imersão em uma série de três placas de 96 poços preenchidos com 200 µL de tampão fosfato salina estéril. A tampa com os pinos foi colocada sobre em uma placa de fundo plano preparado para testes de suscetibilidade de microdiluição em caldo, os poços continham um volume de 200 µL de agente antimicrobiano diluído em CAMHB (Caldo Mueller Hinton suplementado com cátions, 100 mg/mL de Cálcio e 50 mg/mL de magnésio) ou 200 µL de CAMHB sem drogas para o controle de crescimento positivo. Os biofilmes foram submetidos aos antimicrobianos durante 24h a 35°C, a tampa com os pinos foi retirada e lavada três vezes em tampão fosfato, como descrito acima e colocado em 96 poços contendo 200 µL de TSB glicose 2%. Nesse momento antes do descarte da placa com os antibióticos foi realizada uma leitura “a olho nu” para determinar o MIC dos antibióticos em células do biofilme. Em seguida as células do biofilme formados nos

pinos da tampa foram desalojadas por sonicação durante 5 min. a 40 kHz (Hielscher, ultrasonic technology, UIP250MTP) em placas de 96 poços contendo um novo meio de cultura para recuperação das células. A tampa com os pinos foi descartada e substituída com uma tampa normal, e a densidade óptica medida em um leitor de placa em filtro de 600 nm. Foram utilizados poços contendo TSB glicose a 2% puro (sem inoculação) para controles de esterilidade espectrofotométrica. A placa foi incubada por 24 h 35°C, e uma segunda DO em 600 nm medida foi tomada. A CBMB foi definida como a menor concentração da droga que apresentou uma alteração na DO a 600 nm de 10% da leitura obtida para o controle de crescimento positivo entre as leituras realizadas antes da incubação e após 24 h<sup>15</sup>.



**Figura 2** – A: Placa utilizada com TSB glicose 2% para formação de biofilme, recuperação de células e determinação da CIM e CBB – B: Tampa com pinos para formação de biofilme estafilocócico

## Análise Estatística

Para comparar a CIM em células livres e em Biofilme de *Staphylococcus* spp. foi utilizado o teste de proporções e limite de significância de 0,05.

## Resultados

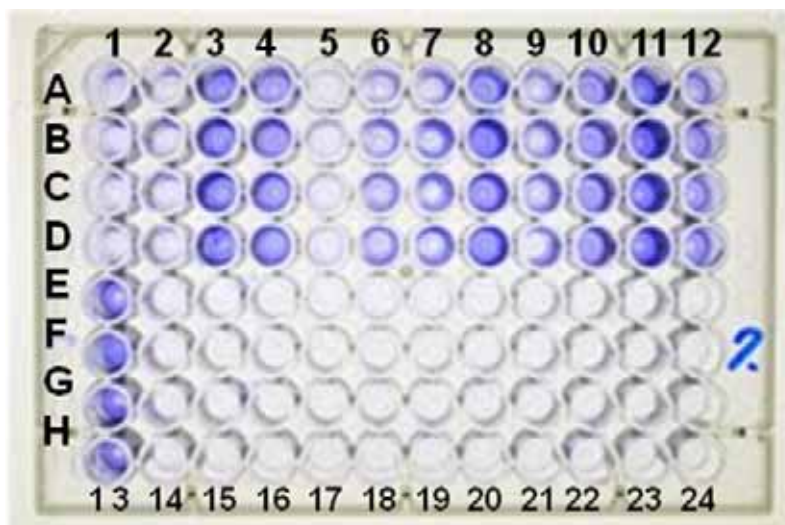
### Pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em placa de Poliestireno (Christensen et al. 1985) modificado

A partir da leitura das placas com filtro de 540nm (Figura 3), foi verificado que das 200 amostras submetidas a este teste, 41 (20,5%) foram classificadas como fraco aderentes e 8 (4%), como forte aderentes, totalizando 49 (24,5%) de amostras positivas e 151 (75,5%) negativas como não aderentes (Tabela 3).

**Tabela 3** - Relação das amostras de estafilococos por espécie com a produção de biofilme no método fenotípico

Espécies	Quantidade de amostras	Teste da Placa
<i>S. aureus</i>	13	FA
<i>S. aureus</i>	1	FOA
<i>S. aureus</i>	36	NA
<i>S. epidermidis</i>	9	FA
<i>S. epidermidis</i>	4	FOA
<i>S. epidermidis</i>	37	NA
<i>S. saprophyticus</i>	12	FA
<i>S. saprophyticus</i>	1	FOA
<i>S. saprophyticus</i>	7	NA
<i>S. haemolyticus</i>	2	FA
<i>S. haemolyticus</i>	1	FOA
<i>S. haemolyticus</i>	17	NA
<i>S. hominis</i>	1	FA
<i>S. hominis</i>	19	NA
<i>S. warneri</i>	3	FA
<i>S. warneri</i>	17	NA
<i>S. lugdunensis</i>	1	FA
<i>S. lugdunensis</i>	1	FOA
<i>S. lugdunensis</i>	18	NA

**FA:**Fraco aderente; **FOA:**Forte aderente; **NA:** Não aderente



**Figura 3** – Teste de aderência a placa de poliestireno: Linhas → A, B, C, D = Amostras: 1, 2, 7, e 9 (fraco aderentes); (não aderente); 3, 4, 8, 10, 11 e 12 (forte aderentes). Linha → E, F, G, H= Amostras 13 *S. epidermidis* ATCC 35983 (controle positivo), 14 *S. epidermidis* ATCC 12228 (controle negativo), 15 – 22 (TSB estéril)

**Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de oxacilina, vancomicina, eritromicina, gentamicina, linezolida e sulfametoxazol-trimetropim pelo método de microdiluição em caldo em células planctônicas de *Staphylococcus* spp.**

Foram analisadas 49 amostras de estafilococos, as quais foram produtoras de biofilme pelos métodos fenotípicos de aderência a placa de poliestireno, sendo 14 *S. aureus* e 35 do grupo dos estafilococos coagulase-negativa (ECN), das quais 13 foram *S. epidermidis*, 13 *S. saprophyticus*, 3 *S. haemolyticus*, 1 *S. hominis*, 3 *S. warneri*, e 2 *S. lugdunensis* obtidas de materiais clínicos de pacientes do HC da Faculdade de Medicina Unesp de Botucatu-SP. Do total de amostras, 34 (69,4%) foram resistentes a oxacilina e nenhuma foi resistente à vancomicina. Em relação à eritromicina, 20 (40,8%) foram resistentes e 15 (30,6%) apresentaram resistência

intermediária; para gentamicina 18 (36,7%) foram resistentes e 1 (2%) revelou resistência intermediária, nenhuma amostra apresentou resistência à Linezolida e 8 (16,3%) foram resistentes a Sulfametoxazol-Trimetroprim. As amostras resistentes às drogas por espécie estão descritas na tabela (4).

**Tabela 4** - Distribuição das bactérias planctônicas por espécie em relação à resistência aos antimicrobianos.

Espécies	OXA		VAN		ERI		GEN		LIN		SX-TR	
	R	RI	R	RI	R	RI	R	RI	R	RI	R	RI
	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<i>S. aureus</i> (n=14)	3	●	0	0	6	5	0	1	0	●	0	●
<i>S. epidermidis</i> (n=14)	13	●	0	0	10	0	12	0	0	●	5	●
<i>S. saprophyticus</i> (n=14)	13	●	0	0	4	4	3	0	0	●	2	●
<i>S. haemolyticus</i> (n=3)	3	●	0	0	0	2	2	0	0	●	1	●
<i>S. hominis</i> (n=1)	1	●	0	0	0	1	1	0	0	●	0	●
<i>S. warneri</i> (n=3)	1	●	0	0	0	3	0	0	0	●	0	●
<i>S. lugdunensis</i> (n=2)	0	●	0	0	0	0	0	0	0	●	0	●
Total	34	-	0	0	20	15	18	1	0	0	8	-

R: Resistente; RI: Resistência intermediária; ●: Droga sem MIC de resistência intermediária; OXA: oxacilina; VAN: vancomicina; ERI: eritromicina; GEN: gentamicina; LIN: linezolida; SXRT: sulfametoxazol-trimetoprim

#### **Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de oxacilina, vancomicina, eritromicina, gentamicina, linezolida e sulfametoxazol-trimetoprim pelo método de microdiluição em caldo em células de biofilme de *Staphylococcus* spp.**

A determinação da sensibilidade de *Staphylococcus* spp. planctônicos e em biofilme para os seis agentes antimicrobianos testados revelou uma diferença significativa em relação aos dois grupos de células. As CIMs estão expressos na Tabela 5.

Tabela 5 – Sensibilidade de *Staphylococcus* sp. em células planctônicas e em biofilme.

	Antimicrobianos (µg/ml)					
	OXA	VAN	ERI	GEN	LIN	SX--TR
CIM <sub>50</sub>	2	2	2	2	1	0,5/9,5
CIM <sub>90</sub>	64	4	>128	64	2	8/152
Variação	<0,125 – >128	1– 4	0,25 – >128	0,125 - >128	0,25 2	0,03/0,59 – 16/304
CIM* <sub>50</sub>	4	4	32	4	1	<0,5/9,5
CIM* <sub>90</sub>	128	8	256	256	2	8/152
Variação	32 – 256	1– 32	0,25– 256	0,25 – 256	0,25– 4	<0,5/9,5 – 16/304

CIM: Concentração inibitória mínima em células planctônicas; CIM\*: Concentração inibitória mínima em células de biofilme. Amostras estudadas para CIM: n=49; OXA: oxacilina; VAN: vancomicina; ERI: eritromicina; GEN: gentamicina; LIN: linezolidia; SX-TR: sulfametoxazol-trimetoprim

A análise estatística dos resultados revelou aumento significativo na resistência de *Staphylococcus* spp. em biofilme em relação as planctônicas. A análise revelou valores significativos para Oxacilina nas espécies *S. epidermidis* (p=0,042) e *S. saprophyticus* (p=0,0098); Vancomicina em *S. aureus* (p=0,0168), *S. epidermidis* (p=0,0004) e *S. saprophyticus* (p= <0,0001); Eritromicina em *S. aureus* (p=0,0099), *S. haemolyticus* (p=0,0301), *S. hominis* (p=0,0056), *S. lugdunensis* (p=0,0035), *S. saprophyticus* (p=0,043) e *S. warneri* (p=0,0005) e Gentamicina em *S. aureus*: (p=0,0124).

Para a vancomicina no biofilme, 3 amostras (6%) passaram a resistentes e 15 (30,6%) a resistentes intermediárias. No caso das outras drogas, houve um aumento considerável de amostras planctônicas sensíveis que passaram a ser resistentes no

biofilme, exceto para a linezolida que nenhuma das amostras planctônicas e em biofilme apresentaram resistência (Tabela 6).

**Tabela 6** - Comparação do perfil de resistência às drogas em células planctônicas e em biofilme de *Staphylococcus spp.*

Microrganismos	Bactérias planctônicas		Bactérias em biofilme	
	R – N (%)	RI – N (%)	R – N (%)	RI – N (%)
oxacilina	34 (69,4)	●	38 (77,6)	●
vancomicina	0 (0)	1 (2)	3 (6,1)	15 (30,6)
eritromicina	20 (40,8)	15 (30,6)	33 (67,3)	9 (18,4)
gentamicina	18 (36,7)	1 (2)	21 (42,8)	0 (0)
linezolida	0 (0)	●	0 (0)	●
Sulf-trimet.	8 (16,3)	●	11 (22,4)	●

●: Droga sem CIM de resistência intermediária; R: Resistente; RI: Resistência Intermediária

Foram verificadas as variações das CIMs em células planctônicas de biofilme e a porcentagem de resistência, com algumas espécies revelando diferenças significativas (Tabela 7). As amostras em biofilme apresentaram um considerável aumento da CIM quando comparadas com as planctônicas, chegando esse aumento a mais de 8 vezes nos valores, com algumas amostras passando da categoria de sensíveis na condição de planctônicas para resistentes quando em biofilme (Tabela 8).

A determinação da Concentração Bactericida em Biofilme (CBMB)) foi realizada para as 49 amostras de *Staphylococcus spp.* produtoras de biofilme. Os resultados mostraram que em todas as espécies as CBBs para as drogas testadas foram altas, com a maioria das amostras resistente aos antimicrobianos testados (Tabela 9).

**Tabela 7** – Comparação das CIMs e porcentagem de resistência em células planctônicas e em biofilme de *S. aureus* e espécies de Estafilococos coagulase-negativa.

Organismos (n)	Oxacilina			Vancomicina			Eritromicina			Gentamicina			Linezolid			Sulfametoxazol/Trimetoprim					
	CIM	CIM*	% R	Var.	CIM	CIM*	% R	Var.	CIM	CIM*	% R	Var.	CIM	CIM*	% R	Var.	CIM	CIM*	% R	Var.	
	Var.	% R	% R	Var.	Var.	% R	% R	Var.	Var.	% R	% R	Var.	Var.	% R	% R	Var.	Var.	% R	% R	Var.	% R
<i>S. aureus</i> (14)	0,5-128	21,4	42,9	1-4	2**	2-4	35,7*	0,5-128	11**	77	1-8	7,1**	1-32	21,4**	0,5-1	0	0,03/0,59-0,25/4,75	0	0	<0,5/9,5	0
<i>S. epidermidis</i> (13)	0,5-64	100	100	2-4	0	2-32	38,5*	0,25-256	77	0,25-256	77	0,25-256	100**	0,25-1	0	0	<0,5/9,5-8/152	38,5	0	<0,5/9,5-8/152	61,5
<i>S. saprophyticus</i> (13)	1-4	100	100	2-4	0	2-32	53,8	0,5-256	61,3	0,5-256	92,3	0,125-32	23	1-2	0	0	0,125-2,38	15,4	0	<0,5/9,5-16/304	15,4
<i>S. haemolyticus</i> (3)	2-256	100	100	2	0	2-4	0	0,25-2	33,3**	1-16	100**	1-32	66,6	0,25-0,5	0	0	0,5/4,75-16/304	33,3	0	0,5/4,75-16/304	33,3
<i>S. hominis</i> (1)	256	100	100	4	0	4	0	4	100*	256	100	32	100	64	1	0	1/19	0	0	1/19	0
<i>S. lugdunensis</i> (2)	0,5-1	0	0	1	0	1-2	0	0,25-8	50	16-256	100	2	0	0,5	0	0	0,5/9,5	0	0	0,5-9,5-1/19	0
<i>S. warneri</i> (3)	0,25-16	33,3	66,6	1	0	1-8	33,3*	1-2	33,3*	4-16	100**	0,25-0,5	0	0,25-1	0	0	0,06/1,18-0,5/9,5	0	0	<0,5/9,5	0

CIM: Concentração inibitória mínima em células planctônica; CIM\*: Concentração inibitória mínima em células de biofilme; \* Resistência Intermediária; \*\*Resistência Intermediária e Total; Var. = Variação dos MICs; %; R = porcentagem de resistência. Pontos de corte para sensibilidade/resistência de acordo com CLSI (2013).

**Tabela 8** – Variação do aumento dos valores da CIMs e alteração da categoria de sensíveis para resistentes em relação às células planctônicas e em biofilme.

Organismos (n)	Oxacilina			Vancomicina			Eritromicina			Gentamicina			Linezolid			Sulfametoxazol-Trimetoprim								
	2X	4X	8X	S- R	2X	4X	8X	S- R	2X	4X	8X	S- R	2X	4X	8X*	2X	4X	8X*	S- R					
<i>S. aureus</i> (14)	21,4	0	14,2	<b>21,4</b>	50	7,1	0	<b>28,6</b>	14,3	14,3	35,7	0	21,4	0	<b>14,8</b>	7,1	0	0	0	21,4	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i> (13)	35,7	15,3	7,7	0	23	23	7,7	<b>46,1</b>	38,5	7,7	0	0	7,7	7,7	0	38,7	0	0	0	30,8	7,7	0	0	<b>23</b>
<i>S. saprophyticus</i> (13)	38,4	7,7	7,7	0	23	38,4	15,4	<b>53,8</b>	23	7,7	38,4	0	61,5	0	0	7,7	0	0	0	15,4	0	0	0	0
<i>S. haemolyticus</i> (3)	33,3	0	0	0	33,3	0	0	0	0	66,6	33,3	33,3	100	0	0	33,3	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. hominis</i> (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. lugdunensis</i> (2)	100	0	0	0	50	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	50	0	0	0	50	0	0	0	0
<i>S. warneri</i> (3)	0	0	33,3	<b>33,3</b>	33,3	0	33,3	<b>33,3</b>	0	33,3	66,6	66,6	66,6	33,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

2X: Percentagem de amostras que com aumento de 2 vezes na CIM em biofilme; 4X: Percentagem de amostras que com aumento de 4 vezes na CIM em biofilme; 8X\*: Percentagem de amostras que com aumento de 8 vezes na CIM em biofilme; S-R: Percentagem de isolados que apenas na presença do biofilme são resistentes ou resistentes intermediários.

**Tabela 9** – Perfil da concentração bactericida mínima em biofilme em *S. aureus* e espécies de Estafilococos coagulase-negativa - µg/ml

Organismos (n)	OXA			VAN			ERI			GEN			LIN			SXTR		
	N (%)	CBMB	N (%)	CBMB	N (%)	CBMB	N (%)	CBMB	N (%)	CBMB	N (%)	CBMB	N (%)	CBMB	N (%)	CBMB	N (%)	CBMB
<i>S. aureus</i> (14)	1 (7,1)	8	2 (14,2)	128	1 (7,1)	256	1 (7,1)	256	1 (7,1)	256	14(100)	>64	14(100)	>32/608				
	1 (7,1)	64	12 (85,7)	>128	13 (92,9)	>256	13 (92,9)	>256										
	1 (7,1)	128																
	2 (14,2)	256																
	9 (64,3)	>256																
<i>S. epidermidis</i> (13)	2 (15,4)	256	1 (7,7)	128	3 (23,1)	256	3 (23,0)	256	13 (100)	>64	1 (7,7)	32/608						
	11 (84,6)	>256	12 (92,3)	>128	10 (76,9)	>256	10 (77,0)	>256			12 (92,3)	>32/608						
<i>S. saprophyticus</i> (13)	1 (7,7)	128	1 (7,7)	128	3 (23,1)	256	9 (69,2)	256	13 (100)	>64	2 (15,4)	32/608						
	1 (7,7)	256	12 (92,3)	>128	10 (76,9)	>256	4 (30,8)	>256			11 (84,6)	>32/608						
	11 (84,6)	>256																
<i>S. haemolyticus</i> (3)	3 (100)	>256	1 (33,3)	128	1 (33,3)	256	1 (33,3)	256	3 (100)	>64	3 (100)	>32/608						
			2 (66,7)	>128	2 (66,7)	>256	2 (66,7)	>256										
<i>S. hominis</i> (1)	1 (100)	>256	1 (100)	>128	1 (100)	>256	1 (100)	>256	1 (100)	>64	1 (100)	>32/608						
	1 (33,3)	8	3 (100)	>128	1 (33,3)	256	1 (33,3)	256	1 (33,3)	64	3 (100)	>32/608						
<i>S. warneri</i> (3)	1 (33,3)	16			2 (66,7)	>256	2 (66,7)	>256	2 (66,7)	>64								
	1 (33,3)	32																
<i>S. lugdunensis</i> (2)	2 (100)	>256	2 (100)	>128	2 (100)	>256	2 (100)	256	2 (100)	>64	2 (100)	>32/608						

OXA: oxacilina; VAN: vancomicina; ERI: eritromicina; GEN: gentamicina; LIN: linezolida; SX-TR: sulfametoxazol-trimetoprim

## Discussão

A utilização de antibióticos na rotina para tratamento de infecções estafilocócicas geralmente consegue eliminar as células planctônicas, já as células presentes nos biofilmes conseguem se disseminar ainda quando o tratamento é interrompido, já que permanecem protegidas tanto da ação dos agentes antimicrobianos como do sistema imunológico do hospedeiro<sup>16</sup>. Este fenômeno se deve à presença de grande quantidade de produtos extracelulares, como polissacarídeos ou proteínas, além de uma adequada condição para crescimento e expressão de genes específicos para resistência<sup>17</sup>.

Uma das grandes preocupações na questão da resistência aos antimicrobianos de estafilococos está relacionada a *S. aureus* resistentes a oxacilina, pelo fato de geralmente serem resistentes a múltiplas drogas e devido o grande número de amostras encontradas. Salimnia e Brown<sup>18</sup>, por exemplo, estudaram 300 isolados de *S. aureus* e, destes, 59,3% foram resistentes a oxacilina, enquanto Hope et al<sup>17</sup>, estudando 1448 *S. aureus* associados a bacteremias, encontrou 42% de resistência à oxacilina, nenhum isolado apresentou resistência à vancomicina e 81,7% dos MRSA (*S. aureus* resistentes à meticilina) foram resistentes à eritromicina. Já em nosso estudo, com 14 amostras clínicas na forma planctônica, apenas 3 (21,4%) foram resistentes a oxacilina, 1 (2%) resistente intermediária a vancomicina, sendo esta também resistente a oxacilina, além de 42,8% resistentes à eritromicina, sendo sensíveis aos demais antibióticos testados. Estudos têm demonstrado que vancomicina e teicoplanina tiveram sua ação reduzida em *S. aureus*<sup>20, 21, 22</sup>. Entretanto, nossos dados foram semelhantes ao encontrado por Menegotto e Picoli<sup>23</sup> que estudaram amostras comunitárias de *S. aureus*, relatando resistência à oxacilina em 7,5% dos isolados, à eritromicina, 45%, e sensibilidade total à vancomicina. Em relação aos ECN, todas as amostras de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* foram resistentes a oxacilina (100%), além da maioria também ser resistente à eritromicina (77

e 100%, respectivamente), gentamicina (100 e 66,3%, respectivamente) e sulfametoxazol/trimetoprim (61,5 e 33,3%, respectivamente). Dados semelhantes aos nossos em relação à resistência a esses antimicrobianos nessas espécies foram encontrados em outros estudos<sup>23,24,25</sup>. *S. saprophyticus* também revelou uma significativa porcentagem de amostras resistentes a oxacilina (100%), além de 30,1% para eritromicina, 23,0% para gentamicina e 15,3% para sulfametoxazol/trimetoprim. Em relação à resistência a oxacilina, nossos resultados foram semelhantes ao encontrado por Ferreira et al.<sup>26</sup>, os autores relatam que a grande quantidade de isolados resistentes a oxacilina indica que o ponto de corte preconizado pelo CLSI possa superestimar a resistência à oxacilina em *S. saprophyticus*, sugerindo que modificações são necessárias para a correta detecção dessa resistência. Trabalhos com *S. saprophyticus* obtidos de urina revelaram 45% de amostras resistentes a oxacilina e 22,2% à eritromicina<sup>25</sup>. Também foi observada resistência à oxacilina no único *S. hominis* do presente estudo e em uma das três amostras de *S. warneri* que foi resistente à oxacilina. Os dois isolados de *S. lugdunensis* não mostraram resistência a nenhuma das drogas, resultados semelhantes aos descritos por Dundar et al.<sup>27</sup> e Frank et al.<sup>14</sup> que, pesquisando a sensibilidade de amostras planctônicas de *S. lugdunensis*, relataram sensibilidade total aos 10 antimicrobianos testados.

A presença do biofilme aumentou o MIC em duas, quatro, oito e até dezesseis vezes em relação às células planctônicas. Tal fenômeno se apresentou de forma mais frequente com a vancomicina e a eritromicina. O trabalho de Antunes et al.<sup>28</sup> encontrou o aumento de até 64 vezes no MIC de vancomicina em *S. epidermidis* e *S. aureus* forte-produtores de biofilme, e outras espécies, como *S. capitis* e *S. haemolyticus*, demonstraram menor variação nos MICs sem e com o biofilme. No presente estudo, isolados de *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri* e *S. lugdunensis*, não apresentaram muita variação nos MICs na presença de biofilme,

provavelmente porque essas espécies são fracas produtoras de biofilme<sup>29</sup> e pelo número restrito de isolados.

Diferentemente do observado pelo presente estudo, Frank et al.<sup>14</sup> encontraram resistência à linezolida e à vancomicina em *S. lugdunensis* na presença do biofilme. Neste estudo, apesar de o MIC ter aumentado sutilmente, na presença do biofilme, para essas drogas nos isolados de *S. lugdunensis*, eles permaneceram sensíveis à vancomicina e linezolida. *S. lugdunensis* é geralmente suscetível à maioria dos antimicrobianos, sendo que a produção de beta-lactamase é descrita em apenas 25% dos isolados, e a resistência à metilicina e a glicopeptídeos é incomum<sup>29</sup>. Essas observações demonstram que a produção de biofilme resulta em uma importante barreira que impede a difusão do antimicrobiano até as células bacterianas<sup>26</sup>.

Neste estudo foi determinado a concentração bactericida mínima para biofilme (CBMB) em *S. aureus* e 6 espécies de ECN. Foi constatado que a CBMB para oxacilina em *S. aureus* variou de 8µg/ml até >256µg/ml, enquanto para a maioria das amostras de *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* e *S. lugdunensis* a CBMB foi >256µg/ml, somente *S. warneri* revelou uma CBMB bem menor em relação as demais espécies para a oxacilina, variando de 8µg/ml a 32µg/ml. Em estudos realizados por Nabila et al.<sup>29</sup> a CBMB para amostras de *S. aureus* e *S. epidermidis* após serem desprendidas do biofilme e recuperadas em meio de cultura, semelhante aos procedimentos utilizados neste estudo, variou entre 8 e 16 vezes para as drogas vancomicina, eritromicina e gentamicina. Tanto em nossos estudos como os realizados por Nabila et al.<sup>29</sup> mesmo altas doses desses antibióticos não foram suficientes para eliminar *S. aureus* e *S. epidermidis* obtidos de biofilme. Também Sarginur et al.<sup>30</sup> testaram vários antibióticos em células planctônicas e em biofilme de *S. aureus* e *S. epidermidis*, revelando CBMB em células de biofilme semelhantes ao encontrados em nosso estudo com relação à oxacilina, vancomicina, eritromicina, gentamicina e linezolida.

Outro estudo semelhante a este, testando vários antibióticos para células planctônicas e biofilme de *S. lugdunensis* encontraram a CBMB para vancomicina e linezolida  $>128\mu\text{g/ml}$ , resultados similares aos obtidos nesse estudo com CBMB  $>128\mu\text{g/ml}$  e  $>64\mu\text{g/ml}$  para *S. lugdunensis*<sup>14</sup>. A maioria dos relatos encontrados na literatura sobre a resistência aos antimicrobianos em biofilme são sobre *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. lugdunensis*. O nosso estudo revelou que outras espécies menos estudadas, geralmente por não terem muitos relatos de infecções associadas a elas, como *S. haemolyticus*, *S. warneri* e *S. hominis* apresentaram uma CBMB muito alta em relação às drogas testadas, inclusive para vancomicina e linezolida as CBMB foram  $>128$  e  $>64 \mu\text{g/ml}$ , respectivamente, sugerindo que maior atenção deve ser dada a estas espécies de ECN, que também revelaram resistência aos antimicrobianos, principalmente quando em biofilme.

### **Conclusões**

A produção de biofilme é uma estratégia bem sucedida para a sobrevivência microbiana e para o estabelecimento da infecção. Como os mecanismos de defesa do hospedeiro e a resposta aos antimicrobianos são prejudicados com a presença de bactérias no biofilme, as infecções crônicas e sepses relacionadas a biofilme representam uma grande preocupação. Portanto, protocolos diferenciados para testar o perfil de resistência aos antimicrobianos devem ser incorporados na rotina dos laboratórios de microbiologia clínica para escolha do tratamento adequado.

## **Suporte Financeiro**

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Processo FAPESP nº **2011/07285-5** e Secretaria da Educação do estado de São Paulo através do programa Bolsa Mestrado/Doutorado.

## **Conflitos de Interesse**

Não existe conflito de interesse.

## Referências

1 Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2:95–108.

2 Cafiso V., Bertuccio T., Santagati M., Campanile F., Amicosante G., Perilli M.G., Selan L., Artini M., Nicoletti G., Stefani S. Presence of the *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. *Clin Microbiol Infect* 2004; **10**:1081-88.

3 Gotz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol* 2002; **43**:1367-78.

4 Otto M. Staphylococcal Infections: Mechanisms of Biofilm Maturation and Detachment as Critical Determinants of Pathogenicity. *Annu Rev Med* 2013; **64**:175-88.

5 Atshan SS, Shamsudin MN, Lung LT, Sekawi Z, Ghaznavi-Rad E, Pei CP. Comparative characterisation of genotypically different clones of MRSA in the production of biofilms. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 417247.

6 Antunes AL, Trentin DS, Bonfanti JW, Pinto CC, Perez LR, Macedo AJ, Barth AL. Application of a feasible method for determination of biofilm antimicrobial susceptibility in staphylococci. *APMIS* 2010; **118**:873–77.

7 Cargill JS, Upton M. Low concentration of vancomycin stimulate biofilm formation in some clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Pathol* 2010; **62** : 1112-6.

8 Koneman EW, et al; *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 5a ed. Philadelphia: JB Lippincott; 1997.

9 Cunha MLRS, Sinzato YK, Silveira LVA. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative staphylococci. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004;**99**:855-60.

**10** Couto I, Pereira S, Miragaia M, *et al.* Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by Internal Transcribed Spacer PCR. . *Clin Microbiol* 2001; **39**:3099–103.

**11** Christensen GD, Simpson WA, Yonger JJ, *et al.* Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 1985; **22**: 996-06.

**12** Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Approved Standard M100-S22*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2012.

**13** NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically—Sixth Edition: Approved Standard M7-A6*. NCCLS, Wayne, PA, USA, 2003.

**14** Frank KL, Reichert EJ, Piper K.E, *et al.* In Vitro Effects of Antimicrobial Agents on Planktonic and Biofilm Forms of *Staphylococcus lugdunensis* Clinical Isolates. *Antim Ag Chem* 2007; **51**:888-95.

**15** Moskowitz SM, Foster JM, Emerson J, *et al.* Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2004; **42**:1915-22.

**16** Wang X, Yao X, Zhu Z, *et al.* Effect of berberine on *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *Int J Antimicrob Agents* 2009; **34** : 60-6.

**17** Hope R, Livermore DM, Brick F, *et al.* Non-susceptibility trends among staphylococci from bacteraemias in the UK and Ireland on behalf of the BSAC Working Parties on Resistance Surveillance. *J A Chemotherapy* (2008) **62**: ii65–ii74.

**18** Salimnia H, Brown WJ. Detection of Oxacillin Resistance in *Staphylococcus aureus*: Comparison of Phoenix Oxacillin and Cefoxitin MICs, MicroScan Oxacillin MIC, Oxacillin and

Cefoxitin Disk Diffusion, and *mecA* Gene Detection. As presented at the Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) 2005.

**19** El-Feky MA, El-Rehewy MS, Hassan MA, *et al.* Effect of ciprofloxacin and N-acetylcysteine on bacterial adherence and biofilm formation on ureteral stent surfaces. *Pol J Microbiol* 2009; **58**:261-7.

**20** Kostenko V, Ceri H, Martinuzzi RJ. Increased tolerance of *Staphylococcus aureus* to vancomycin in viscous media. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; **51**: 277–88.

**21** Gaudio de Allori M C, Jure MA, Romero C, *et al.* Antimicrobial Resistance and Production of Biofilms in Clinical Isolates of Coagulase-Negative *Staphylococcus* Strains. *Biol Pharm Bul* 2006; **29**:1592-96.

**22** Surekha. Y. Asangi MJ, Sathyanarayan MS, *et al.* Speciation of clinically significant Coagulase Negative Staphylococci and their antibiotic resistant patterns in a tertiary care hospital. *Int J Biol Med Res* 2011; **2**:735-39.

**23** Menegotto FR, Picoli SU. Staphylococcus aureus oxacilina resistente (MRSA): Incidências de cepas adquiridas na comunidade e (CA-MRSA) e importância da pesquisa e descolonização em hospital. *RBAC* 2011; **39**: 147-150

**24** Singh S, Banerjee G. Simple method for speciation of clinically significant coagulase negative Staphylococci and its antibiotic sensitivity/resistant pattern in NICU of tertiary care centre. *Biomedical Research* 2008; **19**:97-101.

**25** Sarathbabu R, Rajkumari N, Ramani TV. Characterization of Coagulase negative Staphylococci isolated from urine, pus, sputum and blood samples. *Intern J Pharm S Inv* 2013; **2**:37-46.

**26** Ferreira AM, Bonesso MF, Mondelli AL, Camargo CH, Cunha MLRS. Oxacillin resistance and antimicrobial susceptibility profile of *Staphylococcus saprophyticus* and other *Staphylococci* isolated from patients with urinary tract infection. *Chemotherapy* 2012; **58**: 482-91.

**27** Dundar D, Tamer GS, Kasap M. Features of *Staphylococcus lugdunensis* isolated in western region of Turkey. *A J Microbiol Res* 2012; **6**:2999-04.

**28** Antunes ALS, Bonfanti JW, Perez LRR, Pinto CCF, *et al.* High vancomycin resistance among biofilms produced by *Staphylococcus* species isolated from central venous catheters. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011; **106**:3-5.

**29** Nabila A, El-Shekh, Amal MA, *et al.* In vitro Activity of some Antimicrobial Agents against Intact and Disrupted Biofilms of Staphylococci in the Indwelling Vascular Catheter Patients. *K W Applied Sciences J* 2010; **10**:108-120.

**30** Saginur R, Melissa ST, Ferris W, *et al.* Multiple Combination Bactericidal Testing of Staphylococcal Biofilms from Implant-Associated Infections. *Ant Ag Chemot* 2006; **50**: 55-61.

## CONCLUSÃO

- A comparação da estrutura do biofilme de *S. aureus* e estafilococos coagulase-negativa através da microscopia eletrônica de varredura revelou um biofilme bem estruturado cobrindo as células e revestindo quase a totalidade do cateter, entretanto na ausência da expressão do operon *ica* ou *icaA*, um biofilme menos estruturado com característica diferente sugere outros mecanismos para obter essa configuração.
- A maioria das amostras apresentou os genes do operon *ica*, sendo mais freqüentes em *S. aureus* e *S. epidermidis*, com maior freqüência do gene *icaA* em *S. aureus*.
- O RT-PCR mostrou uma diferente combinação da expressão dos genes nas diferentes espécies estudadas, sendo o gene *icaC* o mais expresso e pouca expressão do gene *icaA*.
- A produção de biofilme e expressão dos genes *ica* foi mais freqüente em *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*.
- *S. aureus* e ECN em biofilme mostraram um aumento considerável na CIM em relação às células planctônicas. Em relação à CBMB o estudo confirmou que mesmo altas concentrações de vancomicina não foram capazes de eliminar os biofilmes de *S. aureus* e espécies de ECN. Dos antimicrobianos testados a linezolida mostrou melhores resultados na inibição de estafilococos em biofilme, sem aumento do MIC quando comparado com células planctônicas e nenhuma amostra resistente.

■ Em todas as amostras de ECN os resultados revelaram inibição da formação de biofilme na presença de RIP, porém não interferiu na formação de biofilme de *S. aureus*. O peptídeo RIP se mostrou uma importante ferramenta que futuramente poderá ser utilizada na prevenção de infecções causadas por ECN relacionadas à produção do biofilme.

## ANEXOS



Universidade Estadual Paulista  
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.  
CEP: 18.618-970  
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143  
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br  
e-mail coordenadoria: tsardeni@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde  
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 14 de Fevereiro de 2011.

Of. 37/11-CEP

Ilustríssima Senhora  
Prof.ª. Dr.ª. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha  
Departamento de Micro/Imuno do  
Instituto de Biociências de Botucatu

Prezada Dr.ª. Maria de Lourdes,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que Projeto de Pesquisa (Protocolo CEP 3783-2011) Biofilme Estafilocócico: Prevenção, detecção da produção e determinação do perfil de resistência a antimicrobianos, a ser conduzido por Adilson de Oliveira, orientado por Vossa Senhoria, recebeu do relator parecer favorável aprovado em reunião de 14 de fevereiro de 2011.

Situação do Projeto: APROVADO. Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi  
Secretário do CEP